

Kunststoffmikrosysteme für biologische Anwendungen



Dissertation
der Fakultät für Geowissenschaften
der Ludwig-Maximilians-Universität

Vorgelegt von
Marc Hennemeyer

München, den 04.02.2009

Verteidigung: 08. Juli 2009

Gutachter: PD Dr. Robert W. Stark
Prof. Dr. Wolfgang Schmahl

KUNSTSTOFFMIKROSYSTEME FÜR BIOLOGISCHE ANWENDUNGEN

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	HINTERGRUND	3
3	MIKROFLUIDISCHE SYSTEME	9
3.1	UV-Lithographie	9
3.2	Bonding	12
3.3	Oberflächenstrukturierung auf der Nanometerskala	18
3.4	Oberflächenanpassung	22
3.5	Aktivierung von Blutplättchen in funktionalisierten Kanälen	42
3.6	Modellsystem für Stenosen	47
3.7	Blattfedersensoren zur Analyse von Flüssigkeiten und Suspensionen	49
4	RESÜMEE UND AUSBLICK	56
5	LITERATURVERZEICHNIS	58
6	VERÖFFENTLICHUNGEN	68
6.1	Acoustical force nanolithography of thin polymer films	70
6.2	Hydrophilisation of SU-8: Wet Chemical and Plasma Processes	77
6.3	Cell Proliferation Assay on Plasma Activated SU-8	111
6.4	Cantilever Microrheometer for the characterization of sugar solutions	116
6.5	Anhang: Growth of epitaxial Pr ₂ O ₃ layers on Si(1 1 1)	130
7	ANHANG	136
7.1	Protokolle	136
7.2	Spritzenpumpe, LabView Steuerung	143

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Oberflächenanpassung von Polymeren für mikrofluidische Kanal- und Sensorsysteme sowie mit der Erstellung und Anwendung dieser Systeme auf biologische Proben. Die Oberflächenstrukturierung und Funktionalisierung stellen wichtige Aspekte bei der Fabrikation funktionaler Mikrosysteme dar. Neben der Anpassung der Benetzungseigenschaften der Oberflächen auf spezielle Anwendungen ist die Funktionalisierung der Oberflächen mit Molekülen essentiell um mikrofluidische Systeme zu Reaktor- und Sensorsystemen auszubauen. Die Funktionalisierung der Oberflächen erstreckt sich hier von einfachen Metallbeschichtungen als Katalysatoren bis zu der im Rahmen dieser Arbeit vornehmlich untersuchten Beschichtung mit Proteinen als Vermittler von definierten Wechselwirkungen zwischen Zellen und Oberflächen.

Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang die lokale Proteinbeschichtung der Oberflächen, welche erlaubt zur gleichen Zeit die Wechselwirkungen zwischen einem Zelltyp und verschiedenen Substraten zu beobachten. Lokale Proteinbeschichtungen sind nicht nur im Bereich der Proteomik von entscheidender Bedeutung, wo sie die parallele Analyse von Proteinwechselwirkungen ermöglicht, sondern auch auf vielen Gebieten der Zellphysiologie. So wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Mikrokanalsysteme lokal mit Proteinen der extrazellulären Matrix (Kollagen, von-Willebrand-Faktor, Fibrinogen sowie Albumin) beschichtet und als Modellsystem für die Blutgerinnung in pathologisch veränderten Gefäßen zur Anwendung gebracht.

Eine besondere Herausforderung bei der Proteinbeschichtung von Mikrosystemen besteht darin die Oberflächen nicht nur mit den Proteinen zu beschichten, sondern zugleich die physiologische Funktion der Proteine über den gesamten Prozess der Systemintegration zu erhalten. Dies kann zum einen durch eine Anpassung der Integrationsprozesse erfolgen, so dass nach der Beschichtung der Oberflächen keine Prozesse mehr durchzuführen sind, die auf Proteine denaturierend wirken, oder, wie im folgenden eingeführt, durch die lokale Beschichtung der Oberflächen in den bereits vollständig integrierten Systemen.

Neben der Etablierung der photolithographischen Prozesse zur Erstellung von mikrofluidischen Systemen behandelt die Arbeit auch die nanoskalige Strukturierung der Oberflächen auf der Nanometerskala mittels der akustischen Kraftmikroskopie, eines speziellen Modus der rasterkraftmikroskopischen Manipulation. Durch die Einführung einer akustischen Anregung über die Probe anstelle der Anregung über den Federbalken des Kraftmikroskops wurde hier eine bessere Kontrollierbarkeit des Manipulationsprozesses erreicht.

Die lokale Veränderung der Oberflächeneigenschaften der für die Herstellung der Systeme verwendeten Materialien ist ein weiteres wichtiges Themengebiet. Besonderes Augenmerk wurde hier auf die Bearbeitung der Oberfläche des in der Mikrosystemtechnik breit eingesetzten Photolackes SU-8 sowie von Glasoberflächen gerichtet, da diese für biomedizinische Anwendung breite Verwendung finden. Dabei wurde nicht nur die physikalisch-chemische Veränderung des Materials untersucht, sondern auch die Auswirkungen der Materialveränderung auf seine Biokompatibilität analysiert. Der Untersuchung der Auswirkungen von Plasmabehandlung auf die behandelten Oberflächen kam dabei große Bedeutung zu, da die Plasmabehandlung ein wesentliches Verfahren für die Anpassung der Benetzbarkeit der Oberflächen ist, und somit auch als Vorbehandlung für die Beschichtung mit Proteinen zum Einsatz kommt.

Für die lokale Proteinbeschichtung selbst wurden zwei verschiedene Verfahren etabliert. Zum einen Mikrokontaktdruck für reversibel verschlossene Systeme, da der Mikrokontaktdruck zulässt, praktisch beliebige Strukturen auf die Oberfläche zu drucken und beim reversiblen verschließen der Systeme keine die Proteine denaturierenden Prozesse zum Einsatz kommen.

Zum anderen die lokale Abscheidung von Proteinen aus laminaren Strömungen für die Beschichtung bereits irreversibel verschlossener Mikrostrukturen. Hier wurde durch die Erstellung spezieller Kanalgeometrien die räumlich begrenzte Beschichtung von Mikrokanälen ermöglicht. Die proteinbeschichteten Kanäle wurden im Anschluss als Modellsysteme für die Untersuchung von Gerinnungsprozessen im menschlichen Gefäßsystem eingesetzt.

Abschließend wurden im Rahmen der Arbeit erstellte Sensorsysteme dazu verwendet die rheometrischen Eigenschaften von biologisch relevanten Flüssigkeiten zu bestimmen sowie die Anlagerung von Zellen an proteinfunktionalisierte Blattfedersensoren in physiologischer Umgebung nachzuweisen. Der Nachweis der Anlagerung von Zellen an die Blattfedersensoren stellt dabei einen ersten Schritt in Richtung paralleler Analyse der Adhäsionsdynamik von Zellen an verschiedene Proteine dar.

2 Hintergrund

Die Miniaturisierung elektronischer Schaltkreise war eine der Triebfedern der wirtschaftlichen und technologischen Entwicklung der vergangenen 50 Jahre. Durch die Integration elektronischer Schaltkreise auf Halbleiterchips wurden die heute üblichen Prozessoren und Speicherchips mit ihren Milliarden von Speicher- und Rechenschaltkreisen ermöglicht, die die massenhafte Verarbeitung von Daten erlauben. Nur hierdurch können heute hoch komplexe Berechnungen und Simulationen, wie sie beispielsweise bei der Ab-initio-Kalkulation von Molekülen in der physikalischen Chemie oder bei der Finite-Elemente-Simulation von Bauteilen in den Ingenieurwissenschaften erforderlich sind, nutzbar gemacht werden. Ein ähnlicher Nutzen wird auch von mechanischen und fluidischen Mikrosystemen erhofft, die seit nunmehr 20 Jahren einen wesentlichen Aspekt der Forschung auf dem Gebiet der Mikrosystemtechnik darstellen. Die Systeme sollen dabei durch Integration von Sensoren und Aktuatoren eine Brücke von der Elektronik zur Umwelt schlagen. Mikroelektromechanische Systeme (MEMS) sind bereits in einem Stadium angelangt, das ihre industrielle Verwendung ermöglicht. Sie finden in zahlreichen kommerziellen Produkten Anwendung, so beispielsweise als Beschleunigungssensoren in Airbagsystemen, als Druckköpfe in Tintenstrahldruckern oder, in Kombination mit optischen Bauteilen, als mikrooptische Systeme in Handykameras. In Zukunft sollen in der Entwicklung befindliche, schluckbare oder injizierbare, selbstangetriebene Kameras die medizinische Diagnostik revolutionieren (Kim 2001), mechanische Datenspeicher durch massive Parallelverarbeitung riesige Speicherdichten ermöglichen (Lutwyche 2000, Vettiger 2000) und mikroskopische Flüssigsysteme chemische und biologische Analysen vereinfachen und beschleunigen (Manz 1990, Wilding 1994, Burns 1998, Northrup 1998, Reyes 2002).

Ein weiteres wesentliches Anwendungsfeld stellt die Entwicklung künstlicher Nasen, d.h. chemischer Sensoren zum Nachweis kleinster Molekülkonzentrationen in Fluiden dar. Dabei werden mikroskopische Blattfedern auf ihrer Oberfläche beschichtet, sodass sie die zu detektierenden Moleküle spezifisch binden können. Die resultierende Massenveränderung kann dann durch Messung der dynamischen Eigenschaften der Blattfedern vermessen werden. Eine weitere Anwendung solcher Blattfedern bezieht sich auf die Analyse der rheometrischen Eigenschaften newtonscher Flüssigkeiten (Bergaud 2000, Boskovic 2002). Dieses Verfahren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in ein mikrofluidisches System integriert und als eine Anwendung für die Analyse von Zuckerlösungen eingesetzt. Zusätzlich wurde die Anwendbarkeit von Blattfedersensoren zur Detektion der Zelladhäsion in Flüssigkeiten untersucht.

Die Integration solcher Sensorsysteme in mikrofluidische Kanalsysteme ist ein wichtiger Schritt bei der Entwicklung sogenannter *micro total analysis systems* (μ TAS). μ TAS Systeme bestehen aus mehreren komplexen, auf einem Chip integrierten Mikrofluidikkomponenten, die nicht nur die Möglichkeit bieten chemische oder biologische Reaktionen auf Mikrometerskala ablaufen zu lassen, sondern zudem die Reaktion selbst sowie ihre Reaktionsprodukte *in situ* zu vermessen und zu analysieren. Ein besonderes Interesse an der Entwicklung solcher integrierten Messsysteme besteht in Hinblick auf biologische und medizinische Anwendungen. Hier können μ TAS-Systeme die Möglichkeit eröffnen die hoch komplexen Prozesse bei der Analyse der DNA und Proteinkooperation sowie bei der Untersuchung der Wechselwirkung von Zellen mit Oberflächen zu parallelisieren.

Generell enthalten μ TAS vier Bauteilgruppen. Im einzelnen sind dies Ventile zur Steuerung des Flusses, Mischer zur gezielten Vermengung verschiedener Flüssigkeiten, Reaktoren, in denen Flüssigkeiten unter definierten Bedingungen miteinander oder mit örtlich gebundenen Partnern reagieren können, sowie Analysatoren, die der Untersuchung der Flüssigkeiten dienen. Diese Baugruppen stellen entsprechend ihrer Funktionalität jeweils spezifische Anforderungen an die Beschaffenheit der Kanaloberflächen sowie an die Geometrie der Kanalsysteme und damit auch an die verwendete Prozesstechnik. Die technische Umsetzung dieser Anforderungen befindet sich zu großen Teilen noch im Anfangsstadium. Für die Kontrolle der Flüssigkeitsströme mittels Ventilen wurden bereits verschiedenste Lösungen, wie die Verwendung von mikroskopischen Bimetallstreifen oder mikropneumatischer Ventile in plastischen Polymeren untersucht (Shoji 1994, Hosokawa 2000, Go 2004).

Auf der Mikrometerskala stellte die Mischung von Flüssigkeiten für lange Zeit ein großes Problem dar. Aufgrund des strikt laminaren Verhaltens der Flüssigkeiten in mikroskopischen Kanälen ist ein turbulentes Mischen, wie es aus makroskopischen Experimenten bekannt ist, nicht möglich. Andererseits sind die Abmessungen der meisten mikrofluidischen Systeme aber noch zu groß, um die diffusive Mischung von Flüssigkeiten effektiv zu nutzen. Daher wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Geometrien untersucht, die den Mischprozess über die rein diffusive Mischung hinaus beschleunigen sollen. Die in der Literatur beschriebenen Systeme reichen von passiven Methoden, die mit Hilfe von geometrischen Strukturen ein Strecken und Stauchen der Lagen in der Flüssigkeit bewirken und dadurch eine Beschleunigung der Durchmischung erreichen (Wang 2002), über die Strukturierung der Kanaloberfläche, die eine Schichtung der Flüssigkeit in Lagen bewirkt (Stroock 2002, Stroock 2004, Yang 2004), bis hin zu aktiven Systemen, die durch Luftblasen (Garstecki 2005), extern gesteuerte Partikel (Mensing 2004) oder mittels akustischer Oberflächenwellen im

Mikrosystem Verwirbelungen (Wixforth 2004) erzwingen sollen. Durch die vorgestellten Systeme konnte die Zeit zur Mischung von Flüssigkeiten auf bis zu ein hundertstel im Vergleich zu einer einfachen Diffusionsstrecke reduziert werden.

Im Vergleich zu den Mischern stellen Reaktoren nur moderate Anforderungen an die Geometrie der Systeme. Es genügen meist einfache Verbreiterungen der Kanäle um den Flüssigkeiten eine große Fläche für mögliche Reaktionen mit an der Oberfläche gebundenen Partnern zu bieten. Demgegenüber besteht aber die Notwendigkeit die Temperatur zu regeln und somit chemischen Reaktionen die erforderliche Aktivierungsenergie zuzuführen sowie Einfluss auf ihre Reaktionsgeschwindigkeit nehmen zu können (Ehrfeld 1998, Eijkel 1998, Ehrfeld 2000, L'Hostis 2000). Insbesondere biochemische Anwendungen, wie die Polymerase Kettenreaktion, die der Molekularbiologie erst die Analyse des genetischen Materials ermöglichte, benötigen exakt definierte Temperaturverläufe (Wilding 1994, Cheng 1996, Woolley 1996).

Auch Analytik-Systeme haben in der Regel nur geringe Anforderungen an die Geometrie der Kanäle selbst. Insbesondere optische Sensoren erfordern lediglich ausreichende Flächen um die zu analysierenden Substanzen zu beleuchten und das resultierende Signal auszulesen (Kamholz 1999, Orth 2003, Ribeiro 2005, Wu 2005) genauso wie Elektroden für elektrische Messungen (Ayliffe 1999). Größerer Aufwand ist für die Integration mechanischer Sensoren wie mikroskopischer Blattfedern aufzuwenden, insbesondere wenn die Sensoren direkt im Rahmen der Lithographie in ein Mikrosystem integriert werden sollen.

Solche auf Blattfedern basierende Sensoren entwickelten sich aus der Rasterkraftmikroskopie. Die theoretische Basis für die Verwendung der auch Cantilever genannten Blattfedern als Sensoren legten Arbeiten über die dynamischen Vorgänge bei der Blattfederbewegung in Fluiden (Sader 1998, Aimé 1999) und über den Einfluss externer Anregungen auf die Blattfedern (Xu 2007). Die verschiedenen Ansätze Blattfedern als Sensoren zu verwenden wurden kürzlich zusammenfassend beschrieben (Ziegler 2004). Dort wurden auch maßgeschneiderte Systeme mit integrierten elektronischen Komponenten beschrieben (Franks 2002), spezielle verkleinerte Blattfedern für spektroskopische Anwendungen (Viani 1999), Blattfederarrays (Battiston 2001) sowie erste Ansätze für polymerbeschichtete Blattfedern (Betts 2000) und Vollpolymerblattfedern (Calleja 2003). Neben der Entwicklung der Systeme und ihrer vorgenannten Komponenten stellt die Anpassung der Oberflächen eine Kernanforderung bei der Entwicklung von Mikrosystemen dar. Außer Silizium und Glas kommen beim Aufbau von Mikrosystemen auch Polymere, wie Polyacrylate (PMMA) oder Epoxide, zum Einsatz, die alle unterschiedliche Oberflächeneigenschaften aufweisen. Diese müssen für die verschiedenen Anwendungen angepasst werden.

Ein Ziel der Oberflächenanpassung ist die Verbesserung der Benetzbarkeit. Während Glas bereits im natürlichen Zustand eine gute Benetzbarkeit aufweist, sind Silizium und insbesondere die Kunststoffe, die in der Mikrosystemtechnik zum Einsatz kommen, wesentlich abweisender gegenüber Wasser. Durch die kleinen Abmessungen der Mikrosysteme und das daraus resultierende große Oberflächen-Volumen-Verhältnis spielen Oberflächeneffekte eine wesentlich größere Rolle als in makroskopischen Systemen. Deshalb ist eine Anpassung der Benetzbarkeit der Kunststoffe unumgänglich, um eine vollständige Befüllung der Mikrosysteme zu gewährleisten. Zahlreiche Studien haben sich mit diesen Anpassungen beschäftigt und für verschiedene Materialien nass- und trockenchemische Verfahren dafür etabliert (Toth 1994, France 1998, Hillborg 2000, Hegemann 2003, Zhang 2005). Auch für SU-8, einen Photolack der 1997 von IBM speziell für die photolithographische Herstellung chemisch hochstabiler Mikrostrukturen vorgestellt wurde, wurden dazu Studien veröffentlicht, eine vergleichende Bewertung der unterschiedlichen Methoden hinsichtlich Wirksamkeit und Auswirkung auf die Morphologie der Oberflächen stand aber bisher noch aus (Nordström 2004, Wang 2006, Walther 2007).

Neben der einfachen Anpassung der Benetzbarkeit ist die Funktionalisierung von Oberflächen mit örtlich gebundenen Reagenzien und Katalysatoren von entscheidender Bedeutung bei der Entwicklung von Mikroreaktoren und -sensoren, insbesondere für biochemische Analysesysteme (Chabinyk 2001, Orth 2003). Durch die lokale Beschichtung von Oberflächen mit Proteinen oder DNA-Abschnitten werden Sensorsysteme ermöglicht, die hochgradig parallel die genetischen Bestandteile einer Testflüssigkeit auswerten können (Bernard 2000, MacBeath 2000, Delehanty 2003). Sie stellt daher einen Schlüsselschritt bei der Entwicklung von DNA-Analysechips dar. Daneben kann die Oberflächen-funktionalisierung zudem die Verwendung von Mikrosystemen für zellbiologische Versuche ermöglichen. Durch die Beschichtung mit verschiedenen Proteinen können die Mikrosysteme für die gleichzeitige Untersuchung der Zellreaktion auf verschiedene äußere Reize verwendet werden. Die Reaktion der Zellen auf verschiedene Oberflächen ist nicht nur in physiologischen Prozessen im Körper wesentlich, sondern auch ein wichtiger Faktor der Biokompatibilität von Implantaten. Während für den Ablauf physiologischer Prozesse im menschlichen Körper die Zell-Protein-Wechselwirkung lebensnotwendig ist, kann eine mangelnde Biokompatibilität von Implantaten auf Grund unerwünschter Zellanlagerung beispielsweise zu lebensgefährlichen Thrombosen führen.

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Mikrosysteme für die Untersuchung von Zellen und ihres Verhaltens in Gegenwart von Proteinen vorgeschlagen (Strand 2004). Die Arbeiten folgten dabei im Wesentlichen zwei Richtungen, der Beschichtung von Oberflächen mit Proteinen auf der einen Seite

(Vörös 07) sowie der Bereitstellung von Konzentrationsgradienten in Kulturlösungen auf der anderen (Jarnagin 2000, Kirk 2004).

Zur strukturierten Beschichtung von Oberflächen mit Proteinen existieren neben der Strukturierung mit Hilfe von Mikrodüsen (MacBeath 2000, Delehanty 2003), wie es aus dem Tintenstrahldruck bekannt ist, vor allem Mikrokontaktdruckverfahren zur Übertragung von Strukturen auf Oberflächen. Hierfür werden die gewünschten Strukturen mit Hilfe photolithographischer Techniken von Stempelmastern abgeformt. Nachdem die Stempel mit den entsprechenden Proteinlösungen getränkt wurden, können die Strukturen dann durch einfaches Aufdrücken auf die Oberfläche auf diese übertragen werden. Ein wesentlicher Nachteil dieser Verfahren, besonders im Hinblick auf die Verwendung in geschlossenen mikrofluidischen Systemen, besteht darin, dass der Druckvorgang vor dem Verschließen der Kanäle durchgeführt werden muss. Da in der Regel der Verschluss der Kanäle irreversibel unter Verwendung von chemischen oder physikalischen Verbindungsverfahren durchgeführt wird, kann eine Denaturierung der Proteine nicht ausgeschlossen werden. Daher ist eine Methode zur Beschichtung der Kanalwände erst nach dem Verschließen der Systeme wünschenswert.

Prozesse zur lokalen, lateral strukturierten Beschichtung von Oberflächen im geschlossenen System wurden unter anderem im Patent von Vörös *et al.* (2007) beschrieben. Durch das kreuzweise Anordnen von mikrofluidischen Kanälen ermöglichen solche Verfahren beispielsweise die Erstellung von Proteinarrays. Werden senkrecht zu den, in parallelen Linien aufgebracht, Proteinen verschiedene Antikörper zugegeben, entsteht hierbei eine Matrix von Bindungspartnern, wodurch in einem einzigen Versuchsdurchlauf die Effektivität vieler Protein-Antikörper-Kombinationen getestet werden kann.

Diese Verfahren fanden bisher vor allem in der strukturierten Beschichtung offener Oberflächen Verwendung und werden als wohletablierte Verfahren in der Proteomik angewendet. Für die Funktionalisierung mikrofluidischer Systeme wurden dagegen bislang nur wenige Verfahren etabliert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher mikrometerskalige Flusssysteme mit speziell adaptierten Geometrien entwickelt und Verfahren getestet, um diese Systeme für verschiedene Anwendungen im Rahmen zellbiologischer und medizinischer Fragestellungen zu verwenden.

Während in heutigen Versuchsanordnungen in der Regel jeweils nur die Antwort der in der Probe enthaltenen Zellen auf ein einzelnes Protein erfassbar ist, weist die vorliegende Arbeit einen Weg, in räumlich benachbarten Gebieten Zellen unterschiedliche Merkmale zu präsentieren. Somit kann die unterschiedliche Reaktion der Zellen auf gegebene Reize direkt verglichen werden, ohne veränderte Ausgangsbedingungen durch unterschiedliche Versuchsbedingungen

zu riskieren. In der vorliegenden Dissertation wurde dieses Verfahren auf die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens menschlicher Blutplättchen an verschiedene Oberflächen angewendet. Die hierbei verwendeten Oberflächen umfassen zum einen den in der Herstellung der Systeme verwendeten SU-8, sowohl in unbehandelter als auch oberflächenmodifizierter Form, um dessen Bio- und Hemokompatibilität abzuklären, zum anderen Proteine aus der extrazellulären Matrix – Kollagen, Albumin und von-Willebrand-Faktor (vWF) – die bei der Blutgerinnung eine tragende Rolle spielen.

Basierend auf den vorgenannten Problemstellungen behandelte die vorliegende Dissertation drei Bereiche, die Etablierung von Standardverfahren zur Herstellung von mikrofluidischen Kanalsystemen, die Funktionalisierung der Oberflächen dieser Systeme zur Vorbereitung spezieller Analysen sowie den Nachweis der Anwendbarkeit der erstellten Systeme auf ausgewählte Probleme aus dem biologischen und medizinischen Umfeld.

3 Mikrofluidische Systeme

3.1 UV-Lithographie

Die UV-Lithographie ist ein Standardverfahren der Halbleiter- und Mikrosystemtechnik. Das Verfahren basiert auf der Übertragung zweidimensionaler Strukturen von Masken auf photoempfindliche Polymere. Dabei werden die zur Übertragung verwendeten Masken, die in der Regel aus Chromstrukturen auf gläsernen Substraten bestehen, meist durch serielle Prozesse hergestellt. Am häufigsten werden hierzu rasternde Lasersysteme verwendet, wobei die erreichbaren Auflösungen durch die Wellenlänge der Laserlichtquelle beschränkt sind. Für höchste Auflösungen, wie sie bei der Erzeugung von Masken für die Extrem-UV-Lithographie mit Wellenlängen zwischen 10 und 50 nm benötigt werden, existieren Belichtungsanlagen, die mit fokussierten Elektronenstrahlen arbeiten. Für die vergleichsweise niedrigen lateralen Auflösungen bei der Erstellung von mikrofluidischen Systemen, mit ihren Abmessungen von mehreren 10 bis zu einigen 100 μm , ist jedoch die Belichtung mit einem Laser-Scanning-System ausreichend.

Die Prozesse zur Erstellung der Kanalsysteme mussten zunächst in der Arbeitsgruppe neu etabliert werden, sodass ein wesentlicher Teil der Arbeit darauf verwendet wurde, die lithographischen Prozesse zu optimieren und Prozesse zur Verbindung mehrerer Lackschichten einzurichten. Für die Lithographie wurden unterschiedliche Fotolacke verwendet und diese auf ihre Tauglichkeit bezüglich der Verwendung in mikrofluidischen Systemen überprüft. Zunächst wurde die Herstellung der Strukturen mit Novolak-basierten Lacken untersucht. Die Lacke gehören zur Klasse der Positivresiste und sind je nach Ausführung als Lacke für die Erstellung dicker Schichten bis zu 80 μm in einzelnen Beschichtungsschritten etabliert. Bei der Belichtung von Positivphotolacken wird die Struktur eines Moleküls im Lack durch die einfallende Strahlung chemisch verändert. Im Falle der meisten Novolak-basierten Lacke zerfällt hierbei das Additiv Naphtochinondiazid in Indencarbonsäure, die wiederum in Basen gut löslich ist (Schuster 1991). Da auch die Löslichkeit des gesamten Novolak in basischen Lösungen durch dieses Additiv um mehrere Größenordnungen verändert wird, erhält man damit einen sehr wirkungsvollen Positivlack.

Da in der Halbleitertechnik Standardprozesse für die Verarbeitung der Lacke vorhanden sind, konnten mit den Novolak-basierten Lacken schnell Kanalstrukturen mit Kanalbreiten von 100 μm und Kanaldicken von 10 bis 50 μm erstellt werden. Die Auflösung mikroskaliger Strukturen bei der Strukturübertragung durch Schattenwurf, wie im Falle der UV-Lithographie mittels Masken, ist durch Beugungseffekte begrenzt. Die minimale Strukturgröße b , die abbildungstreu erzeugt werden kann und damit die maximal erreichbare

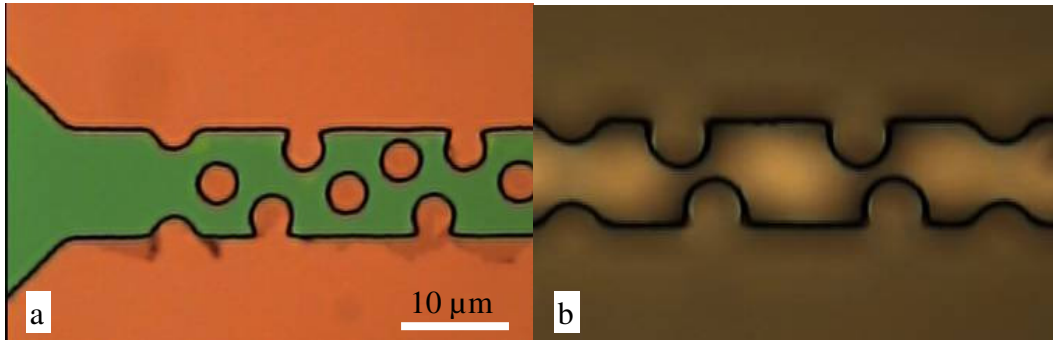


Abbildung 1: optische Mikroskopiebilder von Kanälen mit Turbulatoren, strukturiert in ma-P 100 mit 10 µm (a) bzw. 50 µm (b) Schichtdicke. Die Kanalbreite beträgt 10 µm. Im dicken Lack sind die freistehenden Turbulatoren in der Kanalmitte nicht mehr sichtbar.

Auflösung, hängt dabei sowohl von der verwendeten Wellenlänge des Lichtes als auch von der Dicke des belichteten Lackes ab und kann durch die Formel

$$b = 1,5\sqrt{\lambda \cdot \frac{d}{2}} \quad (1)$$

abgeschätzt werden. Hier bezeichnen λ die Wellenlänge des Lichtes und d den Abstand zwischen den Oberflächen von Maske und Substrat. Bei einer Lackdicke von 10 µm ergibt sich daraus eine theoretisch erreichbare Auflösung von etwa 2,2 µm, bei 50 µm Lackdicke eine Auflösung von etwa 4,4 µm. Die Auflösungen die nach Optimierung der Prozesse standardmäßig erreicht wurden bewegten sich in der Nähe dieser theoretischen Werte.

Abbildung 1 zeigt einen 10 µm Kanal mit integrierten Turbulatoren – prozessiert in 10 µm (links) bzw. 50 µm (rechts) dickem Lack. Die Kanalbreite ist durch geringfügige Überbelichtung und Überentwicklung um ca. 4% erhöht, die Größe der Turbulatoren im selben Maße erniedrigt. Im Bild 1 b) ist zu erkennen, dass die Turbulatoren, die in der Kanalmitte angesiedelt wären, durch die beschränkte Auflösung nicht mehr im Lack strukturiert werden konnten. Generell war bei dicken Schichten eine funktionsfähige Abbildung der Strukturen in den 10 µm Kanälen auf Grund der Auflösungsbeschränkung nicht möglich. Die Kanäle wurden mit gegossenen PDMS Deckeln reversibel verschlossen und mit Flüssigkeiten perfundiert. Hauptnachteil der Strukturierung mittels Lacken auf Novolakbasis war die schlechte Beständigkeit gegenüber Lösungsmitteln. Bereits nach weniger als einer Minute ergaben sich in Durchflusseexperimenten mit Wasser-Ethanolmischungen so starke Materialabtragungen, dass die Systeme undicht wurden. Zudem sind Novolak-Fotolacke ungeeignet für die Erstellung mehrlageriger Systeme, wie sie für 3D Strukturen benötigt werden.

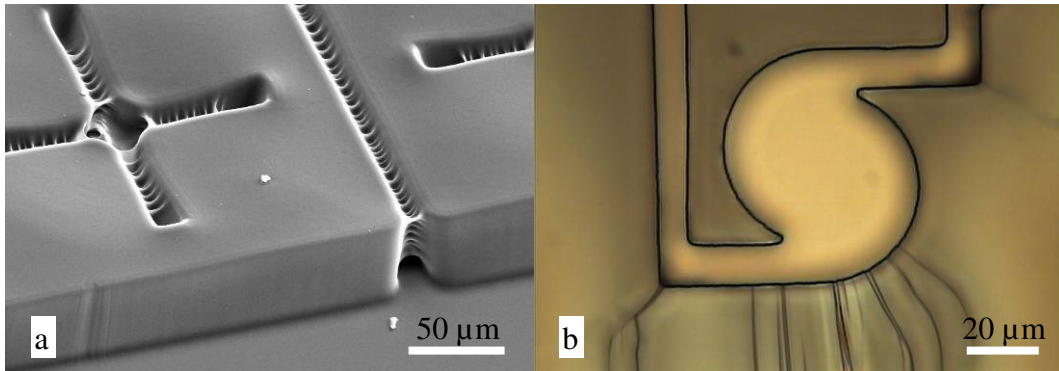


Abbildung 2: a) REM Bild eines typischen *t-toppings*; Auf Grund kurzweiliger UV-Strahlung wird oberflächennaher Lack zu früh ausgehärtet. b) optisches Bild einer Struktur in SU-8 mit von der Kante ausgehenden Spannungsbrüchen.

Daher wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Herstellung der Flusssysteme auf Prozesse mit dem aus Epoxiden bestehenden Negativlack SU-8 umgestellt (Shaw 02). Im Gegensatz zum Positivprozess wird beim Negativprozess durch den Lichteinfall nicht die Löslichkeit der Lacke erhöht, sondern eine Quervernetzung der im Lack enthaltenen Moleküle verursacht. Durch diese Quervernetzung erreicht der Negativprozess mechanisch sehr belastbare Strukturen (Bilenberg 2006). Da zudem bei SU-8 der Prozess der Quervernetzung durch die Lichteinstrahlung nur initiiert wird, die weitere chemische Reaktion aber unter Wärmezufuhr stattfindet, besitzt SU-8 auch einen sehr hohen optischen Kontrast, der besonders große Aspektverhältnisse zwischen Strukturbreite und -höhe erlaubt (Lorenz 1997). SU-8 hat sich bei den Negativlacken zu einem der Standardlacke für hochfeste mechanische Teile entwickelt (Lin 2002, Seidemann 2002, Carlier 2004). Auf Grund seiner chemischen Struktur mit acht Epoxy-Gruppen pro Molekül bietet der Lack nach der Aushärtung eine besonders große mechanische und chemische Stabilität und ist auch durch nasschemische Verfahren kaum angreifbar (del Campo 2007).

Nachteil des SU-8 ist die komplizierte Prozesstechnik die der Lack erfordert um eine gute Adhäsion auf dem Trägermaterial und eine hohe Auflösung zu erreichen (Zhang 2001). Im Unterschied zu den vorher besprochenen Novolak-Lacken benötigt SU-8 zwei zusätzliche Backprozesse um nach der Belichtung auszuhärten. Die exakten Prozessparameter beeinflussen dabei die mechanischen Eigenschaften des gehärteten Lackes wesentlich. Abbildung 2 zeigt typische Artefakte wie sie durch nicht optimal angepasste Prozessparameter bewirkt werden.

Die Verwendung eines zu breiten Wellenlängenbereiches bei der Belichtung kann *t-topping* bewirken. Dieses übermäßige Vernetzen von Photolack an der Oberfläche wird durch die starke Absorption von UV-Licht unter 365 nm im SU-8 bedingt. Die vorzeitige Vernetzung an der Oberfläche bewirkt, dass der Lack

während der Entwicklung nicht vollständig aus den freizulegenden Strukturen herausgelöst werden kann.

Zu schnelle Temperaturwechsel erzeugen durch ungleichmäßige thermische Dehnung Spannungsrisse im Material. Durch langsamere Temperaturwechsel sowie die Vermeidung großer zusammenhängender Lackareale können solche Störungen vermieden werden. Eine Aufstellung der während der Arbeit optimierten Prozesse für die Verarbeitung dicker SU-8 Schichten befindet sich im Anhang.

3.2 Bonding

Um dreidimensionale Systeme zu ermöglichen, bieten sich verschiedene Methoden der Strukturierung an, die kürzlich in einem ausführlichen Review zusammen gefasst wurden (Abgrall 2007). Kurz dargestellt lassen sich die Prozesse in vier Methoden einteilen, die jeweils entweder auf dem Auffüllen von Leerräumen, der Maskierung der vorhergehenden Schichten, auf Lamination oder auf lokalisierter Quervernetzung des verwendeten Polymers beruhen. Abbildung 3 stellt die verschiedenen Verfahren schematisch dar. Nach dem, allen Verfahren gemeinsamen, Aufschleudern und Aushärten der ersten Schicht, trennt sich die Zweiphotonenpolymerisation (2PP) von den Schichtverfahren. Bei den Schichtverfahren – Füllung, Maskierung und Lamination – folgt nach dem Aufbringen der ersten Schicht die Strukturierung in Standardprozesstechnik. Nach Aushärtung der Schicht werden abhängig vom Prozess entweder die nicht ausgehärteten Bereiche mit einer Maske abgedeckt (Maskierung) oder die Schicht zunächst entwickelt. Im letzteren Falle werden vor dem Aufbringen der zweiten Schicht entweder die Leerräume mit einem leicht löslichen Füllmaterial aufgefüllt (Füllung) oder die zweite Lage wird zunächst auf einem separaten Substrat bis zum Softbake prozessiert und dann in einem Flip-Chip Prozess auf die bereits bestehenden Strukturen aufgebracht (Laminierung). Nach dem Belichten und Entwickeln der nun aufgebrachten Schicht kann das Verfahren beliebig oft wiederholt werden und dadurch ein System aus vielen Schichten aufgebaut werden. Im Gegensatz zu den echten Schichtverfahren wird bei der 2PP unmittelbar eine dicke Schicht Photolack auf das Substrat aufgebracht und die 3D-Struktur direkt in den Photolack geschrieben. Anstelle der Belichtung des Lackes durch Maskenlithographie erfolgt hier also eine Quervernetzung durch einen Laser. Die Wellenlänge des Lasers liegt dabei weit über derjenigen, die zur Vernetzung des Polymers nötig ist. Durch Fokussierung des Lasers im Inneren des Polymers treten dort allerdings nichtlineare Effekte auf, die im Fokus zu einem Zwei-Photoneneffekt führen und so genügend Energie für die Vernetzung der Polymermoleküle bereitstellen. Nach dem Abrastern des gesamten Polymervolumens folgt auch hier die Entwicklung des Photolackes auf nasschemischem Wege.

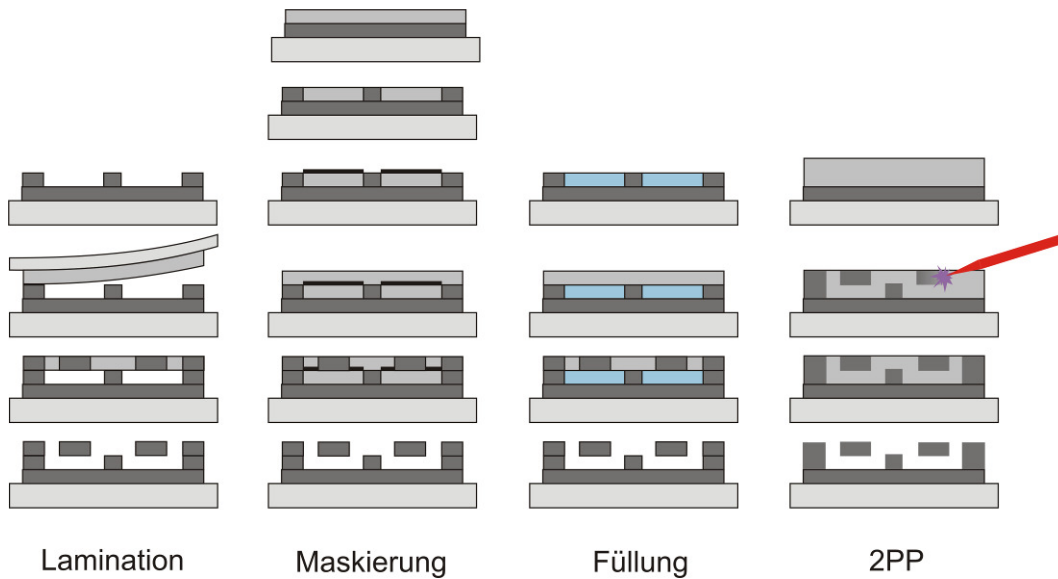


Abbildung 3: Schema der unterschiedlichen Prozesse zur Erstellung mehrschichtiger Mikrosysteme mit Polymeren.

Alle aufgeführten Verfahren haben spezielle Vor- und Nachteile. Am leichtesten realisierbar sind der Füll- sowie der Maskierungsprozess, da hierbei nur Techniken zum Einsatz kommen die im Rahmen der Lithographie bereits etabliert sind. Jedoch können hierbei prinzipiell keine verschlossenen Hohlräume erzeugt werden, da der lösliche Lack nach der Aushärtung aus den nicht belichteten Bereichen entfernt werden müsste, von der Entwicklungsflüssigkeit aber nicht erreicht werden kann.

Zudem erfordert die Maskierung eine Bedampfung der Lackoberfläche mit Metall, die einen zusätzlichen Prozessschritt bedeutet und nicht immer wünschenswert ist, da die Durchsichtigkeit des Materials lokal aufgehoben wird. Auch mit der 2PP können keine geschlossenen Hohlräume erzeugt werden, da der im Hohlraum vorhandene Lack nicht herausgelöst werden kann. Zudem ist die 2PP als serielles Verfahren im Vergleich zu den anderen Techniken wesentlich langsamer und ist wegen der benötigten leistungsstarken Laser auch deutlich teurer. Sie bietet aber die Möglichkeit nahezu beliebige Strukturen zu erzeugen. Mittels Laminierung können hingegen auch abgeschlossene Hohlräume erzeugt werden, da bereits vor dem Aufbringen der nächsten Lage alle löslichen Lackreste durch die Entwicklung entfernt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurden aufgrund der Einschränkungen bei der Maskierung und Füllung, sowie dem hohen Aufwand für die Einrichtung eines 2PP Systems die benötigten Mehrschichtsysteme auf Basis der Laminierung hergestellt.

Für die Verbindung mehrerer Lackschichten wurden in der Literatur bereits verschiedene Verfahren vorgeschlagen. Im Wesentlichen unterscheiden sich die Verfahren in der Verwendung eines Haftmittels. Mehrere Artikel diskutieren die Verwendung unterschiedlicher Materialien als Verbindungsschicht (L'Hostis 2000,

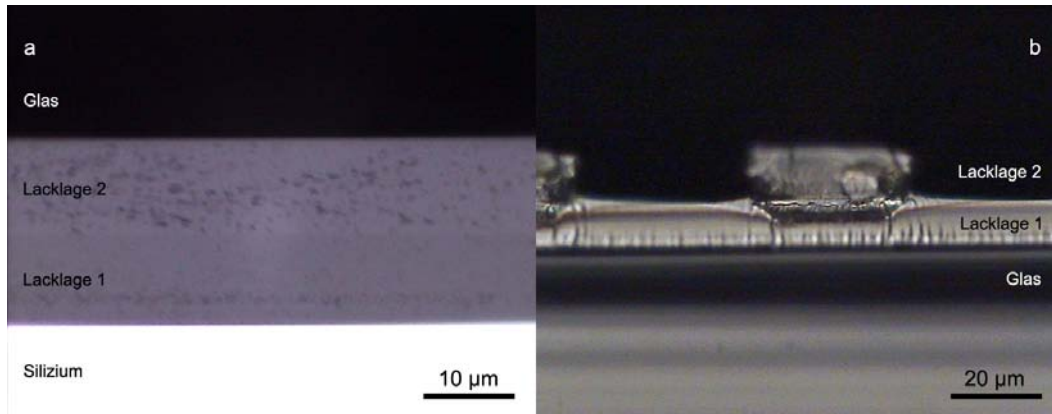


Abbildung 4: optische Mikroskopiebilder. a) Bruchfläche eines Stapels aus fest auf halbfest verbundenen Wafern mit je 10 µm Lack. Die Trennlinie zwischen den beiden Lagen ist nur durch die leicht unterschiedliche Absorption der beiden Lagen erkennbar. Zwischen den beiden Lagen sind keinerlei Einschlüsse erkennbar. b) Bruchfläche im Bereich von Mikrokanälen. Lacklage 1 ist die unstrukturierte erste Lage, auf die die zweite Lacklage aufgebondet und strukturiert wurde. Der die zweite Schicht tragende Wafer ist bereits abgelöst.

West 2002, Bilenberg 2004), wobei teilweise ausschließlich kapillare Kräfte für die Verteilung eines Klebers über die zu verbindenden Flächen verwendet wurden (Lin 2002). Da jedoch die Verwendung von Klebstoffen die Gefahr beinhaltet, dass feine Strukturen durch einfließenden Kleber verstopft werden, wurde für die Verbindung der SU-8 Schichten in dieser Arbeit darauf verzichtet. Die Verbindung erfolgte ausschließlich mit Hilfe des prozessierten Fotolackes.

Zur Verbindung der SU-8 Schichten ohne Haftvermittler bestehen die Möglichkeiten die Verbindung vor oder nach der Quervernetzung des Photolackes herbeizuführen. Bereits quervernetzter SU-8 erfordert zur Verbindung verhältnismäßig große Andruckkräfte und Temperaturen. Blanco *et al.* (2004) schlugen einen Prozess vor, bei dem die zu verbindenden Schichten unter einem Druck von 300 kPa für 20 Minuten bei 100 °C verbunden werden.

Tabelle 1: die verschiedenen SU-8 Bondingtypen und ihre Einschränkungen bezüglich der Prozessverlässlichkeit, wie sie während der Arbeit auftraten. Verschluss bezeichnet die Neigung beim Bonden Hohlräume zu verschließen, gebondete Fläche bezieht sich auf den Anteil der tatsächlich verbundenen Flächen, Zuverlässigkeit auf die Anfälligkeit des Prozesses gegenüber Veränderungen der Parameter.

	Lin	Blanco	Jackman
Bondingtyp	Kleber	fest auf fest	halbfest auf fest
Verschluss	-	+	o
Gebondete Fläche	+	-	+
Zuverlässigkeit	o	o	+

Wichtige Voraussetzung für die Verbindung mit Hilfe dieses Protokolls ist die nicht abgeschlossene Polymerisation der zu verbindenden Schichten, die nur schwer zu kontrollieren ist. Obwohl die Methode ein etabliertes Verfahren für die Verbindung von SU-8 Schichten ist, konnte sie im Rahmen der Arbeit nicht zuverlässig durchgeführt werden. Es kam regelmäßig zu keiner oder nur geringfügiger Verbindung der Schichten miteinander. Der Grund für die mangelhafte Verbindung ist vor allem beim fehlenden Bonder zu suchen. Die im Rahmen der Arbeit hergestellte Low-Cost-Lösung aus einer Kombination von Heizplatte und handbetriebener Presse konnte die hohen benötigten Temperaturen an der Verbindungsschicht nicht erreichen. Als alternative Verbindungstechnik wurden daher Versuche mit nicht quervernetztem Photolack durchgeführt. Das Verfahren orientierte sich dabei an einem Protokoll, das bereits in einer früheren Arbeit veröffentlicht wurde (Jackman 2001, Li 2003). Nach der Strukturierung der SU-8 Schicht auf dem ersten Wafer wurde ein zweiter, durchsichtiger Wafer aus Kalknatriumglas oder Pyrex® mit einer Opferschicht beschichtet und danach eine Schicht SU-8 auf aufgeschleudert und einem Softbake unterzogen. Nach dem Softbake wurden die beiden Wafer im Maskaligner zueinander ausgerichtet, unter Vakuum aufeinander gefügt und bei einer Temperatur von 65°C zusammengefügt. Anschließend erfolgte die Belichtung. Durch die Verbindung der Wafer bei erhöhter Temperatur ergab sich nach der Verbindung eine Durchbiegung der Wafer (Warpage) von etwa 0,8 mm über den vollen Waferdurchmesser. Die Verbiegung der Wafer ist auf die unterschiedlichen thermischen Ausdehnungskoeffizienten von Kalknatron-Glas und Silizium zurückzuführen und könnte durch die Verwendung von Borofloat-Glas® nahezu vollständig verhindert werden. Da die Durchbiegung für die Erstellung der Systeme dieser Arbeit keine wesentlichen Nachteile erbrachte wurde jedoch darauf verzichtet.

Tabelle 2: mittlere Schälwiderstände, gebondete Flächenanteile, Anteil der Wafer bei denen die Schichten zerstörungsfrei getrennt werden konnten und Anzahl der Partikel pro Wafer wie sie bei optimaler Parameterwahl für die verschiedenen Bondingtechniken gemessen wurden. γ ist der Schälwiderstand, a_{bond} der Flächenanteil auf der optisch eine Verbindung zwischen den Lagen festgestellt wurde, n_s der Anteil der verbundenen Lagen die ohne Beschädigung wieder getrennt werden konnten und N die mittlere Partikeldichte auf der Oberfläche.

	γ	a_{bond}	n_s	N 1/cm ²
SU-8 Fest-fest	0	0,14 ± 0,22	1	0,05
SU-8 Fest-halbfest Vollflächig	4 J/m ²	0,67 ± 0,04	0	0,06
SU-8 Fest-halbfest Strukturiert	2 J/m ²	1 ± 0	0,1	0,002
PDMS	-	0,98 ± 0,02	0,18	0,8

Nach der Belichtung wurde der Waferstapel einem PEB unterzogen und der Glaswafer vom Stapel abgelöst. Anschließend erfolgte die Entwicklung der zweiten SU-8-Schicht. Um Güte und Stärke der Verbindung zu testen wurden sowohl der Anteil der tatsächlich verbundenen Fläche durch optische Inspektion vermessen, als auch Spaltversuche der verbundenen Wafer durchgeführt. Für die Spaltversuche wird zwischen die beiden verbundenen Wafer eine dünne Klinge eingeschoben, die die beiden Wafer auseinander drängt. Durch die entstehenden Kräfte wird die Verbindung zwischen den beiden Wafern soweit gelöst, bis sich zwischen den adhäsiven Kräften in der Verbindungsschicht und den separierenden Kräften durch die Spannungen in den Wafern ein Gleichgewicht einstellt. Aus der Klingendicke, dem Abstand zwischen Klinge und Separationsgrenze sowie den mechanischen Eigenschaften der Wafer kann dann die Verbindungsstärke γ berechnet werden.

$$\gamma = \frac{d_k^2 E_1 d_1^3 E_2 d_2^3}{16 L^4 (E_1 d_1^3 + E_2 d_2^3)}. \quad (2)$$

Hier bezeichnen $E_{1/2}$ und $d_{1/2}$ jeweils den Youngschen Modulus und die Dicke des Wafers 1 bzw. 2, d_k die Dicke der Klinge und L den Abstand zwischen Klingleite und Abrissfront.

Die Ergebnisse der Spaltversuche und Flächenvermessungen für die unterschiedlichen verwendeten Bondingmethoden sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Schälwiderstände vollflächiger Wafer, die mit Spaltversuchen ausgemessen wurden, lagen im Mittel bei etwa 4 J/m^2 und damit etwa 10 mal höher als bereits in einer älteren Arbeit veröffentlicht (Li 2003). Diese erhebliche Erhöhung der Bondstärke ist auf zwei Ursachen zurückzuführen. Um einen auf die Evakuierung des Zwischenraumes zwischen den Wafern vor dem eigentlichen Bonding, die eventuelle Lufteinschlüsse reduziert, zum anderen auf den im Vergleich zur älteren Veröffentlichung wesentlich kürzeren Softbake, der einen höheren Anteil an Lösungsmittel im Lack belässt und dadurch die Verbindung der noch nicht vollständig polymerisierten Lackschichten unterstützt. Der scheinbar niedrigere Schälwiderstand bei strukturierten Wafern ist auf die durch die Strukturierung verkleinerte Kontaktfläche zwischen den Wafern zurückzuführen.

Abbildung 5 a zeigt zwei gebondete SU-8 Schichten auf einem Siliziumwafer nach einem Spaltversuch. In weiten Bereichen ist es zu einem Ablösen des SU-8 entlang der Kontaktfläche zum Wafer gekommen. Demgegenüber ist die Terrasse im Vordergrund, in deren Bereich die Verbindung zwischen den beiden SU-8 Schichten gelöst wurde, auf eine kleine Fläche begrenzt. Die Bruchfläche senkrecht zur Wafer- und SU-8 Oberfläche zeigt keinerlei Trennlinie zwischen den SU-8-Schichten. Die lamellaren Strukturen, die im optischen und elektronenmikroskopischen Bild erkennbar sind, sind Brüche, die sich von der Lackoberfläche aus durch den Lack ziehen. Die Brüche kommen durch die großen

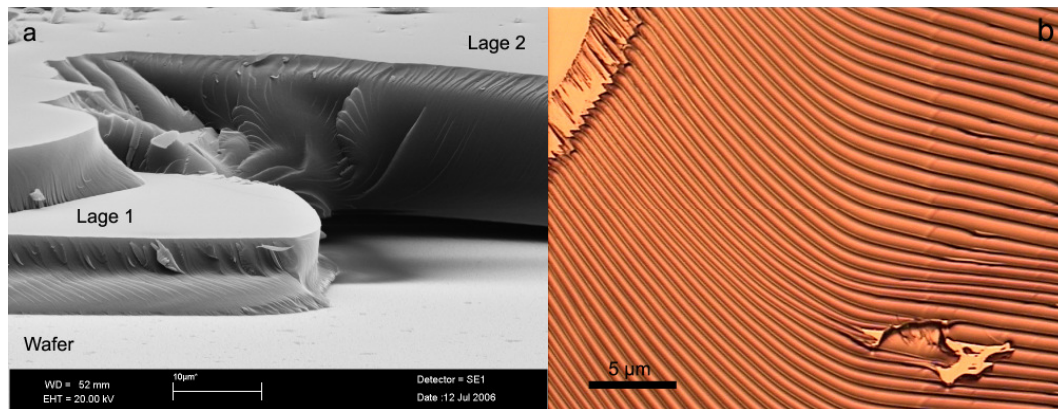


Abbildung 5: a) REM Aufnahme an der Bruchstelle eines Spaltversuchs zwischen zwei SU-8 Schichten. Im Vordergrund ist ein Bereich erkennbar, in dem die zweite Lage von der ersten getrennt wurde. Im Hintergrund verläuft die Bruchfläche ohne Übergang durch beide Lagen, die untere Lage beginnt sich vom Wafer zu lösen. b) optisches Mikroskopiebild der lamellaren Strukturen wie sie auch im REM Bild auf der Bruchkante zu sehen sind.

Kräfte zustande, die während des Spaltversuchs auftraten, so dass das SU-8 Material selbst zersplittert. Diese Befunde bestätigen die hohe Festigkeit der Verbindung die durch das halbfest auf fest Verfahren erreicht werden konnte.

Die optische Inspektion der Bondflächen zeigte eine Abhängigkeit des Anteils der verbundenen Fläche von der Topographie der Oberfläche. Bei vollflächigem Bonden unstrukturierter Wafer konnten keine Ergebnisse erzielt werden, bei denen mehr als 75 % der Waferoberfläche miteinander verbunden waren. Dies ist vor allem durch die Reinraumklasse sowie die große Härte des SU-8 begründet. Bereits bei einer Unebenheit auf der Waferoberfläche von weniger als 10 µm ergaben sich große kreisförmige Areale (bis zu 1,5 cm Durchmesser) in denen während des Bondens kein Kontakt zwischen den Wafern hergestellt werden konnte. Solche Unebenheiten können sowohl durch Partikel, als auch durch Lackverwerfungen erzeugt werden. Im Mittel wiesen die verarbeiteten Wafer 0,06 Partikel pro Quadratzentimeter auf.

Demgegenüber war bei der Verbindung strukturierter Wafer auch die vollständige Verbindung der zu Verfügung stehenden Bondingfläche möglich. Durch die Strukturierung sank die mittlere Anzahl von störenden Unebenheiten auf weniger als 0,002 Partikel pro Quadratzentimeter.

Neben der Verbindung von SU-8 Schichten musste auch ein Verfahren zur Verbindung von PDMS Schichten mit PDMS sowie Glas etabliert werden. Ein zuverlässiges Verfahren dafür stellt die sauerstoffplasmaunterstützte Verbindung dar. Um die Parameter des Verfahrens, bei dem sowohl die Glas- als auch die PDMS-Oberfläche mit Sauerstoffplasma aktiviert werden und nach dem Zusammenfügen ausgeheizt werden, an die speziellen Erfordernisse der vorhandenen Geräte und zu erstellenden Systeme anzupassen, wurden eine Reihe von Parametern untersucht, darunter die Dosis der Plasmaaktivierung, die

Temperatur des Ausheizprozesses, sowie der Einfluss der beim Bonding wirkenden Kraft. Die Bewertung des Bondingergebnisses musste beim PDMS ausschließlich über die verbundene Fläche erfolgen, da die Dicke und hohe Elastizität der PDMS Schichten einen Einsatz der Spalttechnik verhinderte. Während die Temperatur beim Ausheizen nur einen geringen Einfluss auf das Bondingergebnis hatte, sobald eine Mindesttemperatur von 160°C überschritten war, war der Einfluss der Aktivierungsdosis weniger sprunghaft. Der Anteil der irreversibel verbundenen Fläche erreichte hier einen Maximalwert von etwa 95% bei 1 Minute Plasmadauer und 50 W Leistung und fiel bei höheren Dosen schnell ab. Bei Aktivierungszeiten über 5 Minuten veränderte sich die Oberfläche des PDMS derart, dass keine Verbindung zu PDMS oder Glas mehr hergestellt werden konnte. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in einer früheren Studie veröffentlicht, wobei ein direkter Vergleich der benötigten Leistung und Aktivierungsdauer auf Grund der unterschiedlichen verwendeten Geräte nicht möglich ist (Jo 2000). Für die beim Bonding wirkende Kraft konnte im Rahmen der durchgeführten Versuche kein wesentlicher Einfluss auf die Verbindungsqualität festgestellt werden. Die hohe Anzahl an Teilchen auf den PDMS Oberflächen ist dadurch begründet, dass die Bondingversuche nicht unter Reinraumbedingungen durchgeführt wurden. Aufgrund der großen Elastizität des PDMS wird das Bondingergebnis dadurch aber nicht wesentlich beeinträchtigt.

3.3 Oberflächenstrukturierung auf der Nanometerskala

Für die Mikrostrukturierung existieren verschiedene Verfahren, die teilweise bereits in industrielle Herstellungsprozesse integriert sind, sich zum anderen Teil aber noch in der wissenschaftlichen Entwicklung befinden. Während die Prozessierung von Oberflächen auf der Skala von wenigen μm bis hinab zu weniger als 100 nm mit Hilfe lithographischer Verfahren bereits weit fortgeschritten ist und bei der Herstellung integrierter Schaltkreise im industriellen Umfeld zu Einsatz kommt, sind Verfahren für die Herstellung kleinster Strukturen noch Thema wissenschaftlicher Forschung.

Hier wurden von verschiedenen Gruppen unterschiedliche Techniken zur Manipulation von Oberflächen mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM, *atomic force microscope*) vorgeschlagen, die vor kurzem in einem Übersichtsartikel miteinander verglichen wurden (Tseng 2005). Der Vorteil der rasterkraftmikroskopischen Manipulation, im Vergleich zu optischen oder elektronenmikroskopischen Verfahren, ist die Möglichkeit auch nicht leitende Materialien zu strukturieren (Fotiadis 2002).

Auflösungsbegrenzungen resultieren hierbei einzig aus den Abmessungen der verwendeten Sonde sowie aus der Kontrollierbarkeit des Manipulationsprozesses

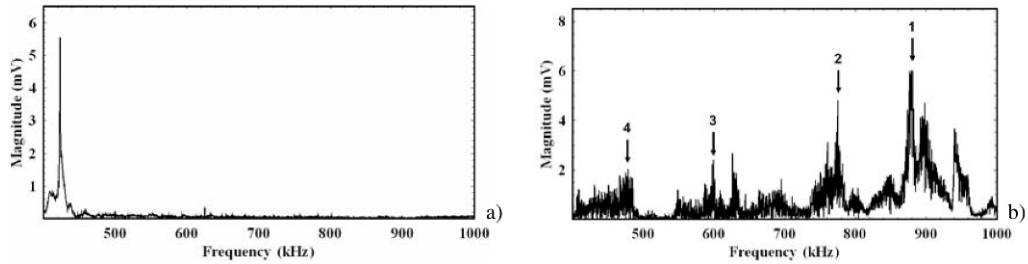


Abbildung 6: Veränderung des Resonanzspektrums beim Übergang von der freien zur substratgekoppelten Schwingung [entnommen aus Manuskript 1, F.J. Rubio-Sierra et al., *phys.stat.sol.(a)*, 203, 1481-1486, ©2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim].

selbst. Eine Reihe von Arbeiten der vergangenen Jahre behandelte den Einfluss verschiedener Parameter auf die Mikromanipulation, wie die Härte der Sondenspitze (Rank 1997), die Auflagekraft (Gnecco 2002) und den Zustand des Probenmaterials (Stark 1998).

Nachteil der Arbeiten auf Basis quasistatischer Manipulation, d.h. der Manipulation durch einfaches Aufpressen der Abtastnadel des AFM, sind die großen lateralen Kräfte, die bei der Manipulation auftreten und unvorhersagbare Bewegungen der Sonde verursachen können, die wiederum die Genauigkeit der Strukturierung einschränken. Daher wurden in den vergangenen Jahren insbesondere dynamische Verfahren untersucht, bei denen die Manipulationssonde zusätzlich zur lateralen Bewegung einer kleinen Oszillation senkrecht zu Probenoberfläche unterworfen wurden um so Lateralkräfte zu reduzieren. Um die Genauigkeit dieser Methode weiter steigern zu können, müsste die Bewegung der Sonde jedoch exakt vorhersagbar sein. Eine solche Vorhersage ist aber, auf Grund der Transfercharakteristik der Blattfeder und des antreibenden Piezokristalls im AFM, kaum umsetzbar.

Ein besser geeigneter Ansatz beruht auf der Anregung der Blattfeder über die Einkopplung akustischer Schwingungen von Seiten der Probe, da hierbei die Anregung direkt an der Messspitze erfolgt und die Fortpflanzung der Anregungswelle durch die Blattfeder keine Rolle spielt. Im Rahmen des Manuskriptes 1 wurde eine solche Anregung mit Hilfe eines akustischen Signalgebers unter der Probe realisiert und der Einfluss der wesentlichen Parameter wie Anregungsamplitude, -frequenz und Vorspannkraft untersucht.

Die Versuche wurden mit einem kommerziellen Rasterkraftmikroskop (Nanoscope Dimension) durchgeführt, welches hierfür um einen akustischen Signalgeber auf der Probenhalterung erweitert wurde. Als Proben kamen mit einem Novolak-basiertem Photolack beschichtete, 1 cm^2 große Silizium-Plättchen zur Anwendung. Mit diesem Aufbau konnte die Eignung des Manipulationssystems für die Strukturierung von Fotolacken auf Nanometerskala und somit deren möglichen Einsatz zur Oberflächenmodifikation mikrofluidischer Systeme unmittelbar beurteilt werden.

Sowohl die Manipulation als auch die Bildgebung vor und nach der Strukturierung der Oberflächen wurde mit harten Blattfedern (40 N/m) durchgeführt, um eine ausreichende Steifigkeit für die Bearbeitung zu gewährleisten. Ausschließlich während der Bearbeitung der Oberfläche wurde über den Signalgeber eine sinusförmige Schwingung in die Probe eingekoppelt. Zur Abbildung der Oberfläche wurde das Rasterkraftmikroskop im allgemein bekannten Tappingmodus betrieben.

Zur Untersuchung des Einflusses der Wechselwirkung zwischen Probenoberfläche und Messsonde auf das Schwingungsverhalten der Blattfeder, wurden Untersuchungen an frei schwingenden sowie an oberflächengekoppelten Federn durchgeführt. Das untersuchte Frequenzband erstreckte sich von ca. 400 kHz bis 1 MHz, da in diesem Frequenzbereich Resonanzen der Blattfeder zu erwarten war. Abbildung 6 zeigt das Resonanzspektrum bei 2 μm Abstand von der Probe und somit frei schwingender Blattfeder (a) sowie bei Kopplung zwischen Probe und Sonde (b). Solange die Blattfeder frei schwingen konnte war im untersuchten Frequenzbereich nur ein Peak bei 423,4 kHz zu beobachten. Durch die Kopplung der Sonde mit der Oberfläche veränderte sich das Spektrum. Es waren nun mehrere Peaks identifizierbar, die in erheblich verstärktes Rauschen eingebettet waren. Das Ergebnis verdeutlicht zudem die Abhängigkeit der Schwingungsamplitude des gekoppelten Systems von der Anregungsfrequenz.

Neben der Untersuchung des Einflusses der Anregungsmagnitude, der Schwingungsamplitude sowie der Vorspannkraft der Blattfeder auf die Schnitttiefe, die in Manuskript 1 nachgelesen werden können, zeigten die Ergebnisse der Studie auch eine mit der Amplitude zunehmende Anhäufung von Material an den Schnittkanten. Diese Ablagerung des Materials aus den erzeugten Schnitten wurde bereits in frühen Arbeiten zur quasistatischen Nanomanipulation berichtet (Hamada 1992, Jin 1992) und von Capella (2002a und 2002b) auch in zwei Arbeiten zur *dynamic plowing lithography* in Poly(methylmethacrylat) untersucht. Wie in diesen Arbeiten dargestellt, bewirkt die bei der Manipulation auf die Probe einwirkende Kraft entweder eine elastische (reversible) Deformation des Polymers oder eine viskoplastische (irreversible) Verformung. Während elastische Verformungen bei kleinen Kräften eine Rolle spielen, ist der vorherrschende Effekt bei der Manipulation die viskoplastische Verformung. Diese plastischen Verformungen führen bei der quasistatischen Lithographie meist zu einer Verschiebung des Materials vom Gebiet der erzeugten Linie in deren Randbereich. Demgegenüber bewirkt die dynamische Manipulation zusätzlich einen Volumenzuwachs des versetzten Materials. Für diesen Volumenzuwachs wurden in den oben genannten Arbeiten drei Ursachen diskutiert, nämlich ein Einlagern von Luft in das Material, die Reaktion des Polymers mit Wassermolekülen sowie ein Entfalten der Polymermoleküle während der Manipulation und eine daraus

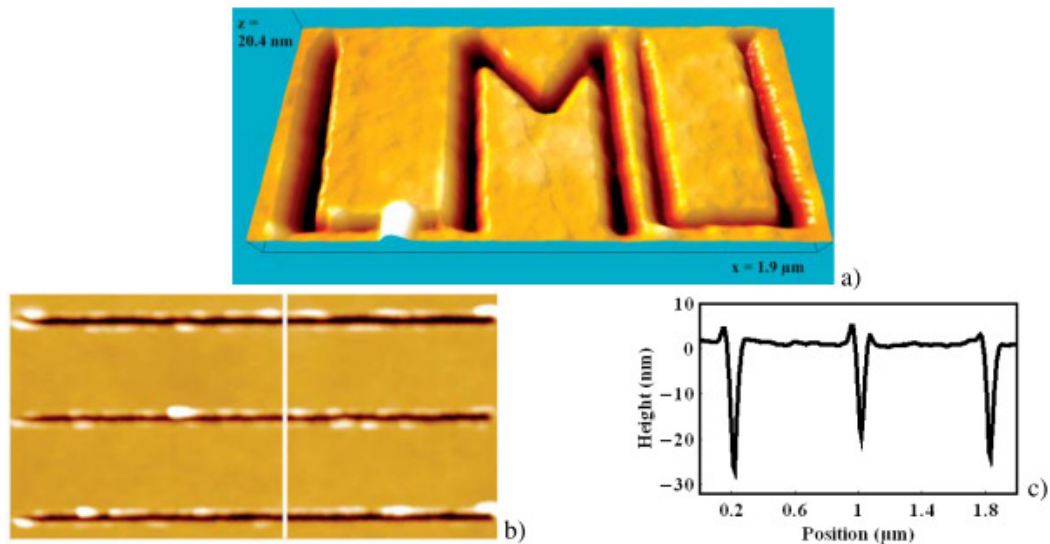


Abbildung 7: Nanostrukturen in Polymer erzeugt mit akustischer Lithographie. Die Breite der Linien beträgt weniger als 100 nm [aus Manuskript 1, F.J. Rubio-Sierra et al., *phys.stat.sol.(a)*,203,1481-1486 © 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim].

resultierende geringere Materialdichte. Die mit der akustischen Kraftlithographie durchgeführten Manipulationen zeigten bei allen Amplituden nur einen geringen Seitenwall, der auch bei Berücksichtigung der Messunsicherheit durch den Einfluss der Messspitze auf den Abbildungsprozess keinesfalls die großen Volumenvergrößerungen erreicht, wie sie bei der normalen *dynamic plowing lithography* beobachtbar sind.

Die Messunsicherheit ist hauptsächlich durch die systematischen Fehler bei der kraftmikroskopischen Abbildung einer Oberfläche bedingt. Durch die Form der Messspitze wird das Bild der Oberfläche verändert. Dieser Einfluss ist bei der Abbildung von Strukturen, die mit derselben Sonde geformt wurden, besonders gravierend (Capella 2002b). Um dennoch zu verlässlichen Aussagen über die Strukturbreiten zu gelangen, wurde diese sogenannte Konvolution bei der Auswertung berechnet, wie bereits in früheren Publikationen vorgeschlagen worden war (Villarubia 1997, Stark 2003). Somit wurde die sonst unterschätzte Strukturbreite der erzeugten Linien bzw. die überschätzte Breite der Randwälle weitgehend korrigiert.

Die Resultate der Untersuchung der verschiedenen Parameter belegen die Eignung der akustischen Anregung für die Mikrolithographie. Insbesondere die Ergebnisse des Volumenvergleichs zwischen Gräben und Randwällen erlauben den Schluss, dass die akustische Anregung Vorzüge gegenüber der normalen, dynamischen Lithographie bietet. Diese erzeugt große Seitenwälle, die bei großen Anregungsamplituden ein Mehrfaches des Volumens der freigelegten Gräben erreichen kann. Demgegenüber entstehen bei der akustischen Lithographie auch bei großen Anregungsamplituden nur vergleichsweise kleine Seitenwälle. In Abbildung 7 sind Nanostrukturen abgebildet, die mit Hilfe der akustischen

Lithographie in Photolack strukturiert wurden. Die Breite der Linien beträgt weniger als 100 nm auf halber Schnitttiefe und ist am Schnittboden, der die relevante Strukturgröße für eventuell folgende Prozessschritte darstellt, nur wenige 10 nm breit.

Die akustische Lithographie erlaubt eine feine Abstimmung der die Manipulation beeinflussenden Parameter Amplitude, Frequenz und Vorspannkraft. Sie bietet dadurch die Möglichkeit einer exakten und reproduzierbaren Manipulation der Oberfläche. Trotz der guten Ergebnisse der Studie zur akustischen Lithographie wurde das Verfahren letzten Endes nicht standardmäßig in die Erstellung der Kanalsysteme integriert, da zum einen eine so hohe Auflösung für die im Weiteren durchgeführten Anwendungen nicht erforderlich war, zum Anderen, da das Verfahren auf Grund seines seriellen Charakters wesentlich zeitaufwendiger ist, als die bereits eingeführten photolithographischen Prozesse.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Moritz wurden im Rahmen der rasterkraftmikroskopischen Arbeiten auch Versuche zur Abbildung epitaktischen Wachstums von Praseodymoxid auf Silizium (111) Oberflächen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie sind im Anhang, Manuskript 5, nachlesbar.

3.4 Oberflächenanpassung

Neben der Strukturierung der Photolacke zur Erstellung der Kanalgeometrien ist die Abstimmung der Oberflächeneigenschaften der, für die Erstellung der Mikrosysteme verwendeten, Materialien ein wichtiger Schritt bei der Herstellung der Mikrosysteme. Schon bei der Befüllung der Mikrokanäle können die Oberflächeneigenschaften der Kanalwände eine entscheidende Rolle spielen. So kann durch eine gute Benetzbarkeit der Oberflächen die Entstehung von Luftblasen beim Einleiten von Flüssigkeiten reduziert werden, da durch die bessere Benetzbarkeit die Wahrscheinlichkeit für das Verweilen von Luft an den Kanalwänden reduziert wird. So konnten in einer Studie 600 μm große Kammern in einem mikrofluidischen System aus SU-8 nicht durch Kapillardruck befüllt werden, solange das Material seine typische schlechte Benetzbarkeit aufwies. Erst durch die Verbesserung der Benetzbarkeit mittels nasschemischer Methoden vermochte der Kapillardruck die Kammern zu füllen (Nordström 2004).

Eine Reihe weiterer Arbeiten hat sich bereits mit der maßgeschneiderten Anpassung der Oberflächeneigenschaften von verschiedenen Polymeren befasst, um so unterschiedliche Zwecke wie die verringerte Adhäsion von Partikeln auf Oberflächen, gesteigerte Benetzbarkeit (Hillborg 2004, Tseng 2004), kovalente Bindung von Molekülen auf der Oberfläche (Schmalenberg 2004, Marie 2006)

sowie verbesserte biologische Kompatibilität zu erzielen (Hattori 1985, van Wachem 1987, Webb 1998).

3.4.1 Plasmabehandlung zur Anpassung der Benetzbarkeit

Neben der schon angesprochenen nasschemischen Methoden zur Veränderung der Oberflächenchemie wurde in den Studien auch die Anwendung von verschiedenen Plasmen zur Funktionalisierung polymerer Oberflächen vorgeschlagen. Mehrere Studien berichten über die Behandlung von PDMS mit Sauerstoff- und Argonplasmen sowie über die Anwendung von UV-Ozon Plasma (Hegemann 2003, Hillborg 2004, Olah 2005).

Durch den Energieübertrag, der vor allem durch die im Plasma enthaltenen Ionen und Elektronen vermittelt wird, werden die Polymere an ihrer Oberfläche chemisch verändert. Die randständigen Methylgruppen des PDMS werden durch die auftreffenden Ionen vom Molekül abgespalten und durch freie Sauerstoffatome ersetzt. Abbildung 8 zeigt wie die erzeugten CO-Gruppen dann mit Wasserstoffatomen aus dem Polymer oder der Luft Silanolgruppen bilden, über die in der weiteren Folge andere Moleküle kovalent gebunden werden können (McDonald 2000). Durch den Austausch der nichtpolaren Alkylgruppen durch polare Hydroxylgruppen wird zudem die Benetzbarkeit der Oberfläche erhöht.

Bei SU-8 bewirkt die Einwirkung sowohl von Argon- und Sauerstoffplasma (Zhang 2005, Walther 2007) als auch die nasschemische Ätzung mit Cerium-Ammonium-Nitrat (CAN) eine Verstärkung der Benetzbarkeit. Alle Prozesse wirken oxidierend an den Kohlenstoffverbindungen im SU-8 Molekül. Hierbei werden C-C und C-H Bindungen aufgetrennt und die freiwerdenden Bindungen werden bei Luftkontakt durch Sauerstoffatome und OH-Gruppen besetzt (Zhang 2005). Im SU-8 gibt es für diese Prozesse zwei hauptsächliche Angriffspunkte; zum einen Epoxidringe an der Polymeroberfläche, die während der Quervernetzung durch die aus dem Photoinitiatorsalz entstehende Säure nicht aufgeschlossen wurden, zum anderen Methylgruppen an den Molekülflanken, wie in Abbildung 9 zu erkennen ist.

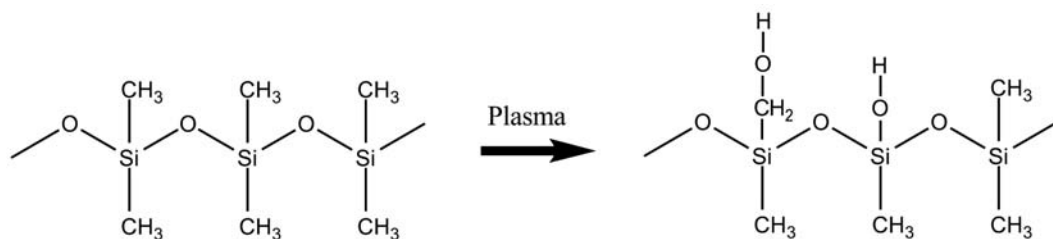


Abbildung 8: mögliche Veränderungen des Poly(dimethyl)siloxan unter dem Einfluss von sauerstoffhaltigem Plasma. Nach Abspaltung einer Methylgruppe oder eines H-Atoms lagert sich eine OH Gruppe an die freigewordene Bindungsstelle an.

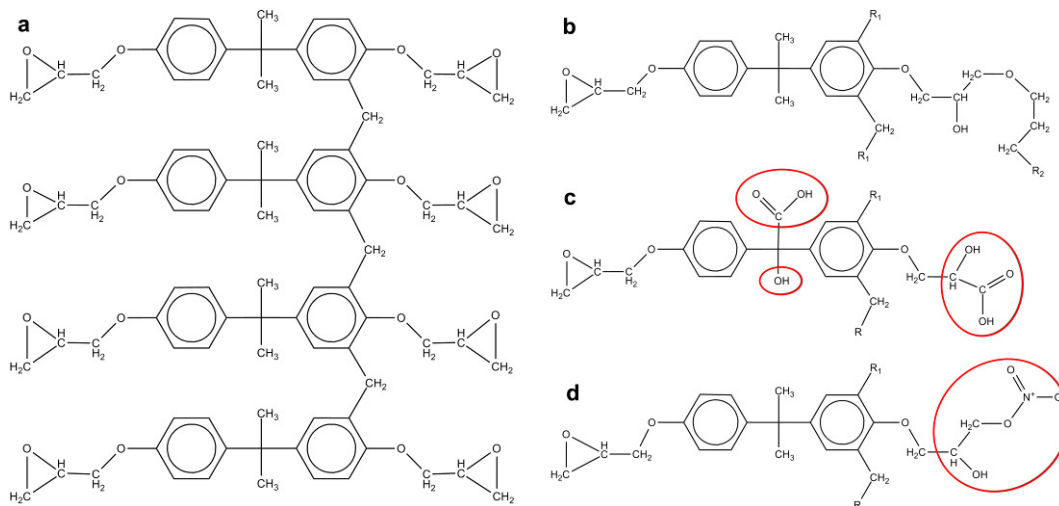


Abbildung 9: Strukturmodelle des Polymermoleküls im SU-8. a) komplettes Molekül im flüssigen SU-8 b) eine Molekülgruppe aus der Molekülmitte nach Quervernetzung am rechten Epoxidring c) die drei wahrscheinlichsten Veränderungen am Molekül nach Plasma und d) Veränderung des Moleküls durch CAN wie sie auf Basis der Ergebnisse der Studien (Iranpoor 1995, Zhang 2005, Stangegaard 2006, Walther 2007, Wang 2007) erklärt werden.

Für die nasschemische Ätzung stellen die Epoxidringe den bevorzugten Angriffsort dar, da CAN ein besonders wirkungsvolles Agens zur Öffnung von Epoxidringen ist. Die freigewordenen Bindungsstellen am Epoxidring werden dann durch Nitratgruppen aus der Lösung abgesättigt, welche polare Moleküle bewirken. Durch Plasma kann ebenfalls an den Methylgruppen eine Oxidation erfolgen, die unter Lufteinfluss mit Hydroxyl- und Carboxylgruppen abgesättigt werden.

Eine entsprechende Anreicherung von Hydroxyl- und Carboxylgruppen an der Oberfläche des Polymers wurde sowohl für Sauerstoffplasma als auch für Argonplasma mit Hilfe von XPS Messungen nachgewiesen. Die XPS-Spektren zeigten eine deutliche Verringerung des für C-C und C-H Bindungen typischen Peaks bei 285 eV zugunsten eines Peaks bei 289,3 eV, der für C-O-O Bindungen typisch ist (Zhang 2005, Walther 2007). FTIR-Messungen an CAN geätzten Oberflächen ergaben vergleichbare Resultate zu den XPS Messungen. Dies legt die Deutung nahe, dass vor allem an den verbliebenen Epoxidringen eine Reaktion eingeleitet wird, die zunächst zu einem Aufbrechen des Epoxidringes und in der Folge zu einer Anlagerung einer Hydroxyl und einer Nitratgruppe an den freigewordenen Bindungsstellen führt (Iranpoor 1995, Stangegaard 2006, Wang 2007).

Die Behandlungen der Oberfläche bewirken neben der chemischen Veränderung zusätzlich eine Ätzung der Oberfläche. Damit geht eine Veränderung der Topografie der Polymeroberfläche einher, die mit länger werdender Behandlungsdauer zunächst zunehmend rauer wird und sich schließlich asymptotisch einem Rauigkeits-Grenzwert nähert (Zhang 2005, Walther 2007).

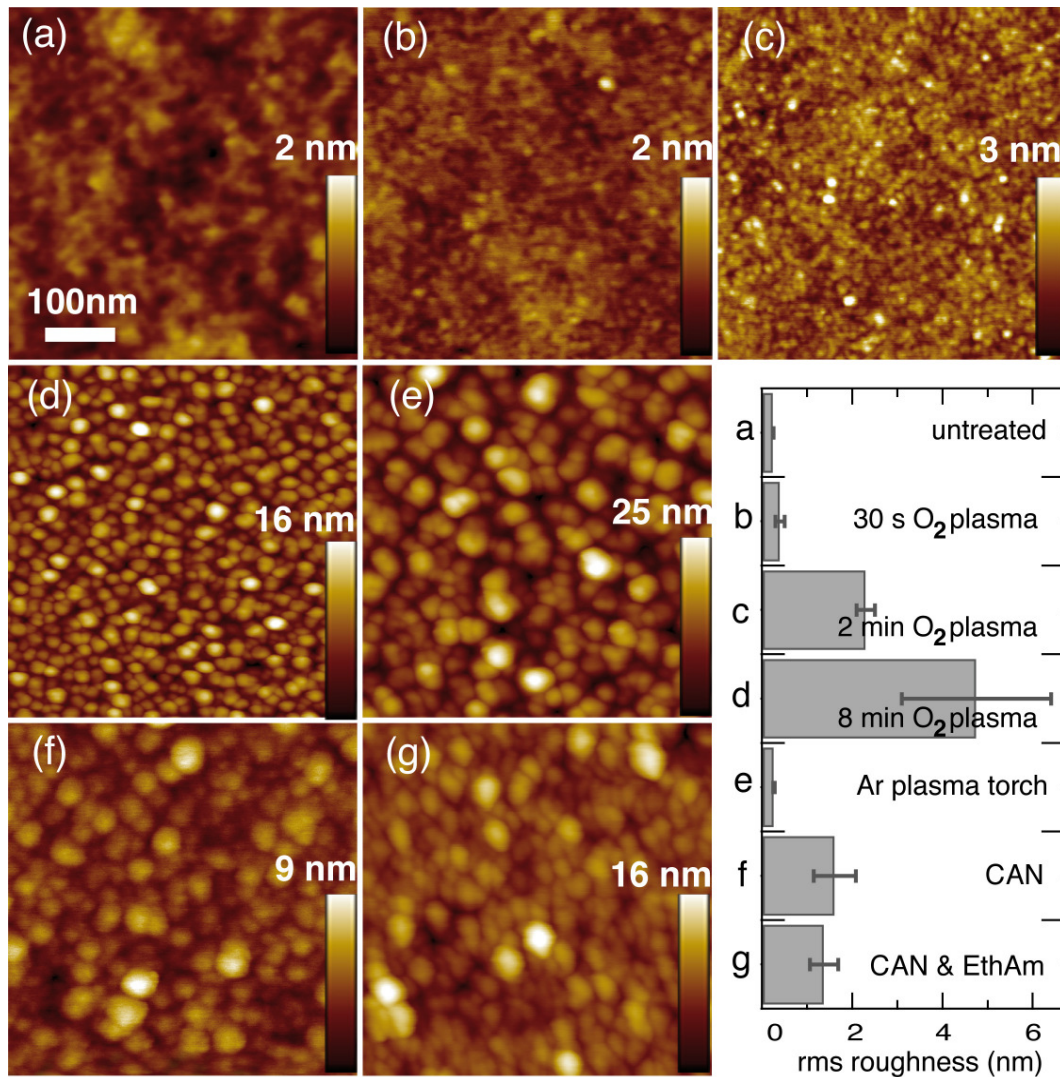


Abbildung 10: Oberfläche von SU-8 nach unterschiedlichen Behandlungen. A) unbehandelt, B) Argonplasma Fackel (C) 0,75 kJ O₂-Plasma, (D) 6 kJ O₂-Plasma, (E) 24 kJ O₂-Plasma, (F) CAN Nassätzung, (G) CAN mit nachfolgender Ethanolamine Behandlung [mit freundlicher Genehmigung entnommen aus Manuskript 2, F. Walther et al., unveröffentlicht].

Sowohl die Rasterkraftmikroskopie als auch die Vermessung des Kontaktwinkels zwischen einer Analyseflüssigkeit und der Probenoberfläche erlaubt es, die Auswirkung der verschiedenen Behandlungen auf die Eigenschaften der Probenoberfläche zu analysieren.

In Abbildung 10 ist ein Vergleich der Auswirkungen der oben eingeführten Verfahren zur Oberflächenbehandlung auf die Topographie von SU-8 Proben dargestellt. Die SU-8 Schichten wurden mittels photolithographischer Standardprozesse auf Siliziumchips aufgebracht und danach unterschiedlichen Oberflächenbehandlungen (Ar-Plasma, O₂-Plasma, UV-Ozon, nasschemisch mit CAN, sowie CAN und Ethanolamin) unterzogen.

Anhand der Bilder ist deutlich zu erkennen, wie mit ansteigender Plasmadosis die Struktur der Oberfläche verändert wird. Dabei ist die stetig größer werdende Rauigkeit das offenkundigste Merkmal aller Prozesse mit Ausnahme der Ätzung

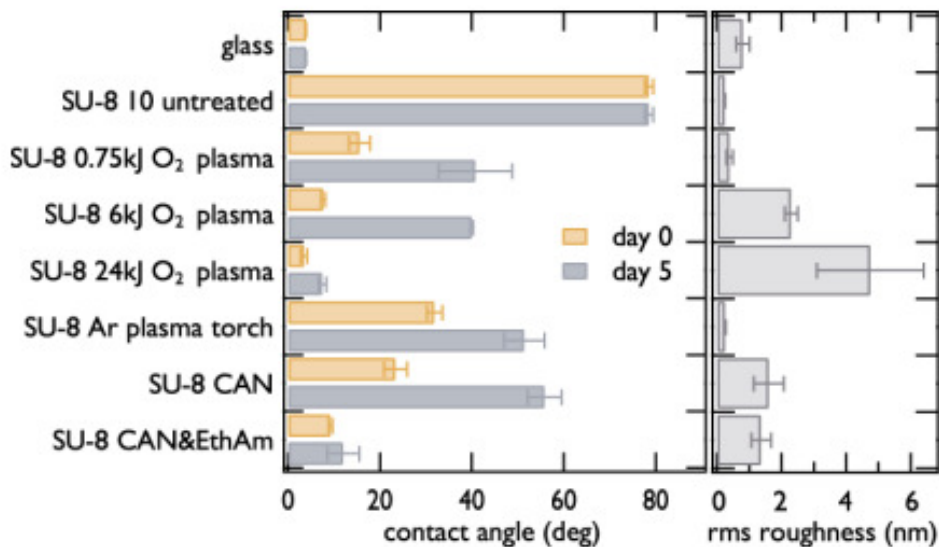


Abbildung 11: Kontaktwinkel und rms-Rauhigkeiten nach den verschiedenen Oberflächenbehandlungen und ihr zeitlicher Zerfall [mit freundlicher Genehmigung entnommen aus Manuskript 2, F. Walther et al., unveröffentlicht].

mittels Argonplasma. Der Wert der quadratisch gemittelten Rauigkeit wurde von 0,25 nm auf unbehandeltem SU-8 auf 4,75 nm auf SU-8, der einer Ätzung mit einer Dosis von 24 kJ ausgesetzt wurde, fast verzwanzigfacht. Zudem ist die Vergrößerung der lateralen Ausdehnung der auf der Oberfläche entstehenden Strukturen besonders prominent. Der mittlere Durchmesser stieg hier von wenigen Nanometern auf etwa 20 nm an.

Vergleichend durchgeführte Kontaktwinkelmessungen zeigten zugleich einen Anstieg der Benetzbarkeit der Polymeroberfläche, mit einer deutlichen Reduzierung der Kontaktwinkel bei allen Verfahren. Die geringste Veränderung wurde durch das Argonplasma verursacht, wodurch der Kontaktwinkel von 78,5° auf unbehandeltem Lack je nach Bestrahlungsdosis auf bis zu 28,9° sank. Mittels nasschemischer Behandlung mit CAN wurde ein ähnlicher Wert mit 23,4° erreicht, welcher durch die nachfolgende Beschichtung mit Ethanolamin auf 10,1° weiter reduziert werden konnte. Einen noch stärkeren Einfluss auf die Benetzbarkeit übte die Behandlung mit Sauerstoffplasma aus. Der Kontaktwinkel konnte dabei auf Werte von 15,6° bei niedriger Dosis bis zu weniger als 5° bei hoher Dosis abgesenkt werden. Allen Behandlungen gemein ist ein, auf die Hydrophilisierung folgender, zeitlicher Rückgang der Benetzbarkeit, der mit ansteigender Plasmadosis langsamer ablief.

3.4.2 Einfluss der Plasmabehandlung auf das Zellwachstum

Alle Methoden zur Oberflächenaktivierung, die im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kamen, sowohl Sauerstoff-, Luft- und Argonplasma als auch die nasschemischen Ätzprozesse, weisen unterschiedliche Ätzraten in Abhängigkeit der Materialzusammensetzung auf. So werden aus Polymerstrukturen bevorzugt

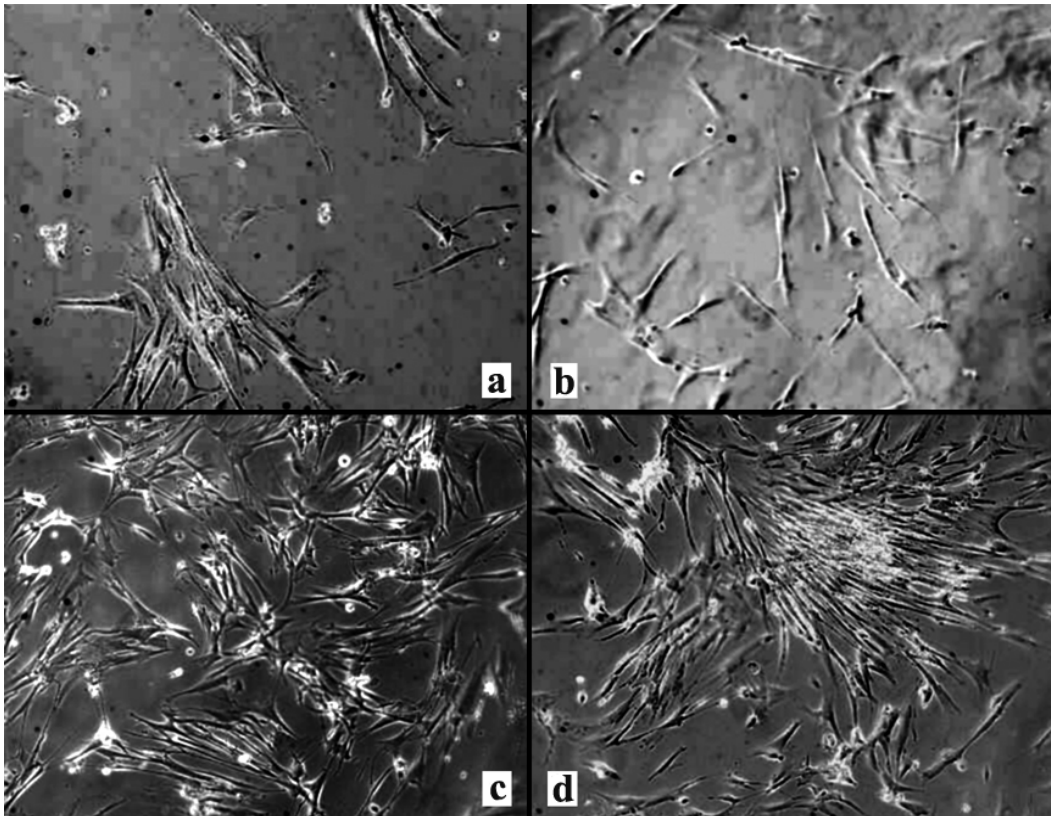


Abbildung 12: Repräsentative Bilder des Zellbewuchses nach 3 Tagen Kultivierung. a zeigt den Zustand auf Glaschips, b c und d den Zustand auf SU-8 vor bzw. nach Plasmaaktivierung mit 2,77 bzw. 22,2 J/cm² [entnommen aus Manuskript 3, *Microelectronic Engineering*, 85, M. Hennemeyer et al., *Cell Proliferation Assay on Plasma Activated SU-8*, 1298-1301, Copyright (2008), with permission from Elsevier].

leichtere Elemente aus den Kohlenstoffverbindungen herausgelöst, während schwerere Elemente wie zum Beispiel Metallatome weniger effektiv angegriffen werden. Da das Schwermetall Antimon als Bestandteil des Photoinitiatorsalzes Triarylsulfonium-Hexafluoroantimonat im SU-8 enthalten ist, bewirkt die Oberflächenbehandlung von SU-8 daher neben der Veränderung der Oberflächenchemie und der Erhöhung der Rauigkeit zudem eine Erhöhung der Antimon-Konzentration. Diese Erhöhung der Konzentration ist deutlich in XPS Messungen zu erkennen (Walther 2007). Aufgrund der potentiellen Toxizität von Antimon (De Boeck 2003, Patterson 2003) könnte die Biokompatibilität von oberflächenbehandeltem SU-8 eingeschränkt sein. Die Eignung der plasmaaktivierten Oberflächen, als Substrat für Zellbewuchs zu dienen, ist ein wesentlicher Aspekt in der Definition der Biokompatibilität dieser Materialien. Diese Eignung kann durch Zellzuchtexperimente untersucht werden.

Unbehandelter SU-8 wurde bereits in verschiedenen Vorgängerstudien auf seine Biokompatibilität hin untersucht (Kotzar 2002, Voskerician 2003). Obwohl die Studien Hinweise darauf geben, dass SU-8 nicht vollständig biokompatibel sein könnte, erwies sich die Toxizität des Materials dabei als nachrangig (Stangegaard 2006). Die Behandlung der Oberfläche mit CAN konnte sogar die

Wachstumsrate von Zellen auf der Polymeroberfläche erhöhen, wobei allerdings eine mutagene Eigenschaft des Materials nach der Oberflächenveränderung nicht ausgeschlossen werden konnte. Ob die in der Studie beobachtete, Erbgut verändernde Eigenschaft der geätzten Oberflächen im SU-8 begründet lag oder in dem zur Ätzung verwendeten CAN, konnte in den genannten Studien nicht abschließend beantwortet werden (Kotzar 2002, Voskerician 2003, Stangegaard 2006).

Die Plasmabehandlung der Oberfläche bietet im Vergleich mit der nasschemischen Ätzung hinsichtlich der Bewertung der Biokompatibilität den Vorteil, dass hier kein Eintrag weiterer Chemikalien stattfindet. Daher kann direkt auf die Eigenschaften des Materials selbst rückgeschlossen werden. Es wurden daher Zellwachstumsexperimente auf plasmabehandelten SU-8 Oberflächen durchgeführt.

Da im Rahmen der Biokompatibilitätsversuche Durchlichtmikroskopie verwendet werden musste, kamen in diesem Fall Glaswafer als Substrate zur Anwendung. Diese Glaswafer wurden den etablierten Standardprotokollen folgend mit SU-8 belackt und anschließend mit einem Sauerstoffplasma mit Bestrahlungsdosen zwischen 0 und $22,2 \text{ J/cm}^2$ behandelt. Nach der Plasmabehandlung wurden die Proben sowie ein weiterer Satz unbeschichteter Glaschips in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Herzzentrum München (AG Maßberg) sterilisiert und anschließend mit MRC-5 Zellen besät. MRC-5 ist eine Zelllinie aus fetalem Lungenbindegewebe, die in der Qualitätskontrolle von Zellkulturgefäßen etabliert ist. Im Unterschied zu den in bisherigen Studien verwendeten Zelllinien wurden diese nicht aus Krebszellen, sondern aus einem gesunden Zellstamm abgeleitet. Die Proben wurden nach dem Besäen für 3 Tage kultiviert und nach Fixierung der Zellen sowohl qualitativ anhand ihrer Morphologie als auch quantitativ durch Auszählen definierter Zählareale bewertet.

Die Zellen zeigten auf allen Substraten ihr physiologisches Erscheinungsbild (Jacobs 1970), mit einem langgezogenem Zellkörper und zytoplasmatischen Fortsätzen. Auf Glas und unaktiviertem SU-8 wurden vornehmlich vereinzelte Zellen und nur gelegentlich Anhäufungen zu Zellhaufen beobachtet. Im Gegensatz dazu war auf den plasmaaktivierten SU-8 Oberflächen eine deutliche Bildung von Zellaggregaten zu erkennen, in denen die einzelnen Zellen zahlreiche Kontaktstellen zueinander gebildet hatten, was dem physiologischen Zustand bei hoher Zelldichte entspricht.

Die quantitative Auswertung bestätigte die qualitative Aussage. Die Zelldichte stieg von 50 Zellen/mm^2 auf Glas und 75 Zellen/mm^2 auf unbehandeltem SU-8 auf 350 Zellen/mm^2 auf SU-8, der mit hoher Dosis aktiviert wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass die Biokompatibilität trotz der Anreicherung von Antimon an der Oberfläche des Polymers nicht reduziert wurde, sondern im Gegenteil das Zellwachstum sogar gefördert wurde. Die Begründung für dieses

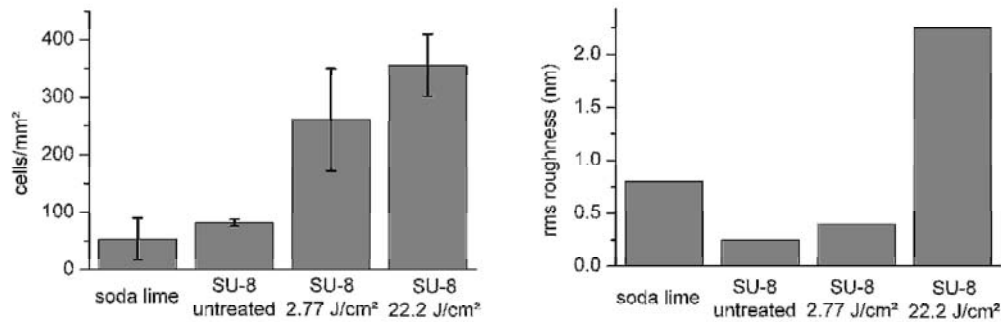


Abbildung 13: links: Zelldichte auf den unterschiedlich vorbehandelten Substraten, rechts: die zu den jeweiligen Substraten gehörigen Oberflächen Rauigkeiten [entnommen aus *Manuskript 3, Microelectronic Engineering, 85, M. Hennemeyer et al., Cell Proliferation Assay on Plasma Activated SU-8, 1298-1301, Copyright (2008), with permission from Elsevier*].

unintuitive Ergebnis ist in einer Kombination verschiedener Einflüsse zu suchen. Von Seiten des Antimons selbst ergeben sich verschiedene Möglichkeiten.

Zum einen wurde bei der XPS-Analyse der plasmabehandelten Oberflächen vorwiegend fünfwertiges Antimon gemessen (Walther 2007), welches als weniger toxisch relevant eingestuft wird als die dreiwertige Ausprägung des Antimons (De Boeck 2003). Zudem deuten weitere Versuche darauf hin, dass das angereicherte Antimon zumindest teilweise von der Oberfläche abgewaschen werden kann. Dass das verbleibende, oberflächennahe Antimon tatsächlich auch biologisch aktiv sein kann ist zudem unwahrscheinlich, entzieht sich aber einer Untersuchung.

Wesentlicher Faktor bei der Erhöhung des Zellwachstums auf den behandelten Oberflächen ist die grundsätzliche Veränderung der Oberflächeneigenschaften. Allein die Anwesenheit von Oberflächenladungen, wie sie durch die Einbettung von Carboxylgruppen verursacht werden, kann bereits die Adhäsion von Zellen an Oberflächen unterstützen. Der Einfluss der Oberflächenrauigkeit scheint auf der anderen Seite von untergeordneter Wichtigkeit zu sein. Zwar deuten frühere Studien eine Verbesserung der Zelladhäsion bei Rauigkeiten in der Größenordnung von einigen Mikrometern an (Hattori 1985, van Wachem 1987, Webb 1998), ein ähnlicher Effekt für Rauigkeiten auf der Nanometerskala, wie sie durch die Plasmaaktivierung erzeugt werden, konnte jedoch auch in anderen Studien nicht nachgewiesen werden (Lampin 1997, Deligianni 2001). Zusammengefasst stellt die Plasmaaktivierung der SU-8 Oberflächen in Kombination aller Teilaspekte eine wirkungsvolle Methode dar den Bewuchs der Oberfläche mit Zellen zu fördern.

3.4.3 Funktionalisierung durch Mikrokontaktdruck

Als weiterer Prozessschritt zur Anpassung der Oberflächeneigenschaften dienten zwei verschiedene Methoden zur lokalen Beschichtung der Oberfläche mit Proteinen, Mikrokontaktdruck sowie Proteinabscheidung aus laminaren Strömungen.

Die Eignung des Mikrokontaktdrucks zur lokalen Beschichtung von Oberflächen mit Proteinen wurde bereits in einer Reihe von Untersuchungen nachgewiesen und zur gezielten Strukturierung des Zellwachstums eingesetzt (Re 1994, Chen 1998). Zu Beginn der Experimente zum Mikrokontaktdruck stand insbesondere die indirekte Proteinbeschichtung von Goldoberflächen unter Verwendung von Alkanthiolen als Bindeglied im Vordergrund. Die in den Thiolen enthaltenen SH Gruppen bilden Bindungen mit der Goldoberfläche und können über den Alkanrest, der von der Oberfläche weg weist, kovalente Bindungen zu Proteinen bilden (Kumar 1993, Mrksich 1995).

Ogleich diese Methode einen hohen Wirkungsgrad zwischen verfügbarer Proteinmenge und Bedeckung der Oberfläche erreicht und vor allem eine hervorragende Selektivität der Proteinanlagerung an die Alkanthiole ermöglicht, während die unbeschichteten Goldareale frei von Proteinen bleiben, weist das Verfahren doch zwei Nachteile auf. Zum einen entspricht Gold keiner biologisch oder medizinisch relevanten Oberfläche, zum anderen kann eine Denaturierung der Proteine und damit auch eine Reduktion oder gar ein Ausschalten der physiologischen Funktion des Proteins aufgrund der kovalenten Bindung an die Alkanthiole nicht ausgeschlossen werden.

In der biologischen und medizinischen Forschung werden vor allem unspezifische Beschichtungen verschiedener Oberflächen durch Inkubation eingesetzt. Hierbei werden Proteinlösungen auf die zu beschichtenden Oberflächen aufgebracht und für definierte Reaktionszeiten dort belassen. Die Proteine lagern sich dann durch Oberflächenladungseffekte und Dipolwechselwirkung an der Oberfläche an.

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass mit Hilfe des Mikrokontaktdruckes die unspezifische Anlagerung der Proteine, wie sie bei der Inkubation stattfindet, auch lokal strukturiert möglich ist. In der Zwischenzeit wurden bereits zahlreiche Proteine mit diesem Verfahren auf verschiedene Oberflächen gedruckt, so beispielsweise Polylysin auf Glas oder Immunglobulin G auf Polystyrol (Bernard 1998, James 1998, Bernard 2000). Die gedruckten Proteinstrukturen können beispielsweise genutzt werden, um gerichtetes Wachstum von Neuronen zu fördern (Branch 1998) oder den Einfluss der Dichte fokaler Adhäsionspunkte auf das Zellwachstum zu untersuchen (Lehnert 2004).

Trotz der Erfolge die mit dem Mikrokontaktdruck bereits erzielt wurden sind noch wichtige Fragen offen. So wurde der Mikrokontaktdruck für die physiologisch wichtigen extrazellulären Matrixproteine Kollagen, Fibrinogen und von-Willebrand-Faktor bisher nicht untersucht. Albumin, Fibrinogen sowie von-Willebrand-Faktor sind Proteine des Blutplasmas, die wesentliche Funktionen bei der Blutstillung übernehmen. Sie beeinflussen dabei unter anderem auch die Adhäsion von Zellen an die Oberflächen der verletzten Gefäße, im Falle des

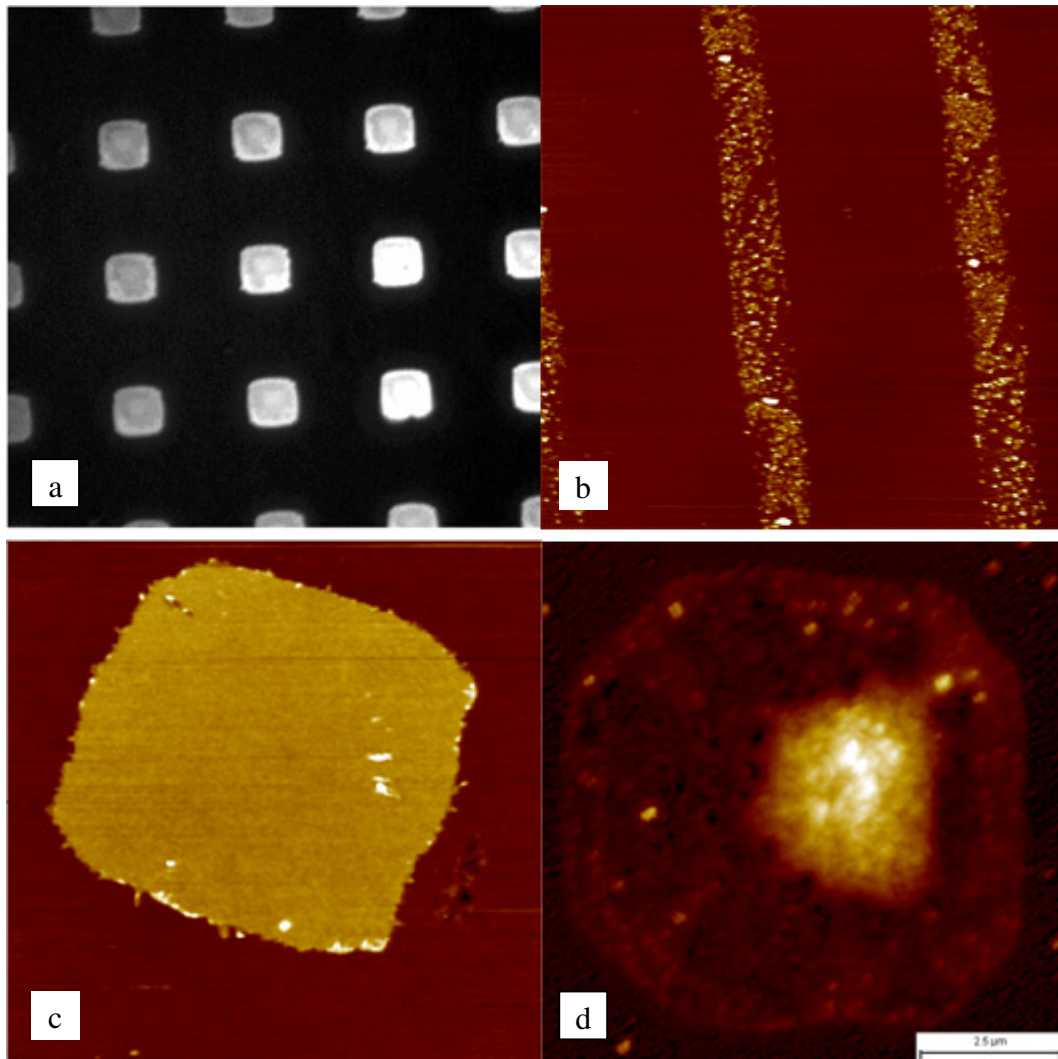


Abbildung 14: Beispielgebende Bilder von gedruckten Proteinen. a) zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Albumin auf Glas, b), c) und d) AFM-Bilder von Albumin, Fibrinogen, und Kollagen [Abbildung: E. Schönberger].

Albumins hemmend, im Falle des Fibrinogens sowie des von-Willebrand-Faktors fördernd, durch Ansprechen einer Reihe von Abläufen in der Aktivierungskaskade des Gerinnungssystems. Als weiteres, wichtiges Protein kommt in diesem Zusammenhang Kollagen zum Tragen, das als Stützstruktur in den Gefäßwänden vorkommt, bei Verletzungen freigelegt und ebenfalls mit Zellen aus dem Blut in Kontakt tritt. Durch diesen Kontakt wird ebenfalls eine Aktivierungskaskade ausgelöst, die letztendlich zur Blutgerinnung führt.

Um Protokolle zur strukturierten Beschichtung von Glasoberflächen für Proteine aus dieser Gruppe zu etablieren, wurden Versuche mit den oben genannten Proteinen durchgeführt. Für den Druck von Proteinen wurden verschiedene Druckstrukturen entworfen und mittels UV-Lithographie Master hergestellt. Für die Herstellung der Master kam SU-8 zum Einsatz. Dieser wurde entsprechend der vorher etablierten Standardverfahren, wie im Anhang erläutert, verarbeitet. Zusätzlich zum Standardprozess wurden die Master einem Hardbake unterzogen, das heißt einem abschließenden Backprozess bei hohen Temperaturen, um eine

vollständige Vernetzung des SU-8 sicherzustellen sowie eventuell verbliebenes Lösungsmittel aus dem Material zu treiben. Dies verringert auch das Risiko die Stempelflächen mit SU-8 zu verunreinigen.

Nach Fertigstellung der Master wurden diese in einem Plasmaprozess mit Hexafluorpropen als Prozessgas mit einer teflonartigen Schicht bedeckt und dadurch passiviert. Durch diese Passivierung der Masteroberfläche wird das Ablösen der Stempel vom Master erleichtert. Vom Master wurden dann die eigentlichen Stempel mit Poly(dimethyl)siloxan abgegossen und unmittelbar nach ihrer Aushärtung für den Druckprozess verwendet.

Nach dem Ablösen der Stempel vom Master wurden diese zunächst mit einem Sauerstoffplasma niedriger Dosis aktiviert und dann in einem Zweischrittverfahren mit Proteinen beschichtet. Die Details der Proteinbeschichtung sind im Anhang 7.1.3 dargestellt. Der Übertrag der Proteine vom Stempel auf die verwendete Glasoberfläche erfolgte durch definiertes Aufdrücken der Stempel auf die zu bedruckende Oberfläche in einer selbstgebauten Stempelapparatur.

Zur Analyse des Druckergebnisses wurden die Proben mittels Rasterkraftmikroskopie sowie im Falle fluoreszenzmarkierter Proteine zusätzlich mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die gemäß diesem Protokoll erzeugten Drucke wiesen durchweg einen deutlichen Übertrag von Proteinen auf die Glasoberfläche auf. Dabei variierte allerdings die Uniformität der Beschichtung wie in Abbildung 14 ersichtlich ist. Während mit Fibrinogen dichte Filme erzeugt werden konnten, die auch bei rasterkraftmikroskopischer Abbildung keinen Anhaltspunkt einer Substruktur erkennen ließ, bildete Albumin im AFM Bild deutlich erkennbare Körner im bedruckten Bereich, die allerdings im Fluoreszenzbild nicht aufgelöst werden konnten. Die Drucke von Albumin, Kollagen und Fibrinogen wiesen durchweg Dicken im Bereich von Monolagen auf.

Die Resultate bestätigen die Möglichkeit die verwendeten Proteine direkt auf Glas zu drucken, ohne dabei auf Bindungsvermittler wie die häufig eingesetzten Alkanthiole zurückgreifen zu müssen. Entsprechende Ergebnisse wurden bisher zwar bereits für Antikörper veröffentlicht (Bernard 1998), jedoch noch nicht für die physiologisch wichtige Klasse von Proteinen aus der extrazellulären Matrix. Der Anstieg der Intensität des Fluoreszenzsignales an den Rändern gedruckter Strukturen, der insbesondere bei den Albumindrucken auffällt, ist auf mikroskopische Materialflüsse während der Trocknungsprozesse der gedruckten Areale zurückzuführen, wie sie auch in einer älteren Arbeit über Kapillarflüsse beschrieben wurden (Deegan 1997, Schneider 2007).

Einen Sonderstatus unter den gedruckten Proteinen nimmt von-Willebrand-Faktor ein, dessen Fluoreszenzsignal zunächst völlig dem gedruckten Schema widerspricht, wie in Abbildung 15 zu sehen ist. Da bei von-Willebrand-Faktor die

physiologische Funktionalität durch eine Fluoreszenzmarkierung gestört würde, erfolgte die Fluoreszenzmarkierung des Proteins mittels Immunfärbung erst nach dem Druck des Proteins. Hierzu wird der Probe ein für das zu markierende Protein spezifischer, fluoreszenzmarkierter Antikörper zugesetzt. Findet der Antikörper ein passendes Proteinmolekül vor, bindet er an dieses Molekül. Ein Fluoreszenzsignal, das sich wesentlich von dem durch unspezifische Anlagerung hervorgerufenen Hintergrundsignal unterscheidet, weist daher die Anwesenheit des Proteins nach.

Abbildung 15 a) zeigt ein Fluoreszenzmuster, das dem Negativ des erwarteten Musters entspricht. Während die Areale mit dem gedruckten von-Willebrand-Faktor dunkel bleiben, ist im Bereich um die gedruckten Proteinstrukturen das Fluoreszenzsignal des unspezifisch angelagerten Antikörpers zu sehen. Die vorzugsweise Anlagerung von Antikörpern an das Glas, statt an das Protein lässt darauf schließen, dass die für das Anlagern nötigen Bindungsstellen nach dem Drucken für den Antikörper nicht zugänglich sind. Eine Studie zum Einfluss von Scherkräften auf das Anlagerungsverhalten von gelöstem von-Willebrand-Faktor hat sowohl einen erheblichen Einfluss der Scherrate auf die Anlagerung erwiesen, als auch einen dramatischen Wandel der Konformation des Proteins gezeigt (Schneider 2007).

Um den Einfluss einer Scherung auf das gedruckte Protein zu untersuchen, wurden Scherversuche in einem mikrofluidischen System durchgeführt und das Protein nach der Scherung erneut einer Immunfärbung unterzogen. Für die Versuche wurden die im Rahmen der Arbeit entwickelten mikrofluidischen Kanalsysteme reversibel auf die bedruckten Glasobjektträger aufgebondet. Hierfür kamen Kanalsysteme mit einem linearen Hauptkanal zum Einsatz, der eine Breite von 400 μm und eine Höhe von 150 μm aufwies. Als Pumpmechanismus fand das ebenfalls im Rahmen der Arbeit entwickelte Vierkanal-Spritzenpumpensystem Verwendung.

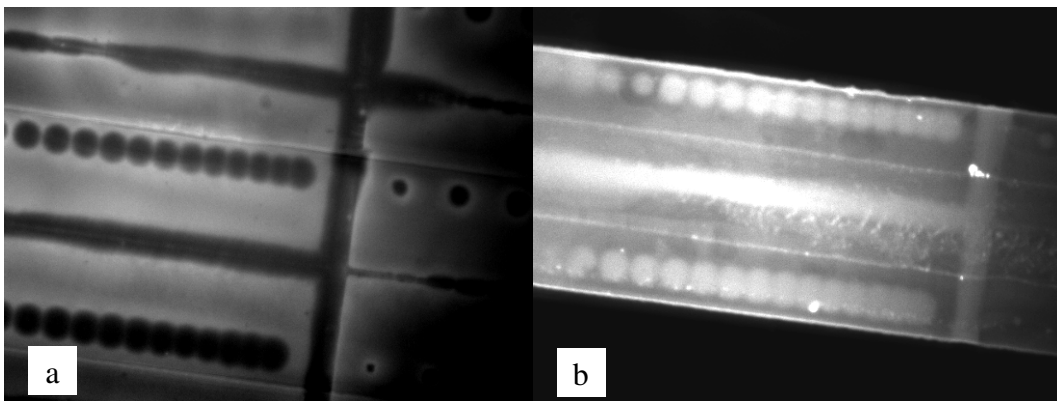


Abbildung 15: Fluoreszenzsignal der mit von-Willebrand-Faktor bedruckten Oberflächen nach Immunfärbung mit fluoreszenzmarkiertem Anti-von-Willebrand-Antikörper. a) Zustand bei Markierung vor Scherung im mikrofluidischen System, b) Zustand nach Scherung.

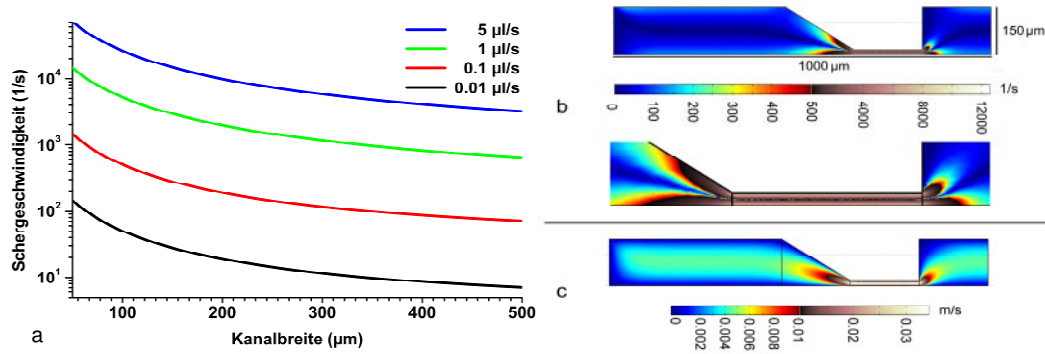


Abbildung 16: a) Abhängigkeit der Scherrate von der Kanalbreite in rechteckigen Kanälen bei konstanter Volumengeschwindigkeit als Ergebnis der Finite-Elemente-Modellierung der Kanäle b) Simulation der Schergeschwindigkeit in der Kanalmitte eines Kanals mit Stenose. Die Schergeschwindigkeit steigt von 150 s^{-1} an den Wänden bei voller Kanalbreite auf über 10000 s^{-1} an den Wänden bei Einschnürung auf $1/10$ der ursprünglichen Kanalbreite. c) lineare Geschwindigkeit in der Kanalmittelebene. Hinter der Stenose ist deutlich ein Sedimentationsbereich mit reduzierter Geschwindigkeit erkennbar.

Um das Verhalten von Flüssigkeiten im mikrofluidischen System vorherzusagen wurden Finite-Elemente-Simulationen durchgeführt. Für die Berechnungen wurden 3-dimensionale Modelle der Flusssysteme mit und ohne Stenose erstellt. Zur Modellierung der Strömungsprozesse wurde die in COMSOL implementierte, generalisierte Form der Navier-Stokes-Gleichung

$$\rho \frac{\partial \mathbf{u}}{\partial t} - \nabla \left[\eta \left(\nabla \mathbf{u} + (\nabla \mathbf{u})^T \right) \right] + \rho (\mathbf{u} \cdot \nabla) \mathbf{u} + \nabla p = \mathbf{F} \quad (3)$$

zusammen mit der üblichen Kontinuitätsgleichung der Fluidodynamik

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \quad (4)$$

verwendet. Hierbei bezeichnet \mathbf{u} das Geschwindigkeitsfeld, ρ und η die Dichte und Viskosität der Flüssigkeit, p und \mathbf{F} den Druck in der Flüssigkeit sowie die extern wirkenden Kräfte. Als Randbedingungen wurde an den Kanalwänden schlupffreie Bewegung angenommen, d.h. das Geschwindigkeitsfeld \mathbf{u} wurde dort gleich 0 gesetzt. Extern wirkende Kräfte wurden indirekt über die Festlegung der Zuflussgeschwindigkeit am Kanalbeginn und des Druckes am Kanalsende definiert ($p_{\text{Auslass}}=0$). Für die Parameteranalysen von η , ρ und den Kanalabmessungen wurden Wertebereiche gewählt, die im Bereich der experimentell wichtigen Größen lagen. Für η wurde der Bereich zwischen $0,1 \text{ mPas}$ und 25 mPas betrachtet, entsprechend der Viskositäten von niedrigviskosen Flüssigkeiten wie Pentan ($0,2 \text{ mPas}$) bis zum oberen Grenzwert der Viskosität von Blut (25 mPas). Eine ähnliche Wahl wurde für den Wertebereich der Dichte ρ getroffen, wo die Werte den Bereich zwischen Pentan (ca. $0,6 \text{ g/cm}^3$) und Saccharose-gesättigtem Wasser (ca. $1,4 \text{ g/cm}^3$) überdecken.

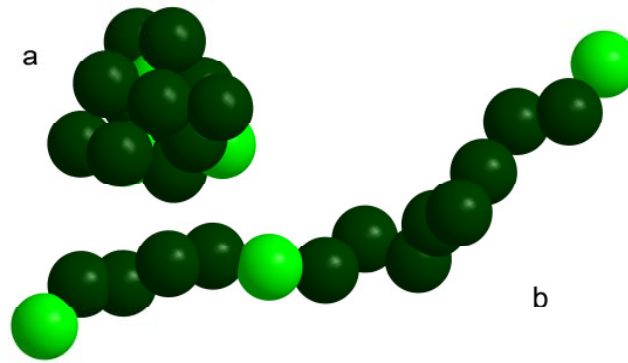


Abbildung 17: Modell der Konformationsänderung des vWF-Moleküls durch hohe Scherraten. Durch die Scherung wird das anfänglich kollabierte Molekül (a) gestreckt, dadurch werden mehr Bindungsstellen (hellgrün) zugänglich (b) (vgl. (Schneider 07)).

Es wurden Kanalabmessungen zwischen $10\ \mu\text{m}$ und $500\ \mu\text{m}$ sowie Zuflussgeschwindigkeit von $0,01\ \mu\text{l/s}$ bis $100\ \mu\text{l/s}$ untersucht, entsprechend der experimentell zugänglichen Werte. Die Lösungen wurden mit Hilfe einer Konvergenzanalyse auf Konsistenz überprüft. Da in den Simulationen wie auch in den realen Experimenten die Volumengeschwindigkeit konstant gehalten wurde, zeigten die Parameteranalysen, dass im untersuchten Bereich der Einfluss der Dichte und Viskosität keine qualitative Änderung des Fließverhaltens bewirkt, sondern lediglich den Druckverlauf im Kanal verändert. Die Variation der Zuflussgeschwindigkeit wirkt sich ebenfalls ausschließlich als linearer Parameter auf die Strömungsgeschwindigkeiten aus.

Ausgehend von den Ergebnissen der Modellierung wurden für die Scherversuche die Volumengeschwindigkeiten bestimmt, die für Scherraten von wenigen $1\ \text{s}^{-1}$ bis über $30000\ \text{s}^{-1}$ benötigt wurden. Abbildung 16 zeigt Ergebnisse der Finite-Elemente-Simulationen zur Abhängigkeit der Schergeschwindigkeit von der Kanalbreite. In Abbildung 16 a) ist der Anstieg der Schergeschwindigkeit mit abnehmender Kanalbreite und zunehmender Volumengeschwindigkeit wiedergegeben. Im Gegensatz zur $1/R^4$ Abhängigkeit, wie sie das Hagen-Poiseuillesche Gesetz für Rohre mit kreisförmigem Querschnitt vorhersagt, ergab die Interpolation der Ergebnisse für rechteckige Rohre einen Exponenten nahe bei 2. Dies entspricht auch den Erwartungen, da eine Verringerung des Radius im Falle des Rohres quadratisch über die Fläche sowohl in den Druckabfall als auch in die Volumengeschwindigkeit eingeht. Demgegenüber wird beim Rechteckkanal nur eine Seite in ihrer Abmessung verändert die folglich insgesamt auch nur quadratisch in die Rechnung einfließt. Die Veränderung der Volumengeschwindigkeit selbst bewirkt eine lineare Veränderung der Scherraten. Für Geschwindigkeiten über $5\ \mu\text{l/s}$ waren die vorhergesagten Scherungen in allen Kanalbereichen so groß, dass sie keine biologische Relevanz mehr besaßen.

Auf Basis der Ergebnisse der Finite-Elemente-Rechnungen und Perfusionsexperimenten ergab sich, dass niedrige Scherraten bis 5000 s^{-1} keine Änderungen am ursprünglich gemessenen Fluoreszenzsignal bewirkten, das in Abbildung 15 a) wiedergegeben ist. Erst unter dem Einfluss hoher Scherraten über 5000 s^{-1} wurde das Signal verändert, so dass nach einer erneuten Fluoreszenzfärbung ein invertiertes Fluoreszenzmuster erkennbar wurde. Abbildung 15 b) zeigt das Ergebnis der Färbung nach dem Scherversuch. Die Begrenzung der Musterveränderung wurde durch die Verwendung des Mikrofluidiksystems für den Scherversuch verursacht. Sowohl Scherung als auch erneute Immunfärbung fanden nur innerhalb des Kanals statt.

Die Invertierung des Fluoreszenzsignals ist analog zu den Ergebnissen der Studie von Schneider *et al.* zu deuten (Schneider 2007). Durch die Scherung kommt es zu einer Entfaltung der Proteine, die nach dem Drucken zunächst in einer kollabierten Form vorliegen. Durch die Entfaltung bieten die Proteine auf der Oberfläche eine vielfach höhere Anzahl an zugänglichen Bindungsstellen für die Antikörper (Abbildung 17). Neben einer Bestätigung der Scherratenabhängigkeit der Struktur des von-Willebrand-Faktors, zeigt das Auftreten dieser Konformationsänderung zusätzlich die bewahrte physiologische Aktivität des auf die Oberfläche gedruckten Proteins. Dies ist umso bemerkenswerter, als es während des Druckprozesses zum Trocknen des Proteins kommt.

3.4.4 Beschichtung in laminaren Strömungen

Als zweite Möglichkeit für die Beschichtung der Oberflächen bietet sich die Abscheidung der Proteine aus einer Lösung im Laminarstrom an. Durch die Abscheidung im mikrofluidischen System ist zudem eine lokale und strukturierte Beschichtung der Oberfläche möglich. Wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens ist, dass die Proteinbeschichtung auch nach dem Verschließen des mikrofluidischen Systems durchgeführt werden kann und so die Proteine beim Verbindungsprozess nicht beschädigt werden können. Zudem ist der zeitliche Abstand zwischen Proteinbeschichtung und eigentlichem Experiment durch den fehlenden Bondingschritt kürzer, als bei den vorher genannten Methoden.

Mikrofluidische Systeme zur lokalen Ablagerung von Material zu verwenden wurde erstmalig in Kim *et al.* (1995) vorgeschlagen. Ausgehend von diesen ersten Ansätzen wurde das Verfahren in verschiedenen Studien hinsichtlich der lokalen Beschichtung von Oberflächen mit Proteinen für Proteomikanwendungen untersucht. Besonderer Schwerpunkt wurde dabei, wie beim Mikrokontaktdruck, auf Immunglobuline gelegt, für die die Bildung von selbstorganisierten Monolagen in mikrofluidischen Systemen nachgewiesen werden konnte (Delamarche 1998). Mit einer weiteren Studie konnte die Eignung mikrofluidischer Systeme für die Proteinanalyse nachgewiesen werden, indem das verwendete System nach Ablagerung einer ersten Schicht von Immunglobulinen

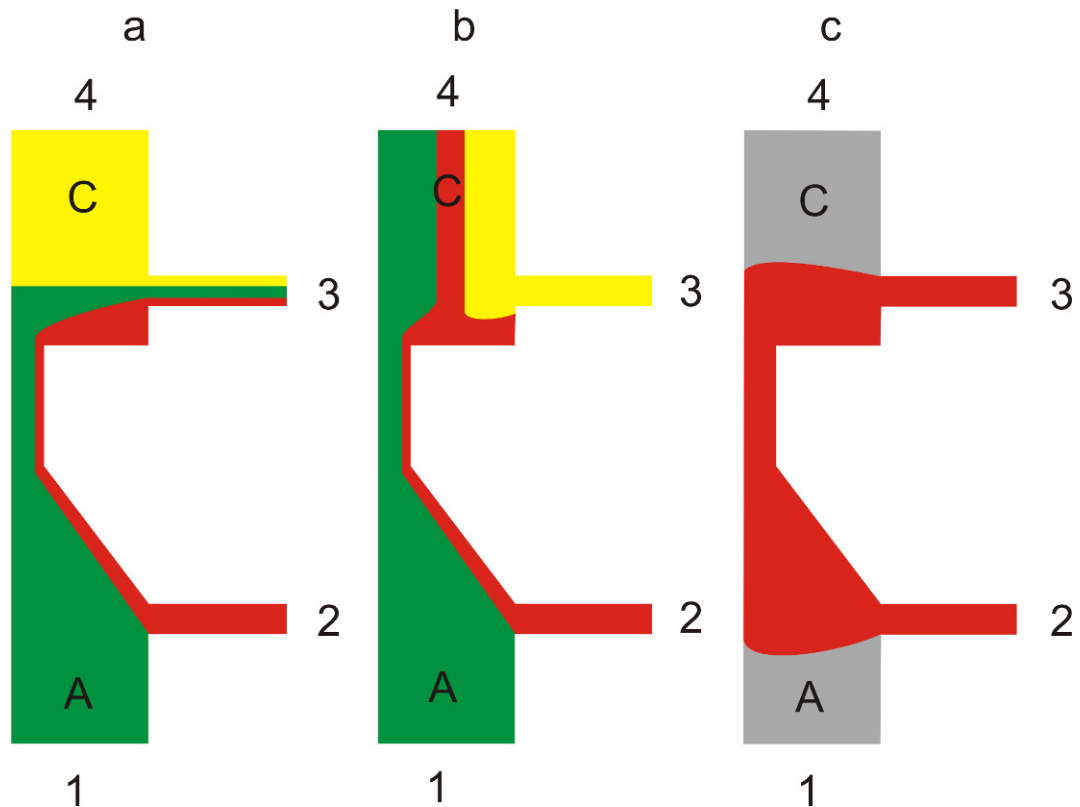


Abbildung 18: Schematische Abbildung einer Kanalgeometrie und der Auswirkung verschiedener Befüllungen. Die Farben stellen verschiedene Proteine dar, die in den Kanal eingepumpt werden. Die Zahlen 1 bis 4 benennen die Zuleitungen des Systems. A, B und C stellen die drei Regionen Vorlauf, Stenose und Nachlauf dar, in die das System unterteilt werden kann.

abgelöst und um 90° rotiert wieder auf die Probe aufgebracht wurde. Anschließend wurde das System mit, zu den Immunglobulinen passenden, fluoreszenzmarkierten Antikörpern verschiedener Tierarten durchströmt und danach die Intensität des Fluoreszenzsignals bestimmt. Hierdurch wurde ein paralleles screening verschiedener Antikörper in Wechselwirkung mit ein und demselben Protein ermöglicht. Obgleich das Verfahren bereits Eingang in die Proteomik gefunden hat, wurde es für die Vorbehandlung von Versuchssystemen für die Zellbiologie bisher nicht eingesetzt.

Für die lokale Beschichtung wurden in der vorliegenden Arbeit Mikrofluidiksysteme im bereits oben beschriebenen Abgussverfahren aus PDMS hergestellt, mit Hilfe der Plasmaverbindungstechnik mit Glasobjektträgern unlösbar zusammengefügt und anschließend mit den Proteinen Albumin, Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor und Kollagen sowie mit dem Biopolymer Poly-l-lysin-Polyethylenglykol (PLL-PEG) durchspült.

Die Kanäle waren zweidimensionale Strukturen, die je nach Folgeanwendung eine spezielle Ausprägung mit verschiedenen Verzweigungen und eventuellen Engstellen aufwiesen. Abbildung 18 zeigt als ein Beispiel die wichtigste erstellte Geometrie, die Stenose, und die Auswirkung unterschiedlicher Zuführung der Proteinlösung in das System. Aus den vier Zuführungen des Systems ergeben sich insgesamt 16 theoretische Möglichkeiten das System zu befüllen. Die beiden Ausführungen die sich durch vier Zu- beziehungsweise Ableitungen ergeben würden sind nicht relevant, da es dabei zu keiner Befüllung des Systems käme. Abbildung 18 a) und b) stellen zwei schematische Repräsentationen der für die Anwendung besonders interessanten Situationen mit drei Zuläufen und einem Ablauf dar.

Die Situation, wie sie in a) abgebildet ist, spielt eine wichtige Rolle bei Perfusionsexperimenten von Blutplättchen. Wird dem System von Anschluss 1 Albumin zugeführt, während über die Anschlüsse 2 und 4 verschiedene Proteine zugeführt werden die bei der Blutgerinnung eine aktive Rolle spielen, ergibt das System insgesamt ein Modell für eine stenotische Verengung eines peripheren Blutgefäßes mit einer lokalen Funktionalisierung nur einer einzigen Kanalwand im Bereich der Verengung des Systems. Dies entspricht auch der Funktionalisierung wie sie vornehmlich für die Scherversuche an Blutplättchen im folgenden Kapitel verwendet wurden.

Indem die Flussrichtung in den Anschlüssen 3 und 4 umgekehrt wird, können den durch den Hauptkanal strömenden Zellen nun drei verschiedene Proteine zur gleichen Zeit angeboten werden, sodass eine gleichzeitige Beobachtung der Reaktion der Zellen auf die Proteine möglich ist (b). Durch Variation der Volumenströme die aus Anschluss 1 bzw. 2 zugeführt werden ist zusätzlich eine Veränderung der Breite des vom jeweiligen Protein erreichten Kanalbereichs möglich (19 a und b). Der Anteil der von den Proteinen bedeckten Oberfläche ist

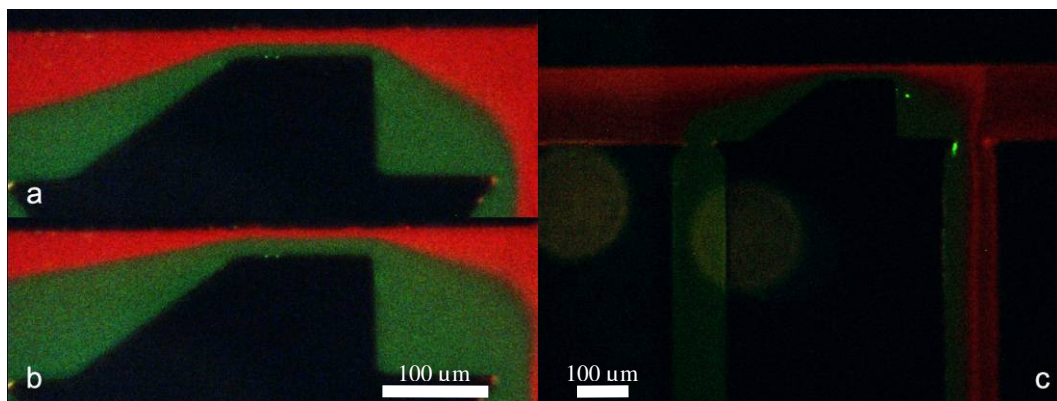


Abbildung 19: Stenosensystem während (a und b) und nach (c) Funktionalisierung mit Kollagen (grün) und PLL-PEG (rot). Die Höhe und Breite des Kanalsystems betragen in den Hauptkanälen 150 µm, im Bereich der Stenose ist die Kanalbreite auf unter 30 µm reduziert. a) Verhältnis der Flussraten 1 zu 1, b) Verhältnis 1 zu 4.

dabei in den Grenzen der geometrischen Genauigkeit der Kanäle proportional zum Verhältnis der Volumengeschwindigkeiten. Da die Kanäle produktionsbedingt jedoch nicht vollständig rechteckig sind, sind kleine Abweichungen zu beobachten.

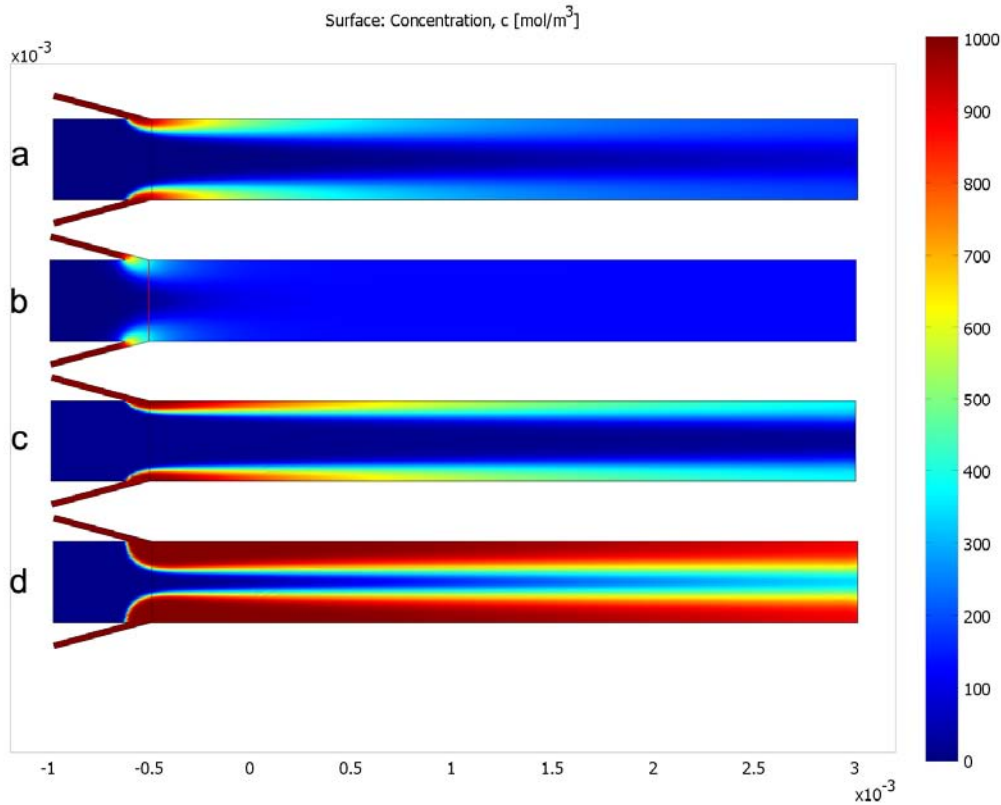
Die weiteren Möglichkeiten bei der Funktionalisierung je zwei Kanäle als Zu- und Abläufe zu verwenden führt dagegen zu einem schwer kontrollierbaren, instabilen Verhalten des Flusssystems. So führen bei der Verwendung der Anschlüsse 1 und 4 als Zuläufe, sowie 2 und 3 als Abläufe schon kleinste Schwankungen im Druckverhältnis zwischen den Zuläufen oder den Abläufen dazu, dass es entweder zu einem Fluss von 1 nach 2 sowie von 4 nach 3 kommt oder aber dazu, dass einer der Abläufe von beiden Zuläufen gespeist wird. Aufgrund dieses instabilen Verhaltens wurden diese Konfigurationen in den Experimenten nicht weiter verfolgt.

Die Situation mit nur einem aktiven Zulauf muss schließlich noch einmal unterteilt werden. Wenn alle drei verbleibenden Anschlüsse als Ablauf verwendet werden wird das gesamte System mit einer Proteinlösung gefüllt. Anders verhält es sich, wenn das System zunächst mit neutraler Flüssigkeit befüllt wird und dann zwei der Abflüsse verschlossen werden. Hierdurch wird eine selektive Funktionalisierung einer Kanalregion ermöglicht, die durch keine der anderen Methoden zu verwirklichen ist (Abbildung 18 c).

Neben der Funktionalisierung der Oberflächen durch die Ablagerung von Proteinen wurden die Systeme zudem für die Ausbildung von Wirkstoffgradienten in der Flüssigkeit getestet, wie es bereits von Jeon *et al.* in Arbeiten 2000 und 2002 vorgeschlagen wurde. Während der Experimente wurde destilliertes Wasser durch den Hauptkanal bei niedrigen Volumengeschwindigkeiten gepumpt und über die Seitenkanäle ein Farbstoff zugeführt. Entlang der Kanalstrecke bildete sich durch Diffusion ein Konzentrationsgradient. Durch Veränderung der Flussrate änderte sich auch die lineare Geschwindigkeit und damit die nötige Zeit, bis die Flüssigkeit eine bestimmte Position im Kanal erreichen konnte. Hierdurch konnten verschiedene Konzentrationsgradienten im Kanal eingestellt werden.

Zur Vorhersage der Konzentrationen in den einzelnen Kanalregionen bei der Abscheidung aus der Lösung sowie des Konzentrationsgradienten wurden 6 Faktoren untersucht: die Strömungsgeschwindigkeit, das Verhältnis der Zuflussraten, die Viskosität und Dichte der Flüssigkeit sowie die Diffusionskonstante und Konzentration des Markers. Die Modellierung folgte dabei im Wesentlichen dem in Abschnitt 3.4.3 beschriebenen Vorgehen.

Zusätzlich zur Strömungsberechnung mit der Navier-Stokes-Gleichung erfolgte hier zusätzlich eine Berechnung der Diffusion unter Verwendung der, um konvektive Anteile erweiterten, konservativen Formulierung des Fickschen Gesetzes



	a	b	c	d
\bar{v} , Verhältnis	300 µm/s, 1:1	300 µm/s, 1:1	10 mm/s, 1:1	300 µm/s, 1:10
D	5×10^{-10} mm ² /s	5×10^{-9} mm ² /s	5×10^{-10} mm ² /s	5×10^{-10} mm ² /s

Abbildung 20: Finite-Elemente-Simulation der Ausbildung eines Konzentrationsgradienten in einem 500 µm breiten Kanal mit zwei seitlichen Zuflüssen. Einflüsse der Änderung verschiedener Parameter, wie in der Tabelle aufgeführt. \bar{v} bezeichnet die mittlere lineare Geschwindigkeit der Flüssigkeit im Kanal, Verhältnis bezieht sich auf die Geschwindigkeiten im Haupt- und den Nebenkanälen. D bezeichnet die Diffusionskonstante.

$$\delta_{ts} \frac{\partial c}{\partial t} + \nabla \cdot (-D \nabla c + c \mathbf{u}) = R \quad (5)$$

mit der Konzentration c , der Diffusionskonstanten D und der Reaktionsrate R . Da bei der Modellierung nur der stationäre Zustand von Interesse war und Erzeugung oder Vernichtung der Indikatorsubstanz keine Rolle spielen sollte, werden die Reaktionsrate R und die Zeitableitung der Konzentration $\partial c / \partial t = 0$.

Um dem Einfluss der Konvektion Rechnung zu tragen und Oszillationen der Lösung durch numerische Abweichungen zu reduzieren, wurde anisotrope Diffusion in das Modell integriert (*Streamline Upwind Petrov-Galerkin-Formulierung*). Als Randbedingungen für die Navier-Stokes-Berechnungen wurden schlupffreie Bewegung an den Kanalwänden implementiert, konstante Zuflussgeschwindigkeiten an den Einlässen und verschwindender Restdruck am Auslass. Für den Teil der Konvektion und Diffusion wurden am Pufferzufluss die

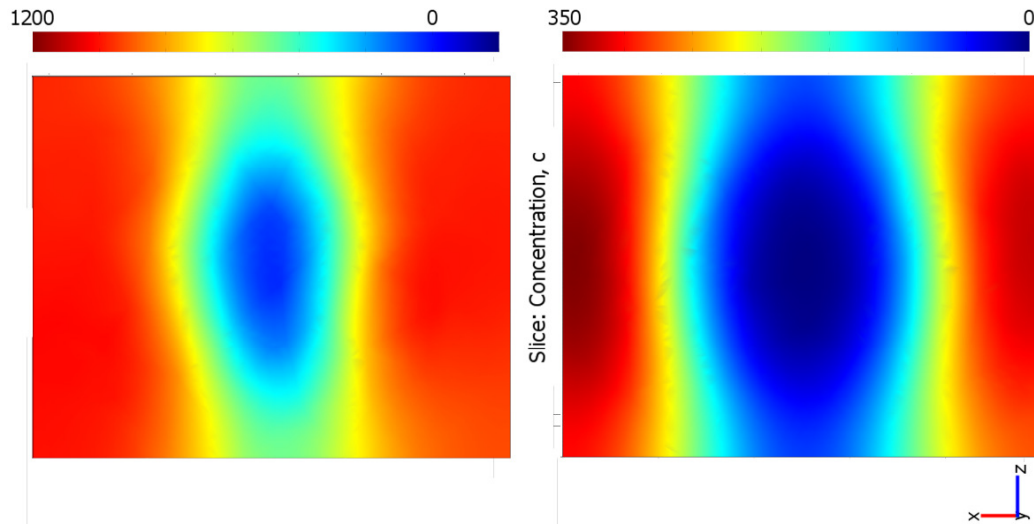


Abbildung 21: FEM-Simulation des Konzentrationsverlaufes in der xz-Ebene, senkrecht zur Flussrichtung bei Zuflussraten von a) 76:760 nl/s und b) 76:76 nl/s.

Konzentration 0 vorgegeben, an den Zuflüssen für den Marker verschiedene Konzentrationen c_0 . Am Auslass wurde reine konvektive Strömung als Randbedingung gesetzt, da hier diffusive Prozesse keine Rolle spielten.

Die Kanalwände unterbinden jeglichen Massenstrom, sodass dort Isolation als Randbedingung gesetzt wurde. Sowohl für die Diffusionskonstante, Konzentration, Dichte und die Viskosität als auch für die Strömungsgeschwindigkeiten und die Zuflussrate wurden Parameteranalysen durchgeführt und die Lösungen mit Konvergenzanalysen überprüft. Es kamen die gleichen Parameterbereiche zur Anwendung wie bei den FEM-Berechnungen in Abschnitt 3.4.3. Für die Konzentration c wurden Werte zwischen 1 mMol/l und 1 Mol/l untersucht, was dem Bereich der experimentell zugänglichen Konzentrationen von Proteinen entsprach. Die Diffusionskonstante D wurde im Bereich zwischen 1×10^{-10} und 5×10^{-9} variiert, was den Bereich der Diffusionskonstanten von Proteinen bis zu Gasmolekülen in Flüssigkeit überdeckte.

Die Ergebnisse der Parameteranalysen ergaben die Ausbildung eines stationären Zustandes für den Konzentrationsverlauf. Im beobachteten Parameterbereich hatten Dichte und Viskosität der Flüssigkeit auf die Konzentrationsverhältnisse im Flusssystem keinen relevanten Einfluss. Auch die Konzentration des Markers beeinflusste den Konzentrationsgradienten im Kanal nur linear; d.h. eine Verdoppelung der Anfangskonzentration führte zu einer Verdoppelung des Konzentrationsgradienten. Durch Variation der Flussraten in den drei Zuflüssen kann Form und Steilheit des Gradienten über weite Bereiche variiert werden. Abbildung 20 zeigt den Konzentrationsverlauf für verschiedene Flussraten. Sowohl mit ansteigender Gesamtflussrate als auch mit Erhöhung der Zuflussrate der Nebenzuflüsse kann die Steilheit des Gradienten erhöht werden. Die Analyse des Konzentrationsgradienten senkrecht zur Flussrichtung zeigte, dass sich

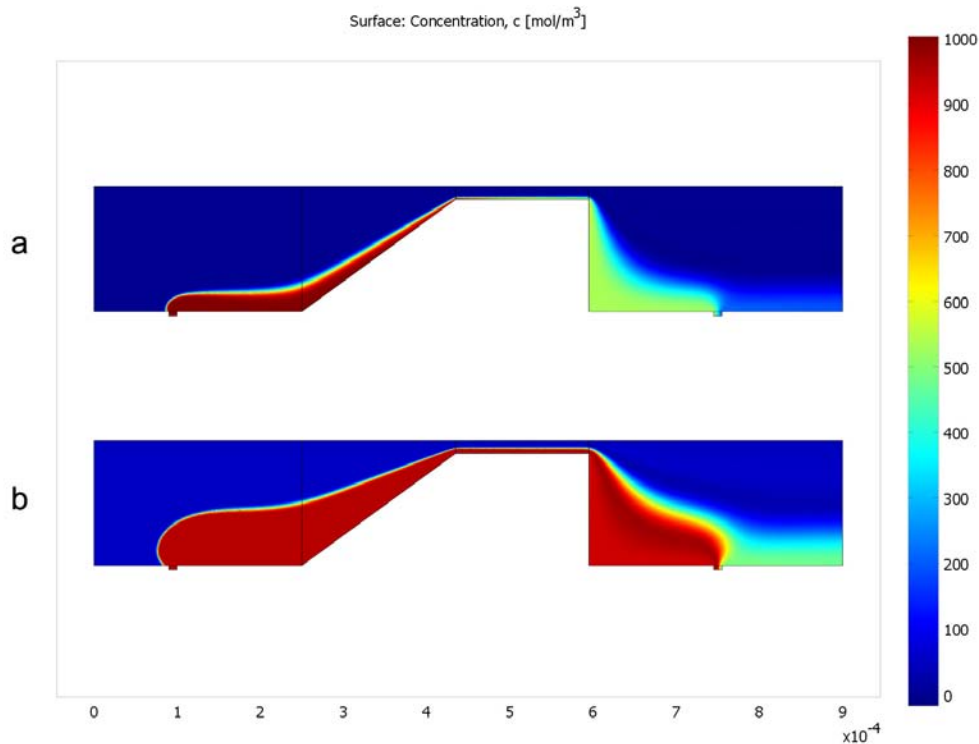


Abbildung 22: FEM Simulation des Konzentrationsverlaufes an der Kanaloberfläche bei einem Verhältnis der Flußraten zwischen Hauptkanal und Funktionalisierungszulauf von a) 1:20 und b) 1:2.

aufgrund des paraboloiden Strömungsprofils im Kanal kein linearer Gradient ausgebildet sondern ebenfalls ein paraboloides Profil.

Zudem bildete sich auch ein Konzentrationsverlauf entlang der z-Achse aus, der allerdings um mehr als eine Größenordnung kleiner war als in x-Richtung. Der Gradient in z-Richtung war nahe der Kanalwand umgekehrt gerichtet als in der Kanalmitte, da der Fluss in der Kanalmittelebene am größten war, und dadurch die Konzentration am wenigsten durch die Diffusion beeinflusst wurde.

Anwendungen solcher Konzentrationsgradienten sind beispielsweise die Untersuchung der Reaktion von Einzellern auf Konzentrationsgradienten von Nährstoffen oder, wie im Falle der *Dictyostelia*, auf den Konzentrationsgradienten eines Botenstoffes wie cyclisches Adenosin Monophosphat. Die Systeme wurden in einer Kooperation mit dem Lehrstuhl für Biophysik der Universität München zur Anwendung gebracht, Resultate der Versuche stehen aber bislang noch aus.

3.5 Aktivierung von Blutplättchen in funktionalisierten Kanälen

Die funktionalisierten Kanalsysteme wurden im Folgenden verwendet, um das Verhalten von Blutplättchen in modellierten Gefäßen zu untersuchen. Die Gefäße des Körpers sind ständig enormer Belastung ausgesetzt. So entstehen im

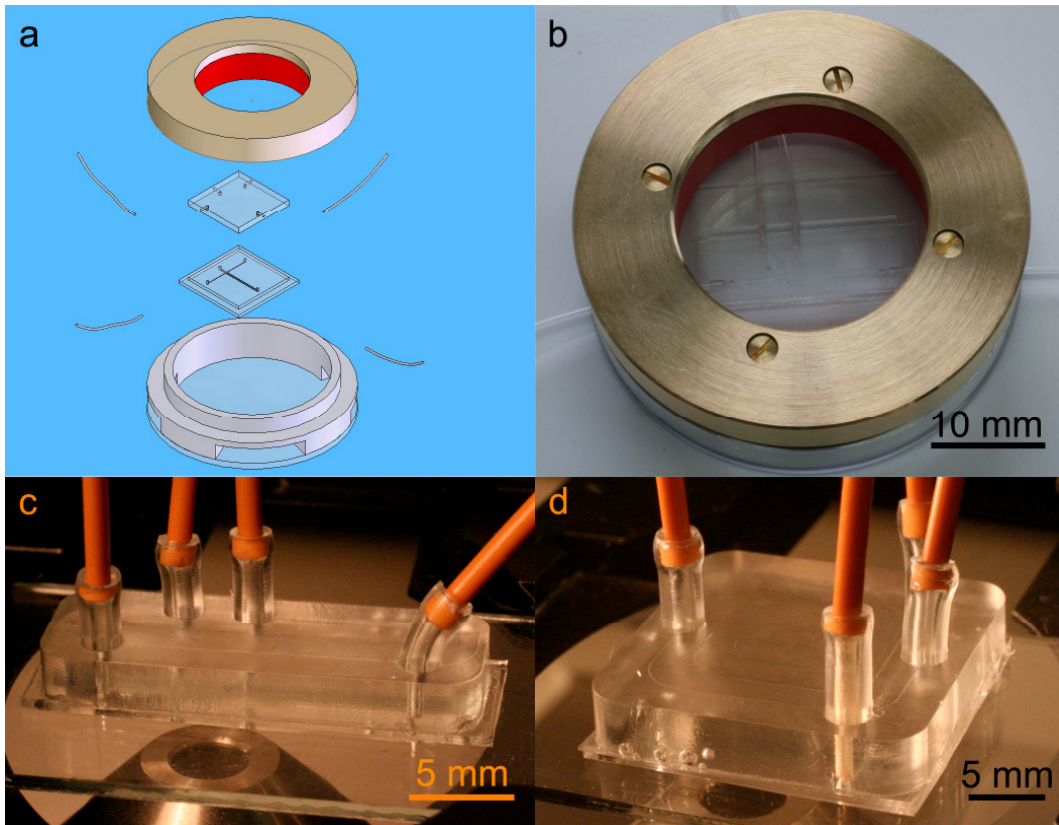


Abbildung 23: unterschiedliche Ausführungen vollständig integrierter Mikrofluidiksysteme. a und b zeigen den Aufbau für reversibel gebundene Flusssysteme, c und d zwei Ausführungen für irreversibel gebundene PDMS Systeme.

Hochdruckteil des Gefäßsystems Wandspannungen von etwa 20 - 200 KPa (Deetjen 1994). Aufgrund der fortwährenden Belastung kommt es auch im gesunden Körper ständig zu mikroskopischen Verletzungen der Gefäßwände. Um diese ständigen Verletzungen zu reparieren, hat sich im Verlauf der Evolution ein komplexes und höchst wirkungsvolles System der Blutstillung und Wundheilung herausgebildet, das im gesunden Zustand jede Beschädigung der Gefäße sofort repariert, ohne durch übermäßige Aktivität Thrombosen im Gefäßsystem zu erzeugen.

Das Gerinnungssystem des Blutplasmas wird durch zwei parallele Aktivierungskaskaden getragen, die insgesamt 12 Faktoren beinhalten, die in den Ablauf eingreifen. Der plasmatischen Gerinnung ist eine zelluläre Phase zeitlich vorgelagert, die für die vorliegenden Studien von besonderem Interesse war. Wichtigster Träger der zellulären Phase sind die Blutplättchen, scheibenförmige Zellen von rund 3 μm Durchmesser. Ein gesunder Mensch besitzt etwa 150000 – 400000 / μl Blut. Sie sind damit nach den roten Blutkörperchen die häufigsten Zellen im Blut. Die Anlagerung von Blutplättchen in der Nähe einer Verletzung ist einer der ersten Schritte im Gerinnungssystem (Blockmans 1995).

Blutplättchen können durch eine Reihe von Einflüssen voraktiviert werden. Neben verschiedenen Botenstoffen, die von bereits aktivierten Blutplättchen

ausgeschüttet werden, gehört vor allem die Belastung durch Scherkräfte zu den entscheidenden äußeren Einflüssen. Plättchen, die solch einen Stimulus erfahren haben, beginnen zunächst eine Rollbewegung auf der Oberfläche der Gefäßwand, bei der sie abgebremst werden. Durch Kontakt mit den durch die Verletzung freigelegten Faktoren – unter anderem Kollagen, von-Willebrand-Faktor und Plättchen aktivierender Faktor (PAF) – bildet das Blutplättchen mit Hilfe seiner faktorspezifischen Rezeptoren vorübergehende Bindungen an diese Adhäsionspunkte.

Das aktuell weitgehend akzeptierte Modell der Wechselwirkung zwischen der Zelle und den aktivierenden Faktoren beschreibt eine Reihe von Glykoproteinen (GP) als wesentliche Träger der Aktivierung. Demnach sind die Glykoproteine GPIaIIa, GPIV sowie GPVI für die Interaktion mit Kollagen zuständig. Die Wechselwirkung der Zelle mit vWF wird GPIb zugeordnet, das seinerseits über eine Signalkette den Glykoproteinkomplex GPIIbIIIa aktiviert, der in der Folge eine irreversible Bindung mit den Fasern des aktivierten vWF vermittelt. Die zahlreichen vorübergehenden Bindungen sorgen insgesamt für eine weitere Aktivierung und gleichzeitige Verlangsamung der Thrombozyten, sodass sie schließlich fähig sind eine bleibende Anhaftung an das Substrat aufzubauen. Mit der fortschreitenden Adhäsion des Thrombozyten an die Substratoberfläche geht auch eine ausgeprägte Veränderung der Form einher. Obwohl diese Formveränderung einen wesentlichen Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion hat, sind die einzelnen Parameter wie Volumen- oder Dickenänderung der Blutplättchen bisher nicht untersucht. Auch die explizite Rolle der verschiedenen Glykoproteine ist noch nicht endgültig verstanden, obwohl viele Teile dieses Aktivierungssystems bereits gut untersucht wurden. Modellsysteme, die spezifisch einzelne Faktoren präsentieren und ansonsten die Eigenschaften natürlicher Gefäße möglichst realitätsnah nachbilden, können hier eine wertvolle Hilfestellung leisten.

Die im Rahmen der Arbeit entwickelten Kanalsysteme wurden zunächst dazu verwendet, einen möglichen Einfluss von SU-8 Oberflächen auf die Aktivierung von Blutplättchen zu untersuchen. Von ähnlichen Versuchen wurde bereits in einer früheren Veröffentlichung berichtet (Weisenberg 2002). Allerdings wurde diese unter statischen Adhäsionsbedingungen durchgeführt und bietet daher auf Grund der fehlenden Scherung der Thrombozyten nur einen beschränkten Informationsgehalt. Es wurden deshalb Perfusionsexperimente mit menschlichen Blutplättchen in mikrofluidischen Flusssystemen aus PDMS durchgeführt, die auf SU-8 Substrate aufgebondet wurden. Die SU-8 Oberflächen waren zum Teil mit Plasma vorbehandelt um auch den Einfluss der Plasmaaktivierung auf die Reaktion der Thrombozyten zu bestimmen. Als Kontrolle wurden zudem Experimente mit Glassubstraten durchgeführt und die Aktivierungsstadien der Blutplättchen mit Hilfe eines Rasterkraftmikroskops kategorisiert. PDMS wurde

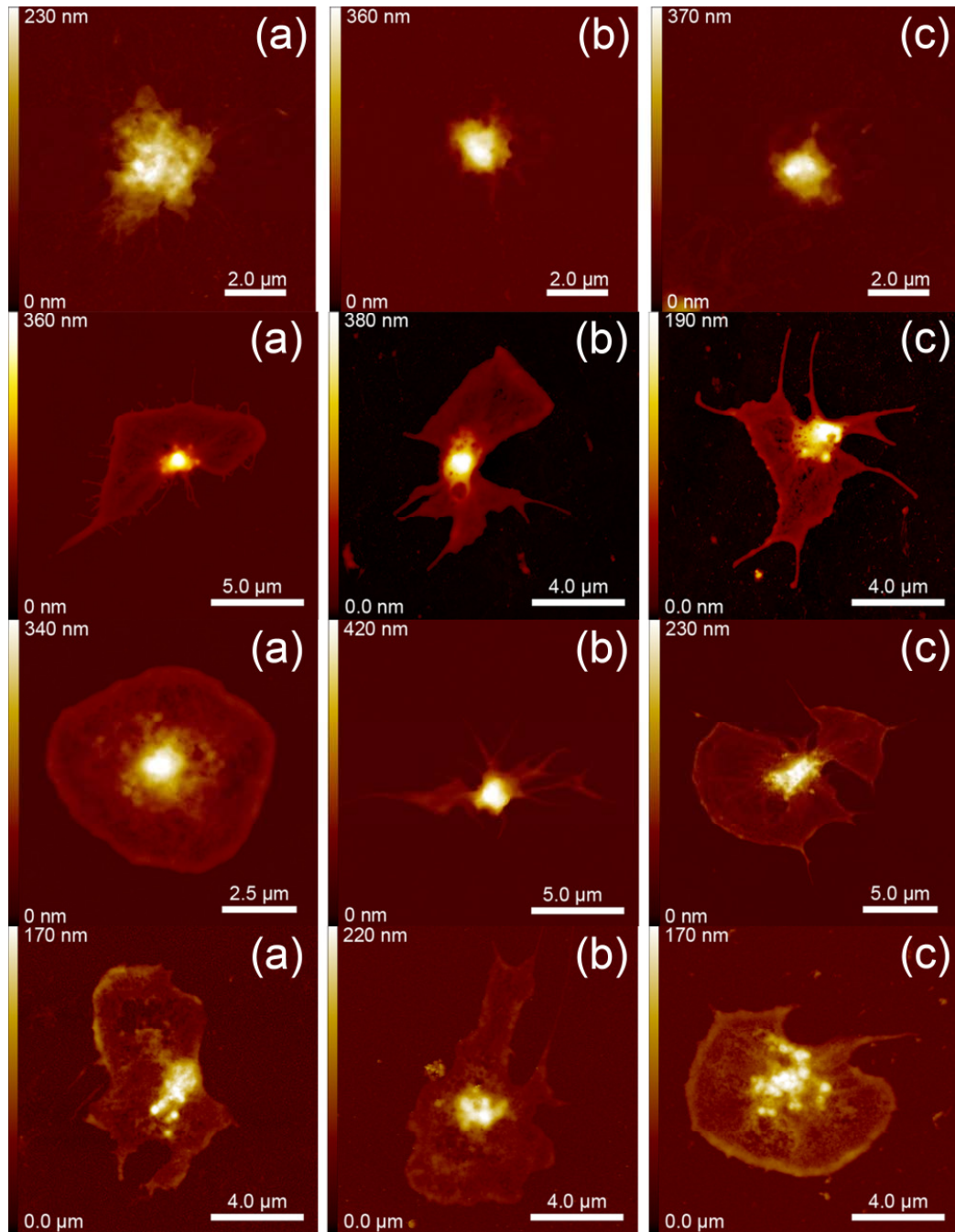


Abbildung 24: Thrombozyten auf unterschiedlichen Substraten. 1) Glassubstrat 2) unbehandeltes SU-8 3) SU-8 nach 2 Minuten O₂-Plasmabehandlung 4) nach 8 Minuten O₂-Plasmabehandlung [mit freundlicher Genehmigung M. Janko, unveröffentlicht].

als Material für die Kanäle verwendet, da es bei der Plasmaaktivierung die dem Bondingprozess vorausgeht eine SiO₂ Schicht an der Oberfläche ausbildete und dadurch ähnliche Hämokompatibilitätseigenschaften aufwies wie Glas. Zudem ergaben Vorversuche keine Aktivierung der Thrombozyten durch das mit Sauerstoffplasma behandelte PDMS. Abbildung 23 zeigt den Aufbau der verwendeten Flusssysteme. Für reversibel gebondete Kanalsysteme wurde ein Systemhalter entwickelt (a und b), der die Möglichkeit bietet während der Perfusion die eingelegten Systeme unter einem beliebigen optischen Mikroskop

zu begutachten. Aufgrund der Verschraubung von Ober- und Unterteil des Halters kann auf die Systeme anpassbar Druck ausgeübt werden und diese dadurch optimal abgedichtet werden. Für irreversibel gebundene PDMS Systeme wurden Anschlussysteme aus PDMS entwickelt, die selbst mittels Plasmabondings mit dem PDMS Kanalsystem verbunden wurden. Besonderer Vorteil dieser Variante ist die Möglichkeit das gesamte System aus PDMS aufzubauen. Beide Systeme wurden mit Drücken bis zu 300 mbar getestet und zeigten keine Undichtigkeiten.

Für die Perfusion wurde plättchenreiches Plasma (PRP) durch mehrere Wasch und Zentrifugationsschritte aus dem Blut gesunder Freiwilliger gewonnen. Das exakte Protokoll für die Aufbereitung folgt den Vorgaben aus der Publikation von Maßberg *et al.* (1998) und ist in Anhang 7.1.2 abgedruckt. Das plättchenreiche Plasma wurde auf eine Endkonzentration von 200000 Plättchen/ μl eingestellt und bei einer Scherrate von 130 s^{-1} durch das Mikrofluidiksystem perfundiert. Während der 15 minütigen Perfusion konnte das Fortschreiten der Adhäsion lichtmikroskopisch überwacht werden. Unmittelbar nach der Perfusion wurden die Proben mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit dem Rasterkraftmikroskop abgebildet. Die gewonnenen Daten wurden hinsichtlich bedeckter Grundfläche, Volumen, Umfang sowie bezüglich ihrer Zirkularität analysiert, wie sie von Park *et al.* als ein Parameter zur Analyse der Aktivierung von Blutplättchen vorgeschlagen wurde (Park 1990).

Die Analyse zeigte drei unterscheidbare Formenklassen, die mit Aktivierungsstadien in Übereinstimmung gebracht werden konnten: oblate Plättchen, die auf eine nur geringe Aktivierung und nur vorübergehende Adhäsion hinwiesen, solche mit ausgeprägten Pseudopodien, die mit Plättchen identifiziert werden konnten, welche bereits eine endgültige Adhäsion, aber noch nicht ihre volle Aktivierung erreicht hatten und vollständig ausgebreitete Plättchen, die das Endstadium ihrer Aktivierung erreicht hatten und bereits sehr fest an der Oberfläche verankert waren.

Abbildung 24 zeigt Thrombozyten die auf den oben beschriebenen, verschiedenen Substraten perfundiert wurden. Die Bilder der ersten Zeile sind auf Glas entstanden. Die Thrombozyten zeigten eine kompakte Struktur mit nur vereinzelten Pseudopodien, wie sie für gering aktivierte Zellen typisch ist und bedeckten im Mittel eine Fläche von etwas weniger als $18 \mu\text{m}^2$.

Demgegenüber war bereits bei den Zellen auf unbehandeltem SU-8, die in der 2. Zeile zu sehen sind, eine wesentlich stärkere Aktivierung mit deutlicher Ausbildung von Pseudopodien zu erkennen. Sie bedeckten mit ca. $29 \mu\text{m}^2$ auch eine erheblich größere Fläche. Die 2 minütige Plasmabehandlung des SU-8 steigerte die Aktivierung weiter, sodass dort bereits voll adhärierte Zellen zu finden waren. Wie in der dritten Zeile von Abbildung 24 zu erkennen ist, waren bei den dort gefundenen Zellen die Flächen zwischen den Pseudopodien bereits

mit Zellmaterial ausgefüllt. Auch die bedeckte Fläche war daher nochmals angestiegen und erreichte im Mittel nun über $30 \mu\text{m}^2$.

Die Bilder der vierten Zeile, die Zellen von der Oberfläche des 8 Minuten behandelten SU-8 wiedergibt, zeigen neben einer starken Aktivierung der Thrombozyten zudem eine erhebliche Menge an Zellbruchstücken. Diese sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass es auf der sehr hydrophilen Oberfläche des SU-8 zu besonders starkem Tethering – vorübergehendem Anhaften der Zellen auf der Oberfläche – kam, so dass die Thrombozyten besonders großen Kräften ausgesetzt wurden, was letztlich zum Abreißen von Teilen der Zellen während der ersten Phase der Adhäsion führte. Dies steht auch in Einklang mit der Beobachtung, dass die mittlere bedeckte Fläche im Vergleich zu den anderen SU-8 Oberflächen wieder eine Abnahme zeigte und nur noch bei ca. $25 \mu\text{m}^2$ lag. Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, waren auch auf allen SU-8 Oberflächen schwächer aktivierte Zellen präsent. Dies entspricht den Erwartungen, da während der gesamten Perfusionszeit Thrombozyten in das System eingespült wurden. Zellen, die den Kanal erst gegen Ende der Perfusionszeit erreichten, hatten daher nur eine wesentliche kürzere Zeit zur Verfügung, um in der Aktivierung voranzuschreiten, als solche, die schon zu Beginn der Perfusion in den Kanal gepumpt wurden.

Ein Vergleich der Verteilungen der Aktivierungsstadien zeigte einen Anstieg des Anteils stark aktivierter Thrombozyten beim Übergang von Glas zu SU-8 als Substrat, sowie mit zunehmender Zeit der Plasmabehandlung. Zudem zeigten die Ergebnisse, dass SU-8, insbesondere nach Oberflächenaktivierung durch O_2 -Plasma, die Aktivierung von Blutplättchen wesentlich erhöht.

3.6 Modellsystem für Stenosen

Um die Verwendbarkeit mikrofluidischer Kanäle als Modellsysteme für Untersuchungen zur Blutgerinnung zu demonstrieren, wurden zusätzlich Versuche zur Thrombusbildung in Kanalsystemen mit einer modellierten Stenose durchgeführt. Entsprechend der oben genannten Ergebnisse wurde als Trägermaterial der Funktionalisierung Glas gewählt und die Systeme selbst aus PDMS erstellt, um eine Aktivierung der Thrombozyten durch die Anwesenheit von SU-8 auszuschließen. Die Kanäle wurden, wie oben beschrieben, nach Aufbenden des Kanalsystems zunächst im Bereich der Stenose mit Kollagen aus einer Lösung beschichtet. Nach der Beschichtung waren die Kanäle im Bereich der Stenose auf Seiten der Einschnürung mit Kollagen bedeckt.

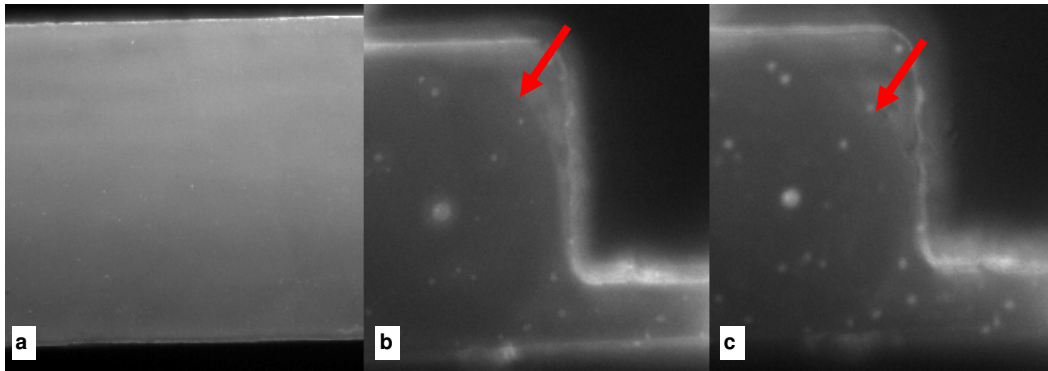


Abbildung 25: a) Kanal vor der Einschnürung, 4 Minuten nach Beginn der Perfusion b) die Region unmittelbar hinter der Einschnürung 10 und 20 Minuten nach Beginn der Perfusion. Die Pfeile weisen auf den Rand der Ablagerungen.

Die für den Versuch gewonnenen Thrombozyten wurden mit Fluoreszenzfarbstoff markiert und zu PRP resuspendiert. Dieses wurde im Volumenverhältnis 1:1 mit Erythrozyten vermischt, um ein annähernd physiologisches Verhältnis zwischen flüssigen und zellulären Bestandteilen herzustellen. Die Anreicherung des PRP mit Erythrozyten war für dieses Experiment erforderlich, da Erythrozyten an der Thrombusbildung beteiligt sind, indem sie in Thromben eingelagert werden. Die Suspension wurde anschließend bei einer Volumengeschwindigkeit von $0,01 \mu\text{l/s}$ durch den Kanal gepumpt. Dies entspricht der Fließgeschwindigkeit in großen Arteriolen wie sie durch das Modellsystem nachgebildet werden und bewirkte mittlere lineare Geschwindigkeiten von $400 \mu\text{m/s}$. Im Bereich der Einschnürung stieg die mittlere Geschwindigkeit auf das Zehnfache an. Der Anstieg der mittleren Geschwindigkeit und die gleichzeitige Abnahme der Kanalbreite, bewirkten einen starken Anstieg der Scherrate. Finite-Elemente-Berechnungen ergaben für die verwendete Schergeschwindigkeit eine Zunahme der Scherrate von unter 100 s^{-1} auf mehr als 2000 s^{-1} in der Stenose (eine ausführlichere Diskussion der FEM-Simulation ist im Abschnitt zu den FEM Rechnungen in Kapitel 3.1.3 zu finden). Während der gesamten Perfusionszeit wurde das System mit Hilfe einer Hochgeschwindigkeitskamera durch ein Lichtmikroskop beobachtet. Im Bereich vor der Einschnürung des Kanals ergab die Beobachtung auch nach mehreren Minuten der Perfusion keinen Hinweis auf eine nennenswerte Ablagerung von Thrombozyten (Abbildung 25 a).

Demgegenüber begannen sich bereits kurz nach Beginn der Perfusion im Bereich hinter der Stenose Erythrozyten und Thrombozyten abzulagern (Abbildung 25 b und c). Die Ablagerung ist im Bild als grauer Schleier zu erkennen, welcher durch die Mischung der fluoreszenzmarkierten Blutplättchen und der nicht markierten Erythrozyten zustande kam. Die hell abgesetzten Punkte, die im Kanal zu erkennen sind, konnten auf Aggregate adhärerter Thrombozyten zurückgeführt werden. Die größere Signalintensität der Aggregate ist durch den, im Vergleich zur Ablagerung im Strömungsschatten der Stenose, höheren Anteil an Thrombozyten bedingt. Die beobachtete Ablagerung einer Mischung aus

Blutplättchen und roten Blutkörperchen entsprach den Erwartungen, da sich hinter der Stenose ein Bereich sehr niedriger Strömungsgeschwindigkeit ergab, die in dieser Form auch durch die Simulationsrechnungen vorhergesagt wurde.

Die durch die großen Scherraten im Bereich der Einschnürung aktivierten Thrombozyten konnten sich dadurch leicht an den mit Kollagen beschichteten Kanalwänden anlagern. In der Folge bildeten sich Unebenheiten, sodass sich zusätzlich rote Blutkörperchen ablagerten. Die Menge an adhärennten Zellen nahm mit dem weiteren Verlauf der Perfusion weiter zu, bis es nach etwa 25 Minuten zum vollständigen Verschluss des Kanals im Bereich der Stenose kam. Die mikroskopische Analyse des Thrombus zeigte ein sehr intensives Fluoreszenzsignal am Zufluss des verengten Kanalteilstückes und ist auf eine massive Anlagerung von Thrombozyten zurückzuführen.

Die Versuche konnten die Einsetzbarkeit des Mikrokanalsystems für die Untersuchung pathologischer Vorgänge im Gefäßsystem nachweisen. Die Ausbildung des Thrombus im Strömungsschatten der modellierten Stenose eröffnet die Möglichkeit, den Einfluss unterschiedlicher Faktoren des Gerinnungssystems auf die Thrombusbildung zu untersuchen.

3.7 Blattfedersensoren zur Analyse von Flüssigkeiten und Suspensionen

Neben den Versuchen zum Verhalten von Zellen in den mikrofluidischen Kanälen wurden Versuche mit Blattfedersensoren in den Kanälen durchgeführt. Die Versuche hatten zwei Zielrichtungen: zum einen die Etablierung eines Verfahrens zur Messung der fluidischen Eigenschaften von Flüssigkeiten, das heißt ihrer Viskosität und Dichte, zum anderen die Machbarkeitsuntersuchung eines Sensors der direkt in der Flüssigkeit die Adhäsion von Zellen am Blattfedersensor misst. Beide Anwendungen basierten auf der Analyse der mechanischen Eigenschaften einer in ein mikrofluidisches System eingebetteten Mikroblattfeder.

Die Idee, schwingende Balken zur Messung fluidischer Eigenschaften von Flüssigkeiten zu verwenden, existiert bereits seit längerer Zeit. Ursprünglich entwickelte sich dieser Ansatz im Bereich der Schiffbautechnik, wo erste Versuche zum Verhalten von schwingenden Platten in Flüssigkeiten durchgeführt wurden (Lindholm 1965). Mit der Miniaturisierung der vergangenen Jahre und der Entwicklung mikroskopischer Blattfedern im Zuge der Rasterkraftmikroskopie steht heute eine weite Palette an mikroskopischen Blattfederstrukturen zur Verfügung, so dass die Blattfedern als Mikrosensoren ein breites Interesse auf sich gezogen haben (Sader 1995, Oden 1996, Sader 1998, Sader 1999, Boskovic 2002, Agoston 2005, Green 2006). Aus diesen Ansätzen haben sich zwei verschiedene Messprinzipien herauskristallisiert, je nachdem ob die

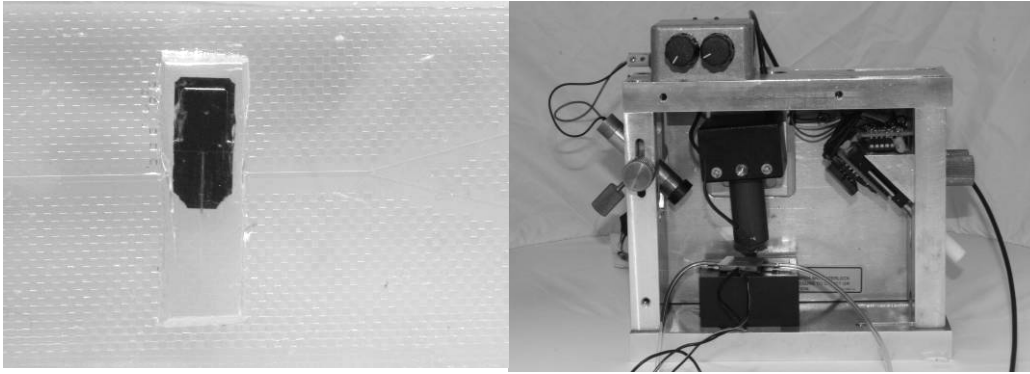


Abbildung 26: a) in das Mikrofluidiksystem eingebettete Blattfeder b) Aufbau für die Lichtzeigerdetektion.

Blattfedersensoren extern zu Schwingungen angeregt werden (Bergaud 2000) oder rein auf thermisches Rauschen reagieren (Oden 1996, Ahmed 2001).

Gemein ist beiden Methoden die Analyse des Resonanzspektrums der Blattfedern. Aus der Lage der Resonanzfrequenz und der Güte der Schwingung können dabei gleichzeitig Dichte und Viskosität der die Blattfeder umgebenden Flüssigkeit bestimmt werden. Da die Bewegung der durch thermisches Rauschen angeregten Sensoren durch die theoretischen Modelle exakter beschrieben wird (Xu 2007), wurden diese für die Viskositätsmessungen verwendet. Als Testflüssigkeiten kamen Zuckerlösungen zum Einsatz, da Zucker ein häufiger Bestandteil biologischer Flüssigkeiten ist.

3.7.1 Messsystem für rheologische Eigenschaften von Fluiden

Zur Messung der Resonanzspektren wurden die Blattfedern in ein mikrofluidisches Kanalsystem integriert und Verbiegungen der Feder mittels Lichtzeigerdetektion, wie sie aus dem AFM bekannt ist, ausgelesen. Der Messaufbau sowie das Mikrofluidiksystem sind in Abbildung 26 wiedergegeben, eine detailliertere Beschreibung des Messsystems ist in Manuskript 4 zu finden. Das entstehende Signal wurde anschließend fouriertransformiert. Aus dem Frequenzverhalten wurde durch Anfitzen der Bewegungsgleichung des gedämpften harmonischen Oszillators (siehe Gleichung 1 in Manuskript 4) die Resonanzfrequenz sowie die Güte des Schwingers ermittelt. Nach der Theorie für die Bewegung rechteckiger Blattfedern in viskosen Flüssigkeiten (Sader 98; Boskovic 02), sind Viskosität ρ und Dichte η der umgebenden Flüssigkeit, sowie Resonanzfrequenz ω_r und Güte Q des Schwingers über die Formeln

$$\omega_R = \frac{\omega_{vac}}{\sqrt{1 + \frac{\pi \rho b^2}{4\mu} \Gamma_r(\omega_R)}}, \quad (6)$$

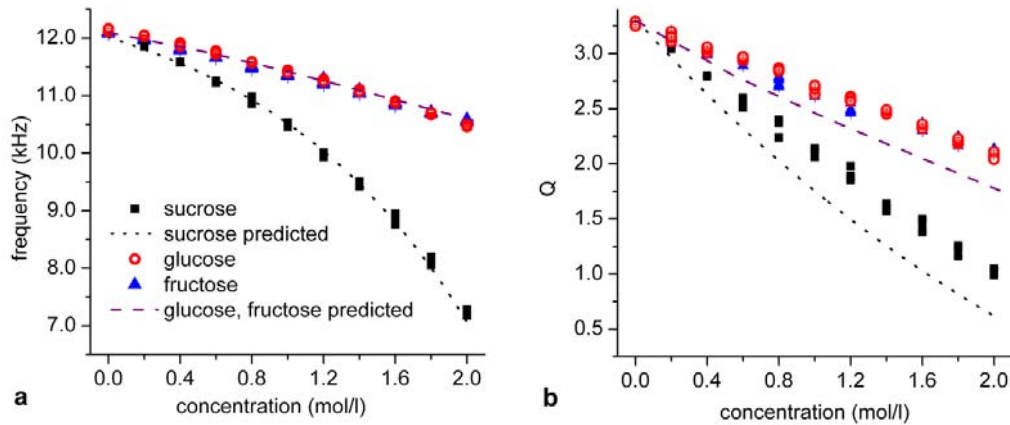


Abbildung 27: Abnahme a) der Resonanzfrequenz und b) der Güte mit zunehmender Zuckerkonzentration eines der verwendeten Sensoren [entnommen aus Manuskript 4, M. Hennemeyer et al., *Sensors* 8, (2008), 10-22].

$$Q = \frac{4\mu}{\pi\rho b^2 + \Gamma_r(\omega_R)} \cdot \Gamma_i(\omega_R) \quad (7)$$

gekoppelt. Hierbei fließen nur die Breite b und die lineare Massendichte μ als Eigenschaften der Blattfeder in die Gleichung ein, sowie die hydrodynamische Funktion $\Gamma(\omega)$. Diese weist für Blattfedern mit rechteckigem Querschnitt eine komplexe Form auf. Auch sie ist aber außer von der Frequenz nur von der Dichte und Viskosität der umgebenden Flüssigkeit abhängig sowie von der Breite der Blattfeder. Ihre exakte Form kann in der Veröffentlichung von Sader (1998) zum Frequenzverhalten von Blattfedern in viskosen Medien nachgelesen werden. Zur Ermittlung der Eigenschaften der Testflüssigkeiten musste das System zunächst mit bekannten Flüssigkeiten kalibriert und anschließend die Gleichungen 6 und 7 numerisch gelöst werden.

Die Messungen ergaben die theoretisch beschriebenen Verschiebungen der Resonanzfrequenz und Güte des Sensors zu niedrigeren Werten mit zunehmender Konzentration der verschiedenen Zucker in der Lösung, wie aus Abbildung 3 in Manuskript 4 hervorgeht.

Abbildung 27 zeigt, dass die gemessenen Resonanzfrequenzen den auf Basis der oben eingeführten theoretischen Beschreibung vorhergesagten Werten entsprachen. Demgegenüber waren die gemessenen Güten durchweg höher als aus den theoretischen Vorhersagen hervorgeht. Eine mögliche Erklärung für die Abweichung von den theoretischen Werten könnte in einer Absorption von Energie aus dem Laser und einer dadurch verursachten Erwärmung der Zuckerlösungen liegen. UV/Vis-Absorptionsmessungen an den Zuckerlösungen ergaben eine messbare Absorption im Wellenlängenbereich des Lasers. Das Absorptionsspektrum ist in Abbildung 5 in Manuskript 4 wiedergegeben. Obwohl der absorbierte Anteil der Laserenergie mit maximal 5 % sehr gering war, kann ein messbarer Einfluss auf Grund der sehr kleinen Volumina und der hohen

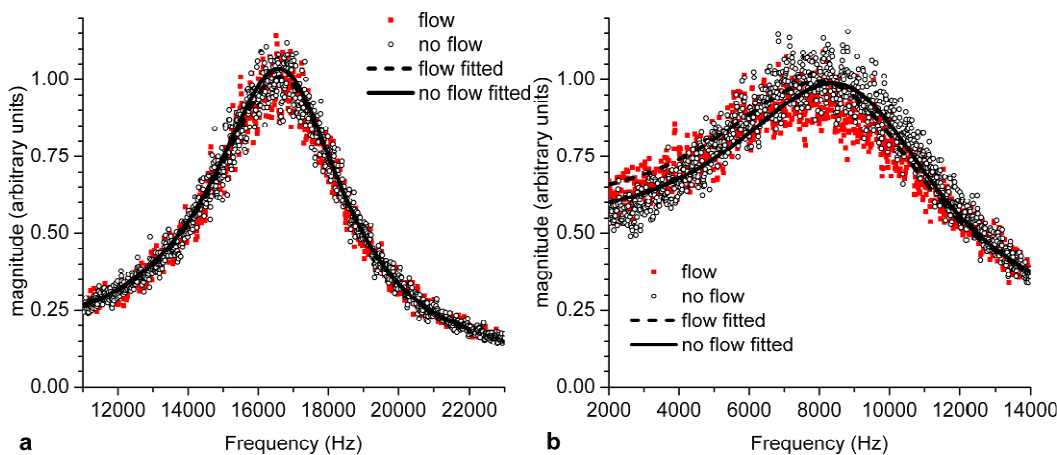


Abbildung 28: Einfluss einer im System vorhandenen Strömung. Während bei reinem Wasser (a) kein Einfluss erkennbar ist verschiebt sich bei einer Saccharoselösung mit 2 mol/l Konzentration (b) der Resonanzpeak bei einer Strömung von $3\mu\text{l/s}$ um 150 Hz zu niedrigeren Frequenzen im Vergleich zu ruhender Flüssigkeit [entnommen aus *Manuskript 4, M. Hennemeyer et al., Sensors 8, (2008), 10-22*].

Energiedichte des Lasers nicht ausgeschlossen werden. Eine Veränderung der Temperatur des Gesamtsystems wurde durch eine im Messaufbau integrierte Temperaturüberwachung ausgeschlossen. Dennoch könnte eine lokale Erwärmung durch den örtlich begrenzten Einfluss des Lasers vorliegen.

Um den Einfluss der Absorption von Laserenergie auf die Viskosität der Lösung zu untersuchen, wurden zusätzliche Tests mit und ohne aktiven Fluss der Lösung durch die Messkammer durchgeführt. Aus Abbildung 28 ist zu erkennen, dass es bei den Versuchen an Saccharoselösungen durch das Zuschalten einer Strömung zu einer Verschiebung der Peakfrequenz zu niedrigeren Werten kam. Die Strömung selbst scheint dabei keinen Einfluss zu haben, da bei Versuchen in reinem Wasser keine Verschiebung der Peakfrequenz erkennbar war. Die Vernachlässigbarkeit von dynamischen Effekten der Strömung bei kleinen Strömungsgeschwindigkeiten bestätigt auch eine kürzlich veröffentlichte Studie an organischen Flüssigkeiten (Etchart 2008).

Der Einfluss der Heizung durch den Laser auf die Viskosität der Flüssigkeit war allerdings zu klein, um die gesamte Abweichung der Messwerte zu erklären. Da eine direkte Klärung des Phänomens nicht erreicht werden konnte, wurde versucht die Abweichung durch Einführen einer Korrekturfunktion auszugleichen und vorhersagbar zu machen. Die Korrekturfunktion wurde mit Hilfe des Levenberg-Marquardt-Algorithmus auf Basis einer Dreipunkt Exponentialfunktion ermittelt. Mit Hilfe dieser Korrekturfunktion konnte die Abweichung bei der Ermittlung der Viskositätswerte auf weniger als 10 % eingeschränkt werden im Vergleich zu mehr als 110 % Streuung ohne Korrektur. Obwohl die Korrektur rein phänomenologisch war, bot sie dennoch die Möglichkeit, Messungen an Zuckerlösungen mit deutlich gesteigerter Verlässlichkeit durchzuführen.

3.7.2 Multileversysteme für die Zelldetektion

Abschließend wurde untersucht, ob das Prinzip der Blattfedersensoren für die Detektion von Zelladhäsionen in Flüssigkeit verwendbar ist. Da Vorversuche mit dem vorgestellten Messsystem mit einzelnen Federbalken eine zu geringe Empfindlichkeit ergaben, um Zelladhäsion zu detektieren, wurden weitere Versuche an einem kommerziellen Sensorsystem mit einem Array bestehend aus 8 Blattfedern durchgeführt (Hubler 2003). Grundlage der Detektion ist auch hierbei eine Messung der Peakfrequenz des gedämpften Schwingers sowie die Verschiebung dieser. Sie wird in diesem Fall jedoch vor allem durch die Anlagerung von zusätzlicher Masse an die Blattfeder bedingt (Lang 2005). Um den Blutplättchen unterschiedliche Oberflächen zur Adhäsion zur Verfügung zu stellen, wurden die Blattfedern im Vorfeld mit Proteinen aus der zuvor beschriebenen Gruppe der extrazellulären Matrixproteine beschichtet.

Die Beschichtungen wurden mit Hilfe von Kapillaren durchgeführt, die eine auf einzelne Blattfedern begrenzte Funktionalisierung ermöglichten. Dadurch wurde gewährleistet, dass in jedem verwendeten Array sowohl beschichtete als auch unbeschichtete Blattfedern zur Verfügung standen und somit vergleichende Messungen ermöglicht wurden. Der Beschichtungsvorgang ist für zwei der Sensoren in Abbildung 29 a) zu sehen. Nach der Funktionalisierung wurden die Blattfedern in eine Flusskammer eingebaut und die Kammer mit plasmaartiger Salzlösung (Tyrodes-Lösung) gefüllt. Die Injektion des eigentlichen PRP erfolgte über ein Sechsport-Ventil, wie es auch in der Flüssigchromatographie Anwendung findet. Dadurch wurde eine exakte Steuerung der Perfusionsdauer gewährleistet.

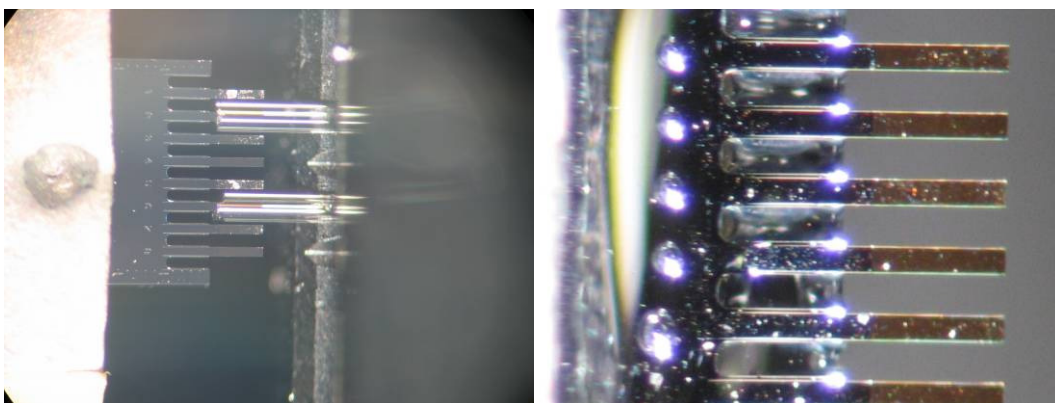


Abbildung 29: a) Blattfederarray während der Funktionalisierung einzelner Federn durch Kapillaren b) ein Array nach Perfusion von PRP durch die Messkammer. Auf der Oberfläche ist eine deutliche Anlagerung von Thrombozyten zu erkennen.

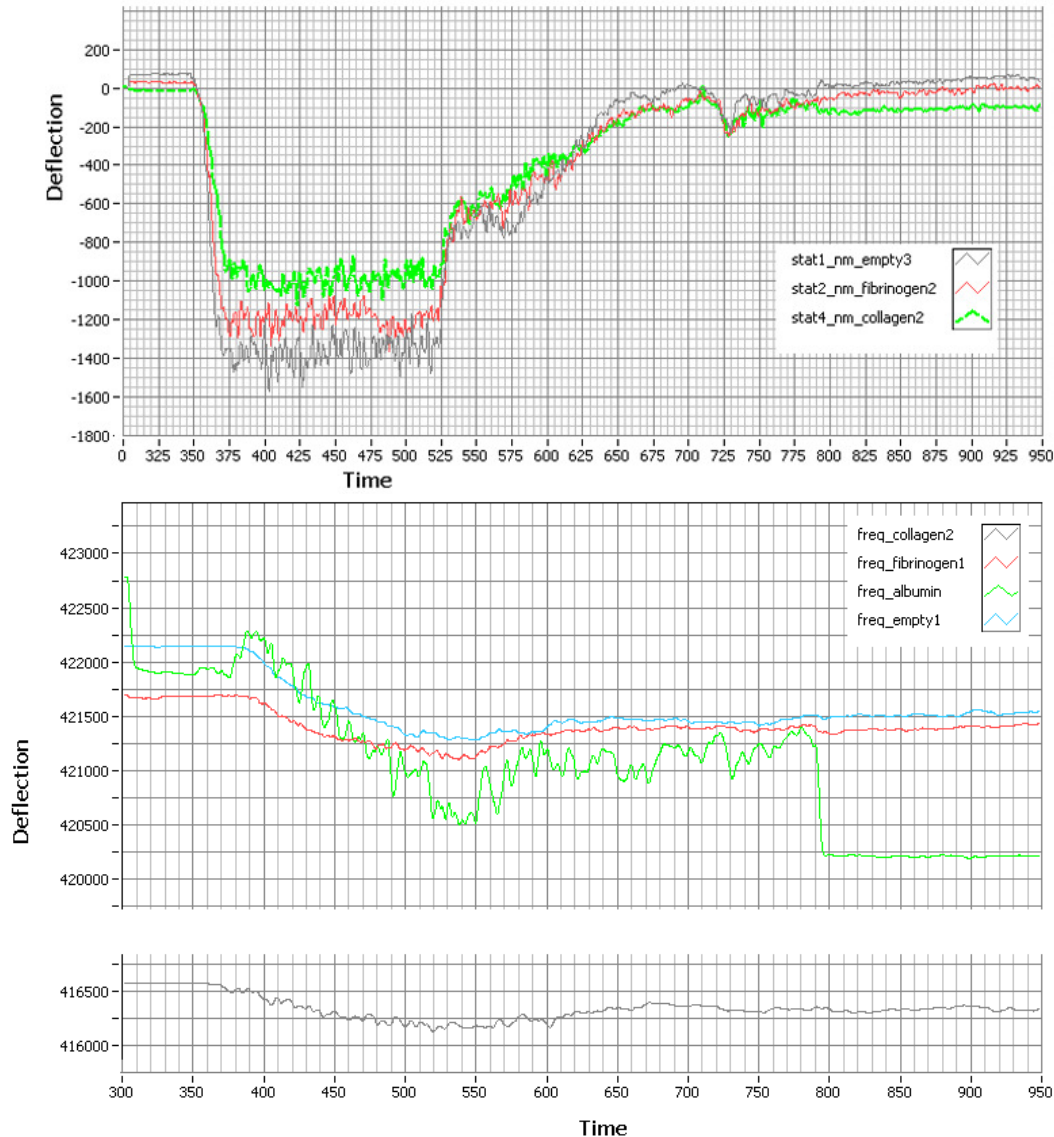


Abbildung 30: quasistatisches (oben) und dynamisches (unten) Signal des Sensorarrays. Das statische Signal zeigt einen vorübergehenden Ausschlag, das dynamische Signal zeigt eine Erniedrigung der Peakfrequenzen die auch nach Beendigung der PRP Perfusion nicht vollständig rückgebildet wird.

Während der gesamten Perfusion wurden sowohl die Frequenzantwort der Blattfedern als auch deren mittlere Verbiegung überwacht. Das Ergebnis der Messungen ist in Abbildung 30 wiedergegeben. Während die scheinbare statische Verbiegung tatsächlich auf Veränderung der optischen Eigenschaften der Flüssigkeiten zurückgeführt werden muss (siehe hierzu auch ähnliche Ergebnisse in früheren Studien, so z.B. in Pera *et al.* (2007)), kann die im Verlauf der Perfusion festgestellte Frequenzveränderung nur durch die Anlagerung von zusätzlicher Masse an die Oberfläche erklärt werden.

Die Peakfrequenz der Blattfedern sank bei allen Blattfedern im Schnitt um maximal 350 Hz und stieg nach Ende der PRP Perfusion wieder um rund 100 Hz an. Daraus folgt, dass ein Teil der Frequenzantwort durch die Veränderung der rheometrischen Eigenschaften der Nährlösung bzw. des PRP verursacht wurde.

Lediglich die verbleibende Reduktion der Resonanzfrequenz um 250 Hz wurde durch die Anlagerung von Blutplättchen verursacht. Die mikroskopische Inspektion der Blattfedern nach den Perfusionsexperimenten zeigte eine deutliche Anlagerung von Partikeln auf der Oberfläche der Blattfedern, wie in Abbildung 30 b) ersichtlich. Ein messbarer Unterschied der Frequenzantwort zwischen den verschiedenen funktionalisierten Blattfedern konnte allerdings nicht festgestellt werden. Trotzdem zeigten die Versuche die prinzipielle Verwendbarkeit von Blattfederarrays zum Nachweis von Zelladhäsionen.

4 Resümee und Ausblick

Die im Rahmen der Arbeit entwickelten mikrofluidischen Systeme demonstrieren die vielseitige Anwendbarkeit der Mikrointegration auf dem Gebiet der biomedizinischen Analytik. Die in der Arbeit etablierten Verfahren für die Herstellung mikrofluidischer Kanalstrukturen und die Verbindung zu 3-dimensionalen Systemen stellen bereits heute wichtige Prozesse für die Entwicklung von Prototypsystemen dar und werden in den kommenden Jahren auch in der Massenfertigung von biomedizinischen Systemen Bedeutung gewinnen. Die über die Strukturierung der Systeme hinausgehende lokale Funktionalisierung durch Plasmaprozesse und Proteinbeschichtungen erweitert den Anwendungsbereich solcher Mikrosysteme auf Anwendungen, bei denen spezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Zellen zu untersuchen sind. Die in der Arbeit durchgeführten Versuche an Blutzellen sind hier nur ein Beispiel. Das vorgestellte Modellsystem für die Untersuchung der Blutgerinnung und Thrombosebildung in Arteriolen und Kapillaren ist durch den einfachen Herstellungsprozess auf Basis des Rapid-Prototyping schnell verfügbar und kann zukünftig für Serientests verwendet werden. Durch die Verringerung der benötigten Blutmenge für solche Perfusionsexperimente auf etwa 1/30 der bisher nötigen Menge wird auch die Verwendung von Blut aus gentechnisch veränderten Mäusen ermöglicht werden. Dadurch wird eine Untersuchung des Einflusses bestimmter Proteine auf der Zelloberfläche ermöglicht, die mit den bisherigen Systemen nicht zugänglich war. Die fortschreitende Miniaturisierung wird in den kommenden Jahren zudem ermöglichen, Systeme zur Analyse von Zell-Oberflächen-Wechselwirkungen auch in lebende Organismen zu implantieren und somit die biologischen Prozesse ohne vorherige Aufbereitungsschritte zu beobachten. Ob für diese implantierbaren Mikrosysteme als Werkstoff auf den hier untersuchten SU-8 zurückgegriffen werden kann muss in weiteren Studien endgültig abgeklärt werden. Zwar konnte bei den Zellzuchtexperimenten keine direkt pathogene Wirkung des Werkstoffes auf Zellen festgestellt werden, dennoch kann eine krebserregende Wirkung auf Basis der Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden.

Die in die Mikrosysteme integrierten Blattfedersensoren weisen zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten auf, von der Verwendung als Viskositätsmesser im Gefäßsystem, die im Körper das Blut von Hypertoniepatienten überwachen bis hin zu hochgradig parallelisierten Sensorarrays, die in der Proteomik und in der medizinischen Diagnostik den Nachweis von Proteinen in Testflüssigkeiten vereinfachen und beschleunigen werden. Daneben sind die in die Mikrosysteme eingebetteten Blattfedersensoren ein erster Schritt in Richtung der Integration eines Rasterkraftmikroskops in ein mikrofluidisches System. Ein solches System würde es beispielsweise ermöglichen, die Vorgänge beim Anlagern und Abreißen

von Zellen auf Oberflächen unter dem Einfluss von Scherströmungen zu untersuchen.

5 Literaturverzeichnis

- Abgrall, P., V. Conedera, H. Camon, A. M. Gue and N. T. Nguyen, 2007, "SU-8 as a structural material for labs-on-chips and microelectromechanical systems", *Electrophoresis*, **28**(24): 4539-4551.
- Agoston, A., F. Keplinger and B. Jakoby, 2005, "Evaluation of a vibrating micromachined cantilever sensor for measuring the viscosity of complex organic liquids", *Euroensors XVIII 2004 - The 18th European conference on Solid-State Transducers*, **123-124**: 82.
- Ahmed, N., D. F. Nino and V. T. Moy, 2001, "Measurement of solution viscosity by atomic force microscopy", *Review of Scientific Instruments*, **72**(6): 2731-2734.
- Aimé, J. P., R. Boisgard, L. Nony and G. Couturier, 1999, "Nonlinear dynamic behavior of an oscillating tip-microlever system and contrast at the atomic scale", *Journal of Physics D: Applied Physics*, **82**(17): 3388-3391.
- Ayliffe, H. E., A. B. Frazier and R. D. Rabbitt, 1999, "Electric impedance spectroscopy using microchannels with integrated metal electrodes", *Journal of Microelectromechanical Systems*, **8**(1): 50-57.
- Battiston, F. M., J. P. Ramseyer, H. P. Lang, M. K. Baller, C. Gerber, J. K. Gimzewski, E. Meyer and H. J. Guntherodt, 2001, "A chemical sensor based on a microfabricated cantilever array with simultaneous resonance-frequency and bending readout", *Sensors and Actuators B: Chemical*, **77**(1-2): 122-131.
- Bergaud, C. and L. Nicu, 2000, "Viscosity measurements based on experimental investigations of composite cantilever beam eigenfrequencies in viscous media", *Review of Scientific Instruments*, **71**(6): 2487-2491.
- Bernard, A., E. Delamarche, H. Schmid, B. Michel, H. R. Bosshard and H. Biebuyck, 1998, "Printing patterns of proteins", *Langmuir*, **14**(9): 2225-2229.
- Bernard, A., J. P. Renault, B. Michel, H. R. Bosshard and E. Delamarche, 2000, "Microcontact printing of proteins", *Advanced Materials*, **12**(14): 1067-1070.
- Betts, T. A., C. A. Tipple, M. J. Sepaniak and P. G. Datskos, 2000, "Selectivity of chemical sensors based on micro-cantilevers coated with thin polymer films", *Analytica Chimica Acta*, **422**(1): 89-99.
- Bilenberg, B., T. Nielsen, B. Clausen and A. Kristensen, 2004, "PMMA to SU-8 bonding for polymer based lab-on-a-chip systems with integrated optics", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **14**(6): 814-818.
- Bilenberg, B., M. Scholer, P. Shi, M. S. Schmidt, P. Boggild, M. Fink, C. Schuster, F. Reuther, C. Gruetzner and A. Kristensen, 2006, "Comparison of high resolution negative electron beam resists", *Journal of Vacuum Science & Technology B*, **24**(4): 1776-1779.

- Blanco, F. J., M. Agirregabiria, J. Garcia, J. Berganzo, M. Tijero, M. T. Arroyo, J. M. Ruano, I. Aramburu and M. Kepa, 2004, "Novel three-dimensional embedded SU-8 microchannels fabricated using a low temperature full wafer adhesive bonding", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **14**(7): 1047.
- Blockmans, D., H. Deckmyn and J. Vermynen, 1995, "Platelet activation", *Blood Reviews*, **9**(3): 143-156.
- Boskovic, S., J. W. M. Chon, P. Mulvaney and J. E. Sader, 2002, "Rheological measurements using microcantilevers", *Journal of Rheology*, **46**(4): 891-899.
- Branch, D. W., J. M. Corey, J. A. Weyhenmeyer, G. J. Brewer and B. C. Wheeler, 1998, "Microstamp patterns of biomolecules for high-resolution neuronal networks", *Medical & Biological Engineering & Computing*, **36**(1): 135-141.
- Burns, M. A., B. N. Johnson, S. N. Brahmaandra, K. Handique, J. R. Webster, M. Krishnan, T. S. Sammarco, P. M. Man, D. Jones, D. Heldsinger, C. H. Mastrangelo and D. T. Burke, 1998, "An integrated nanoliter DNA analysis device", *Science*, **282**(5388): 484-487.
- Calleja, M., P. Rasmussen, A. Johansson and A. Boisen, 2003, "Polymeric mechanical sensors with integrated readout in a microfluidic system", *Proceedings of the SPIE*, **5116**: 314-321.
- Capella, B. (2002a). *Dynamic plowing lithography und Kraft-Abstands-Kurven Indentation als lithographische Methoden für die Modifizierung von Polymeroberflächen*, Dissertation an der Fakultät III - Prozesswissenschaften - der Technischen Universität Berlin, Berlin.
- Cappella, B. and H. Sturm, 2002b, "Comparison between dynamic plowing lithography and nanoindentation methods", *Journal of Applied Physics*, **91**(1): 506-512.
- Carlier, J., S. Arscott, V. Thomy, J. C. Fourrier, F. Caron, J. C. Camart, C. Druon and P. Tabourier, 2004, "Integrated microfluidics based on multi-layered SU-8 for mass spectrometry analysis", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **14**(4): 619-624.
- Chabinyc, M. L., D. T. Chiu, J. C. McDonald, A. D. Stroock, J. F. Christian, A. M. Karger and G. M. Whitesides, 2001, "An integrated fluorescence detection system in poly(dimethylsiloxane) for microfluidic applications", *Analytical Chemistry*, **73**(18): 4491-4498.
- Chen, C. S., M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides and D. E. Ingber, 1998, "Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function", *Biotechnology Progress*, **14**(3): 356-363.
- Cheng, J., M. A. Shoffner, G. E. Hovichia, L. J. Kricka and P. Wilding, 1996, "Chip PCR .2. investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips", *Nucleic Acids Research*, **24**(2): 380-385.

- De Boeck, M., M. Kirsch-Volders and D. Lison, 2003, "Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity", *Mutat Res*, **533**(1-2): 135-52.
- Deegan, R. D., O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel and T. A. Witten, 1997, "Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops", *Nature*, **389**(6653): 827-829.
- Deetjen, P. and E. Speckmann, -J., 1994, *Physiologie*, Urban&Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore.
- del Campo, A. and C. Greiner, 2007, "SU-8: a photoresist for high-aspect-ratio and 3D submicron lithography", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **17**(6): R81-R95.
- Delamarche, E., A. Bernard, H. Schmid, A. Bietsch, B. Michel and H. Biebuyck, 1998, "Microfluidic networks for chemical patterning of substrate: design and application to bioassays", *Journal of the American Chemical Society*, **120**(3): 500-508.
- Delehanty, J. B. and F. S. Ligler, 2003, "Method for printing functional protein microarrays", *Biotechniques*, **34**(2): 380-385.
- Deligianni, D. D., N. D. Katsala, P. G. Koutsoukos and Y. F. Missirlis, 2001, "Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength", *Biomaterials*, **22**(1): 87-96.
- Ehrfeld, W., V. Hessel and H. Lehr, 1998, "Microreactors for chemical synthesis and biotechnology - current developments and future applications", *Microsystem Technology in Chemistry and Life Science*, **194**: 233-252.
- Ehrfeld, W., V. Hessel and H. Löwe, 2000, *Microreactors: New Technology for Modern Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Eijkel, J. C. T., A. Prak, S. Cowen, D. H. Craston and A. Manz, 1998, "Micromachined heated chemical reactor for pre-column derivatisation", *Journal of Chromatography A*, **815**(2): 265-271.
- Etchart, I., H. Chen, P. Dryden, J. Jundt, C. Harrison, K. Hsu, F. Marty and B. Mercier, 2008, "MEMS sensors for density-viscosity sensing in a low-flow microfluidic environment", *Sensors and Actuators A: Physical*, **141**(2): 266-275.
- Fotiadis, D., S. Scheuring, S. A. Muller, A. Engel and D. J. Muller, 2002, "Imaging and manipulation of biological structures with the AFM", *Micron*, **33**(4): 385-397.
- France, R. M. and R. D. Short, 1998, "Plasma treatment of polymers: The effects of energy transfer from an argon plasma on the surface chemistry of polystyrene, and polypropylene. A high-energy resolution X-ray photoelectron spectroscopy study", *Langmuir*, **14**(17): 4827-4835.
- Franks, W., D. Lange, S. Lee, A. Hierlemann, N. Spencer and H. Baltes, 2002, "Nanochemical surface analyzer in CMOS technology", *Ultramicroscopy*, **91**(1-4), 21.

- Garstecki, P., M. A. Fischbach and G. M. Whitesides, 2005, "Design for mixing using bubbles in branched microfluidic channels", *Applied Physics Letters*, **86**(24): 244108.
- Gnecco, E., R. Bennewitz and E. Meyer, 2002, "Abrasive wear on the atomic scale", *Physical Review Letters*, **88**(21): 215501.
- Go, J. S. and S. Shoji, 2004, "A disposable, dead volume-free and leak-free in-plane PDMS microvalve", *Sensors and Actuators A: Physical* **114**(2-3): 438-444.
- Green, C. P. and J. E. Sader, 2006, "Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids near a solid surface with applications to the atomic force microscope", *Journal of Applied Physics*, **98**(11): 114913.
- Hamada, E. and R. Kaneko, 1992, "Micro-tribological evaluations of a polymer surface by atomic force microscopes", *Ultramicroscopy*, **184**: 42-44.
- Hattori, S., J. D. Andrade, J. B. Hibbs, D. E. Gregonis and R. N. King, 1985, "Fibroblast cell-proliferation on charged hydroxyethyl methacrylate copolymers", *Journal of Colloid and Interface Science*, **104**(1): 72-78.
- Hegemann, D., H. Brunner and C. Oehr, 2003, "Plasma treatment of polymers for surface and adhesion improvement", *Nuclear Instruments & Methods*, in: *Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms*, **208**: 281-286.
- Hillborg, H., J. F. Ankner, U. W. Gedde, G. D. Smith, H. K. Yasuda and K. Wikstrom, 2000, "Crosslinked polydimethylsiloxane exposed to oxygen plasma studied by neutron reflectometry and other surface specific techniques", *Polymer*, **41**(18): 6851-6863.
- Hillborg, H., N. Tomczak, A. Olah, H. Schonherr and G. J. Vancso, 2004, "Nanoscale hydrophobic recovery: A chemical force microscopy study of UV/ozone-treated cross-linked poly(dimethylsiloxane)", *Langmuir*, **20**(3): 785-794.
- Hosokawa, K. and R. Maeda, 2000, "A pneumatically-actuated three-way microvalve fabricated with polydimethylsiloxane using the membrane transfer technique", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **10**(3): 415-420.
- Hubler, U., 2003, "Concentris: nanomechanics for biomolecular recognition", *BioWorld*, **4**: 2-3.
- Iranpoor, N. and P. Salehi, 1995, "Ceric ammonium-nitrate - a mild and efficient reagent for conversion of epoxides to beta-nitrato alcohols", *Tetrahedron*, **51**(3): 909-912.
- Jackman, R. J., T. M. Floyd, R. Ghodssi, M. A. Schmidt and K. F. Jensen, 2001, "Microfluidic systems with on-line UV detection fabricated in photodefinable epoxy", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **11**(3): 263.
- Jacobs, J. P., C. M. Jones and J. P. Baille, 1970, "Characteristics of a human diploid cell designated Mrc-5", *Nature*, **227**(5254): 168-170.

- James, C. D., R. C. Davis, L. Kam, H. G. Craighead, M. Isaacson, J. N. Turner and W. Shain, 1998, "Patterned protein layers on solid substrates by thin stamp microcontact printing", *Langmuir*, **14**(4): 741-744.
- Jarnagin, K. R., S. T. Kunitake and B. S. Manian, 2000, "Device and method for cell motility assay", US patent US000006238874B1.
- Jeon, N. L., S. K. W. Dertinger, D. T. Chiu, I. S. Choi, A. D. Stroock and G. M. Whitesides, 2000, "Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems", *Langmuir*, **16**(22): 8311-8316.
- Jeon, N. L., H. Baskaran, S. K. W. Dertinger, G. M. Whitesides, L. Van de Water and M. Toner, 2002, "Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device", *Nature Biotechnology*, **20**(8): 826-830.
- Jin, X. and W. N. Unertl, 1992, "Submicrometer modification of polymer surfaces with a surface force microscope", *Applied Physics Letters*, **61**(6): 657-659.
- Jo, B.-H., L. M. Van Lerberghe, K. M. Motsegood and D. J. Beebe, 2000, "Three-dimensional micro-channel fabrication in polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer", *Journal of Microelectromechanical Systems*, **9**(1): 76-81.
- Kamholz, A. E., B. H. Weigl, B. A. Finlayson and P. Yager, 1999, "Quantitative analysis of molecular interaction in a microfluidic channel: the t-sensor", *Analytical Chemistry*, **71**(23): 5340-5347.
- Kim, B., Y. M. Lim, J. Lee, J. Park, S. H. Kim and J.-O. Park, 2001, "Self-propelled endoscopic micro-robot and system for intestinal endoscopy", Patent: US 2002/0111535 A1.
- Kim, E., Y. N. Xia and G. M. Whitesides, 1995, "Polymer microstructures formed by molding in capillaries", *Nature*, **376**(6541): 581-584.
- Kirk, G. L., P. Sweetnam, O. Schueller, E. Ostuni and E. Kim, 2004, "Biological assays using gradients formed in microfluidic systems", Patent: CA000002503186A1.
- Kotzar, G., M. Freas, P. Abel, A. Fleischman, S. Roy, C. Zorman, J. M. Moran and J. Melzak, 2002, "Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices", *Biomaterials*, **23**(13): 2737-2750.
- Kumar, A. and G. M. Whitesides, 1993, "Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol ink followed by chemical etching", *Applied Physics Letters*, **63**(14): 2002-2004.
- L'Hostis, E., P. E. Michel, G. C. Fiaccabrino, D. J. Strike, N. F. de Rooij and M. Koudelka-Hep, 2000, "Microreactor and electrochemical detectors fabricated using Si and EPON SU-8", *Sensors and Actuators B: Chemical*, **64**(1-3): 156-162.
- Lampin, M., R. Warocquier-Clérout, C. Legris, M. Degrange and M. F. Sigot-Luizard, 1997, "Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration", *Journal of Biomedical Materials Research*, **36**(1): 99-108.

- Lang, H. P., M. Hegner and C. Gerber, 2005, "Cantilever array sensors", *Materials Today*, **8**(4): 6
- Lehnert, D., B. Wehrle-Haller, C. David, U. Weiland, C. Ballestrem, B. A. Imhof and M. Bastmeyer, 2004, "Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion", *Journal of Cell Science*, **117**(1): 41-52.
- Li, S., C. B. Freidhoff, R. M. Young and R. Ghodssi, 2003, "Fabrication of micronozzles using low-temperature wafer-level bonding with SU-8", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **13**(5): 732-738.
- Lin, C.-H., G.-B. Lee, B.-W. Chang and G.-L. Chang, 2002, "A new fabrication process for ultra-thick microfluidic microstructures utilizing SU-8 photoresist", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **12**(5): 590-597.
- Lindholm, U. S., D. D. Kana, W.-H. Chu and H. N. Abramson, 1965, "Elastic vibration characteristics of cantilever plates in water", *Journal of Ship Research*, **9**: 11-22.
- Lorenz, H., M. Despont, N. Fahrni, N. LaBianca, P. Renaud and P. Vettiger, 1997, "SU-8: a low-cost negative resist for MEMS", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **7**(3): 121-124.
- Lutwyche, M. I., M. Despont, U. Drechsler, U. Durig, W. Haberle, H. Rothuizen, R. Stutz, R. Widmer, G. K. Binnig and P. Vettiger, 2000, "Highly parallel data storage system based on scanning probe arrays", *Applied Physics Letters*, **77**(20): 3299-3301.
- MacBeath, G. and S. L. Schreiber, 2000, "Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination", *Science*, **289**(5485): 1760-1763.
- Manz, A., N. Graber and H. M. Widmer, 1990, "Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing", *Sensors and Actuators B*, **1**(1-6): 244.
- Marie, R., S. Schmid, A. Johansson, L. Ejsing, M. Nordstrom, D. Hafliger, C. B. V. Christensen, A. Boisen and M. Dufva, 2006, "Immobilisation of DNA to polymerised SU-8 photoresist", *Biosensors and Bioelectronics*, **21**(7): 1327.
- Massberg, S., G. Enders, R. Leiderer, S. Eisenmenger, D. Vestweber, F. Krombach and K. Messmer, 1998, "Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: The role of P-selectin", *Blood*, **92**(2): 507-515.
- McDonald, J. C., D. C. Duffy, J. R. Anderson, D. T. Chiu, H. K. Wu, O. J. A. Schueller and G. M. Whitesides, 2000, "Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)", *Electrophoresis*, **21**(1): 27-40.
- Mensing, G. A., T. M. Pearce, M. D. Graham and D. J. Beebe, 2004, "An externally driven magnetic microstirrer", *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A*, **362**: 1059-1068.
- Mrksich, M. and G. M. Whitesides, 1995, "Patterning self-assembled monolayers using microcontact printing: a new technology for biosensors?", *Trends in Biotechnology*, **13**(6): 228-235.

- Nordström, M., M. Rodolphe, M. Calleja and A. Boisen, 2004, "Rendering SU-8 Hydrophilic to Facilitate Use in Micro Channel Fabrication", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **14**(12): 1614-1617.
- Northrup, M. A., B. Benett, D. Hadley, P. Landre, S. Lehew, J. Richards and P. Stratton, 1998, "A miniature analytical instrument for nucleic acids based on micromachined silicon reaction chambers", *Analytical Chemistry*, **70**(5): 918-922.
- Oden, P. I., G. Y. Chen, R. A. Steele, R. J. Warmack and T. Thundat, 1996, "Viscous drag measurements utilizing microfabricated cantilevers", *Applied Physics Letters*, **68**(26): 3814-3816.
- Olah, A., H. Hillborg and G. J. Vancso, 2005, "Hydrophobic recovery of UV/ozone treated poly(dimethylsiloxane): adhesion studies by contact mechanics and mechanism of surface modification", *Applied Surface Science*, **239**(3-4): 410-423.
- Orth, R. N., T. G. Clark and H. G. Craighead, 2003, "Avidin-biotin micropatterning methods for biosensor applications", *Biomedical Microdevices*, **V5**(1): 29.
- Park, K., F. W. Mao and H. Park, 1990, "Morphological characterization of surface-induced platelet activation", *Biomaterials*, **11**(1): 24-31.
- Patterson, T. J., M. Ngo, P. A. Aronov, T. V. Reznikova, P. G. Green and R. H. Rice, 2003, "Biological activity of inorganic arsenic and antimony reflects oxidation state in cultured human keratinocytes", *Chem Res Toxicol*, **16**(12): 1624-31.
- Pera, I. and J. Fritz, 2007, "Sensing lipid bilayer formation and expansion with a microfabricated cantilever array", *Langmuir*, **23**(3): 1543-1547.
- Rank, R., H. Bruckl, J. Kretz, I. Monch and G. Reiss, 1997, "Nanoscale modification of conducting lines with a scanning force microscope", *Vacuum*, **48**(5): 467-472.
- Re, F., A. Zanetti, M. Sironi, N. Polentarutti, L. Lanfrancone, E. Dejana and F. Colotta, 1994, "Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial-cells", *Journal of Cell Biology*, **127**(2): 537-546.
- Reyes, D. R., D. Iossifidis, P. A. Auroux and A. Manz, 2002, "Micro total analysis systems. 1. Introduction, theory, and technology", *Analytical Chemistry*, **74**(12): 2623-2636.
- Ribeiro, J. C., G. Minas, P. Turmezei, R. F. Wolffenbuttel and J. H. Correia, 2005, "A SU-8 fluidic microsystem for biological fluids analysis", *Sensors and Actuators A: Physical*, **123-124**: 77.
- Sader, J. E., 1998, "Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope", *Journal of Applied Physics*, **84**(1): 64-76.
- Sader, J. E., I. Larson, P. Mulvaney and L. R. White, 1995, "Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers", *Review of Scientific Instruments*, **66**(7): 3789-3798.

- Sader, J. E., J. W. M. Chon and P. Mulvaney, 1999, "Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers", *Review of Scientific Instruments*, **70**(10): 3967-3969.
- Schmalenberg, K. E., H. M. Buettner and K. E. Uhrich, 2004, "Microcontact printing of proteins on oxygen plasma-activated poly(methyl methacrylate)", *Biomaterials*, **25**(10): 1851-1857.
- Schneider, S. W., S. Nuschele, A. Wixforth, C. Gorzelanny, A. Alexander-Katz, R. R. Netz and M. F. Schneider, 2007, "Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(19): 7899-7903.
- Schuster, C. and J. Bendig, 1991, "Produkte der Decarboxylierung photochemisch dargestellter Indencarbonsaure-Derivate", *Journal für praktische Chemie* **333**(1): 91-99
- Seidemann, V., J. Rabe, M. Feldmann and S. Büttgenbach, 2002, "SU-8-micromechanical structures with in situ fabricated movable parts", *Microsystem Technologies*, **8**(4 - 5): 348-350.
- Shaw, M., D. Nawrocki, R. Hurditch and D. Johnson, 2002, "Improving the process capability of SU-8", MicoChem Corp.: 1-9.
- Shoji, S. and M. Esashi, 1994, "Microflow devices and systems", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **4**(4): 157-171.
- Stangegaard, M., Z. Wang, J. P. Kutter, M. Dufva and A. Wolff, 2006, "Whole genome expression profiling using DNA microarray for determining biocompatibility of polymeric surfaces", *Molecular Biosystems*, **2**(9): 421-428.
- Stark, R. W., F. J. Rubio-Sierra, S. Thalhammer and W. M. Heckl, 2003, "Combined nanomanipulation by atomic force microscopy and UV-laser ablation for chromosomal dissection", *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, **32**(1): 33-39.
- Stark, R. W., S. Thalhammer, J. Wienberg and W. M. Heckl, 1998, "The AFM as a tool for chromosomal dissection - the influence of physical parameters", *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, **66**: S579-S584.
- Strand, D. and D. Barrow, 2004, "Configurable microfluidic substrate assembly", Patent: WO2004/052540A2
- Stroock, A. D., S. K. W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H. A. Stone and G. M. Whitesides, 2002, "Chaotic mixer for microchannels", *Science*, **295**(5555): 647-651.
- Stroock, A. D. and G. J. McGraw, 2004, "Investigation of the staggered herringbone mixer with a simple analytical model", *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A*, **362**: 971-986.
- Toth, A., I. Bertoti, M. Blazso, G. Banhegyi, A. Bognar and P. Szaplanczay, 1994, "Oxidative damage and recovery of silicone-rubber surfaces. 1. X-ray photoelectron spectroscopic study", *Journal of Applied Polymer Science*, **52**(9): 1293-1307.

- Tseng, A. A., A. Notargiacomo and T. P. Chen, 2005, "Nanofabrication by scanning probe microscope lithography: A review", *Journal of Vacuum Science & Technology B*, **23**(3): 877-894.
- Tseng, F. G., K. H. Lin, H. T. Hsu and C. C. Chieng, 2004, "A surface-tension-driven fluidic network for precise enzyme batch-dispensing and glucose detection", *Sensors and Actuators A: Physical*, **111**(1): 107-117.
- van Wachem, P. B., A. H. Hogt, T. Beugeling, J. Feijen, A. Bantjes, J. P. Detmers and W. G. Vanaken, 1987, "Adhesion of cultured human-endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge", *Biomaterials*, **8**(5): 323-328.
- Vettiger, P., M. Despont, U. Drechsler, U. Durig, W. Haberle, M. I. Lutwyche, H. E. Rothuizen, R. Stutz, R. Widmer and G. K. Binnig, 2000, "The 'Millipede' - More than one thousand tips for future AFM data storage", *Ibm Journal of Research and Development*, **44**(3): 323-340.
- Viani, M. B., T. E. Schäffer, A. Chand, M. Rief, H. E. Gaub and P. K. Hansma, 1999, "Small cantilevers for force spectroscopy of single molecules", *Journal of Applied Physics*, **86**(4): 2258-2262.
- Villarrubia, J. S., 1997, "Algorithms for scanned probe microscope image simulation, surface reconstruction, and tip estimation", *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, **102**(4): 425-454.
- Vörös, J., M. Dusseiller and M. Textor, 2007, "Microfluidic device for patterned surface modification", Patent: EP 1 807 206 A1
- Voskerician, G., M. S. Shive, R. S. Shawgo, H. von Recum, J. M. Anderson, M. J. Cima and R. Langer, 2003, "Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices", *Biomaterials*, **24**(11): 1959-1967.
- Walther, F., P. Davydovskaya, S. Zucher, M. Kaiser, H. Herberg, A. M. Gigler and R. W. Stark, 2007, "Stability of the hydrophilic behavior of oxygen plasma activated SU-8", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **17**(3): 524-531.
- Wang, H., P. Iovenitti, E. C. Harvey and S. Masood, 2002, "Optimizing layout of obstacles for enhanced mixing in microchannels", *Smart Materials and Structures*, **11**: 662-667.
- Wang, Y., M. Bachman, C. E. Sims, G. P. Li and N. L. Allbritton, 2006, "Simple photografting method to chemically modify and micropattern the surface of SU-8 photoresist", *Langmuir*, **22**(6): 2719-2725.
- Wang, Y. L., J. H. Pai, H. H. Lai, C. E. Sims, M. Bachman, G. P. Li and N. L. Allbritton, 2007, "Surface graft polymerization of SU-8 for bio-MEMS applications", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **17**(7): 1371-1380.
- Webb, K., V. Hlady and P. A. Tresco, 1998, "Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading,

and cytoskeletal organization”, *Journal of Biomedical Materials Research*, **41**(3): 422-430.

Weisenberg, B. A. and D. L. Mooradian, 2002, “Hemocompatibility of materials used in microelectromechanical systems: Platelet adhesion and morphology in vitro”, *Journal of Biomedical Materials Research*, **60**(2): 283-291.

West, J., B. Karamata, B. Lillis, J. P. Gleeson, J. Alderman, J. K. Collins, W. Lane, A. Mathewson and H. Berney, 2002, “Application of magnetohydrodynamic actuation to continuous flow chemistry”, *Lab on a Chip*, **2**(4): 224-230.

Wilding, P., M. A. Shoffner and L. J. Kricka, 1994, “PCR in a silicon microstructure”, *Clinical Chemistry*, **40**(9): 1815-1818.

Wixforth, A., C. Strobl, C. Gauer, A. Toegl, J. Scriba and Z. von Guttenberg, 2004, “Acoustic manipulation of small droplets”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **379**(7-8): 982-991.

Woolley, A. T., D. Hadley, P. Landre, A. J. deMello, R. A. Mathies and M. A. Northrup, 1996, “Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device”, *Analytical Chemistry*, **68**(23): 4081-4086.

Wu, M. H., H. Y. Cai, X. Xu, J. P. G. Urban, Z. F. Cui and Z. Cui, 2005, “A SU-8/PDMS hybrid microfluidic device with integrated optical fibers for online monitoring of lactate”, *Biomedical Microdevices*, **7**(4): 323-329.

Xu, X. and A. Raman, 2007, “Comparative dynamics of magnetically, acoustically, and Brownian motion driven microcantilevers in liquids”, *Journal of Applied Physics*, **102**(3): 034303.

Yang, R., J. D. Williams and W. J. Wang, 2004, “A rapid micro-mixer/reactor based on arrays of spatially impinging micro-jets”, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **14**(10): 1345-1351.

Zhang, J., K. L. Tan, G. D. Hong, L. J. Yang and H. Q. Gong, 2001, “Polymerization optimization of SU-8 photoresist and its applications in microfluidic systems and MEMS”, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **11**(1): 20-26.

Zhang, J., W. X. Zhou, M. B. Chan-Park and S. R. Conner, 2005, “Argon plasma modification of SU-8 for very high aspect ratio and dense copper electroforming”, *Journal of the Electrochemical Society*, **152**(10): C716-C721.

Ziegler, C., 2004, “Cantilever-based biosensors”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **V379**(7): 946-959.

6 Veröffentlichungen

Manuskript 1:

Acoustical force nanolithography of thin polymer films

F.J. Rubio-Sierra, A. Yurtsever, M. Hennemeyer, W.M. Heckl und R.W. Stark

Physica status solidi (a) (2006), 203, 1481–1486

Manuskript 2:

Hydrophilisation of SU-8: Wet Chemical and Plasma Processes

Ferdinand Walther, Tanja Drobek, Alexander M. Gigler, Marc Hennemeyer,
Michael Kaiser, Helmut Herberg, Tetsuji Shimitsu, Gregor E. Morfill und Robert
W. Stark

(eingereicht)

Manuskript 3:

Cell Proliferation Assay on Plasma Activated SU-8

M. Hennemeyer, F. Walther, S. Kerstan, K. Schürzinger, A.M. Gigler und
R.W. Stark

Microelectronic Engineering (2008),

Manuskript 4:

Cantilever Microrheometer for the characterization of sugar solutions

M. Hennemeyer, S. Burghardt und R.W. Stark

Sensors (2008), 8, 10-22

Anhang Manuskript 5:

Growth of epitaxial Pr₂O₃ layers on Si(1 1 1)

N. M. Jeutter, M. Hennemeyer, R. Stark, A. Stierle und W. Moritz

Materials Science in Semiconductor Processing (2006), 9, 1079-1083

6.1 *Acoustical force nanolithography of thin polymer films*

F.J. Rubio-Sierra, A. Yurtsever, M. Hennemeyer, W.M. Heckl und
R.W. Stark

Physica status solidi (a) (2006), 203, 1481–1486

Acoustical force nanolithography of thin polymer films

F. J. Rubio-Sierra¹, A. Yurtsever¹, M. Hennemeyer¹, W. M. Heckl^{1,2}, and R. W. Stark^{*,1}

¹ CeNS and Crystallography, Department of Earth and Environmental Sciences, Ludwig-Maximilians-Universität München, Theresienstr. 41, 80333 München, Germany

² Deutsches Museum, Museumsinsel 1, 80538 München, Germany

Received 30 September 2005, revised 16 December 2005, accepted 17 December 2005

Published online 4 April 2006

PACS 07.79.Lh, 68.37.Ps, 81.16.Nd

Nanomachining of thin polymer resist films with an atomic force microscope (AFM) is a promising route for the fabrication of nanoscale devices. In order to enhance the controllability of the nanomachining process an in-plane acoustic wave is coupled to the sample support. This enhances the intermittent force exerted by the AFM tip. The lateral resolution reached by this method is only limited by the physical size of the AFM tip to dimensions far below the light diffraction limit. The main process parameters are the frequency and magnitude of the acoustic wave, and the preloading force. In this work, the feasibility of acoustical force lithography and the influence of the relevant parameters are investigated.

© 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

1 Introduction

Surface patterning at the smallest scale is a key issue for the further development of technological and scientific applications that require rapid prototyping of nanostructures. Currently, optical lithography is the standard technique for the fabrication of structured surfaces. However, the lateral resolution of optical lithography is limited by diffraction. To overcome this limitation, alternative surface patterning methods have been developed during the last years, such as e-beam lithography, masked deposition, scanning probe techniques, or microcontact printing [1]. Scanning probe microscope related techniques represent the most versatile approach for rapid prototyping of lateral nanoscale structures [2, 3]. Among the members of the scanning probe family, the atomic force microscope (AFM) has experienced an impressive development for its application to lithography [4, 5]. Essentially, there are three physically different types of AFM lithography: local anodic oxidation [6], surface chemical patterning [7], and mechanical machining [8]. Mechanical machining by AFM has the main advantages of being a direct method – it is not restricted to functional materials. The resolution is only limited by the physical dimensions of the AFM tip, which is much smaller than the light diffraction limit.

Currently, two different approaches are used for mechanical machining by AFM. The quasi-static approach relies on the application of a static load on the sample to produce plastic deformation while the AFM tip moves on the surface [9]. The main drawback of the quasi-static method is the poor controllability of the process due to lateral forces [10]. In the second approach, dynamic mechanical machining, the AFM cantilever is oscillated with a small amplitude which minimizes unwanted lateral forces during the lithography process. Typically, the supporting piezo-element is used to generate cantilever oscillations by the excitation of flexural resonant modes. If the AFM tip is sufficiently close to the sample and the excitation is strong enough, nanostructures can be lithographed on the surface. This method is also found in the literature as dynamic plowing lithography [11].

* Corresponding author: e-mail: stark@nanomanipulation.de, Phone: +49 89 2180 4329, Fax: +49 89 2180 4334



The controllability of standard dynamic plowing is limited by the fact that the cantilever actuation depends strongly on the transfer characteristics of the dithering piezo-element and the cantilever: The fixed end actuation of the cantilever introduces a time-delay in the system between the actuation and the tip. This can limit the bandwidth of high-speed closed-loop control of the machining process [12]. Additionally, the non-linear tip-sample interaction produces a strong shift of the cantilever resonant frequency. Thus, a promising method for cantilever excitation is to couple a normal incidence shear acoustic wave to the cantilever tip through sample surface. The acoustic wave is generated by an acoustic transducer below the sample [13, 14].

In the following, we discuss ‘acoustical force nanolithography’, a surface machining method based on the AFM. In order to avoid the hardly controllable stick-slip oscillations of quasi-static plowing lithography, the oscillations are induced by a normal incidence shear acoustic wave. Prior to lithography, the frequency response of the cantilever is acquired to obtain the optimal frequency of operation. The influence of the main experimental parameters such as excitation frequency, amplitude, and the preloading force is investigated in detail.

2 Experimental and methods

The experiments were carried out on a Dimension 3100 Scanning Probe Microscope System (Veeco Metrology, Santa Barbara, CA). Lithography paths were programmed using the NanoMan II software of the instrument. For the process parameters characterization, a triangular cantilever with a nominal force constant of 48 N/m was used (NSC11, MikroMasch, Tallinn, Estonia). For the lithography a rectangular cantilever with a nominal force constant of 40 N/m was used (NSC16, MikroMasch, Tallinn, Estonia). As illustrated in Fig. 1, the sample was mounted on a normal incidence shear wave transducer (v153, Panametrics-NDT, Waltham, MA). For lithography a continuous sinusoidal signal was coupled to the ultrasonic transducer. To switch between imaging and lithography mode, the sample bias voltage signal of the AFM controller was used as trigger signal; this signal can be accessed through a signal access module. In this modified lithography system the sample holder is electrically isolated from the sample bias voltage signal of the controller.

Samples were prepared on silicon chips with a size of about 1 cm². Prior to coating, the chips were cleaned with acetone, isopropanol, and de-ionized water. A thin polymer film was prepared by spin coating ($\omega = 500 \text{ min}^{-1}$ for 30 s, $\omega = 5000 \text{ min}^{-1}$ for 60 s) *ma-p 1205*[®] (based on Novolak, naphthoquinone diazide, and solvents; MicroChem, Newton, MA). After spinning, the samples were dried on a hot plate at 100 °C for 40 s.

All images were acquired in standard tapping mode where the dither piezo of the cantilever holder is used for excitation. For image processing a commercial software package was used (SPIP 4.0, Image Metrology A/S, Lyngby, Denmark). In order to obtain a reliable measurement of the width of the litho-

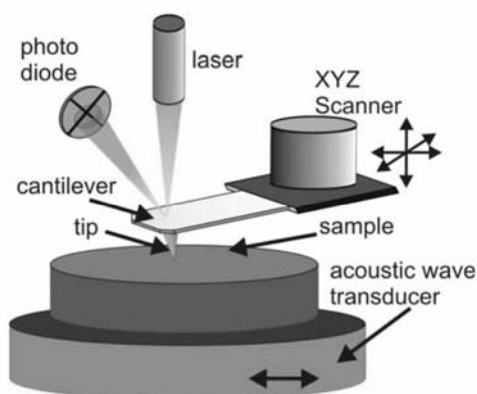


Fig. 1 (online colour at: www.pss-a.com) Schema of the experimental setup for acoustical force nanolithography. The sample holder consists on an acoustic wave transducer that is used to enhance cantilever flexural vibrations for lithography.

graphed structures, the influence of the tip-shape on the measured topography had to be considered. Due to the geometric 'convolution' of the tip shape with the surface profile the width of grooves is underestimated in the raw topographic data. Thus, the images were low-pass filtered to remove high frequency noise. Then, a worst-case tip shape was estimated employing the tip characterization procedure of the software package [15]. In order to obtain reliable upper limits for the width of the nanomachined lines, the tip shape was deconvoluted from topographic data [16].

3 Process parameters

3.1 Resonance spectra

In order to tune the excitation frequency for lithography the frequency response of the cantilever to a continuous single tone excitation of the ultrasonic transducer was analyzed. Two different types of vibration spectra were acquired: one for the free cantilever and one for the surface-coupled cantilever. The excitation frequency was swept stepwise in the frequency band from 400 kHz to 1 MHz. The vibration spectra of the AFM cantilever were measured by demodulation of the deflection signal with an external lock-in amplifier (7280, Ametek, Oak Ridge, TN). The frequency response of the free cantilever is shown in Fig. 2(a). The cantilever was placed about 2 μm over the sample surface during the measurement of the frequency response. The out-of plane oscillations of the vibrations of the ultrasonic transducer couple through the air to the cantilever. Only one resonant peak appears at a frequency of 423.4 kHz within the analyzed frequency band.

In order to acquire the resonance spectra of the surface-coupled cantilever, the vibrating AFM cantilever is brought into intermittent contact by approaching the cantilever to the surface until the AFM cantilever oscillation amplitude was reduced to 20%. Then, the microscope feedback-loop was disconnected and the vibration spectrum was acquired. Figure 2(b) shows the vibration spectrum with several resonant peaks. The main resonance peak is shifted and obscured by new resonances in the spectrum. These new resonances are caused by the strong non-linear character of the tip-sample interaction and resonances in the frequency response of the acoustic transducer [17, 18]. Six major resonant peaks are located at $f = 477.0, 598.2, 637.8, 777.2, 879.6,$ and 940.8 kHz. The response of the system close to 1 MHz is enhanced due to the frequency response of the acoustic wave transducer which is centered at this frequency.

3.2 Acoustic wave frequency

The frequency response of the surface-coupled cantilever shows that the vibration amplitude depends strongly on the excitation frequency. Four traces were lithographed at different resonant peaks of the surface-coupled cantilever frequency response in order to characterize the influence of the excitation frequency (1 Volt signal amplitude). Figure 3(a) shows the resulting traces and the height profile. All lines successfully ploughed grooves on the sample surface. Residual material from the plowing process

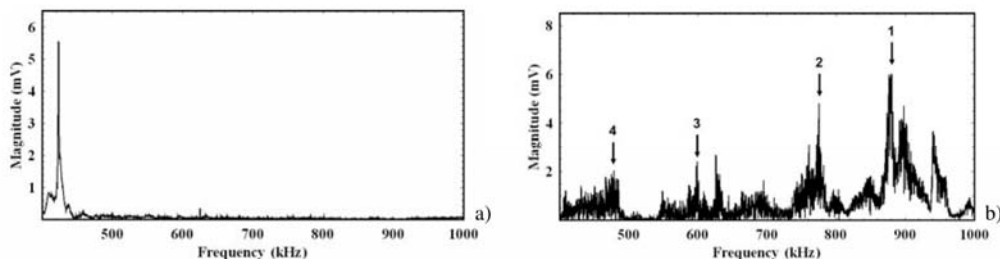


Fig. 2 Vibration spectra of: a) the freely vibrating cantilever, and b) the surface-coupled cantilever. The numbered peaks in (b) were used to characterize the influence of the frequency response in the lithography process.

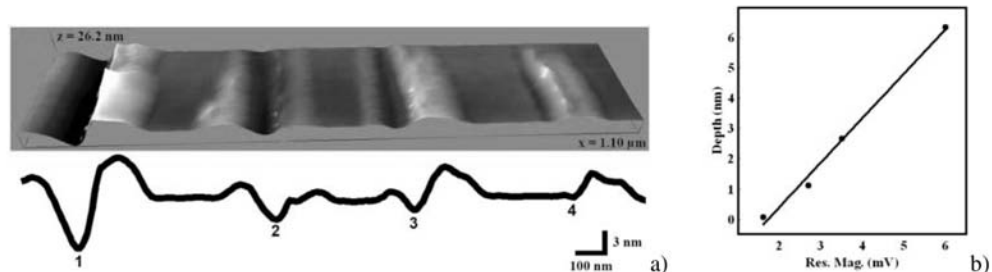


Fig. 3 (online colour at: www.pss-a.com) Variation of lithography depth with the resonant magnitude of the surface-coupled frequency response (Fig. 2). The resonant magnitudes and corresponding excitation frequencies for the four different traces were: trace 1, 6.0 mV (at 879.4 kHz); trace 2, 3.5 mV (at 774.2 kHz); trace 3, 2.7 mV (at 626 kHz); trace 4, 1.6 mV (at 479.4 kHz). a) 3D-representation and height profile of the patterned area. b) Increase of lithographed depth with the frequency response magnitude of the resonant peak. A linear fit of the experimental data is also displayed.

appears at both sides of the grooves. From the results it is clearly seen that the lithographed depth is directly related to which resonant peak is used to generate the acoustic wave. Figure 3(b) shows that the lithographed trace depth increases linearly with the magnitude of the resonant peak.

3.3 Acoustic wave amplitude

The vibration amplitude of the surface-coupled cantilever and, consequently, the applied tip-sample forces, directly depends on the magnitude of the excitation. To characterize the influence of the acoustic wave amplitude on the lithography process, six lines were lithographed using the same frequency (940.8 kHz) but at different magnitudes of the excitation signal.

The first trace was performed without acoustic wave excitation. All the lines traced with acoustic wave excitation resulted in the fabrication of grooves. Figure 4(b) shows a slight deviation from a linear relation between acoustic wave magnitude and lithographed depth. From Fig. 4(a) it is evident that the sample surface appears raised next to the groove. Raised polymer areas after quasi-static machining for loads below the yield strength of the polymer have been previously reported [9]. However, the mechanism for this material displacement is not well understood. Morphological changes induced by viscoelastic effects or localized heat have been proposed as origins of this phenomenon.

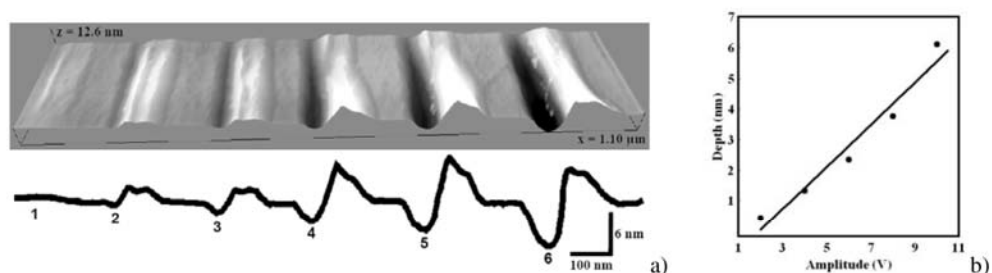


Fig. 4 (online colour at: www.pss-a.com) Increase in lithography depth with the magnitude of the excitation signal. The signal amplitudes for the five different traces were: trace #1, 0 V; trace #2, 2 V; trace #3, 4 V; trace #4, 6 V; trace #5, 8 V; trace #6, 10 V. a) 3D-representation and height profile of the patterned area. b) Relation between lithographed depth and signal magnitude. A linear fit of the experimental data is also displayed.

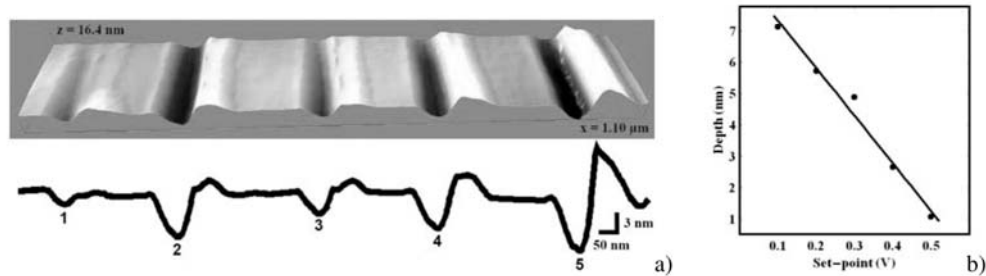


Fig. 5 (online colour at: www.pss-a.com) Variation of lithography depth with set-point of the topography feedback. The corresponding set-points were: trace 1, 0.5 V; trace 2, 0.2 V; trace 3, 0.4 V; trace 4, 0.3 V; trace 5, 0.1 V. a) 3D-representation and height profile of the patterned area. b) Decrease of lithographed depth with increasing set-point. A linear fit of the experimental data is also displayed.

3.4 Preloading force

The coupling of the acoustic wave to the AFM tip depends on the cantilever preloading force. The preloading force is determined by the set-point of the topography feedback prior to lithography. A lower set-point corresponds to a greater preloading force.

Thus, a dependency between the lithographed depth and the preloading force can be expected. To illustrate this, five lines were lithographed at different set-points while applying an excitation signal of 1 V of amplitude at the main resonant peak of the surface-coupled cantilever frequency response (at 879.4 kHz). As expected, a decrease of lithographed depth with increasing set-point is observed in Fig. 5. This dependence has a linear character within the investigated range as seen in Fig. 5(b).

Figure 6 shows two lithographed structures demonstrating the feasibility of the method for the generation of nanostructures. Figure 6(a) shows the lithographed emblem of the Ludwig Maximilians University.

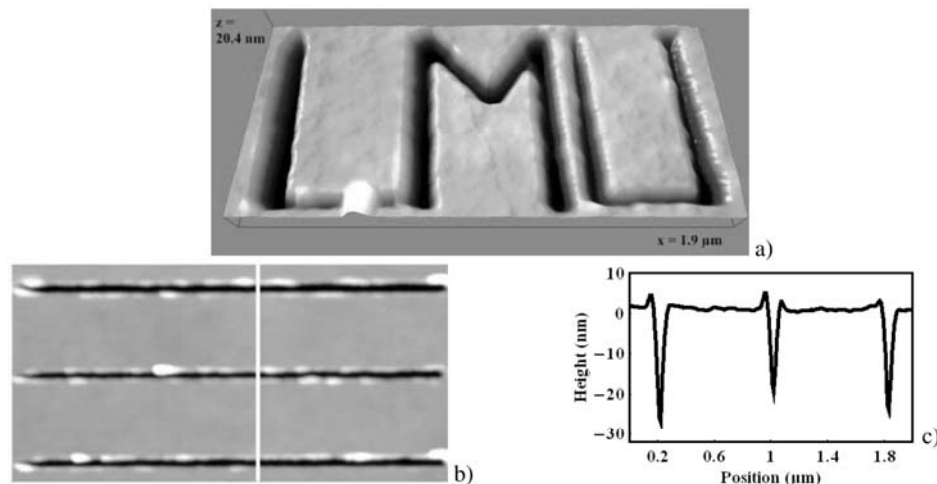


Fig. 6 (online colour at: www.pss-a.com) Nanostructures generated by acoustical force nanolithography: a) lithographed emblem of the Ludwig-Maximilians-University. b) AFM image of three 4 μm long lines lithographed using a signal amplitude of 0.5 V at a frequency of 740 kHz for acoustic wave generation, with an average tip-sample distance of 12.7 nm. Image size (4 × 2 μm) and z-range of 55.6 nm. c) Line profile along the white line in panel b.



Figure 6(b) and (c) show the AFM image and height profile of three lithographed lines with a length of 4 μm . The average line width at FWHM was of 50 nm. The parameters were chosen to reach a line depth greater than 20 nm. This is relevant for the application of this method as first step in high resolution lift-off lithography, where thin resist layers with a thickness about 20 nm are used [19].

4 Conclusions

Acoustical force nanolithography is an AFM lithography method providing control on the machining process by actuation of AFM cantilever through the specimen by an acoustic wave. A precise control can be achieved by tuning the excitation frequency and amplitude of the excitation to purpose. The feasibility of the method along with the characterization of the main parameters was illustrated by lithography of a thin resist film. After initial tuning of the machining forces by fine tuning the excitation frequency, amplitude and set point, the nanolithography process is a reliable process.

Due to the reduced physical dimensions of the AFM tip and precise positioning and force control provided by acoustic force nanolithography, lateral dimensions of the lithographed traces are reduced far beyond light diffraction limit. The method is easy to implement in probe-scanning AFM configurations and can be used as a stand-alone method for surface modification or as complement for fine adjustment of standard mechanical machining of surfaces by AFM.

Acknowledgements Funding by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) under grant 03N8706 is gratefully acknowledged. F. J. Rubio-Sierra thanks the Elite Network of Bavaria for financial support.

References

- [1] M. Geissler and Y. Xia, *Adv. Mater.* **16**, 1249 (2004).
- [2] A. A. Tseng, A. Notagiaco, and T. P. Chen, *J. Vac. Sci. Technol. B* **23**, 877 (2005).
- [3] D. Wouters and U. S. Schubert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 2480 (2004).
- [4] F. J. Rubio-Sierra, W. M. Heckl, and R. W. Stark, *Adv. Eng. Mater.* **7**, 193 (2005).
- [5] D. Fotiadis, S. Scheuring, S. A. Müller, A. Engel, and D. J. Müller, *Micron* **33**, 385 (2002).
- [6] R. Garcia, M. Calleja, and H. Rohrer, *J. Appl. Phys.* **86**, 1898 (1999).
- [7] S. Krämer, R. R. Fuierer, and C. B. Gorman, *Chem. Rev.* **103**, 4367 (2003).
- [8] T. A. Jung, A. Moser, H. J. Hug, D. Brodbeck, R. Hofer, H. R. Hidber, and U. D. Schwarz, *Ultramicroscopy* **42**, 1446 (1992).
- [9] X. Jin and W. N. Unertl, *Appl. Phys. Lett.* **61**, 657 (1992).
- [10] R. W. Stark, S. Thalhammer, J. Wienberg, and W. M. Heckl, *Appl. Phys. A* **66**, S579 (1998).
- [11] M. Heyde, K. Rademann, B. Cappella, M. Geuss, H. Sturm, T. Spangenberg, H. Niehus, *Rev. Sci. Instrum.* **72**, 136 (2001).
- [12] F. J. Rubio-Sierra, R. Vázquez, and R. W. Stark, in: *Proceedings of IMECE2005 2005, ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, November 5–11, 2005, Orlando, Florida, USA.*
- [13] A. Caron, U. Rabe, M. Reinstädler, J. A. Turner, and W. Arnold, *Appl. Phys. Lett.* **85**, 6398 (2004).
- [14] C. K. Hyon, S. C. Choi, S. W. Hwang, D. Ahn, Y. Kim, and E. K. Kim, *Jpn. J. Appl. Phys.* **38**, 7257 (1999).
- [15] J. S. Villarrubia, *J. Natl. Inst. Stand. Technol.* **102**, 435 (1997).
- [16] R. W. Stark, F. J. Rubio-Sierra, S. Thalhammer, and W. M. Heckl, *Eur. Biophys. J.* **32**, 33 (2003).
- [17] U. Rabe, K. Janser, and W. Arnold, *Rev. Sci. Instrum.* **67**, 3281 (1996).
- [18] R. W. Stark, G. Schitter, M. Stark, R. Guckenberger, and A. Stemmer, *Phys. Rev. B* **69**, 085412 (2004).
- [19] C. Martin, G. Rius, X. Borrísé, and F. Pérez-Murano, *Nanotechnology* **16**, 1016 (2005).

6.2 *Hydrophilisation of SU-8: Wet Chemical and Plasma Processes*

Ferdinand Walther, Tanja Drobek, Alexander M. Gigler, Marc Hennemeyer, Michael Kaiser, Helmut Herberg, Tetsuji Shimitsu, Gregor E. Morfill und Robert W. Stark

(eingereicht)

Surface hydrophilisation of SU-8 by plasma and wet chemical processes

Ferdinand Walther ^a, Tanja Drobek ^a, Alexander M. Gigler ^a, Marc Hennemeyer ^a, Michael Kaiser ^b, Helmut Herberg ^b, Tetsuji Shimitsu ^c, Gregor E. Morfill ^c, and Robert W. Stark ^{a,*}

30. October 2009

^a Center for NanoScience (CeNS) and Department of Earth and Environmental Sciences, Ludwig-Maximilians-Universität München, Theresienstraße 41, 80333 Munich, Germany

^b Munich University of Applied Sciences, FB-06, Lothstraße 34, 80335 Munich, Germany

^c Max-Planck-Institut für extraterrestrische Physik, 85748 Garching, Germany

* phone: +49 89 2180 4329, fax: +49 89 2180 4334 e-mail stark@lrz.uni-muenchen.de

Abstract: We investigated the effects of wet chemical and plasma processes for the hydrophilisation of SU-8 with respect to wetting properties, surface roughness, surface modification and contamination. Wet chemical etching with ceric ammonium nitrate (CAN) rendered the SU-8 surface hydrophilic. CAN etching, however, also led to the accumulation of cerium species on the surface, which may interfere with biochemical reactions in the device. Surface activation was also achieved by treatment with a low-temperature atmospheric argon plasma source. This process resulted in an enhanced wettability, which could be attributed to an increase of C=O and COO groups at the surface. Treatment of SU-8 by oxygen plasma led to a stable hydrophilisation and induced an increased surface roughness. Directly after plasma processing, antimony species were accumulated that could be removed with a simple cleaning step. The cleaned SU-8 surface was coated with a protein resistant graft copolymer (PLL-g-PEG) and maintained its hydrophilic properties for several days.

Key words: low-temperature atmospheric plasma source; oxygen plasma; photoresist; SU-8; photoelectron spectroscopy; XPS; roughness; surface modification; wettability; contact angle

1 Introduction

Integrated polymeric microfluidic systems are used in chemical, biochemical, and biological analysis. Polymers and plastic materials are common materials for device fabrication and surface modification. Thus, the controlled adjustment of wetting behaviour, surface roughness, and surface chemistry are important tasks, because these factors determine the interaction between proteins and the surface.^[1-7] Both, poly(dimethylsiloxane) (PDMS), a silicone rubber, and SU-8, an epoxy based negative resist, are well suited for the fabrication of microsystems with typical dimensions in the range from 0.1 μm to 100 μm .^[8-10] Directly after fabrication, these polymer surfaces are hydrophobic. Various processes of surface modification and hydrophilisation of both polymers have been reported. Improved wettability of PDMS can be achieved by UV/ozone-plasma or oxygen plasma treatment.^[11] A hydrophobic recovery of oxidised PDMS, however, occurs on the time-scale of seconds to minutes.^[12-15] In contrast, SU-8 remains hydrophilic for several weeks after oxygen plasma treatment.^[16] Thus, microfluidic devices fabricated in SU-8 can provide a better long-term stability as compared to PDMS devices.

The surface of SU-8 devices can be modified by various processes, such as UV/ozone, plasma or wet chemical treatments. Plasma processes introduce specific binding sites or modify the polymer surface by cross-linking, chain-scission, or incorporation of functionalities.^[17, 18] Oxygen plasma treatment, for example, renders the SU-8 surface hydrophilic by generating carboxy groups at the surface,^[16] increases the surface roughness,^[19] and enhances cell-proliferation on the surface.^[20] The stability of the hydrophilisation depends on the intensity of the plasma treatment.^[16] Exposure to argon plasma also causes an enrichment of carboxy groups on SU-8, saturating at a content of 7.4 %.^[21] However, the effect of atmospheric low-temperature argon plasmas on SU-8 has not yet been investigated. As an alternative to plasma processing, hydrophilisation can also be achieved by wet chemical methods. One approach is

based on a wet etch treatment of the surface followed by coating with ethanolamine.^[22, 23] In the following, we investigate the effects of two process technologies that are available in a typical microfabrication environment, i.e. oxygen plasma treatment and wet chemical etching by ceric ammonium nitrate. In addition, we explore hydrophilisation with a medical low-temperature atmospheric argon plasma source because this technology offers efficient bactericidal effects while leading to a moderate thermal impact,^[24, 25] which will be relevant for the fabrication of future biomedical microdevices.

Wet chemical or plasma processes can be combined with further chemical treatments in order to achieve the desired functionality. In particular, in applications such as microsensing or DNA array technology, the specificity can be enhanced by functional chemical groups,^[26] by means of silanisation after wet chemical modification,^[2, 27, 28] by direct covalent attachment,^[29] or by UV-activated linking.^[6, 30] The surface chemistry of SU-8 can also be modified by a two-step process employing CAN and polyacrylic acid to enhance cell attachment.^[31] Protein resistance is a surface functionality that is often required in biomicrofluidic devices. To this end, coating with PLL-g-PEG provides a viable approach.^[32] This graft copolymer consists of a poly-L-lysine (PLL) backbone with multiple polyethylene glycol (PEG) sidechains. In aqueous solutions of moderate pH, PLL is polycationic and easily adsorbs to negatively charged surfaces, such as metal oxides or plasma activated polymers.^[33] The PEG sidechains form a brush that covers the surface and forms an effective barrier against the adsorption of proteins and other macromolecules.^[34, 35] Coating by PLL-g-PEG is a straightforward process. Thus, we investigate an oxygen plasma treated SU-8 surface subsequently coated with the graft polymer PLL-g-PEG.

To better understand the effects of surface hydrophilisation processes on the surface properties of SU-8, we compare surface activation procedures based on oxygen or argon plasma treatment with a wet chemical etching process using CAN. Particular emphasis is on possible contaminations and changes in the surface chemistry due to subsequent processing. The surfaces were analyzed by contact angle measurements and topographic imaging with an atomic force microscope (AFM). Surface chemical analysis employing X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) was carried out to verify surface oxidation and to check for cerium or antimony species generated by the treatment process. All three surface modification procedures render SU-8 hydrophilic and oxidise the surface. An additional cleaning step in an ultrasonic bath reduces the amount of antimony on the surface while the hydrophilicity is maintained.

2 Materials and methods

2.1 SU-8 resist processing

Silicon (100) wafers were coated with SU-8 10 photoresist. The resin solution contained 35-40 wt.-% volatiles, 2.8 wt.-% SbF_6 salt as photo acid generator, and less than 1 wt.-% Sb.^[36] Gamma-butyrolactone (GBL) was used as solvent for SU-8 10. First, the wafer was dried for at least five minutes at 200 °C on a hotplate. After cooling to room temperature, the substrate was spin coated with 4 ml of the adhesion promoter Ti-Prime (Micro Chemicals, Ulm, Germany) (30 s at 3000 rpm) and baked for two minutes at 120 °C. Then, 4 ml of SU-8 10 were applied to the surface. The spin coating rate was ramped up in several steps to 3000 rpm, resulting in a film thickness of about 10 µm. A pre-bake step was carried out for two minutes at 65 °C. The temperature was then ramped up to 95 °C and kept constant for four minutes. Afterwards, the wafer was slowly cooled to room temperature. Then, the wafers were exposed to UV radiation in a mask aligner for two minutes (Süss MicroTec AG, Garching, Germany).

After a post-exposure bake with the same parameters as for the prebake, the wafers were developed in SU-8 XP (Microresist Technology GmbH, Berlin, Germany) for two minutes. To allow for final cross-linking of the polymer surface and evaporation of residual solvent, a hard-bake step was carried out at 160 °C for two minutes. In the following, we will refer to the pristine surface after the hardbaking as “untreated”.

2.2 Plasma treatment

For oxygen plasma treatment, we used a low frequency (40 kHz) RF-plasma chamber (Diener Electronic GmbH & Co. KG, Nagold, Germany). An oxygen pressure of 0.4 mbar was maintained during plasma treatment. Plasma etching was carried out for 2 min and 8 min with a power of 50 W, corresponding to a total plasma dose of 6 kJ and 24 kJ, respectively. A gentle plasma treatment with 30 s duration at 25 W resulted in a dose of 0.75 kJ.

As an example for a plasma process under atmospheric conditions, a low-temperature atmospheric plasma source at a microwave frequency of 2.45 GHz, also referred to as ‘plasma torch’, was applied (Adtec Plasma Technology Co. Ltd., Hiroshima, Japan). The plasma torch is a device that generates a plasma in atmospheric conditions. It has a plasma output with a diameter of 35 mm. As it is an open device it is used in medical applications such as wound disinfection.^[24, 25, 37] Here, we are interested in the use of such a device for surface modification because surfaces of arbitrary size can be treated as there is no self-contained reactor. Surface modification effects can be caused by argon ions, ultra-violet radiation, and reactive species generated from the atmosphere. We employed 2.2 standard liters per minute (slm) argon gas flow (99.998 % purity) at 85 W plasma power and varied the distance between 1 and 2 cm and the duration between 5 and 20 minutes. The plasma-gas temperature at 1.0, 1.5, and 2.0 cm distance was 100 °C, 50 °C, and 35 °C, respectively.^[25]

2.3 Wet chemical treatment

The ceric ammonium nitrate etch (CAN; Sigma Aldrich No. 22250) was prepared by dissolving CAN in de-ionized water (18.1 M Ω) to a 0.1 M solution. The samples were etched for one hour by immersion in the solution at 50 °C on a microprocessor controlled heating stage (Heidolph MR Hei-end, Heidolph Instruments, Schwabach, Germany) with the reference thermometer inside the solution.

Additional ethanolamine treatment after etching with CAN was applied in some experiments as indicated. First, a 0.1 M solution of ethanolamine (Sigma Aldrich No. E0135) in 0.1 M sodium phosphate buffer (Sigma Aldrich No. S5136) was prepared and adjusted to pH 9.2 by adding HCl solution with a concentration of 3.2 %. The samples were immersed in the solution for one hour at 50 °C using the heating stage with the reference thermometer inside the solution.

For surface coating with PLL-g-PEG, a solution of 1.0 mg PLL(20)-g[4.5]-PEG(5) (Surface Solutions AG, Dübendorf, Switzerland) per ml 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, NaCl 0.138 M, pH 7.4, Sigma Aldrich) was used. The samples were immersed in the PLL-g-PEG solution, incubated for 30 minutes at room temperature, and then rinsed with deionised water.

2.4 Contact angle measurements

In order to determine the contact angle after surface activation, a contact angle goniometer (DSA-10; Krüss GmbH, Hamburg, Germany) was used under ambient conditions (21 °C; relative humidity: 48–52 %) with de-ionized water as probing liquid. A circular fitting algorithm was used for the identification of contact angles. Data of at least three drops per wafer were averaged for each liquid. The error bars represent the standard deviation of the contact angles measured on the respective specimen. To account for a possible fast recovery

after hydrophilisation, the contact angles at day 0 were measured within 30 min after treatment. A second set of measurements was carried out after five days. The long term stability over several weeks was discussed elsewhere.^[38]

2.5 Atomic force microscopy

Surface roughness measurements were conducted with atomic force microscopy using a Dimension 3100 (Veeco, Santa Barbara, CA) and a Nanowizard II (JPK, Berlin, Germany) system in an intermittent contact mode. Silicon cantilevers with a nominal resonance frequency of 300 kHz (BS-TAP300, BudgetSensors, Sofia, Bulgaria) were used in both setups. Images were processed using SPIP 4.5 (Image Metrology A/S, Lyngby, Denmark). After a second-order polynomial plane correction and subsequent line-wise levelling, the root mean square (rms) surface roughness was calculated. To exclude artefacts due to varying scan-sizes, all images were recorded with a scan-size of $500 \times 500 \text{ nm}^2$ at a resolution of 512×512 pixels. The error bars represent the standard deviation of the rms evaluation of at least three different images.

Roughness measurements can be affected by a variety of fabrication parameters and measuring errors, including geometry and wear of the AFM tip in use, the fabrication of the samples, and the stability of the conditions for surface treatment. We minimized the effects of tip wear and other instrumental limitations by following the measurement and image processing procedures described in detail elsewhere.^[19] Average values and error bars represent the statistical mean and standard deviation over all experiments.

2.6 Photoelectron spectroscopy

The surface chemistry of the specimen was analysed approximately five days after surface treatment due to transport delays. XPS analysis was performed using a Phi 5000 VersaProbe

spectrometer (ULVAC-PHI, INC., US) equipped with a 180° spherical capacitor energy analyzer and a multi-channel detection system with 16 channels.

Spectra were acquired at a base pressure of 5×10^{-8} Pa using a focused scanning monochromatic Al-K α source (1486.6 eV) with a spot size of 200 μm and 50 W. The instrument was run in the FAT analyzer mode with electrons emitted at 45° to the surface normal. Pass energy used for survey scans was 187.85 eV and 46 eV for detail spectra.

Charge neutralisation utilizing both a cool cathode electron flood source (1.2 eV) and very low energy Ar⁺-ions (10 eV) was applied throughout the analysis. The spectra were referenced to the carbon C 1s peak (284.8 eV) of aliphatic carbon.

Data were analyzed with CasaXPS [Version 2.3.5, www.casaxps.com] and fitted using Gaussian-Lorentzian functions with least-squares-fitting routines and Shirley iterative background subtraction. Atomic ratios of the elements were calculated from areas corrected for Scofield photoionisation cross-sections,^[39] the transmission function of the instrument, angular asymmetry functions,^[40] and the inelastic mean free paths.^[41] The quantitative results of the chemical analysis are summarized in Tables 1 and 2. The errors of the quantitative results are on the order of a few at.% for the light elements, and larger for Sb and Ce due to inaccuracies of the data available for the photoionisation cross-sections. For the detection of traces, a signal to noise ratio of 3 was used as criterion.

2.7 Microfluidics

Microfluidic channel structures were created in a multi-layer system. First, a support layer was fabricated from SU-8. After the post exposure bake, the central layer was spin-coated onto the SU-8 support layer and its microchannels were structured by photolithography. Then, the system was reversibly covered with another layer. The system was covered and the channels were activated with oxygen plasma after gas exchange in the plasma chamber for 8 min at 50 W plasma power. In particular, a microplasma was ignited within the channel

system. Therefore, only the channel inner surface was activated, while the surface of the surrounding SU-8 remained hydrophobic. Phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4 was used as test liquid. The flow experiment was recorded with 15 frames per second at a resolution of 1024×768 pixels (CCD-camera DFK 31BF03, The ImagingSource Europe GmbH, Bremen, Germany).

3 Results

3.1 Overview

Figure 1 shows the surface topography of both untreated and modified SU-8 surfaces as obtained with an atomic force microscope (AFM) together with the corresponding root mean square (rms) surface roughness. The colour scale of each image was adjusted to display the entire height variation. Thus, the height scales of the individual images correspond to the respective peak-valley roughness values. Untreated SU-8 exhibits a very smooth surface with an rms roughness of (0.25 ± 0.01) nm and a total height variation of only 2 nm (Fig. 1 (a)). The rms roughness increased for oxygen plasma treatment and for wet chemical etching. Surfaces treated with the argon plasma torch, however, remained very smooth. Fig. 2 displays the water contact angle directly after surface treatment of SU-8 10 and after five days of storage. We found that all surface modification methods (plasma and CAN etch) significantly enhanced the wettability. The contact angle of unmodified SU-8 10 was $79^\circ \pm 1^\circ$ and did not alter within five days (Fig. 2).

3.2 Atmospheric argon plasma torch

The treatment with the low-temperature atmospheric argon plasma source caused a topographic peak-to-valley height difference of 2 nm (Fig. 1 (e)). Within the uncertainty of the rms roughness values, surfaces treated with the argon plasma torch

(rms = (0.26 ± 0.02) nm) did not differ from untreated SU-8 10 samples (rms = (0.25 ± 0.01) nm, Fig. 1 (a)). The hydrophilisation effect of the plasma torch as illustrated in Fig. 3 was investigated by the variation of distance and duration. The intensity of the plasma torch can be assumed to decay with the inverse-square of the distance.^[25] Thus, we discuss the measured contact angle after argon plasma torch hydrophilisation as a function of plasma power and duration divided by the square of the distance. The plasma-gas temperature at 1 cm was 100 °C and at 2 cm 60 °C.^[25] Hydrophilisation to a saturation contact angle of about 30° required more than five minutes treatment at a distance of 1.0 to 1.5 cm. Within five days, the saturation contact angle recovered to $52^\circ \pm 4^\circ$. For the treatment with 2 cm distance and 5 min duration the areal energy density was 64×10^{-6} Ws/m². The contact angle measured directly after this plasma dose was $48^\circ \pm 8^\circ$. The effect of hydrophilisation was equivalent for a given areal energy density: A short treatment at one centimetre distance for five minutes (255×10^{-6} Ws/m²) yielded the same saturation contact angle $29^\circ \pm 3^\circ$ as a surface treatment at two centimetres source-target distance for 20 minutes ($29^\circ \pm 2^\circ$). The advantage of an elongated distance is the significantly lower temperature, which prevents unwanted thermal effects.

To understand the evolution of the contact angle from a surface chemical point of view, we analyzed the specimen with X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). Survey spectra for untreated and argon plasma treated SU-8 are displayed in Fig. 4 (a). The detail spectrum of the C 1s region in Fig. 4 (b) illustrates the changes in the surface chemistry due to plasma treatment: With increasing treatment time, the signals from aliphatic carbon and CO decrease, and the signals from C=O and COO increase. The plasma treatment of SU-8 also leads to a slight accumulation of antimony at the surface. The antimony concentration (without cleaning) increases from 0.2 at. % to 0.4 at. % as shown in Fig. 5.

3.3 Oxygen plasma

Oxygen plasma treatment caused more pronounced effects on the surface topography depending on the plasma exposure. After treatment for 30 s at 25 W, small aggregates formed. With increased plasma dose (2 min and 8 min at 50 W), the size of the aggregates increased. The rms roughness changed to (0.4 ± 0.1) nm, (2.3 ± 0.2) nm, and (4.75 ± 1.65) nm depending on the plasma duration and intensity (Fig. 1 (b-d)). The respective contact angle was reduced to $16^\circ \pm 2^\circ$ / $8^\circ \pm 1^\circ$ / $4^\circ \pm 1^\circ$ (Fig. 2). After five days of storage, the contact angle increased to $41^\circ \pm 8.0^\circ$ / $40^\circ \pm 1^\circ$ / $8^\circ \pm 1^\circ$, respectively (Fig. 2). The contact angle of the untreated SU-8 remained constant at the initial value of $79^\circ \pm 1^\circ$ after 5 days of storage. The oxygen plasma doses were chosen to cover the full range from very gentle activation with only minimum effect on topography to intense plasma treatment to achieve complete wettability and increased surface roughness (8 min; 50 W). The intermediate plasma dose led to a slight roughening but also induced nearly full wettability.

The plasma treatment also affected the surface chemistry as illustrated in Fig. 6. The XPS spectra reveal two important effects. First, the signals related to oxygen were increased after plasma treatment. Second, C=O and COO groups were created at the surface. In addition, antimony oxide from the photo acid generator was accumulated.^[16] For the intense plasma treatment (8 min; 50 W), the Sb concentration increased dramatically from 0.2 at. % to 9 at. %. After a short treatment (5 min; 50 W) with H₂O in an ultrasonic bath, however, the signal of antimony was significantly reduced to 0.5 at. %. After the cleaning step, the amount of C=O and COO groups was also reduced (Table 2). With a weak plasma treatment (30 s; 25 W), a much smaller increase of antimony concentration was observed (0.6 at. %). However, the hydrophilicity of the SU-8 samples was only slightly increased under these conditions.

Subsequently, the plasma activated SU-8 surface can be modified with an additional coating of PLL-g-PEG. The rms surface roughness of the coated surface increased only very slightly (less than 10 %) after coating. Directly after coating, a contact angle of $25^\circ \pm 2^\circ$ was achieved (Fig. 2). The contact angle of PLL-g-PEG coated SU-8 stabilized at 30° for at least 30 days and for all three levels of oxygen plasma dose investigated here (data not shown). In the XPS spectra of the PLL-g-PEG-coated SU-8, carbon, oxygen, nitrogen, and traces of antimony are present (Fig. 7 and Table 1). Nitrogen can be assigned to the amine groups of the PLL backbone. The spectra of the O 1s and C 1s regions show a large increase of the C-O-related signal as compared to the untreated reference, which originates from the multiple (ethylene glycol) units of the PEG chains.

3.4 Ceric ammonium nitrate etch

After CAN etching, the rms roughness of SU-8 increased to (1.6 ± 0.5) nm (Fig. 1 (f)) and resulted in an average contact angle of $23.4^\circ \pm 4.3^\circ$ (Fig. 2). After five days of storage, the contact angle recovered to $34.1^\circ \pm 1.1^\circ$. The ethanolamine coating was applied immediately after the CAN etch activation and resulted in an initial contact angle of $10.1^\circ \pm 0.7^\circ$. After storage for five days, we measured a contact angle of $11.1^\circ \pm 2.3^\circ$. This observation shows, that coating of SU-8 with ethanolamine after etching with CAN stabilizes the hydrophilic behaviour. With the ethanolamine coating, the rms roughness was (1.4 ± 0.3) nm (Fig. 1 (g)). The results of the wet chemical treatment were sensitive to variations of the experimental conditions. By agitation of the solution during treatment of the surface, the desired hydrophilisation effect was reduced while roughening was increased. The results presented here were obtained without agitation.

Due to the etching process, the surface chemistry changed as well. In particular, the XPS signal for oxygen increased as shown in Fig. 8 (a). The additional fluorine signals were

caused by a contamination from the PTFE sample holder used during wet chemical treatment. However, the spectrum was dominated by a very strong signal from cerium in various oxidation states (Fig. 8 (b)). The strong cerium signal implies, that there is almost enough cerium present to form a monolayer.

3.5 Passive device

Figure 9 demonstrates the use of plasma activation of SU-8 for applications in passively driven microfluidics. The plasma was generated as a microplasma within the microfluidic channel. In order to demonstrate the hydrophilic nature of the channel, a 20 μ l drop of PBS buffer solution was placed with a micropipette onto the reservoir region. Without surface treatment of SU-8, the drop remained at the inlet where it was placed initially. Only after hydrophilisation, the aqueous solution was driven through the microchannels by capillary forces without any external pumping device. At $t = 1.2$ s, the water-front had advanced 5.4 mm and after 8.5 s the meniscus reached 16.9 mm. The microchannel was filled within 13.1 s.

4 Discussion

All treatments rendered the surface hydrophilic. In terms of roughness and surface chemistry, however, significant differences were observed. The hydrophobic recovery of the SU-8 surfaces after the various treatments may be dominated by the decay of trapped charges and rearrangement of the polymer. In addition, the attachment of contaminants during the recovery process certainly plays a role, even though preparation and sample storage were conducted very carefully. For untreated SU-8, no changes were observed over time, which indicates that it does not provide any active sites.

Treatment with the argon plasma torch produced a very smooth surface, but also rendered the surface hydrophilic with contact angles below 30° . The hydrophilicity remained stable for a few hours (Fig. 3). The contact angle that could be achieved with the plasma torch is in good agreement with results reported in Ref. ^[21] using a March PX-500 cleaning system. An increase in C=O and COO groups was found, which was most likely caused by atmospheric oxygen. After five days, the contact angle recovered to 50° and above. In practical applications, such as simultaneous hydrophilisation and sterilisation of surfaces with low thermal impact,^[24] the use of a plasma torch is advantageous if a smooth surface is required.

Out of the processes discussed here, the oxygen plasma process offers the best and most stable hydrophilisation. This process, however, leads to a roughening of the surface. A recent study showed, that an rms roughness of 3 nm of plasma treated SU-8 correlates to a slight increase (about 10 %) of the effective surface.^[19] The rms roughness values achieved by our processes are very small compared to roughness values achieved by plasma treatment as reported in literature.^[21] Thus, we assume that the nanoscale roughness only slightly affects the macroscopic wetting properties. In contrast, the effect of surface chemistry is clearly relevant for the wetting properties. The higher the plasma dose the more intense the incorporation of oxygen into the sample. This increase of polar C=O and COO groups is correlated with an increased wettability. With the adjustment of the plasma intensity, surface roughness and oxidation can be balanced. The capillary flow through the microdevice clearly illustrates that hydrophilisation by oxygen plasma treatment may also be used to activate the surface inside a microchannel. Oxygen plasma treated SU-8 surfaces can be modified further with agents that require charged surfaces. The attachment of the graft copolymer PLL-*g*-PEG for example, is driven by the positively charged PLL interacting with the negatively charged surface. Surface coating by PLL-*g*-PEG decreases the initial contact angle slightly but

significantly increases shelf life of the hydrophilisation. More importantly, it enhances the stability of the hydrophilic behaviour over various cycles of wetting and drying.

Both effects, surface hydrophilisation and increased surface roughness, were observed after wet chemical treatment. It is assumed that during wet chemical treatment with the CAN etch, epoxy rings at the surface of SU-8 are opened. For passivation of the surface, these negatively charged groups can be saturated by the ethanolamine coating, which leads to a modified surface chemistry.^[5, 23, 31, 42] Although the AFM images of the wet etched surfaces morphologically resembled the SU-8 samples treated by a high dose of oxygen plasma, the rms roughness was smaller. With the additional ethanolamine coating, the samples showed the smallest variation between the contact angle shortly after treatment and after five days. The main disadvantage of the CAN process, however, is the possible contamination of the surface with ceria, which might interfere with biochemical reactions in the microfluidic device. To establish CAN etching as a standard process for the fabrication of biomicrofluidic applications, additional cleaning protocols for the removal of ceria need to be developed and validated.

5 Conclusions

For microfluidic devices, a control of surface properties such as wetting and surface roughness, is desirable. We investigated several methods for the surface hydrophilisation of SU-8 that can be carried out in a typical micro-fabrication environment, including plasma processing with oxygen plasma, cold atmospheric argon plasma, and wet chemical etching by a CAN etch process. All of these processes rendered SU-8 hydrophilic by generating C=O and COO groups at the surface and increasing surface roughness. Plasma processing,

however, leads to an accumulation of antimony species, while cerium species were introduced by CAN etching.

In particular, after treatment with oxygen plasma SU-8 surfaces were roughened, while treatment with an atmospheric pressure plasma torch featured an extremely smooth surface that was only very slightly roughened. The wet chemical process based on CAN etching generates a roughened hydrophilic surface. After a subsequent coating using ethanolamine, the CAN etched SU-8 remains hydrophilic for more than five days. In our experiment, however, a significant accumulation of ceria was found on the surface after CAN etching. In order to remove the contaminant, an adequate cleaning process needs to be developed.

The best hydrophilisation, i.e. the smallest contact angles measured both immediately after treatment and after five days of storage, could be achieved by an intense oxygen plasma treatment. This treatment, however, leads to an increase in antimony oxide from the photo acid generator on the surface due to preferential etching of the resin. As antimony oxide may have adverse effects in bioanalytic systems, an additional cleaning step was investigated to remove the contaminant. Surface chemical analyses show, that a short cleaning in an ultrasonic bath of deionised water is sufficient to effectively remove the antimony oxide from the surface. The cleaned SU-8 surface keeps its hydrophilic behaviour and can be modified further, e.g. with PLL-g-PEG. In summary, our experiments show that plasma processing requires adequate cleaning procedures and is a convenient route to obtain a hydrophilic SU-8 surface suitable for microfluidics.

Acknowledgements

We thank SUSOS Zurich for the XPS measurements and Stefan Zürcher and Samuele Tossatti (SUSOS) for fruitful discussions. We thank Adtec Plasma Technology Co. Ltd. for providing the argon plasma torch. We also thank Ferdinand Jamitzky and René Pompel (Max-Planck-Institut für extraterrestrische Physik, Garching) for fruitful discussions.

References

- [1] J. El-Ali, P. K. Sorger, K. F. Jensen, *Nature* **2006**, *442*, 403.
- [2] M. Calleja, J. Tamayo, M. Nordstrom, A. Boisen, *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88*, 113901.
- [3] R. Seemann, M. Brinkmann, E. J. Kramer, F. F. Lange, R. Lipowsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 1848.
- [4] B. Bhushan, T. Kasai, G. Kulik, L. Barbieri, P. Hoffmann, *Ultramicroscopy* **2005**, *105*, 176.
- [5] G. Blagoi, S. Keller, A. Johansson, A. Boisen, M. Dufva, *Appl. Surf. Sci.* **2008**, *255*, 2896.
- [6] G. Blagoi, S. Keller, F. Persson, A. Boisen, M. H. Jakobsen, *Langmuir* **2008**, *24*, 9929.
- [7] S. Bouaidat, O. Hansen, H. Bruus, C. Berendsen, N. K. Bau-Madsen, P. Thomsen, A. Wolff, J. Jonsmann, *Lab on a Chip* **2005**, *5*, 827.
- [8] A. del Campo, C. Greiner, *J. Michromech. Microeng.* **2007**, *17*, R81.
- [9] P. Abgrall, V. Conedera, H. Camon, A.-M. Gue, N.-T. Nguyen, *Electrophoresis* **2007**, *28*, 4539.
- [10] N. S. Tambe, B. Bhushan, *Ultramicroscopy* **2005**, *105*, 238.
- [11] I. Wong, C. H. Ho, *Microfluid. Nanofluid.* **2009**, *7*, 219.
- [12] H. Hillborg, U. W. Gedde, *IEEE T Dielect El In* **1999**, *6*, 703.
- [13] H. Hillborg, M. Sandelin, U. W. Gedde, *Polymer* **2001**, *42*, 7349.
- [14] H. Hillborg, N. Tomczak, A. Olah, H. Schonherr, G. J. Vancso, *Langmuir* **2004**, *20*, 785.

- [15] A. Olah, H. Hillborg, G. J. Vancso, *Appl. Surf. Sci.* **2005**, 239, 410.
- [16] F. Walther, P. Davydovskaya, S. Zürcher, M. Kaiser, H. Herberg, A. M. Gigler, R. W. Stark, *J. Microchem. Microeng.* **2007**, 17, 524.
- [17] R. M. France, R. D. Short, *Langmuir* **1998**, 14, 4827.
- [18] E. Akdogan, D. Cokeliler, L. Marcinauskas, P. Valatkevicius, V. Valincius, M. Mutlu, *Surf. Coat. Technol.* **2006**, 201, 2540.
- [19] F. Walther, W. M. Heckl, R. W. Stark, *Appl. Surf. Sci.* **2008**, 254, 7290.
- [20] M. Hennemeyer, F. Walther, S. Kerstan, K. Schürzinger, A. M. Gigler, R. W. Stark, *Microelectron Eng* **2008**, 85, 1298.
- [21] J. Zhang, W. X. Zhou, M. B. Chan-Park, S. R. Conner, *J. Electrochem. Soc.* **2005**, 152, C716.
- [22] M. Nordstrom, M. Calleja, A. Boisen, *Ultramicroscopy* **2005**, 105, 281.
- [23] M. Stangegaard, Z. Wang, J. P. Kutter, M. Dufva, A. Wolff, *Mol. BioSyst.* **2006**, 2, 421.
- [24] R. Pompl, F. Jamitzky, T. Shimizu, B. Steffes, W. Bunk, H. Schmidt, M. Georgi, K. Ramrath, W. Stolz, R. W. Stark, T. Urayama, S. Fujii, G. E. Morfill, *New J. Phys.* **2009**, *in press*.
- [25] T. Shimizu, B. Steffes, R. Pompl, F. Jamitzky, W. Bunk, K. Ramrath, B. Peters, W. Stolz, H.-U. Schmidt, T. Urayama, K. Fujioka, R. Ramasamy, S. Fujii, G. E. Morfill, *Proceedings of the 6th International Conference on Reactive Plasmas and 23rd Symposium on Plasma Processing* **2006**, 283.
- [26] M. Joshi, N. Kale, R. Lal, V. R. Rao, S. Mukherji, *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2429.

- [27] Y. L. Wang, C. E. Sims, P. Marc, M. Bachman, G. P. Li, N. L. Allbritton, *Langmuir* **2006**, *22*, 8257.
- [28] M. Joshi, R. Pinto, V. R. Rao, S. Mukherji, *Appl. Surf. Sci.* **2007**, *253*, 3127.
- [29] R. Marie, S. Schmid, A. Johansson, L. E. Ejsing, M. Nordstrom, D. Hafliger, C. B. V. Christensen, A. Boisen, M. Dufva, *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1327.
- [30] Y. L. Wang, M. Bachman, C. E. Sims, G. P. Li, N. L. Allbritton, *Langmuir* **2006**, *22*, 2719.
- [31] Y. L. Wang, J. H. Pai, H. H. Lai, C. E. Sims, M. Bachman, G. P. Li, N. L. Allbritton, *J. Microchem. Microeng.* **2007**, *17*, 1371.
- [32] R. Marie, J. P. Beech, J. Voros, J. O. Tegenfeldt, F. Hook, *Langmuir* **2006**, *22*, 10103.
- [33] A. S. Sawhney, J. A. Hubbell, *Biomaterials* **1992**, *13*, 863.
- [34] G. L. Kenausis, J. Voros, D. L. Elbert, N. P. Huang, R. Hofer, L. Ruiz-Taylor, M. Textor, J. A. Hubbell, N. D. Spencer, *Journal of Physical Chemistry B* **2000**, *104*, 3298.
- [35] T. Drobek, N. D. Spencer, M. Heuberger, *Macromolecules* **2005**, *38*, 5254.
- [36] MicroChem., MicroChem. Corp., Newton, MA, **2001**, pp. 1.
- [37] T. Shimizu, B. Steffes, R. Pompl, F. Jamitzky, W. Bunk, K. Ramrath, M. Georgi, W. Stolz, H. U. Schmidt, T. Urayama, S. Fujii, G. E. Morfill, *Plasma Process Polym* **2008**, *5*, 577.
- [38] F. Walther, P. Davydovskaya, S. Zucher, M. Kaiser, H. Herberg, A. M. Gigler, R. W. Stark, *J. Microchem. Microeng.* **2007**, *17*, 524.
- [39] J. H. Scofield, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **1976**, *8*, 129.

- [40] R. F. Reilman, A. Msezane, S. T. Manson, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **1976**, 8, 389.
- [41] M. P. Seah, W. A. Dench, *Surf. Interf. Anal.* **1979**, 1, 2.
- [42] N. Iranpoor, P. Salehi, *Tetrahedron* **1995**, 51, 909.

Tables

Table 1. XPS chemical analysis of the surface modification. Concentrations are given in relative atomic percent (rel. at. %). Spectra with a signal-to-noise ratio below 3 (no significant peak intensity) are labelled with a minus sign. The traces of Si in various samples arised from debris of the wafer cutting.

plasma treatment	chemical treatment	C	O	Sb	Ce	N	Si	F
- (control)	- (control)	83.5	16.1	0.2	-	-	-	-
Ar plasma 20 min	-	70.5	27.8	0.4	-	-	1.3	-
Ar plasma 10 min	-	73.2	25.2	0.3	-	-	1.3	-
Ar plasma 5 min	-	74.4	23.1	0.2	-	-	2.3	-
O plasma 50W/8min	-	55.0	32.5	9.0	-	1.7	1.0	0.6
O plasma 25W/30s	-	72.8	26.1	0.6	-	-	0.6	-
O plasma 50W/8min	Ultrasonication H ₂ O 5min	74.8	24.7	0.5	-	-	-	-
O plasma 50W/8min	PLL-g-PEG + H ₂ O rinsing	70.3	27.2	0.4	-	2.1	-	-
-	CAN 60 min H ₂ O 1 min	36.2	32.5	-	18	2.4	-	10.9

Table 2. Relative intensities of peaks assigned to different chemical species of carbon (C 1s signal). * In the spectra of the CAN-etched sample there is an overlap of the C 1s shake-up with the Ce 4s signal.

plasma treatment	chemical treatment	C-C	C-O	C=O	COO	Shake-up
- (control)	- (control)	57.3	38.6	-	-	4.1
Ar plasma 20 min	-	49.1	33.6	7.3	8.4	1.6
Ar plasma 10 min	-	52.3	34.8	5.2	6.0	1.6
Ar plasma 5 min	-	55.9	36.4	3.1	2.6	2
O plasma 50W/8min	-	47.9	33.5	8.4	10.2	-
O plasma 25W/30s	-	53.6	33.5	7.0	5.9	-
O plasma 50W/8min	Ultrasonication H ₂ O 5min	54.8	35.0	6.0	4.2	-
O plasma 50W/8min	PLL-g-PEG + H ₂ O rinsing	29.9	61.1	6.3	2.8	-
-	CAN 60 min H ₂ O 1 min	50.1	23	9	9.8	8.2*

Figures

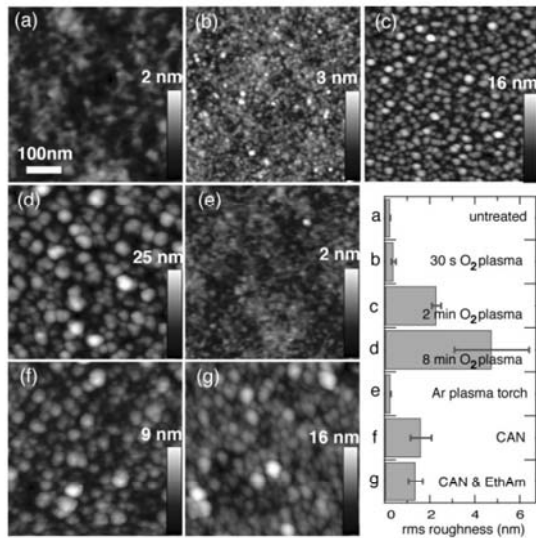


Fig. 1. (color online) Topographic AFM data ($500 \times 500 \text{ nm}^2$) of SU-8 after surface treatment. The colour scale was set to the maximum peak to valley distance in each image as indicated. (a) Untreated reference. Surfaces modified with oxygen plasma at (b) 30 s / 25 W, (c) 2 min / 50 W, and (d) 8 min / 50 W. (e) Surface treated with an argon plasma torch. The surface topography after wet chemical treatment with (f) CAN wet etch, (g) CAN & ethanolamine also show an increased surface roughness. The inset shows the rms roughness of the surfaces.

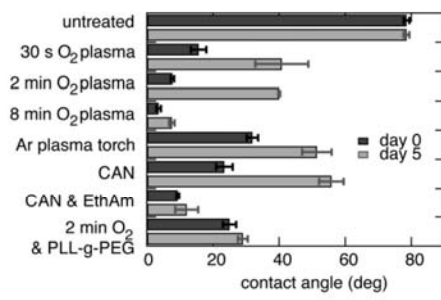


Fig. 2. Contact angles directly after treatment (day 0) and after five days. Data from untreated SU-8 was used as reference.

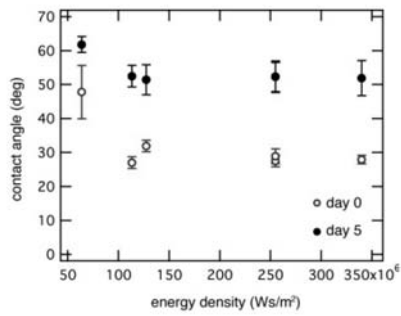


Fig. 3. (color online) Contact angles of water on SU-8 after argon plasma treatment. The atmospheric argon plasma (85 W) was varied within five to twenty minutes duration and a distance of one and two centimetres. The achievable initial contact angle saturated at 29° shortly after plasma treatment. The weakest treatment with two centimetres distance and five minutes duration did not yield the saturation contact angle. After five days the contact angle was 52°.

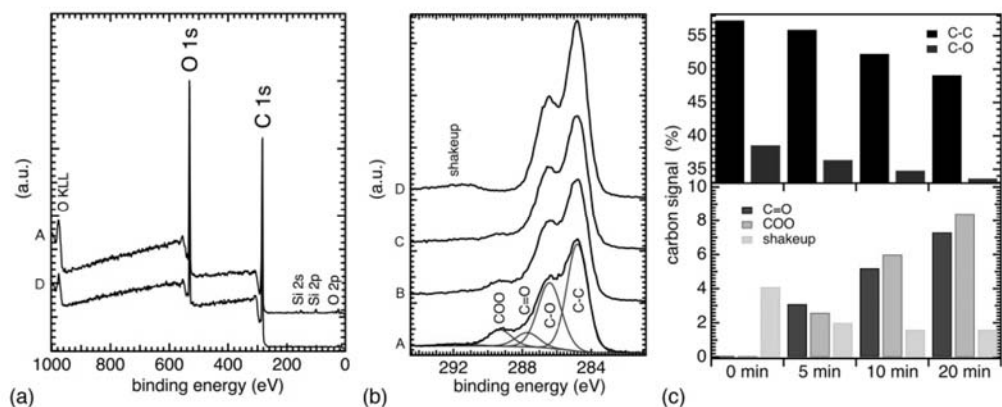


Fig. 4. (color online) Effect of the atmospheric Ar plasma treatment on the carbon species as measured by XPS (about 5 days after treatment). (a) Survey spectra A: plasma treatment 20 min at 2 cm distance. D: untreated reference (b) Details of the C 1s region. A, B, C: plasma treatment for 20, 10, and 5 min at 2 cm distance. D: untreated reference. (c) Carbon signal of different carbon species as a function of treatment time, referred to 100 % C 1s signal.

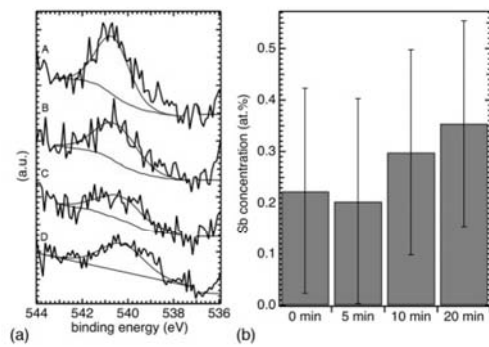


Fig. 5. (color online) Accumulation of Sb on the SU-8 surface due to Ar plasma treatment as measured with XPS. (a) Detail of the Sb3d 3/2 region. A, B, C: plasma treatment for 20, 10, and 5 min. D: untreated reference. (b) Sb concentration as a function of plasma exposure time. The error bars indicate the variance of the results due to changes of the fitting parameters during data processing.

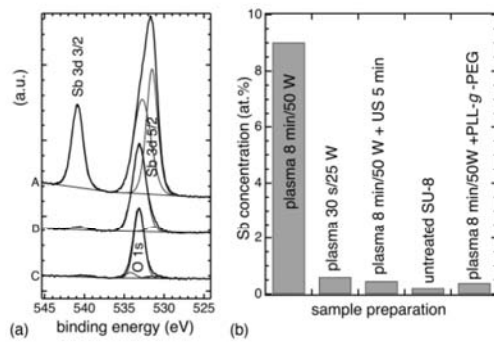


Fig. 6. (color online) Changes in surface chemistry due to oxygen plasma treatment and removal of Sb species with ultrasonication in H₂O. (a) XPS spectra of the O 1s and Sb 3d region. A: plasma treatment (50 W / 8 min). B: Ultrasonication in H₂O for 5 min after plasma activation (50 W / 8 min). C: untreated reference. (b) Quantification of Sb signal for different surface treatments.

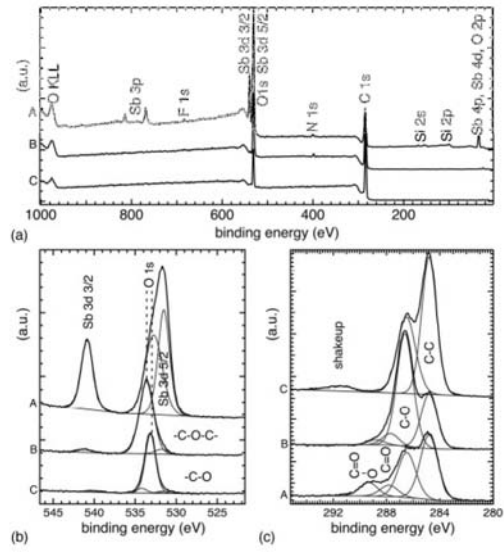


Fig. 7. (color online) XPS signal from oxygen plasma-activated SU-8 samples with PLL-g-PEG coating. A: plasma treatment (50 W / 8 min). B: PLL-g-PEG coating after plasma activation (50 W / 8 min). C: untreated reference. (a) Survey spectra. (b) O 1s and Sb 3d region. (c) C 1s region.

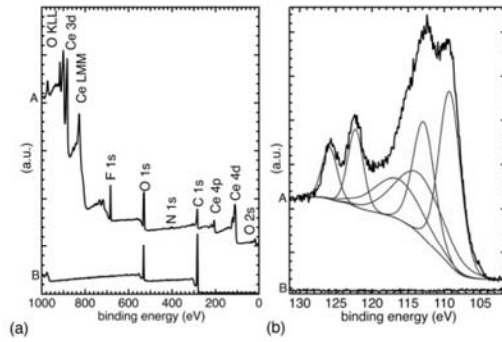


Fig. 8. (color online) Surface modification of SU-8 with CAN etching. A: 60 min CAN etching, followed by 1 min dip in H₂O. B: untreated reference. (a) XPS survey spectra. (b) Ce 4d region. The peaks can be assigned to various initial and final states of Ce³⁺ and Ce⁴⁺.

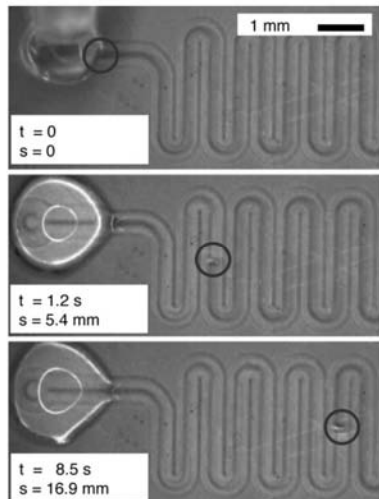


Fig. 9. (color online) Microscope images of advancing water in a SU-8 microchannel (height: 100 μm ; width: 300 μm). Without plasma activation, the water drop did not fill the system (data not shown). After activation by oxygen plasma, the liquid was drawn passively through the microchannels. At $t = 1.2$ s, the water meniscus has advanced 5.4 mm and after 8.5 s the meniscus was at 16.9 mm.

6.3 *Cell Proliferation Assay on Plasma Activated SU-8*

M. Hennemeyer, F. Walther, S. Kerstan, K. Schürzinger, A.M. Gigler und R.W. Stark

Microelectronic Engineering (2008)



Cell proliferation assays on plasma activated SU-8

Marc Hennemeyer^a, Ferdinand Walther^a, Sandra Kerstan^b, Katrin Schürzinger^b,
Alexander M. Gigler^a, Robert W. Stark^{a,*}

^a Center for Nanoscience and Department of Earth and Environmental Sciences, Ludwig-Maximilians-Universität, 80333 München, Germany
^b German Heart Center, Technische Universität München, 80636 München, Germany

Received 25 September 2007; received in revised form 14 January 2008; accepted 15 January 2008
Available online 20 January 2008

Abstract

The photoresist SU-8 is a common material for the fabrication of polymer microfluidic systems. This leads to the question, how cells respond to SU-8 as a substrate. Here, we investigate the effects of oxygen plasma activated SU-8 on cell culturing by means of cell proliferation assays performed on SU-8 coated glass chips. The assays revealed an increase in cell proliferation on activated SU-8 surfaces as compared to untreated SU-8 surfaces. We conclude that the observed increase in proliferation is most likely caused by a change in the surface chemistry.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: SU-8; MRC-5; Biocompatibility; Cell growth; Plasma activation; Hydrophilicity

1. Introduction

The photoresist SU-8 – an EPON based epoxy resin – has proven to be favorable for microfabrication and 3D-lithography due to its excellent capabilities in lithography and its exceptional chemical stability [1]. It is used in soft lithography and for the fabrication of integrated microfluidics, such as lab-on-a-chip systems [2], microreactors [3], or sensors [4]. Polymeric microfluidic systems have also been suggested for biological and medical analysis [5,6], since microsystems are small and, thus, reduce the required fluid volumes. Possible applications include channel systems for the measurement of visco-elastic properties of body fluids [7,8], highly complex micro-total analysis systems, and lab-on-a-chip systems for DNA amplification, and analysis. Implanted systems for health monitoring and drug delivery are also under discussion [9]. While silicon used to be the most important material for the production of such systems, polymeric materials and in particular SU-8

have gained importance, since polymers are cheap to process. However, the native SU-8 surface is hydrophobic. Hence, to use SU-8 in passive microfluidics, it has to be activated. There are wet-chemical processes, e.g. with ceric ammonium nitrate [11] and plasma processes, e.g. with oxygen plasma [10].

For biomedical applications, biocompatibility of the material is essential. To assess the biocompatibility of untreated SU-8, cell culture experiments have been carried out. A study following ISO 10993 together with implantation of different surfaces gave evidence that SU-8 might not be fully biocompatible although the study showed that the toxicity of SU-8 has only a minor impact [12]. Another study examined the effect of SU-8 surfaces – both untreated as well as treated with ceric ammonium nitrate – on carcinoma cells and their genetic information. While cell proliferation decreased in case of the untreated SU-8, the treated SU-8 showed cell growth comparable to that on polystyrene cell culture flasks. Nevertheless, analysis of the genetic material revealed changes in the DNA for one of the wet-chemical treatments [13,14]. For plasma activated SU-8 surfaces, biocompatibility still needs to be addressed.

* Corresponding author. Tel.: +49 89 2180 4329.
E-mail address: stark@lrz.uni-muenchen.de (R.W. Stark).

Therefore, the present study focuses on cell proliferation on oxygen plasma treated SU-8 in comparison to the untreated surface.

2. Materials and methods

SU-8 2 as acquired from MicroChem Corp. (Newton, MA) was used with the developing agent SU-8 Dev 600 (MicroChem). All liquids and gases used in the lithographic process (solvents, developing agent, and process gases) were chosen according to clean room standards.

A wafer of soda-lime glass was cleaned consecutively with acetone, isopropanol, ethanol, and pure water in a spin coater. The wafer was heated to 200 °C afterwards and kept at that temperature for 10 min to remove water from the surface. Immediately after cooling the wafer to room temperature, SU-8 was applied at 500 min⁻¹ for 10 s in order to dispense the resin. This procedure was followed by spinning for 30 s at 5000 min⁻¹ to bring the resin to a final thickness of 1 µm. After 10 min at rest, the wafer was softbaked for 60 s at 65 °C and another 300 s at 95 °C. Consecutively, it was exposed to UV-light (i-line) for 40 s in a MJB55 mask aligner (Süss Microtech, Garching, Germany). A post-exposure bake (65 °C, 60 s followed by 95 °C, 60 s) preceded the development of the wafer in SU-8 developer (300 s). Then the wafer was flushed with isopropanol and dried with clean nitrogen. After processing, the wafer was cut into chips of 1 × 1 cm².

For the experiments, the chips were grouped in three sets of four chips each. Two of the sets were treated with different doses of low frequency (40 kHz) oxygen plasma (Femto, Diener Electronic, Nagold, Germany), applying 25 W for 30 s (2.77 J/cm²) and 50 W for 120 s (22.2 J/cm²), respectively, at a pressure of 0.4 mbar. A third set remained untreated. In addition to these SU-8 chips, one test set was cut from a standard object slide. This set was treated with oxygen plasma of 50 W for 120 s and served as a control.

After surface treatment, all sets were autoclaved and rinsed with phosphate buffered saline (PBS) to provide sterile surfaces. All four sets of chips were seeded with the same amount of MRC-5 cells. This cell line is derived from human fibroblast like cells from fetal healthy lung tissue. It is commonly used in the quality assurance of cell culture devices. The cells were cultivated in Eagle's Minimal Essential medium (EMEM) with Earle's BSS and 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, USA) together with 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 1.5 g/l sodium bicarbonate and 10% fetal bovine serum. During cultivation the cells were stored at 37 °C and 5% CO₂. After 3 days of cultivation, the cells were fixed by submerging them into 4% paraformaldehyde in PBS solution for 20 min. Finally, the chips were inspected with an optical microscope and the number of cells/mm² was counted in four areas at the center of each chip. A statistical one way analysis of the count variance with a Holm-Sidak test to a probability of $p = 0.05$ was carried out.

Surface roughness values were determined by atomic force microscopy (AFM) in tapping mode with a Dimension 3100 equipped with a NanoScope IV controller (Veeco Metrology Inc., Santa Barbara, CA) using silicon cantilevers (BS-TAP300, BudgetSensors, Sofia, Bulgaria).

3. Results

After several days of cell culturing, cell proliferation and cell morphology were investigated by phase-contrast light microscopy. Mainly solitary cells were found on the glass control. Cell agglomerations were very scarce on both surfaces, glass and untreated SU-8 (Fig. 1a and b). The cells formed a nearly confluent layer on SU-8 surfaces treated with both low (Fig. 1c) and high (Fig. 1d) dose plasma. On all samples, the cells showed typical filamentous and vital appearance. A typical fibroblast morphology, as it is described in reference [15], with multiple cytoplasmic appendages interconnecting the cells was observed on the plasma treated surfaces. In contrast, the cells loosely covered the surface and remained solitary in most cases on the untreated SU-8 (Fig. 1b).

A quantitative analysis of the number of cells per unit area revealed a significant increase of the cell density on the plasma activated SU-8. As shown in Fig. 2, the density increased from about 50 cells/mm² on glass and 75 cells/mm² on untreated SU-8 to 260 cells/mm² and 350 cells/mm² on activated SU-8 subjected to a low and a high plasma dose, respectively. This observation indicates an increased cell proliferation on activated SU-8 in comparison to the untreated SU-8. The degree of cell proliferation on the SU-8 surfaces activated by a high and low plasma dose did not differ with statistical significance.

Surface roughness was determined by AFM prior to cell culturing. The results are summarized in Fig. 3. The untreated SU-8 surface was rather smooth with a root mean square (rms) roughness of 0.25 nm. Surface roughness is increased by the plasma treatment to 0.3 nm for the low plasma dose and 2.4 nm for the high plasma dose.

4. Discussion

For the interpretation of the results it is important to recall that the SU-8 solution contains an antimony salt as photo acid generator. Oxygen plasma treatment of processed SU-8 surfaces not only activates the surface, but also preferentially etches the hydrocarbon components of the polymer. Thus, antimony is increasingly accumulated at the surface [10] and might, thus, influence cell proliferation. Antimony and its compounds are suspected to be toxic, but their toxicity and the carcinogenic potency of antimony is still under discussion [16,17]. Several articles describe the clastogenicity and elucidate the effects of antimony to different organisms [16–19]. Despite the enrichment of antimony at the surface of plasma treated SU-8 (up to 2.6 at.%) [10], we did not observe a decreased cell proliferation. This observation can be explained as a combined

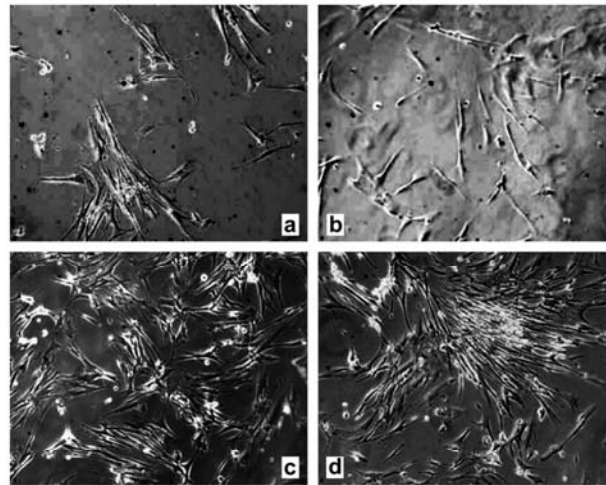


Fig. 1. Representative images (10×) of MRC-5 cells after 3 days of cultivation on (a) plasma activated soda-lime glass, (b) an untreated SU-8 surface, (c) an oxygen plasma activated SU-8 with a dose of 2.77 J/cm² and (d) 22.2 J/cm².

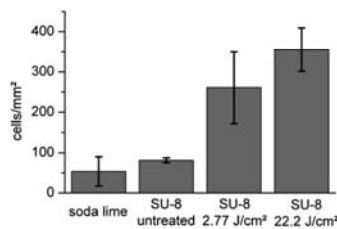


Fig. 2. Average and standard deviation of cells counts on surfaces as indicated ($n = 16$ each).

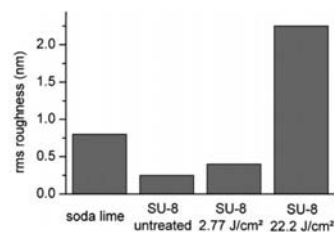


Fig. 3. The rms surface roughness of the substrates prior to cell culture.

effect of several aspects. Firstly, antimony could either be chemisorbed at the surface or washed away during the sample preparation. Both processes would reduce the amount of antimony available for the cells. Secondly, the Sb(V) compounds which we found in SU-8 [10] are reported less

toxic than Sb(III) compounds [16]. As a word of caution it should be mentioned that it still remains to be tested experimentally, to which extent the interaction with SU-8 might provoke carcinogenic mutations although Ref. [16] suggests that mutations are not dominant in the case of Sb(V).

The change of the chemical surface properties and the resulting presence of charges could contribute to the increased proliferation on plasma treated SU-8 [20–22]. Our earlier XPS measurements on plasma activated SU-8 showed an increased density of polar carboxyl groups [10], which also cause surface charges in aqueous solution. Thus, the increased wettability of oxygen plasma activated surfaces correlates with an improved cell attachment. Another important factor might be the surface roughness. A correlation between roughness, wetting, and cell adhesion has been reported by several authors [21–23]. However, no increase of cell proliferation could be found on surfaces with a sub-micrometer roughness for various substrates (PMMA, titanium, hydroxyapatite). Cell adhesion was only enhanced for roughnesses on the order of several micrometers [23,24]. This is in agreement with our observation that there was no statistically significant difference in the cell proliferation on SU-8 surfaces after low and high dose plasma treatment although the rms roughness differs by nearly one order of magnitude within the (sub)-nanometer range.

5. Conclusion

The results indicate that oxygen plasma treatment enhances cell proliferation on bare SU-8. Cell proliferation

on plasma etched SU-8 surfaces significantly exceeds that on untreated SU-8 surfaces. The most probable reason for the enhanced cell growth is the altered surface chemistry due to the plasma treatment. Concluding, the surface activation by oxygen plasma treatment can be a valuable step in processing SU-8 surfaces for applications, where biocompatibility and, hence, cell adhesion is of interest.

Acknowledgement

We gratefully acknowledge financial support by the German Federal Ministry of Education and Research Grant “Nanofutur” 03N8706.

References

- [1] A. del Campo, C. Greiner, *J. Micromech. Microeng.* 17 (2007) R81–R95.
- [2] S. Balslev, A.M. Jorgensen, B. Bilenberg, et al., *Lab Chip* 6 (2006) 213–217.
- [3] R. Yang, J.D. Williams, W.J. Wang, *J. Micromech. Microeng.* 14 (2004) 1345–1351.
- [4] J. Carlier, S. Arscott, V. Thomy, et al., *J. Micromech. Microeng.* 14 (2004) 619–624.
- [5] H. Sato, H. Matsumura, S. Keino, et al., *J. Micromech. Microeng.* 16 (2006) 2318–2322.
- [6] M.H. Wu, H.Y. Cai, X. Xu, et al., *Biomed. Microdev.* 7 (2005) 323–329.
- [7] C. Clasen, G.H. McKinley, *J. Non-Newton. Fluid.* 124 (2004) 1–10.
- [8] P. Wilding, J. Pfahler, H.H. Bau, et al., *Clin. Chem.* 40 (1994) 43–47.
- [9] P. Tabeling, *Introduction to Microfluidics*, Oxford University Press, Oxford, 2005, p. 301.
- [10] F. Walther, P. Davydovskaya, S. Zürcher, et al., *J. Micromech. Microeng.* 17 (2007) 524–531.
- [11] M. Nordström, M. Rodolphe, M. Calleja, et al., *J. Micromech. Microeng.* 14 (2004) 1614–1617.
- [12] G. Kotzar, M. Freas, P. Abel, et al., *Biomaterials* 23 (2002) 2737–2750.
- [13] M. Stangegaard, Z. Wang, J.P. Kutter, et al., *Mol. BioSyst.* 2 (2006) 421–428.
- [14] G. Voskerician, M.S. Shive, R.S. Shawgo, et al., *Biomaterials* 24 (2003) 1959–1967.
- [15] J.P. Jacobs, C.M. Jones, J.P. Baille, *Nature* 227 (1970) 168–170.
- [16] M. De Boeck, M. Kirsch-Volders, D. Lison, *Mutat. Res.* 533 (2003) 135–152.
- [17] T.J. Patterson, M. Ngo, P.A. Aronov, et al., *Chem. Res. Toxicol.* 16 (2003) 1624–1631.
- [18] N. Schaumloffel, T. Gebel, *Mutagenesis* 13 (1998) 281–286.
- [19] T. Gebel, *Chem. Biol. Interact.* 107 (1997) 131–144.
- [20] S. Hattori, J.D. Andrade, J.B. Hibbs, et al., *J. Colloid. Interf. Sci.* 104 (1985) 72–78.
- [21] P.B. van Wachem, A.H. Hogt, T. Beugeling, et al., *Biomaterials* 8 (1987) 323–328.
- [22] K. Webb, V. Hlady, P.A. Tresco, *J. Biomed. Mat. Res.* 41 (1998) 422–430.
- [23] M. Lampin, R. Warocquier-Clérout, C. Legris, et al., *J. Biomed. Mat. Res.* 36 (1997) 99–108.
- [24] D.D. Deligianni, N.D. Katsala, P.G. Koutsoukos, et al., *Biomaterials* 22 (2001) 87–96.

6.4 *Cantilever Microrheometer for the characterization of sugar solutions*

M. Hennemeyer, S. Burghardt und R.W. Stark

Sensors (2008), 8, 10-22

Sensors **2008**, *8*, 10-22

sensors

ISSN 1424-8220

© 2008 by MDPI

www.mdpi.org/sensors

Full Research Paper

Cantilever Micro-rheometer for the Characterization of Sugar Solutions

Marc Hennemeyer, Stefan Burghardt and Robert W. Stark *

Ludwig-Maximilians-Universität München, Center for NanoScience (CeNS) and Dept. Earth and Environmental Sciences, Theresienstraße 41, 80333 Munich, Germany

Web: <http://www.nanobiomat.de>, E-mail: marc@hennemeyer.de; stark@lrz.uni-muenchen.de

* Author to whom correspondence should be addressed.

Received: 29 October 2007 / Accepted: 4 January 2008 / Published: 9 January 2008

Abstract: The volume required for the rheological characterization of fluids can be minimized by using micromechanical cantilevers as viscosity sensors. Here, a simple measurement tool for the characterization of sugar solutions is proposed. The sensor consists of a micromechanical cantilever as used in an atomic force microscopy which is integrated into a closed fluid handling system. Fluid properties are derived from an analysis of the power spectral density of the fluctuations of the cantilever deflection signal. The data acquisition system is operated with standard consumer computer components, which limits the costs for the hardware. Measurements with different sugar solutions indicate that the sensor system provides reliable viscosity values for sugar concentrations as they occur in biological systems. The viscosities of the sugar solutions could be evaluated with an error smaller than 5 %.

Keywords: cantilever sensor, viscosity, sugar solution, thermal noise.

1. Introduction

A rheological characterization of liquids in an integrated device is of high interest in biotechnology, medicine and automotive engineering. Since traditional measurement techniques require at least several millilitres of sample fluid, the last years have seen an increased interest in the miniaturization of measurement tools. To minimize the required fluid volume, rheological characterizations have to be carried out in a microfluidic system.

There have been several approaches to establish vibrating plates as viscometers besides standard measurement techniques such as falling ball, rotation and capillary viscometry. The influence of fluids on vibrating plates and their possible use as sensors has already been discussed in the 1960s [1]. Today, a vast choice of micromechanical cantilevers is commercially available due to the widespread use of the atomic force microscope (AFM). These AFM cantilevers are usually between 100 μm and 400 μm long, 20 μm to 40 μm wide and 2 μm thick. Typical resonant frequencies in water are within the range from 1 kHz to 100 kHz. These characteristics make AFM cantilever well suited physical sensors for the characterization of fluid viscosity based on the principle of vibrating plates. Several research groups demonstrated viscosity measurements by AFM cantilevers. Two measurement strategies can be identified. One relies on the analysis of stochastic fluctuations due to Brownian motion [2, 3] the second on the measurement of the cantilever response to sinusoidal forcing [4]. The former does not require additional actuation of the sensor, whereas an appropriate actuation scheme is required for the latter. Although often neglected, there are subtle differences between both schemes. Theoretical calculations showed that the peak frequency of the response to acoustic excitation is higher than the peak frequency of Brownian motion in highly viscous fluids [5]. Since this peculiarity of the acoustic excitation is usually neglected in the theoretical literature, frequency measurements based on the analysis of Brownian cantilever fluctuations can be expected to be a closer match to theoretical values than measurements obtained by acoustic cantilever excitation.

Another important issue is the simultaneous measurement of liquid density and viscosity since both critically depend on the temperature. Sader et al. developed a theoretical framework [6, 7] for the description of cantilever vibrations in viscous fluids which also allows for the simultaneous measurement of both parameters [8]. Recent theoretical works discussed viscous drag on microcantilevers [9], frequency response of cantilevers near a solid wall [10], and hydrodynamic loading [11] by finite-element analysis. Experimental works covered the application of special cantilever geometries [12], the vibration characteristics in the vicinity of surfaces [10], the influence of the temperature [13], the use of uncalibrated cantilevers [14, 15] and the applicability of cantilever MEMS sensors to the low-flow evaluation of density and viscosity of liquids [16]. Recently it was shown that high flow rates increase the resonant frequency of cantilevers in thin channels [17] due to high pressure differences.

In this work, we demonstrate viscosity measurements of sugar solutions. Sugar solutions are valuable test systems for such a microfluidic device because many biological liquids contain a remarkable amount of sugar. The sugar concentration in plant saps can reach typical values up to 0.8 mol/l [18]. In order to limit the amount of liquid under investigation, a low-cost system for the rheological characterization of liquids was integrated into a microfluidic system. The device was based on commercially available microcantilevers as used in atomic force microscopy.

2. Theoretical Background

Data analysis was based on the method of hydrodynamic function as introduced in Refs. [6-8]. A simple model function was fitted to the power spectral density of stochastic cantilever oscillations. The cantilever was modelled as a beam with rectangular cross section and rectangular plane view, which has a length to width ratio significantly larger than one. These conditions are valid for many commercial available rectangular cantilevers. For quality factors $Q \gg 1$, the amplitude response $A(\omega)$ of the cantilever can be estimated in the vicinity of the resonance peak as a damped driven harmonic oscillator [19]

$$A(\omega) = \frac{A_0 \omega_R^2}{\sqrt{(\omega^2 - \omega_R^2)^2 + \omega^2 \omega_R^2 / Q^2}}, \quad (1)$$

where A_0 denotes the amplitude at the frequency $\omega = 0$, Q the quality factor and ω and ω_R the radial frequency and resonant frequency, respectively. From the theory of the damped harmonic oscillators it is clear that with decreasing Q the difference between the resonant frequency ω_R and the peak frequency in the amplitude response curve increases.

For cantilever calibration and measurement of rheological parameters, we used equations (2a) and (2b) as given in Ref. [8]. Resonant frequency ω_R and quality factor Q in the fluid are given by

$$\omega_R = \frac{\omega_{\text{vac}}}{\sqrt{1 + \frac{\pi \rho b^2}{4\mu} \Gamma_r(\omega_R)}}, \quad (2)$$

$$Q = \frac{4\mu}{\pi \rho b^2 + \Gamma_i(\omega_R)}. \quad (3)$$

Here, parameter ω_{vac} denotes the resonant frequency in vacuum, ρ the density of the fluid, μ the linear mass density of the beam, and Γ the hydrodynamic function as given in Ref. [6]. The indices i and r indicate imaginary and real part of the function. For calibration, the equations (2) and (3) have to be solved for ω_{vac} and μ which leads to

$$\omega_{\text{vac}} = \omega_R \sqrt{1 + \frac{\pi \rho b^2}{4\mu} \Gamma_r(\omega_R)}, \quad (4)$$

$$\mu = \frac{\pi \rho b^2}{4} [Q \Gamma_i(\omega_R) - \Gamma_r(\omega_R)]. \quad (5)$$

After calibration of the cantilever with a test fluid with known properties, the viscosity and density of any fluid can be calculated numerically by simultaneously solving equations (2) and (3) by a computer algebra program such as *Mathematica*TM.

3. Experimental Setup

The measurement system consisted of a mechanical measuring stage, a pre-amplifier, a signal conditioning electronics, and a commercially available sound card for analogue to digital conversion. A steel frame ($L \times W \times H = 160 \text{ mm} \times 60 \text{ mm} \times 140 \text{ mm}$) held all mechanical components of the sensor system. A video camera was attached on the top plate of the frame for optical control and could be adjusted in z-direction for focussing. The support for the measuring chamber was placed at the bottom of the frame. The support could be moved in x- and y-directions to adjust the cantilever in the field of view of the camera (figure 1).

Figure 2 shows the measurement chamber which was made from a $20 \times 20 \times 3.3 \text{ mm}^3$ copper block to ensure thermal stability. A groove in the middle served as measurement chamber. Two supply channels were drilled into the copper block, connecting the measurement chamber with the left and right side of the block. Two flexible plastic tubes (Tygon®, 1.06 mm ID) connected the supply channels to a syringe which served as supply reservoir and to a waste container. The liquid was fed to the measurement chamber by a syringe pump. A PT100 resistance thermometer attached to a digital multimeter was used to control the temperature of the measurement chamber. A stable bulk temperature of 25°C was observed during the measurements. The cantilever chip was glued onto a glass cover slip by a two component epoxy resin (plus endfest 300, UHU GmbH & Co KG, Germany). The channel was then sealed with this glass cover slip using hot-melt adhesive. The total volume of the channel is about $10 \mu\text{l}$ which is reduced to less than $1 \mu\text{l}$ after inserting the cantilever chip.

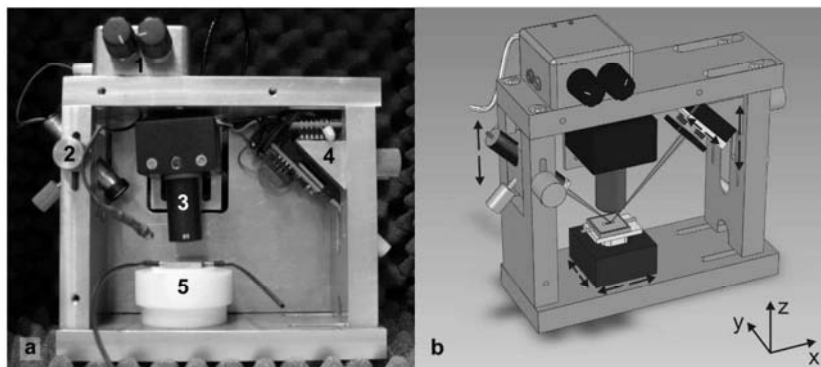


Figure 1. (a) Photograph and (b) drawing of the cantilever sensor system. Important components are the signal pre-conditioning electronics (1), the laser (2), the camera (3) and the photo diode (4). The microfluidic system is placed on top of an adjustable support (5).

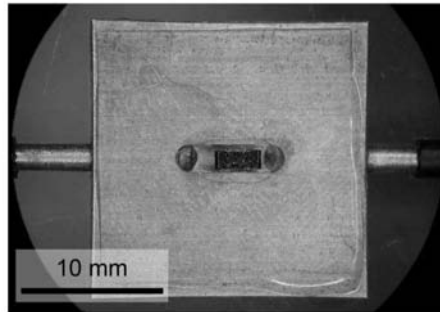


Figure 2. Photograph of the measurement chamber in a 20 mm × 20 mm × 3.3 mm copper block.

For all measurements commercial cantilevers were used (NSC12, MikroMasch, Tallinn, Estonia). E-type cantilevers with a nominal resonant frequency of 29 kHz were used for no-flow measurements. The measurements under steady flow were also performed with the 29 kHz E-type levers and additionally with a harder cantilever (D-type, nominal resonant frequency 39 kHz). Both types of cantilevers had a width of 35 μm . The length was 300 μm (D-type) and 350 μm (E-type). Both thus met the condition of an aspect ratio significantly greater than one [3].

The cantilever deflection was read out by light lever detection. The laser diode (7mW, DL-3147-060 of IMM Meßtechnologie GmbH, Germany) and the photo split detector (QP50-6 U1 of Silicon Sensor GmbH, Germany) were mounted on the sides of the frame. The laser diode could be moved along the vertical axis of the stage for aligning the laser on the cantilever, as well as in the direction of its optical axis for focussing. The photo diode could be moved in the z-axis of the stage and in the plane parallel to its surface as depicted in figure 1 (b). This mounting allows the operator to place the spot of the laser beam in the centre of the diode.

The electronics consisted of a signal conditioning unit together with an amplifier (OP467, Analog Devices, MA, USA) and a commercial soundcard (24bit, 96kHz, Sound Blaster Audigy 2NX™, Creative Labs Inc., Singapore) for data acquisition. Four current to voltage converters were mounted in the direct vicinity of the photodiode, thus minimizing noise pick up. The pre-amplified signals were passed through an analog processing electronics to calculate the difference between top and bottom segments and the resulting signal was recorded by the soundcard. The electronic bandwidth was 20 Hz to 45 kHz. Frequencies between 45 kHz and 48 kHz showed a linear roll off due to the anti-aliasing filter of the soundcard. The data acquisition was controlled by a LabView (National Instruments, Austin, TX, USA) program that incorporated a publicly available LabView VI to access the soundcard, a power-spectral density module and averaging routines.

Experiments were carried out in air, in distilled water, and in various sugar solutions at concentrations from 0.2 mol/l up to 2.0 mol/l. Distilled water was used as reference liquid for calibration of the system. Solutions of the monosaccharides fructose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) and glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), as well as of the disaccharide sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) were characterized. All carbohydrates were prepared by first producing a 2.0 mol/l stock solution that was diluted to the desired concentration. After adjusting the concentration to the desired value, the liquids were degassed in an ultrasonic bath and then injected into the chamber with a syringe pump. For static measurements a series of measurements

was carried out without flow. During the dynamic measurements a steady flow of 3 $\mu\text{l/s}$ was maintained. After each measurement, data were Fourier transformed and a complete set of 250 measurements was consecutively averaged. After flushing the measurement chamber with air it was refilled with new solution to a total number of 5 measurement sets for each concentration.

To evaluate the absorption of light in the sugar solutions in the vicinity of the laser's wavelength, absorption spectra were acquired using a UV-VIS spectrometer (ISS UV/VIS USB 4000, Ocean Optics, Dunedin, FL, USA) that was equipped with a grating and a diode array for simultaneous acquisition of full spectra within a range from 200 nm to 950 nm wavelength.

4. Results and Discussion

4.1. Noise measurements

The measurements in water and sugar solutions showed a clear shift in resonant frequency and Q-factor in comparison to measurements in air. Figure 3 shows typical power spectral densities of the cantilever deflection signal in air, distilled water and 2 mol/l sucrose solution. The datasets were normalized to their total power (area beneath the graph). The signal to noise ratio, defined as the ratio between the peak height and the root mean square (rms) amplitude of the noise in the signal, was about $S/N = 100$ for the measurement in air.

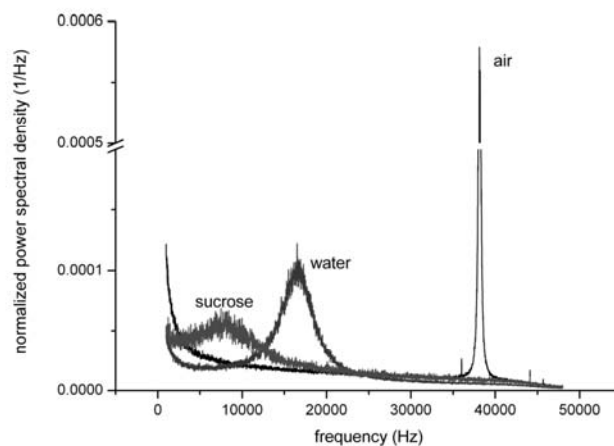


Figure 3: Power spectral density of the deflection signal obtained with the 39 kHz D-type cantilever in air (black), water (red) and 2 mol/l sucrose solution (green). The magnitudes were normalized to the area beneath the curve, i.e. the total power.

In liquid, the signal to noise ratio decreased from $S/N = 10$ in distilled water to a minimum value of $S/N = 5$ with increasing sugar concentration. The resonant frequency decreased from 39 kHz in air to about 16 kHz after flooding the chamber with distilled water. The quality factor decreased from $Q = 147$ to $Q = 3.3$. After water was exchanged by 2.0 mol/l sucrose solution the resonant frequency

was reduced further to 9 kHz and the quality factor dropped to $Q = 1$. Thus the microcantilever was critically or nearly critically damped in sugar solution. This effect was caused by the differences in viscosity and density between water and sucrose solution. A slight roll-off at frequencies over 42 kHz was due to the low-pass anti-alias filter of the soundcard. In the low frequency range, the measurement bandwidth was restricted to frequencies larger than 1.5 kHz since at lower frequencies the signals were dominated by $1/f$ -noise.

4.2. Sensitivity to sugar concentration

Figure 4 shows the resonant frequencies and the quality factors Q for the 29 kHz E-type cantilever in comparison to theoretical values predicted on the basis of literature values. The experimental values for the quality factor Q and resonant frequency $f = \omega/2\pi$ were obtained by fitting the squared response of an oscillator as given by equations (1) to the power spectral density of the cantilever deflection signal. To predict the theoretical values f_{theo} and Q_{theo} the viscosities and densities of the solutions were taken from reference [20] and inserted into equations (2) and (3). For sucrose, additional literature values were taken from Refs. [2-4].

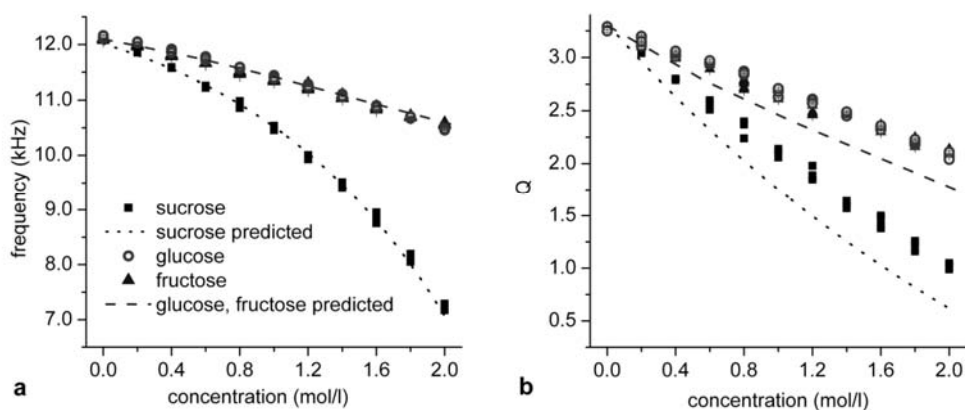


Figure 4: Resonant frequency and quality factor Q of the 29-kHz-sensor (E-type) in various solutions as indicated. The dashed lines indicate predicted values. (a) A good agreement between predicted and measured resonant frequencies was obtained. (b) The predicted Q -factors systematically underestimate the measured values.

For zero concentration, i.e. in pure water, all measurements showed the same frequency and quality factor within the limits of the experimental error. With increasing concentration the resonant frequencies decreased as illustrated in fig. 4 (a). For the glucose measurements the resonances decreased from 12.10 kHz in pure water to 10.50 kHz in 2.0 mol/l solution with a maximum error of 20 Hz. The fructose measurements showed a slightly smaller slope. The resonant frequency decreased

to 10.6 kHz (± 20 Hz) in 2.0 mol/l solution. In sucrose solution, the resonant frequency dropped to 10.20 kHz (± 30 Hz) in 1.0 mol/l solution and to 6.85 kHz (± 50 Hz) in 2.0 mol/l solution. An exponential behaviour of the frequency reduction was observed in the case of sucrose solution. The frequency change in the solution of the disaccharide sucrose was significantly larger than in the monosaccharides fructose and glucose. This difference can be explained by the higher molecular weight and the bigger size of the sucrose molecule. In general, the relations between concentration and resonant frequencies well matched the theoretical predictions of the resonant frequencies.

As indicated in fig. 4 (b) the quality factor also decreased with increasing concentrations. The experimental error was 15 % as obtained from the deviation between the fit and the extremal measurement values. The quality factor in glucose and fructose solution decreased from its maximum value of $Q = 2.45$ in pure water to a minimum of $Q = 1.65$ at 2 mol/l. In the sucrose, the quality factor decreased to $Q = 1.67$ at 1.0 mol/l and $Q = 0.91$ at 2.0 mol/l concentration. In general, the measured quality factors were larger than the predicted quality factors Q_{theo} . The systematic deviation between both increased from less than 10 % at low concentrations to 50% for highly concentrated sucrose.

4.3. Influence of laser heating

As discussed in the previous section there was a systematic discrepancy between theoretically predicted and experimentally measured Q-factors. Such a deviation could be a sign of a heating up of the solutions during the measurement process since viscosities are reduced at higher temperatures. This assumption is also supported by experiments reported by Kim and Kihm [13], who showed that the change of resonant frequency of a microcantilever at increasing temperatures is mainly explained by a reduced viscosity. In our measurement system, no mechanical energy is coupled into the liquid. The detection laser is the only possible source of heat. Thus, UV/Vis-absorption spectra were acquired in order to estimate the amount of energy coupled into the liquid by laser heating. In general, the absorbance A is proportional to the concentration and the path length, as it is predicted by the Beer-Lambert law

$$A = \alpha(\lambda) \cdot l \cdot c, \quad (6)$$

where $\alpha(\lambda)$ denotes the wavelength dependent absorption coefficient, l the path length and c the concentration of the solution. Briefly, the absorbance increases linearly with the concentration and the path length. The spectra in figure 5 show an absorbance of 0.02 at 635 nm wavelength on a path length of 1 mm in 1 mol/l sucrose. The absorbance increased to 0.06 in 2 mol/l sucrose solution.

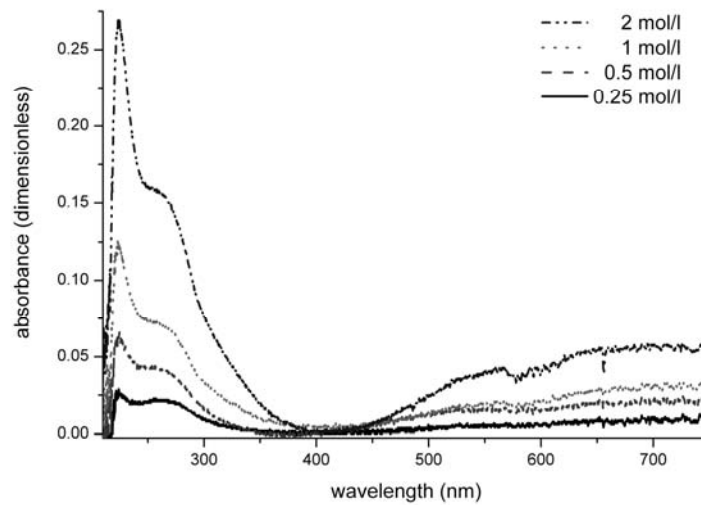


Figure 5. UV/VIS absorbance spectrum of sucrose solutions over 10 mm path length. The absorbance at 635 nm wavelength is about 0.05 for the 2 mol/l concentration and decreases with the concentration.

To test the effects of local heating on resonant frequency and Q-factor, additional measurements were performed without flow and under a steady flow. To rule out hydrodynamic effects pure water was used in the control experiment. As shown in figure 6 (a) no frequency shift could be observed. Figure 6 (b) shows the typical shift of the resonant frequency at a liquid flow of $3 \mu\text{l/s}$ for the D-type cantilevers. After switching on the steady flow of $3 \mu\text{l/s}$ the mean value of the resonant frequency and quality factor dropped from 9.85 kHz to 9.70 kHz and from $Q = 1.37$ to $Q = 1.3$, respectively. A statistical analysis of five independent measurements proved the statistical significance of the shifts. The change in resonant frequency corresponds to an increase in viscosity of about 1.2 mPas. With the relation between temperature and viscosity of sucrose solutions taken from references [21, 22], the increased viscosity can be explained by a heating of 1.2°C of the probed fluid volume. Measurements with the softer cantilevers (E-type) also showed the same trend, although less pronounced. We obtained a mean resonant frequency of 6.85 kHz without flow and of 6.84 kHz at a flow of $3 \mu\text{l/s}$. The Q-factors decreased from a mean value of 1.04 for measurements without flow to a mean value of 0.93 under steady flow.

The most likely reason for the frequency shift in concentrated sugar solutions due to the increased flow is the influence of laser heating on the actual viscosity of the fluid in the vicinity of the cantilever. This heating effect is reduced by the convective heat transport connected with the fluid flow. As the control experiment in water indicates, the effect of the flow itself on the cantilever vibration seems to be negligible (see also Etchart *et al.* [16] for a similar discussion). The effect of the liquid flow was too small to increase the resonant frequencies. After switching the flow off, the resonant frequency recovered to the no-flow value faster than it could be resolved by the measurement process. The fast

increase of the resonant frequency can be explained by the small volumes that have to be heated by the laser to affect the motion of the cantilever. As discussed by Oden *et al.* [2] only a very small volume around the cantilever contributes to its movement. The radius of the fluid volume that influences the motion of the cantilever is about 30 μm for a cantilever with a width of 20 μm . The radius of the focussed laser spot is about 40 μm , thus heating the entire relevant volume.

Thus, only a part of the discrepancy between the experimental data and the theoretical predictions at concentrations higher than one mol/l could be explained by the heating effect of the laser. A noticeable deviation remained between theory and experiment which could only be corrected by a phenomenological master function that will be introduced in the following section. This observation leads to the conclusion, that at high sugar concentrations – which imply Q-factors close to one – the analysis based on the harmonic oscillator is less precise and needs to be improved. Here, more accurate hydrodynamic models for the oscillation of a microcantilever in a viscous fluid are needed.

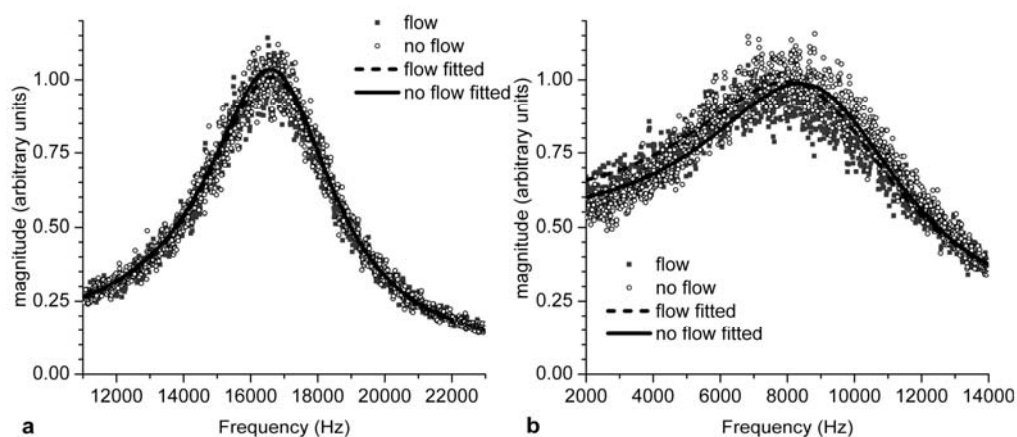


Figure 6 . Effect of liquid flow on the power spectrum. Data were acquired using the 39 kHz D-type cantilever at a bulk temperature of 25 °C. Black circles indicate data obtained without flow while red circles were acquired at a steady flow of 3 $\mu\text{l/s}$. The lines represent the corresponding fits. (a) Control experiment in water. The resonant frequency was not affected by the flow (b) In 2.0 mol/l sucrose solution the resonant shifts 150 Hz to lower frequencies under flow conditions.

4.4. Empirical correction

Due to the nonlinear dependence of the density and viscosity of the quality factor, calculations based on the equations (1-5) would also result in values for the viscosity and density with errors of up to 10 % in the biological relevant concentration range up to 0.8 mol/l. For highly concentrated solutions the systematic error would even reach 100 % at a concentration of 2 mol/l. In order to allow for a precise calculation of viscosity and density a correction function was derived from the relation between the theoretical quality factors Q_{theo} and the mean of the measured quality values Q as shown in Figure 7 (a). From the experimental data a master curve was obtained by regression with the

Levenberg-Marquardt algorithm. The equation for the regression was a three point exponential growth function

$$Q^*(Q) = y_0 + A \cdot \exp\left(\frac{Q}{t}\right). \quad (7)$$

For sucrose the correction parameters were $y_0 = -1.007$, $A = 1.093$ and $t = 2.129$. For fructose and glucose the regression resulted in similar parameters, $y_0 = -0.880$, $A = 1.092$ and $t = 2.201$. As can also be seen in fig 7 (b), there is only a slight variation of the master curve for the different sugar solutions. The correction function eq. (7) permits to correct measured values in order to match theoretical predictions. The relative difference between Q^* and Q_{theo} is less than 1.5 %. By using the corrected quality factor Q^* for the calculation of viscosity, the deviation between the predicted and measured values could be reduced to less than 5 % as illustrated in figure 7 (b). The calculation of density could be greatly improved as well, with deviations not exceeding 10 % over the entire concentration range in comparison to deviations of more than 110% for the uncorrected values. At this point should also be emphasized, that the master curve is purely phenomenological and its parameters have to be obtained for each type of cantilever individually. Nevertheless this procedure provides a valuable tool to calibrate the measurement system. After calibration, the microfluidic sensor allows for a reliable viscosity measurement.

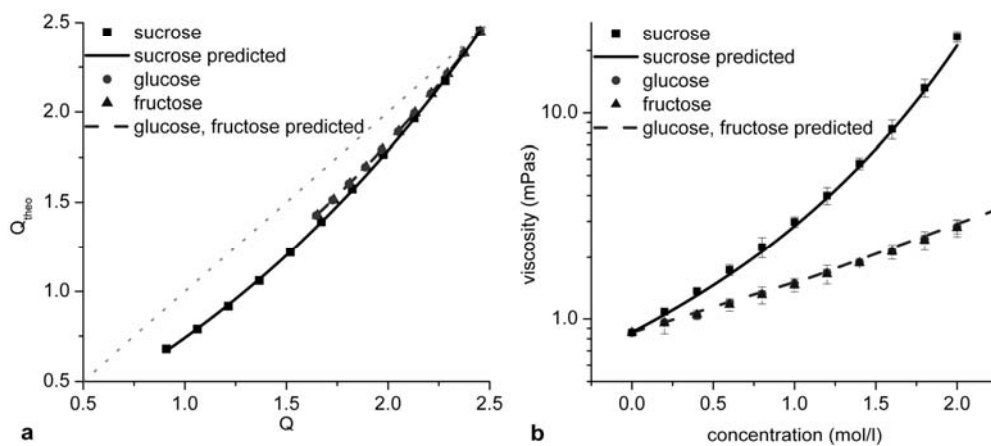


Figure 7. (a) Correlation between the measured quality factor Q and theoretical values Q_{theo} for the three sugar solutions. From the regression of the plots a correction function was derived. The best fit was achieved with an exponential model. The dotted line represents identity. (b) Viscosity calculated from corrected values Q^* for sucrose, fructose and glucose in comparison to the literature data.

5. Conclusions

An integrated microfluidic system for the measurement of density and viscosity of sugar solutions was designed and tested. The measurement system was optimized for the use of a consumer computer soundcard as analogue to digital converter. It was designed to be sensitive enough to rely on stochastic cantilever fluctuations induced by environmental noise and Brownian motion. Resonant frequency and quality factor of the cantilever were obtained by analysis of the noise spectrum of the deflection signal. The integrated system also limits the required fluid volume to less than a micro-litre and allows for characterization of sugar solutions at various concentrations.

A very good agreement between the experimental resonant frequency values and theoretical predictions was found. In the biologically relevant range of sugar concentrations (up to 0.8 mol/l) the measured viscosity values stayed within an error range of less than 10 %. At higher concentrations larger deviations from theoretical values occur and laser heating becomes a noticeable issue. In order to account for these deviations a phenomenological master curve was introduced to correct the measured values. By using a master curve as calibration function reliable viscosity measurements can be achieved in the biologically relevant range with errors smaller than 5 %.

The analysis of the stochastic cantilever oscillations together with the use of consumer computer hardware limits the cost for the measurement hardware since no active actuation is required. This low-cost approach is of course not limited to rheological measurements since the detection of added mass is also feasible. Thus, low cost cantilever sensor systems will certainly find their applications in cost sensitive areas such as education and training or massively parallel testing in highly integrated fluidic systems.

Acknowledgements

Financial support by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF, Grant 03N8706) is gratefully acknowledged.

References

1. Lindholm, U. S.; Kana, D. D.; Chu, W.-H.; Abramson, H. N. Elastic vibration characteristics of cantilever plates in water. *J. Ship Res.* **1965**, *9*, 11-22.
2. Oden, P. I.; Chen, G. Y.; Steele, R. A.; Warmack, R. J.; Thundat, T. Viscous Drag Measurements Utilizing Microfabricated Cantilevers. *Appl. Phys. Lett.* **1996**, *68*, 3814-3816.
3. Ahmed, N.; Nino, D. F.; Moy, V. T. Measurement of Solution Viscosity by Atomic Force Microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **2001**, *72*, 2731-2734.
4. Bergaud, C.; Nicu, L. Viscosity Measurements Based on Experimental Investigations of Composite Cantilever Beam Eigenfrequencies in Viscous Media. *Rev. Sci. Instrum.* **2000**, *71*, 2487-2491.
5. Xu, X.; Raman, A. Comparative dynamics of magnetically, acoustically, and Brownian motion driven microcantilevers in liquids. *J. Appl. Phys.* **2007**, *102*, 034303.
6. Sader, J. E. Frequency Response of Cantilever Beams Immersed in Viscous Fluids with Applications to the Atomic Force Microscope. *J. Appl. Phys.* **1998**, *84*, 64-76.

7. Sader, J. E.; Chon, J. W. M.; Mulvaney, P. Calibration of Rectangular Atomic Force Microscope Cantilevers. *Rev. Sci. Instrum.* **1999**, *70*, 3967-3969.
8. Boskovic, S.; Chon, J. W. M.; Mulvaney, P.; Sader, J. E. Rheological Measurements Using Microcantilevers. *J. Rheol.* **2002**, *46*, 891-899.
9. Clarke, R. J.; Cox, S. M.; Williams, P. M.; Jensen, O. E. The drag on a microcantilever oscillating near a wall. *J. Fluid Mechanics* **2005**, *545*, 397-426.
10. Green, C. P.; Sader, J. E. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids near a solid surface with applications to the atomic force microscope *J. Appl. Phys.* **2005**, *98*, 114913.
11. Basak, S.; Raman, A.; Garimella, S. V. Hydrodynamic loading of microcantilevers vibrating in viscous fluids. *J. Appl. Phys.* **2006**, *99*, 114906.
12. Agoston, A.; Keplinger, F.; Jakoby, B. Evaluation of a vibrating micromachined cantilever sensor for measuring the viscosity of complex organic liquids. *Sens. Act. A* **2005**, *123-24*, 82-86.
13. Kim, S.; Kihm, K. D. Experimental verification of the temperature effects on Sader's model for multilayered cantilevers immersed in an aqueous medium. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *89*, 061918.
14. McLoughlin, N.; Lee, S. L.; Hahner, G. Simultaneous determination of density and viscosity of liquids based on resonance curves of uncalibrated microcantilevers. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *89*, 184106.
15. Papi, M.; Arcovito, G.; De Spirito, M.; Vassalli, M.; Tiribilli, B. Fluid viscosity determination by means of uncalibrated atomic force microscopy cantilevers. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88*, 194102.
16. Etchart, I.; Chen, H.; Dryden, P.; Jundt, J.; Harrison, C.; Hsu, K.; Marty, F.; Mercier, B. MEMS Sensors for Density-Viscosity Sensing in a Low-Flow Microfluidic Environment. *Sens. Act. A* **2007**, doi:10.1016/j.sna.2007.1008.1007.
17. Lubarsky, G. V.; Hahner, G. Calibration of the normal spring constant of microcantilevers in a parallel fluid flow. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, *78*, 095102.
18. Giaquinta, R. T. Phloem Loading of Sucrose. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1983**, *34*, 347-387.
19. Chon, J. W. M.; Mulvaney, P.; Sader, J. E. Experimental validation of theoretical models for the frequency response of atomic force microscope cantilever beams immersed in fluids. *J. Appl. Phys.* **2000**, *87*, 3978-3988.
20. Powell, C. W. R. The viscosity of sugar solutions. *J. Chem. Soc.* **1914**, *105*, 1-23.
21. Bubnik, Z.; Kadlek, P.; Urban, D.; Bruhns, M. *Sugar Technologists Manual*; Bartens: Berlin, 1995; p. 164.
22. Gilli, R. *Calculation on pure sucrose solutions*,
<http://www.seas.upenn.edu/courses/belab/be309/SucroseCalculator.html>, 17. Dec. 2007

6.5 Anhang: Growth of epitaxial Pr₂O₃ layers on Si(1 1 1)

N. M. Jeutter, M. Hennemeyer, R. Stark, A. Stierle und W. Moritz

Materials Science in Semiconductor Processing (2006), 9, 1079-1083



Growth of epitaxial Pr₂O₃ layers on Si(1 1 1)

N.M. Jeutter^{a,*}, M. Hennemeyer^a, R. Stark^a, A. Stierle^b, W. Moritz^a

^aDepartment of Earth and Environmental Sciences, Universität München, 80333 München, Germany

^bMax-Planck-Institut für Metallforschung, 70569 Stuttgart, Germany

Available online 20 November 2006

Abstract

The growth of Pr₂O₃ layers on Si(1 1 1) has been studied by X-ray diffraction, Low-energy electron diffraction (LEED) and atomic force microscopy (AFM). Pr₂O₃ starts to grow as a 0.6-nm thick layer corresponding to one unit cell of the hexagonal phase (1 ML). The X-ray results indicate that layers thicker than 0.6 nm do not grow with the hexagonal phase. Growth takes place at a sample temperature of 500–550 °C. Annealing of the monolayer in UHV at a temperature above 700 °C leads to the formation of Pr₂O₃ and PrSi₂ islands. Silicide islands are found only at annealing in UHV and do not occur at annealing in oxygen atmosphere of 10⁻⁸ mbar. The LEED pattern after heating to 730 °C shows a (2 × 2) and ($\sqrt{3} \times \sqrt{3}$) superstructure and after heating to 1000 °C a (1 × 5) superstructure occurs. The superstructures seen in the LEED pattern arise from silicide structures in the area between the islands. The silicide remains on the surface and cannot be removed with flashing to 1100 °C. Further deposition of Pr₂O₃ on the surface covered with silicide phases does not lead to growth of ordered layers.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Low-energy electron diffraction (LEED); Epitaxial

1. Introduction

Pr₂O₃ is one of the possible metal oxides to replace the native silicon oxide in silicon-based semiconductors, which could fulfil the requirements for a gate oxide [1,2]. It would be highly desirable if epitaxial layers could be grown that exhibit an atomically smooth interface with low-defect density and without silicide or silicate layers at the interface. Only a few oxides have been found up-to-date, which can be grown as epitaxial layer on silicon surfaces. These include HfO₂ and some of the rare

earth oxides like La₂O₃ and Pr₂O₃. Among the rare earth oxides the hexagonal phases have been found to grow epitaxially on the Si(1 1 1) surface and the cubic phases on the Si(1 0 0) surfaces. Pr₂O₃ has been shown previously to grow epitaxially on Si(1 1 1) [3–6], it exhibits a high dielectric constant and is stable in contact with Si at high temperatures. The properties and growth conditions of Pr₂O₃ layers on Si surfaces have therefore been investigated in many studies and by various techniques [7–11] on Si(1 1 1) as well as on Si(1 0 0). An X-ray study of a monolayer Pr₂O₃ on Si(1 1 1) showed that initially a well-ordered layer can be grown. The layer exhibits a p(1 × 1) structure and consists of one unit cell of the hexagonal Pr₂O₃ phase along the c-axis. The interface is formed with a Pr–O–Si bond, whereas the first Pr atom is above the T4 site [12].

*Corresponding author. Present address: ESRF, ID03, BP220, F-38043 Grenoble Cedex 9, France. Tel.: +49 711 6891842; fax: +49 711 6891902.

E-mail address: jeutter@esrf.fr (N.M. Jeutter).

An X-ray study of the strain relaxation in thicker layers showed that above a critical thickness the cubic phase of Pr_2O_3 occurs [8].

One of the key questions in the search for alternative gate oxides on Si substrates is the question of the thermal stability and the interface structure. We present here the results of X-ray diffraction study during growth of the Pr_2O_3 layer, which show that above 650°C Pr silicides are formed when carefully degassed Pr_2O_3 is evaporated. No silicides are found when the layer is annealed in oxygen atmosphere.

2. Experimental results

The Si(111) sample has been prepared in UHV by flash to about 1200°C and subsequent annealing at 900°C . The surface then exhibited the 7×7 reconstruction with low background and sharp reflections in the low-energy electron diffraction (LEED) pattern. Pr_2O_3 layers have been grown by evaporation from a tungsten crucible. The starting material was Pr_6O_{11} that transforms to Pr_2O_3 after careful degassing in UHV. The pressure during evaporation remained in the lower 10^{-9} mbar range and the sample temperature during growth was 550°C . At lower temperatures no ordered structures are obtained and at temperatures above 700°C islands are formed. X-ray diffraction experiments

have been performed at the surface science beam line of the Max-Planck-Institut F. Metallforschung at ANKA, Karlsruhe [13].

The growth of the Pr_2O_3 layer has been monitored by surface X-ray diffraction, see Fig. 1a, by ℓ -scans along the (10ℓ) and (-11ℓ) rod. In this rod the Bragg points of the substrate lattice are at $\ell = -1$ and 5 and the intensity of the clean surface between $\ell = 0.5$ and 4.5 is very small so that the intensity changes during growth arise nearly solely from the growing layer. The intensity increases continuously during growth and exhibits an oscillation, which indicates the presence of two Pr atoms per unit cell of the substrate. This oscillation occurs even at low coverages and indicates that the layer starts to grow as a double layer. This is in good agreement with recent result from STM studies by Libralesso et al. [11]. A structure analysis of the stage when the maximum intensity was reached revealed that the layer consists of one unit cell of the hexagonal phase of Pr_2O_3 [12] as shown in Fig. 1b. This layer is in the following referred to as one monolayer (ML), ordered structures with a lower coverage have not been detected. The LEED pattern shows a 1×1 structure with sharp reflections and low background, see Fig. 2a.

Further growth obviously leads to a restructuring or island formation. The structure of thicker layers has not been analysed here but a recent X-ray

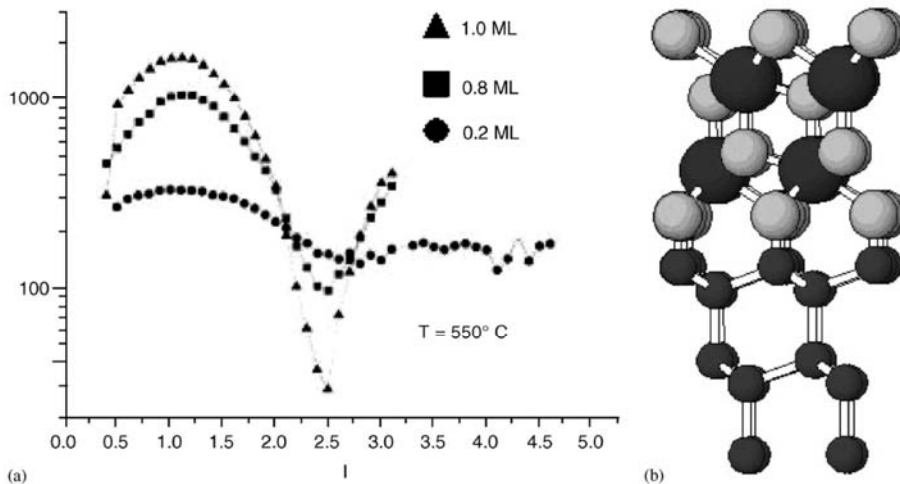


Fig. 1. (a) ℓ -scans of the (10ℓ) rod during deposition of Pr_2O_3 . The continuous increase of the intensity with coverage shows that the initial growth starts with a double layer, i.e., two Pr atoms per substrate unit cell, (b) side view of the structure model.

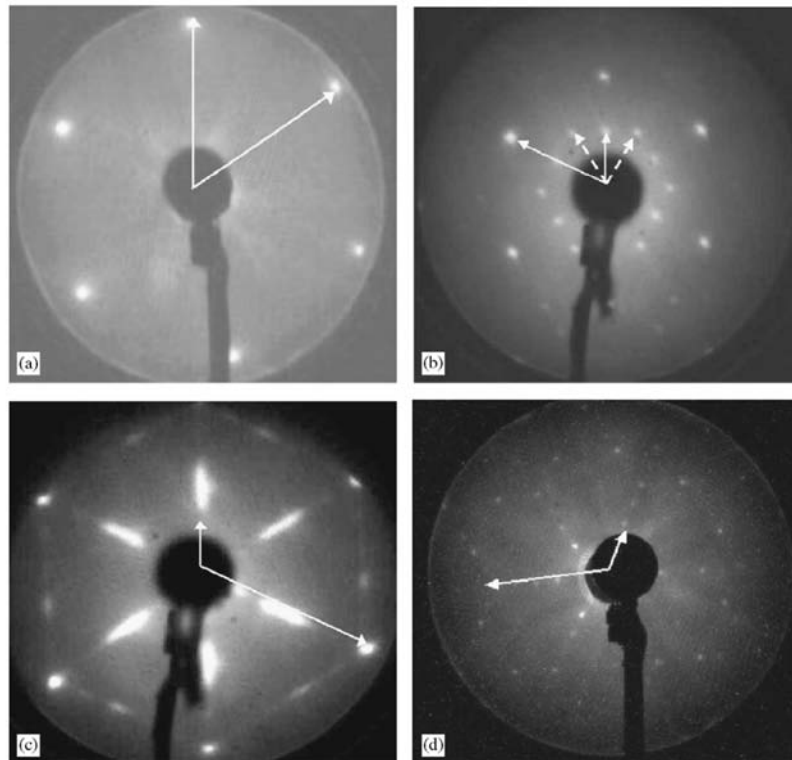


Fig. 2. (a) LEED pattern of the (1×1) structure one monolayer Pr_2O_3 on $\text{Si}(111)$, (b) LEED pattern after annealing the (1×1) structure at 730°C . The pattern shows coincidence of (2×2) and $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})$ structures, (c) disordered (5×1) structure, (d) well-ordered (5×1) phase after annealing at 1000°C . The X-ray diffraction intensities in panels b–d show that islands of Pr_2O_3 and PrSi_2 exist on the surface. The LEED pattern arises from the area between the islands and correspond to the phases obtained after deposition of Pr on $\text{Si}(111)$ [4].

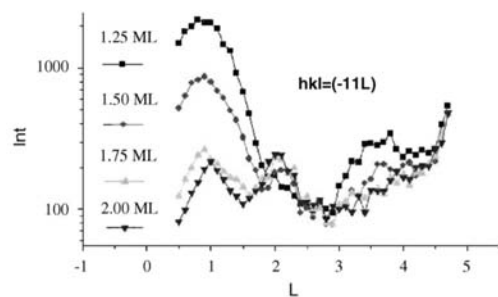


Fig. 3. l -scans of the $(-10l)$ rod during growth at coverage above 1 ML. The significant decrease in the intensity after deposition of more than 1 ML shows that a restructuring takes place. The curve at 2 ML shows peaks at $l = 1$ and 2 that would be expected from a double layer of Pr_2O_3 . The decrease of the intensity by more than a magnitude shows that the coverage with such two Pr_2O_3 layers can only be small.

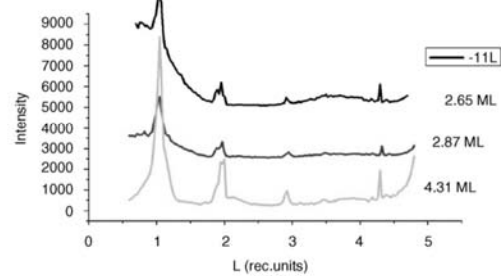


Fig. 4. l -scans of the $(11l)$ rod during deposition of Pr_2O_3 at the substrate temperature of 730°C .

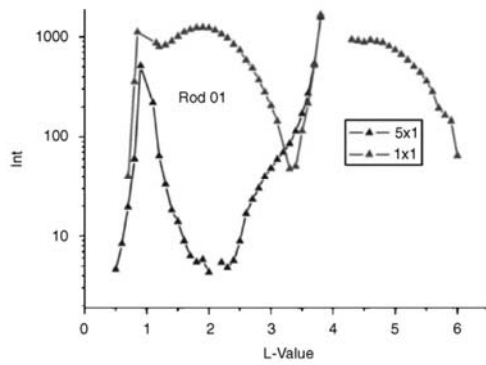


Fig. 5. ℓ -scan of the $(0\ 1\ \ell)$ rod after annealing at $900\ ^\circ\text{C}$ in UHV. In the LEED pattern of the same surface the (5×1) structure is visible. For comparison, the intensity of the $(0\ 1\ \ell)$ rod of the (1×1) structure at 1 ML is shown.

diffraction study of Schröder et al. [8] showed that above a critical thickness of 3 nm the cubic phase of Pr_2O_3 is formed. The ℓ -scans during growth after deposition of 1 ML shown in Fig. 3 exhibit a rapid decrease of the intensity. At coverage of 2 ML two peaks occur at $\ell = 1$ and 2, which would be expected from two hexagonal layers but the intensity is far too small for an ordered layer. It appears that a well-ordered layer of the hexagonal phase with a more thickness than one monolayer does not occur.

Annealing the monolayer at temperatures above $700\ ^\circ\text{C}$ leads to island formation. The intensity along the rods decreases rapidly. Further annealing leads to the formation of silicide islands. The ℓ -scans along the $(-1\ 1\ \ell)$ rod in Fig. 4 show peaks that clearly arise from PrSi_2 islands. The LEED pattern of this surface exhibits a (2×2) and a

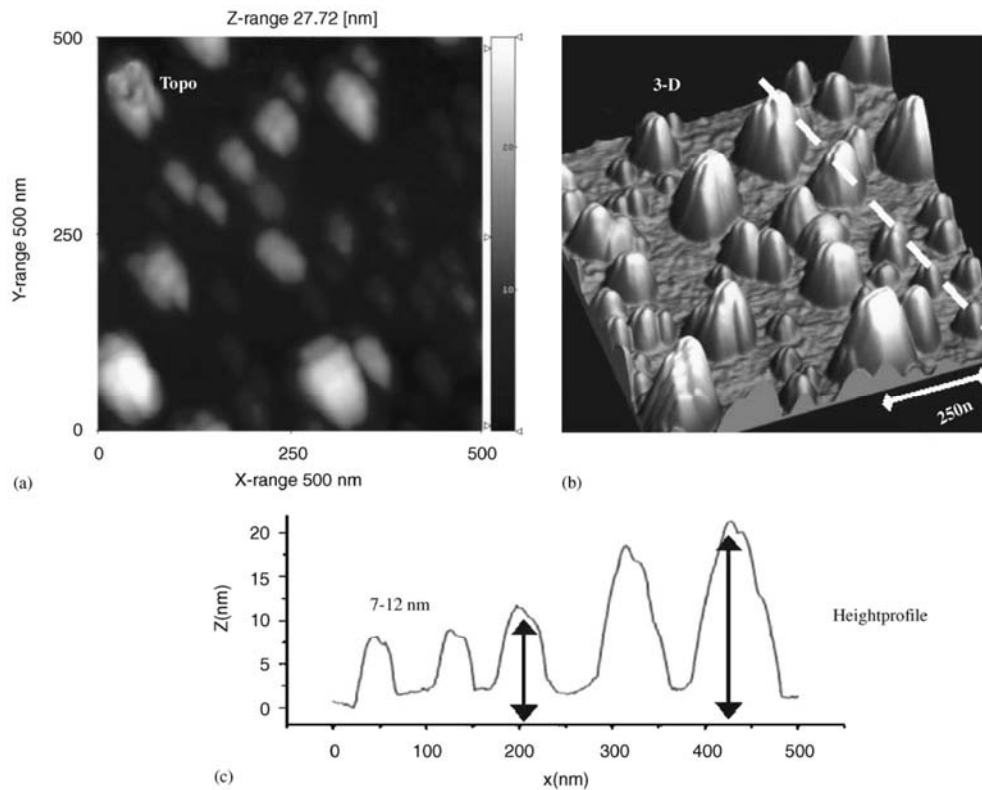


Fig. 6. AFM image of the islands that are formed when Pr_2O_3 is deposited at $730\ ^\circ\text{C}$ in oxygen atmosphere of 10^{-8} mbar. The islands consist of Pr_2O_3 as identified by X-ray diffraction.

($\sqrt{3} \times \sqrt{3}$) structures, see Fig. 2b. These structures can be explained by submonolayer coverages of Pr on Si(111). Similar structures have been observed after deposition of Pr on Si(111) surfaces [14]. Further annealing at temperature up to 1000 °C leads to a (5×1) phase in the LEED pattern (see Fig. 2b and d), which can be explained by lower coverages of Pr on Si(111). Very probably a silicide is formed. With X-ray diffraction no reflections corresponding to the (5×1) periodicity could be detected. The ℓ -scan along the (-11ℓ) (see Fig. 4) rod shows a characteristic asymmetry near the Bragg point, indicating a layer relaxation, which would occur in silicide layers. A quantitative analysis of this data set has not yet been performed (see Fig. 5).

The results show that the Pr_2O_3 layer, when heated to temperatures above about 700 °C in UHV, reacts with Si and forms silicides. Because the heat formation of Pr_2O_3 is larger than the heat formation of SiO_2 , this is not expected to occur at equilibrium conditions. It can be explained by evaporation of SiO_2 from the surface when heated in UHV. The system loses oxygen, Pr remains on the surface and forms silicides. When the surface is annealed in oxygen atmosphere of 10^{-8} mbar no PrSi_2 lines could be identified with X-ray diffraction. This supports the interpretation that the silicide formation occurs due to the evaporation of SiO_2 from the surface. Deposition of Pr_2O_3 at temperature above 730 °C in oxygen atmosphere of 10^{-8} mbar leads to island formation, which could be identified as Pr_2O_3 islands by X-ray diffraction. The islands can be seen in an ex situ AFM image, Fig. 6.

Silicide formation has not been reported in previous studies of Pr_2O_3 layers on silicon surfaces. We interpret this is due to the fact that oxygen is

present when Pr_2O_3 is evaporated from a crucible and the starting material Pr_6O_{11} has not been completely transformed to Pr_2O_3 .

The oxygen in the residual gas then prevents the formation of silicides.

Acknowledgement

Financial support by the BMBF Grant No. 05 KSIWMA is gratefully acknowledged.

References

- [1] Hubbard KJ, Schlom DG. *J Mater Res* 1996;11:2757.
- [2] Wilk GD, Wallace RM, Anthony JM. *J Appl Phys* 2001;89:5243.
- [3] Tarsa EJ, Speck JS, Robinson McD. *Appl Phys Lett* 1993;63:539.
- [4] Osten HJ, Liu JP, Bugiel E, Müssig HJ, Zaumseil P. *Mater Sci Eng* 2001;B87:297.
- [5] Liu JP, Zaumseil P, Bugiel E, Osten HJ. *Appl Phys Lett* 2001;79:67.1.
- [6] Müssig H-J, Dabrowski J, Ignatovich K, Liu JP, Zavadinsky V, Osten HJ. *Surf Sci* 2002;504:159.
- [7] Osten HJ, Liu JP, Bugiel E, Müssig HJ, Zaumseil P. *J Cryst Growth* 2002;235:229.
- [8] Schröder T, Lee T-L, Liberalesso L, Jourmand I, Zegenhagen J, Zaumseil P, et al. *J Appl Phys* 2005;97:074906.
- [9] Schmeisser D, Müssig H-J, Dabrowski J. *Appl Phys Lett* 2004;85:88.
- [10] Schröder T, Lee T-L, Zegenhagen J, Wenger C, Zaumseil P, Müssig H-J. *Appl Phys Lett* 2004;85:1229.
- [11] Liberalesso L, Schröder T, Lee T-L, Jourmand I, Zegenhagen J, Jourmand and Zegenhagen. *Surf Sci Lett* 2005;598:L347–54.
- [12] N. Jeutter, A. Sidorenko, A. Stierle, W. Moritz, *Appl Phys Lett*, submitted.
- [13] Stierle A, Steinhäuser A, Rühm A, Renner FU, Weigel R, Kasper N, et al. *Rev Sci Instrum* 2004;75:5302.
- [14] Grill L, Ramsey MG, Matthew JAD, Netzer IFP. *Surf Sci* 1997;380:324.

7 Anhang

7.1 Protokolle

7.1.1 Lithographie und Abformung

Die Prozessparameter beziehen sich auf die in der Arbeit verwendeten Geräte:

Plasmaanlage	Diener Femto
Maskaligner	Süss MJB 55
Baking	standard Laborheizplatten
Entgaser	Laborexikkator

7.1.1.1 gemeinsame Prozesse für alle SU-8 Schichtdicken

Reinigung	Spülen mit Aceton (reinst) -> Isopropanol (reinst) -> di-Wasser
Trocknen	Stickstoff (reinst, trocken)
Ausheizen	20 Min, 200°C (zur Dehydrierung, Adhäsionsverbesserung)

Für nasse Releaseprozesse 3 Schichten Omnicoat

Auftrag	4ml Omnicoat, zentraler Dispense, 500 rpm, 10 Sek
Abschleudern	3000 rpm, 30 Sek
Bake	200°C, 60 Sek

7.1.1.2 10 µm dicke Lackschichten auf 100 mm Wafern

Lackvorbereitung	Lack in den Dispenser einfüllen und für mindestens 4 h mit Dispenseöffnung nach oben lagern um Entweichen von Luftblasen zu ermöglichen.
Lackauftrag	4 ml SU-8 10, zentraler Dispense, 500 rpm, 10 Sek
Abschleudern	3000 rpm, 30 Sek
Ruhephase	10 Minuten, Raumtemperatur (23°C)
Softbake	55°C, Backstart auf Reinraumentuch Rampe 55°C -> 65°C, 180 Sek 65°C, 120 Sek Temperaturrampe 65°C -> 95°C, 180 Sek 95°C, 300 Sek
Abkühlen	kein Coldchuck!
EBR	Aceton, 1800 rpm, 20 Sekunden, 4 mm Randbreite
EBR Bake	55°C, Backstart auf Reinraumentuch Rampe 55°C -> 95°C, 180 Sek 95°C, 30 Sek

Abkühlen	kein Coldchuck!
Belichten	180 mJ/cm ² , i-line (365 nm), Vakuumkontakt
PEB	55°C, Backstart auf Reinraumbuch Rampe 55°C -> 65°C, 180 Sek 65°C, 60 Sek Rampe 65°C -> 95 °C, 180 Sek 95°C, 60 Sek
Abkühlen	kein Coldchuck!
Entwickeln	SU-8 Dev 600, 120 Sek, Bad ständig bewegen
Spülen	Isopropanol (reinst), 15 Sek di-Wasser
Trocknen	Stickstoff (reinst, trocken)
Hardbake	55°C, Backstart auf Reinraumbuch Rampe 55°C -> 160°C, 300 Sek 160°C, 300 Sek
Abkühlen	auf abgeschalteter Heizplatte. Abkühlung so langsam wie möglich

7.1.1.3 100 µm dicke Lackschichten auf 100 mm Wafern

Wird der Dispense von SU-8 100 aus dem Dispenser oder einer Spritze durchgeführt ist der Lack unbedingt mehrere Tage vor Verwendung in den Dispenser einzufüllen und mit der Öffnung nach oben zu lagern, um das Entweichen von Luftblasen zu ermöglichen

Kontaktvermittler: SU-8 2, 1 µm

Lackauftrag	3 ml SU-8 2, zentraler Dispense, 500 rpm, 10 Sek
Abschleudern	5000 rpm, 60 Sek
Softbake	65°C, 60 Sek 95°C, 60 Sek
Belichten	Flutbelichtung, 150 mJ/cm ² , i-line, <i>proximity</i>
PEB	65°C, 60 Sek 95°C, 60 Sek
Lackauftrag	5 ml SU-8 100, reverser radialer Dispense, 250 rpm, 30 Sek
Abschleudern	500 rpm, 30 Sek 1000 rpm, 10 Sek 2000 rpm, 10 Sek 3000 rpm, 30 Sek
Ruhephase	30 Minuten, Raumtemperatur (23°C)
Softbake	45°C, Backstart auf Reinraumbuch Rampe 55°C -> 65°C, 180 Sek 65°C, 600 Sek

	Temperaturrampe 65°C -> 95°C, 240 Sek
	95°C, 1800 Sek
Abkühlen	95°C -> 45°C, 600 Sek
EBR	Aceton, 1800 rpm, 20 Sekunden, 4 mm Randbreite
EBR Bake	45°C, Backstart auf Reinraumtuch
	Rampe 45°C -> 95°C, 240 Sek
	95°C, 60 Sek
Abkühlen	95°C -> 45°C, 600 Sek
Belichten	400 mJ/cm ² , i-line (365 nm), Vakuumkontakt
PEB	45°C, Backstart auf Reinraumtuch
	Rampe 45°C -> 65°C, 180 Sek
	65°C, 180 Sek
	Rampe 65°C -> 95 °C, 240 Sek
	95°C, 600 Sek
Abkühlen	95°C -> 65°C, 600 Sek
Entwickeln	SU-8 Dev 600, 3*100 Sek, Entwicklerwechsel, Bad ständig bewegen
Spülen	Isopropanol (reinst), 15 Sek di-Wasser
Trocknen	Stickstoff (reinst, trocken)
Hardbake	45°C, Backstart auf Reinraumtuch
	Rampe 45°C -> 160°C, 600 Sek
	160°C, 900 Sek
Abkühlen	auf abgeschalteter Heizplatte. Abkühlung so langsam wie möglich

7.1.1.4 SU-8 Bonding und Release

Prozessierung des ersten Wafers bis einschließlich Entwicklung. Material des zweiten Wafers: Pyrex oder Sodalime

Maskierung	Bedampfung des Wafers mit Aluminium oder Chrom Photolithographische Strukturierung Ätzen des Metalllayers
Releaselayer	Entweder mehrfache Omnicoatbelackung wie in 7.1.1.1 oder Plasmaabscheidung von Hexafluorpropen auf maskierter Seite, 50 W, 0,4 mbar, 10 min
Belackung und Softbake	entsprechend benötigter Schichtdicke

Nach dem Softbake wird der Wafer so an einer unstrukturierten Maske befestigt, dass der Wafer im Maskaligner mit dem Wafer der ersten Schicht in Verbindung gebracht werden kann

Justierung	im Maskaligner. Es sind Alignmentmarken (siehe unten) vorzusehen.
Bondingbake	55° C, Lage auf Glaswafer manuell auf darunterliegende Lagen aufdrücken
Belichtung	Dosis entsprechend der Schichtdicke des 2. Wafers, i-line, Vakuumkontakt
PEB	entsprechend der Schichtdicke des 2. Wafers. Zudem sind die Backzeiten um jeweils 50% zu verlängern
Release	trockener Release vom Hexafluorpropen durch einfaches Ablösen oder nasser Release von Omnicoat: Bad in PG Remover, 80°C, 90 Min
Entwickeln	SU-8 Dev 600, Zeit entsprechend Schichtdicke des 2. Wafers

7.1.1.5 PDMS Abformung

Die Mastererstellung erfolgt gemäß der Standardprozesse für SU-8 wie unter 7.1.1 aufgeführt. Nach der Mastererstellung folgen Passivierung und Abformung wie folgend beschrieben. Plasmaanlage Diener Femto

Passivierung	Plasmaabscheidung von Hexafluorpropen. 50 W, 0.4 mbar, 1 Min
Ansatz PDMS	Sylgard 184, Mischungsverhältnis 1:10, 20g pro Wafer Verrühren für mindestens 3 Min. Das Rühren hat stets in der gleichen Richtung zu erfolgen um eine Entmischung auf Grund der hohen Viskosität zu verhindern
Entgasung	Exsikkator mit Vakuumpumpe, 10 Min, wiederholter Zyklus Vakuum – Belüftung
Abguss	Einfüllen in Abgussform
Entgasung	Exsikkator mit Vakuumpumpe, 10 Min, wiederholter Zyklus Vakuum – Belüftung
Aushärten	Abhängig von Anwendung 60°C, 4 h für bondbare Kanalsysteme 24 h für μ CP Stempel

Verwendung der fertigen Stempel/Mikrosysteme innerhalb einer Woche. Durch Oxidation der Oberfläche nimmt die Güte der abgegossenen Strukturen sowohl für Bonding als auch für μ CP im Laufe der Zeit ab. Auffrischung der Systeme durch Abfolge von HF und HCL/H₂O₂-Dips ist möglich

7.1.1.6 PDMS Bonding

Das Bonding von PDMS auf PDMS oder Glas wird wesentlich durch das Alter der PDMS Stücke beeinflusst. Obwohl ein Auffrischen wie oben beschrieben möglich ist, ist die Verwendung von frischem PDMS vorzuziehen.

Glasreinigung	soll auf Glas gebondet werden ist dieses zunächst zu reinigen Tauchen in Aceton (reinst), 5 Min Spülen mit Aceton (reinst) -> Isopropanol (reinst) -> di-Wasser O ₂ -Plasma, 100 W, 0,4 mbar, 5 Min; das Glas muss völlig fettfrei sein
Aktivierung	PDMS in O ₂ -Plasma, 50 W, 1 Min
Justierung	zu bondende PDMS Oberfläche mit Methanol (reinst) benetzen, PDMS auf Oberfläche legen und unter dem Mikroskop justieren und fixieren
Ausheizen	Hotplate, 170°C, 15 Min
Ruhen	gebondete PDMS Systeme für mindestens 6 h ruhen lassen. Endfestigkeit ist erst nach mehr als 24 h erreicht

7.1.2 Platelet rich plasma Vorbereitung

Benötigte Medien Tyrodes 10x, ACD-Puffer, HEPES

7.1.2.1 Herstellung Tyrodes 10x

	80 g NaCl, 10,15 g NaHCO ₃ 1,95 g KCl 1000 ml destilliertes Wasser oder di-Wasser Bestandteile mischen und sterilfiltrieren
Lagerung	4°C

7.1.2.2 Herstellung ACD Puffer

	12,5 g Natriumcitrat 6,82 g Zitronensäure 10 g Glukose NaOH 500 ml destilliertes Wasser oder di-Wasser Bestandteile mischen und mit NaOH auf pH 4,69 einstellen sterilfiltrieren
Lagerung	4°C

7.1.2.3 Herstellung Tyrodes Gebrauchslösung

Herstellung unmittelbar vor Verwendung

Mischen	0,1 g BSA 0,1 g Glukose 10 ml Tyrodes 10x 90 ml destilliertes Wasser oder di-Wasser Bestandteile mischen, mit HEPES auf pH 7.4 einstellen (ca. 1 ml HEPES)
Aufteilen	zwei Teile im Verhältnis 3:7
pH Anpassung	größeren Teil mit HCl auf pH 6.5 senken

7.1.2.4 prp Herstellung

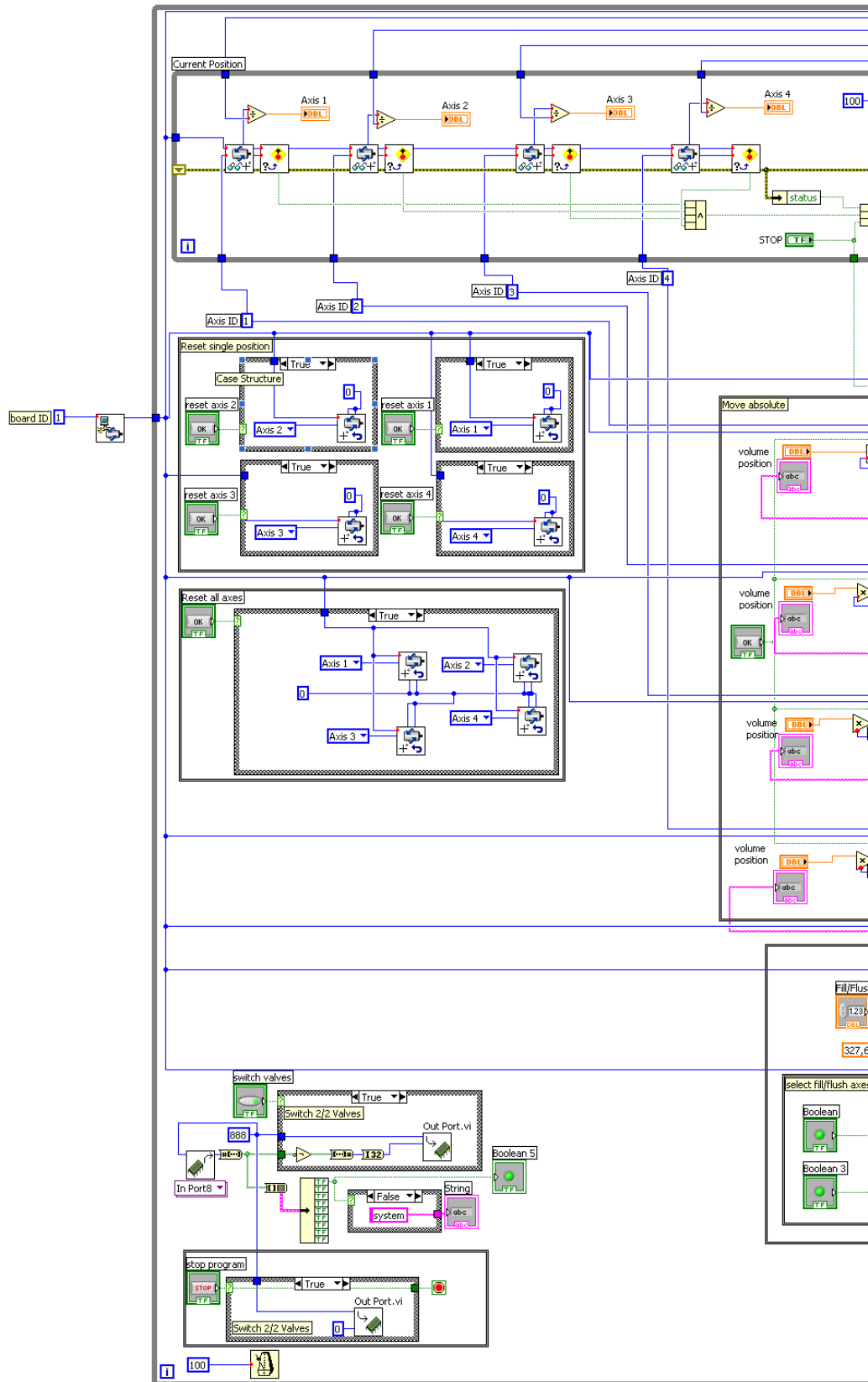
Blutabnahme	4 ml ACD Puffer in 20 ml Spritze. 16 ml Blutabnahme von gesundem Freiwilligen bis . Bei der Blutabnahme ist darauf zu achten das venöse Blut möglichst wenig mit dem Stauschlauch zu stauen, um den Stress auf die Blutplättchen (BP) möglichst gering zu halten
Zentrifugation	Blut auf zwei 15 ml Falcon Röhrchen verteilen. Zentrifugieren, 20 Min, 160 g, Raumtemperatur, keine Bremse
Umpipettieren	nach Zentrifugation drei Flüssigkeitsschichten im Röhrchen: rote Phase am Gefäßboden; gelbliche, leicht trübe Phase im oberen Teil; sehr dünne weiße Zwischenschicht obere Schicht durch Pipettieren in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführen kein Material aus den anderen Phasen mittransportieren Scherungen auf die BP gering halten - Flüssigkeit die Gefäßwand hinunterlaufen lassen, langsame Fließgeschwindigkeit
Verdünnen	Plasma mit Tyrodes pH 6.5 auffüllen auf 35 ml Gesamtmenge. Scherungen gering halten
Mischen	Falcon mehrmals vorsichtig hin- und herkippen
Zentrifugieren	10 Min, 600g, Raumtemperatur, keine Bremse
Dekantieren	Röhrchen öffnen, auf den Kopf stellen, Flüssigkeit ablaufen lassen
Resuspendieren	500 µl Tyrodes pH 6.5 zufügen, Flüssigkeit wiederholt mit Pipette aufsaugen und vorsichtig auf BP Pellet pipettieren um Pellet zu lösen
Verdünnen	mischen mit 500 µl Tyrodes pH 7.4

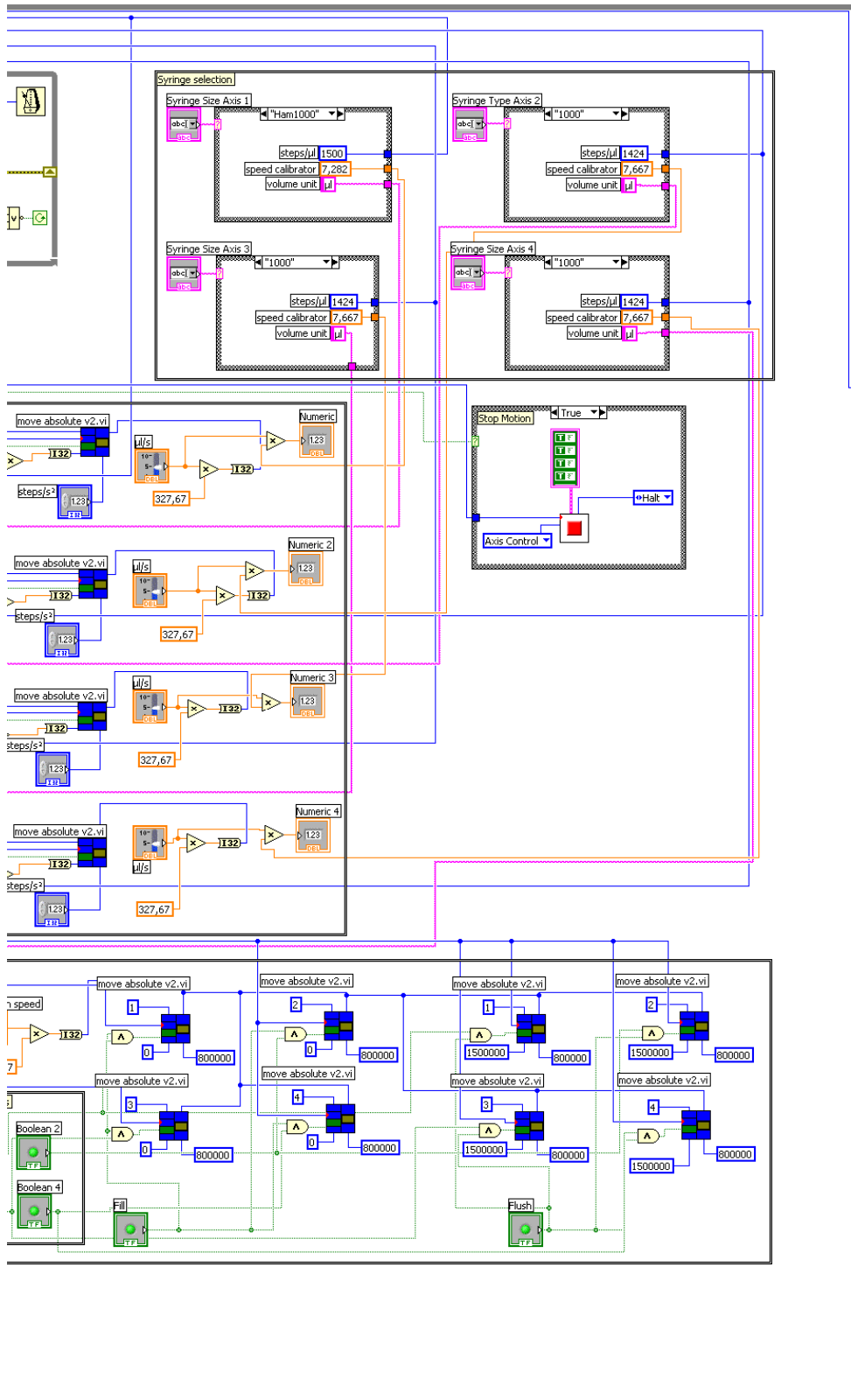
Auszählen	10 µl BP-Lösung verdünnen mit 90 µl Tyrodes pH 7.4 BP zählen in Neubauer-Zählkammer. Resultat ist mit 10 zu multiplizieren
Verdünnen	restliche BP Lösung entsprechend Zählergebnis verdünnen Zielkonzentration: $2 \cdot 10^8$ Plättchen/ml
Reaktivierung	unmittelbar vor dem Versuch Reaktivierung der Plättchen durch Zugabe von je 1 mmol/l CaCl_2 und MgCl_2
Haltbarkeit	Verwendbar bis zum Auftreten von Aggregaten

7.1.3 Mikrokontaktdruck

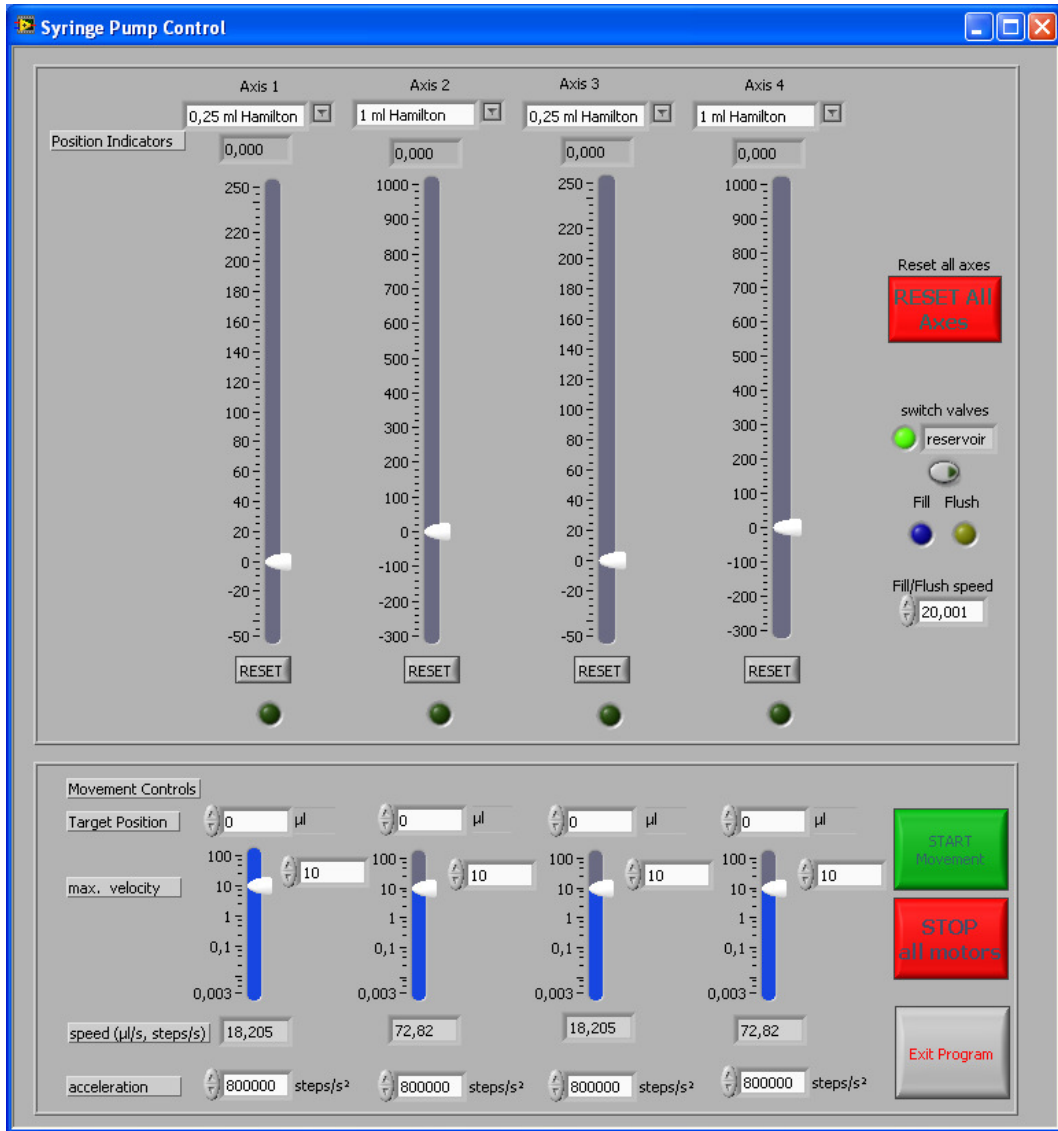
Stempel spülen	di-Wasser
Substrat reinigen	spülen mit Aceton -> Isopropanol -> Ethanol -> di Wasser
Trocknen	Stickstoff (reinst, trocken)
Plasma	Substrat und Stempel 50 W, 0,4 mbar, 30 Sek
Stempel tränken	bedecken mit Proteinlösung 15 Min Inkubation
Abblasen	Stickstoff (reinst, trocken)
Stempel tränken	bedecken mit Proteinlösung 30 Min Inkubation
Trocknen	Stickstoff (reinst, trocken) bis Oberfläche völlig trocken
Drucken	Stempel auf Substrat drücken 0,25 N, 5 Min

7.2 Spritzenpumpe, LabView Steuerung





[unter Mitwirkung von F. Walther]



Danksagung

Zuletzt möchte ich noch die Gelegenheit ergreifen mich bei all denen zu bedanken die die Entstehung dieser Arbeit beeinflusst haben.

Zuerst natürlich bei Dr. Robert Stark, der mir die Gelegenheit in seiner Arbeitsgruppe tätig zu sein und unter seiner Anleitung die vorliegende Arbeit zu erstellen, ohne dabei die Freiheit zu beschneiden mir selbst Gebiete zu wählen, die mich besonders interessierten.

Daneben möchte ich mich auch besonders bei Prof. Wolfgang Heckl bedanken, der mich ursprünglich dazu ermunterte eine Dissertation in Angriff zu nehmen und dessen Labore ich während der gesamten Arbeit mitbenutzen konnte. Besonderer Dank gebührt auch Prof. Herberg von der FH München. Ohne die Möglichkeit seine Reinraum zu verwenden wäre die Arbeit nicht möglich gewesen. In Verbindung damit gilt mein Dank auch Michael Kaiser für seine Hilfe bei allen lithographischen Problemen.

Die Arbeiten zur Biokompatibilität wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Maßberg vom Deutschen Herzzentrum München durchgeführt. Ich danke besonders Dr. Schürzinger und Frau Kerstan, die mir nicht nur hilfreich zur Seite standen sondern mich auch in die Geheimnisse der Arbeit mit biologischen Proben einführten.

Für die Gelegenheit zur Mitarbeit am Artikel über die akustische Kraftlithographie danke ich Dr. Rubio-Sierra. Mein Dank gilt auch Ferdinand Walther für die gemeinsame Arbeit am Spritzenpumpensystem und am Artikel über die Hydrophilisierung von SU-8 sowie für die Mitwirkung am Artikel zur Zellproliferation. Marek Janko danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit an den Thrombozytenversuchen. Ernst Schönberger gilt mein herzlicher Dank für seine wertvollen Beiträge zum Mikrokontaktdruck.

Aus der Arbeitsgruppe Dr. Stark gilt mein Dank besonders Stefan Burghardt, der mich bei der Konstruktion der Spritzenpumpe und der Baugruppe zur Messung der Blattfederverbiegung unterstützte sowie Günther Hesberg und seiner Crew aus unserer feinmechanischen Werkstätte die tolle Arbeit bei der Realisierung der Konstruktionen leistete. Dr. Gigler sei für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen gedankt, sowie für das Korrekturlesen. Daneben danke ich Polina Davydovskaya, Ayhan Yurtsever und Michael Bauer sowie der gesamten AG Heckl für die anregenden Diskussionen und eine tolle Zeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie, Erika, Lutz und Arnd Hennemeyer, die mich nicht nur auf jede erdenkliche Art unterstützten, sondern ohne die ich mich nie zu der Person entwickelt hätte, die ich heute bin.

Und zuletzt möchte ich Ellen danken, für das Korrigieren der Arbeit, vor allem aber für viele Jahre des Rückenstärkens, der Ermutigung und der Geduld