



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina y Ciencias de la
Salud

Grado en Ingeniería Biomédica

**Diseño de microcápsulas de
Recombinámeros tipo elastina (ELRs)
mediante microfluídica para aplicaciones
biomédicas**

Estudiante: Alberto López Tejerina

Tutor 1: Israel González de Torre

Tutor 2: Julio Fernández Fernández

Departamento de Química Analítica

Curso: 2022-2023

ÍNDICE

- 1. INTRODUCCIÓN**
 - 1.1. BIOMATERIALES**
 - 1.1.1. DEFINICIÓN**
 - 1.1.2. POLÍMEROS**
 - 1.1.3. ELPs Y ELRs**
 - 1.1.4. ADN Y PROTEÍNAS**
 - 1.1.5. APLICACIONES ELRs**
 - 1.2. MICROFLUÍDICA**
 - 1.2.1. ESTRUCTURA BÁSICA**
 - 1.2.2. MICROGOTAS**
 - 1.2.2.1. FUNDAMENTOS DE LAS MICROGOTAS**
 - 1.2.2.1.1. EXPRESIONES MATEMÁTICAS DE LA MICROFLUÍDICA**
 - 1.2.2.1.2. DISPOSITIVOS Y GENERACIÓN**
 - 1.2.2.2. MANIPULACIÓN DE LAS MICROGOTAS**
 - 1.2.2.2.1. FISIÓN**
 - 1.2.2.2.2. FUSIÓN**
 - 1.2.2.2.3. MIXING**
 - 1.2.2.3. CLASIFICACIÓN DE LAS MICROGOTAS**
 - 1.2.2.4. APLICACIONES ACTUALES**
- 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**
 - 2.1. OBJETIVOS INICIALES**
 - 2.2. PLAN DE TRABAJO**
- 3. MATERIALES Y MÉTODOS**
 - 3.1. METODOLOGÍA CLICK**
 - 3.2. MICROCHIPS DOLOMITE**
 - 3.3. LEICA DFC3000 G CCD MICROSCOPE CAMERA**
 - 3.4. HARVARD APARATUS PHD 2000**
 - 3.5. BOMBA ISM833C (ISMATEC)**
 - 3.6. ELECTROFORESIS SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)**
 - 3.7. DSC (Differential Scanning Calorimetry)**
 - 3.8. FTIR (Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy)**
 - 3.9. RMN (Resonancia Magnética Nuclear)**
 - 3.10. MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight)**
- 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
 - 4.1. RELACIÓN FLUJO-TAMAÑO**
 - 4.1.1. MICROCHIP HIDROFÍLICO**
 - 4.1.1.1. UNIÓN EN T (2 CANALES)**

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría empezar dando las gracias a mis familiares y amigos que me han estado apoyando durante todo este trabajo, y ellos más que nadie sabe el esfuerzo que hay detrás de este documento. También quería agradecer a Bioforge, y en especial a Israel González y Julio Fernández por estar ayudándome día tras día. Tampoco me puedo olvidar de mi compañero de laboratorio Víctor con el cual he compartido estos últimos meses que me han servido para aprender y familiarizarme rápido con el mundo de la microfluídica, del cual casi yo no tenía casi conocimiento. Y para acabar, también me gustaría agradecer al resto de personas de Bioforge, especialmente estudiantes TFG, que han conseguido que cada día en el laboratorio fuese más ameno y lo disfrutase más.

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein

“El único modo de hacer un gran trabajo es amar lo que haces”

Steve Jobs

“Dos caminos se abrieron ante mí, pero tomé el menos transitado y eso marcó la diferencia”

Robert Frost

“Son tus decisiones y no tus condiciones lo que determina tu destino”

Will Smith

1. INTRODUCCIÓN

1.1. BIOMATERIALES

1.1.1. DEFINICIÓN

En las últimas décadas, el mundo de los biomateriales ha sufrido una gran expansión gracias principalmente a la funcionalidad y alto número de aplicaciones que con estos se pueden lograr.

Los biomateriales es cualquier sustancia diseñada y utilizada para interactuar de forma segura y eficaz con sistemas biológicos como el cuerpo humano. Dichos materiales han sufrido una gran evolución desde la época de los egipcios donde se empleaban en prótesis de dedo y más funciones, hasta nuestros días, donde se utilizan en una amplia gama de aplicaciones de ingeniería médica y biomédica, incluyendo implantes y dispositivos médicos, ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

Los biomateriales deben tener propiedades específicas que les permitan interactuar adecuadamente con los sistemas biológicos. Estas propiedades incluyen biocompatibilidad, impidiendo que el material cause reacciones no deseadas en el cuerpo, y biodegradable, que se vaya eliminando sin generar residuos tóxicos para el organismo. Existen diferentes tipos de biomateriales: metales, polímeros, cerámicas y compuestos híbridos. Cada tipo de biomaterial tiene características y propiedades únicas que lo hacen adecuado para diferentes aplicaciones.

En las últimas décadas los biomateriales han sufrido una gran expansión. Una de las causas más importantes que encontramos en el desarrollo de los biomateriales, proviene de la biología molecular. Esto se debe en parte a que en la década de los 80 se comenzó el conocido Proyecto del Genoma Humano. El objetivo era secuenciar los 3000 millones de nucleótidos que componen el genoma del ser humano. Para ello se empezaron a desarrollar diferentes técnicas y métodos, los cuales sirvieron de trampolín a la biología molecular que conocemos hoy en día. Finalmente, en el febrero de 2001, se publicó en la revista *Nature* que se había secuenciado el noventa por ciento de la secuencia completa de nuestro genoma (2).

1.1.2. POLÍMEROS

Según la Real Academia Española, un polímero se define como un compuesto químico, natural o sintético, formado por polimerización y que consiste esencialmente en unidades estructurales repetidas, de ahí su nombre: poli- (muchas) y -mero (partes) (7). De manera más técnica, un polímero es una macromolécula formada por la unión covalente de unidades estructurales básicas, denominadas monómeros. Estos se van uniendo entre sí dando lugar a polímeros lineales o ramificados, en función de cuál sea su forma de unión. Los polímeros pueden ser sintéticos, naturales o mixtos (8).

Como ejemplo de los naturales encontramos los polinucleótidos (ADN, RNA), lípidos (jabones y ceras) y polisacáridos (almidón y celulosa). Los mixtos son polímeros a caballo

entre sintético y natural. Por último, dentro de los sintéticos podemos clasificarlos en dos grandes grupos (9):

- Plásticos: son compuestos formados por cadenas repetidas de etileno, propileno, cloruro de vinilo o estireno. Tienen la capacidad de poder ser deformados bajo la acción de una fuerza externa y mantener esa forma en ausencia de dicha fuerza.
- Elastómeros: a diferencia de los plásticos, este tipo de polímero son muy elásticos y viscosos, por lo que son capaces de recuperar la forma original una vez son estirados. Los principales componentes de esta cadena son el carbono, el oxígeno o el silicio.

Dentro de los elastómeros, vamos a ver cuáles son las propiedades de estos, así como los tipos que encontramos. Los elastómeros se pueden clasificar en saturados e insaturados (10):

- Saturados: no poseen dobles enlaces por lo que son más resistentes al ozono y al envejecimiento que los insaturados. La resistencia al ozono se trata de un ensayo en la cual se pone a prueba la resistencia de un elastómero.
- Insaturados: son aquellos que tienen en sus cadenas dobles, incluso triples enlaces, que les hacen menos resistentes al ozono y con un mayor desgaste a medida que pasa el tiempo.

La diferencia entre emplear elastómeros saturados e insaturados permite que el elemento final tenga unas características u otras, por lo que es de gran importancia una correcta elección en función del objetivo y el polímero que se desea lograr. A su vez, podemos diferenciar también entre termoestables y termoplásticos. Los primeros se curan para tener un mayor grado de reticulación entre sus cadenas de polímeros, mientras que los segundos se ablandan por encima de una temperatura determinada. La reticulación de los termoestables se considera una reacción irreversible, de ahí que se les denomine termoestable, pues son capaces de mantener una estructura estable (10).

Como hemos visto, los elastómeros poseen características que nos permiten emplearlos en multitud de tareas y aplicaciones. Entre ellas, podemos ver que las más importantes son la viscosidad y la elasticidad. El término viscosidad hace referencia a la relación existente entre la fuerza aplicada y la velocidad con la que este se mueve. Por otro lado, la elasticidad es la capacidad de recuperar la forma anterior una vez ha sido deformado por una fuerza externa, siendo más complicado que estos se agrieten o se rompan. Para concluir tenemos que los elastómeros son insolubles, es decir, que no se disuelven en presencia de disolventes, pudiendo hincharse en algunos casos (10).

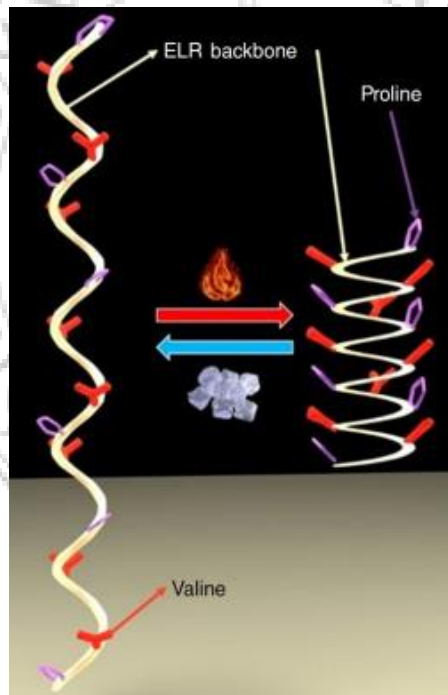
1.1.3. ELPs y ELRs

Los polímeros tipo elastina se caracterizan por tener una gran elasticidad la cual viene dada en gran parte gracias a la presencia de regiones hidrofóbicas en las estructuras de los monómeros, las cuales tienden a autensamblarse contribuyendo a la organización típica de la elastina (11). Este tipo de molécula se caracteriza por tener la capacidad de poder formar diferentes estructuras como geles, películas o nanofibras, lo cual demuestra

su amplio abanico de aplicaciones en la medicina. Estas van desde la administración de fármacos hasta la fabricación de implantes y recubrimientos de dispositivos médicos (1).

Tras diferentes investigaciones a lo largo del siglo pasado, varios grupos trataron de reproducir artificialmente la capacidad de autoensamblaje de los elastómeros naturales. Llegaron a la conclusión de que el pentapéptido que con más frecuencia se repetía era Val-Pro-Gly-Val-Gly (VPGVG), pudiendo aparecer hasta en cincuenta ocasiones en una simple molécula de elastina.

A lo largo de este tiempo, un avance importante fue conocer la influencia de la temperatura sobre la configuración estructural de estas moléculas. Al alcanzar una temperatura concreta, conocida como temperatura de transición (T_t), el elastómero pasa a una conformación conocida como β -espiral, la cual contiene 3 unidades del pentámero mencionado anteriormente. La temperatura de transición puede modificarse de unas moléculas a otras variando el cuarto aminoácido del pentámero, de manera que la nueva formulación será VPGXG, siendo X un aminoácido que tiene influencia sobre la temperatura de transición. Esta temperatura también depende de otros factores como la presión, la luz, el pH o la química del medio.



(11) Figura 2: Cambio de configuración de un ELR en función del aumento o disminución de la temperatura.

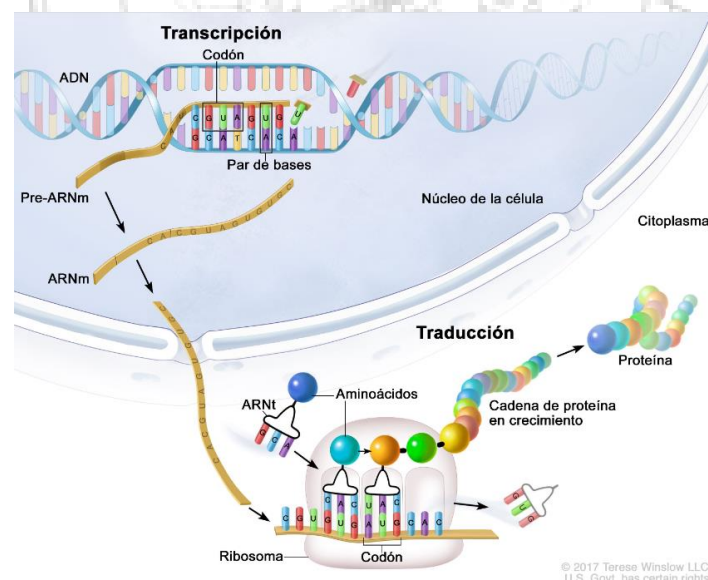
En las últimas décadas, gracias a los grandes avances en la tecnología del ADN recombinante, se empezó a desarrollar técnicas similares en el diseño y producción de las proteínas sintéticas. Es por esta razón por la que la nomenclatura previamente definida ELPs (Elastine-Like Polymers) pasó a ser ELRs (Elastine-Like Recombinamers) (1). A pesar del gran número de avances e innovaciones que han surgido en las últimas décadas, este campo está aún en desarrollo y se espera que próximamente tenga un impacto revolucionario sobre la ciencia.

1.1.4. ADN Y PROTEÍNAS

Antes de adentrarnos en la explicación y aplicaciones de los ELR, debemos conocer de dónde provienen estos, por lo que hablaremos acerca de la genética y las proteínas. El ácido desoxirribonucleico (ADN) es el principal componente genético de los seres vivos ya que esta posee toda la información necesaria para la generación de un organismo, desde sus características y forma hasta su comportamiento y funciones. En los humanos este tiene una estructura de doble hélice, la cual fue desarrollada por Watson y Crick en 1953, proporcionando un gran avance en el campo de la herencia y la genética (3).

El ADN está conformado por cromosomas. El ser humano posee 46 cromosomas, agrupados en 23 pares: 22 autosomas y 1 par sexual, que determinará el sexo del individuo. Como se ha comentado, se trata de una estructura de doble hélice, cada una de las cuales formada por 4 bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina) que se intercalan dando lugar a millones de posibles de combinaciones. La principal característica es que la unión solo se puede realizar entre timina y adenina o entre guanina y citosina (4).

La disposición de dichas bases será fundamental para la creación de un tipo de proteínas u otras. Este proceso está compuesto por dos fases: transcripción y traducción. En la primera etapa se “copian” las bases nitrogenadas de la cadena dando lugar al ARN mensajero. Posteriormente se emplean las bases nitrogenadas para crear una secuencia concreta de aminoácidos, generando así una proteína concreta. La proteína final depende de la secuencia de aminoácidos que se unan, la cual se ve influida a su vez por la secuencia de bases nitrogenadas (5,6).



(7) Figura 1: Representación esquemática de los procesos de transcripción (interior del núcleo) y traducción (ribosomas).

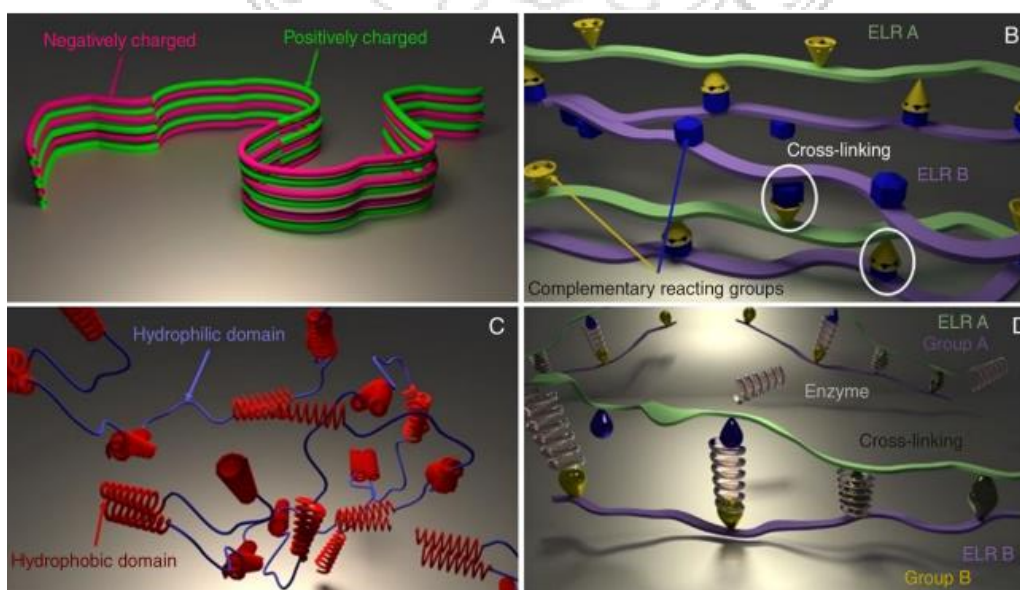
- Estructuras más comunes

Con la adición de determinados compuestos y empleando distintos procesos, es posible generar diferentes estructuras y obtener varias conformaciones de ELR.

En primer lugar, hablaremos de las **películas de revestimiento**. Como bien dice su propio nombre, se tratan de finas capas que permiten dar ciertas características de biocompatibilidad a los objetos que recubren. La principal aplicación es la creación de recubrimientos antifibróticos y antimicrobianos para generar la deposición de una capa que permita la interacción celular dando lugar a una correcta integración del implante (12).

Como segunda estructura característica de los ELRs, encontramos **las micelas y las nanopartículas**. En estos casos el bloque hidrofílico está expuesta al medio externo, dejando en su interior la parte hidrofóbica protegiéndola de que entre en contacto con el exterior. Para que se formen estructuras estables es necesario un requisito, el cual es que el peso molecular sea relativamente alto, teniendo que emplear en la mayoría de los casos un mínimo de 48 pentapéptidos (13). Es importante destacar la influencia que tienen otros factores como la salinidad del medio, la temperatura y el pH sobre la estabilidad de las micelas y nanopartículas. De este modo es posible, mediante la variación de alguno de estos factores, reorganizar la micela y dar lugar a otras estructuras, como por ejemplo vesículas. Su principal aplicación suele ser para la distribución de fármacos y para la experimentación de la actividad de estos en medios artificiales (14).

Por último, tenemos **los hidrogeles**. Se tratan de matrices para su uso en el cuerpo humano, ya que estos poseen un alto contenido en agua que le permite que sus propiedades mecánicas y su capacidad de respuesta frente a estímulos sean similares y concuerden con las de los tejidos naturales (15). Estos entrecruzamientos que forman las matrices se pueden realizar de manera física o covalente, y las propiedades se pueden controlar mediante la ingeniería, consiguiendo moléculas e hidrogeles que sirvan de gran utilidad en los diferentes ámbitos. Existen copolipéptidos en bloques que pueden autoensamblarse en hidrogeles estables, llegando a construir matrices más homogéneas y con menos residuos que puedan modificar las propiedades mecánicas de dichos hidrogeles ((16).



(17,18) Figura 3: Diferentes formas de entrecruzamiento en la fabricación de hidrogeles: A interacción iónica; B cross-linking químico; C interacción hidrofóbica, y D cross-linking activado por enzima.

1.1.5. APLICACIONES DE LOS ELRs

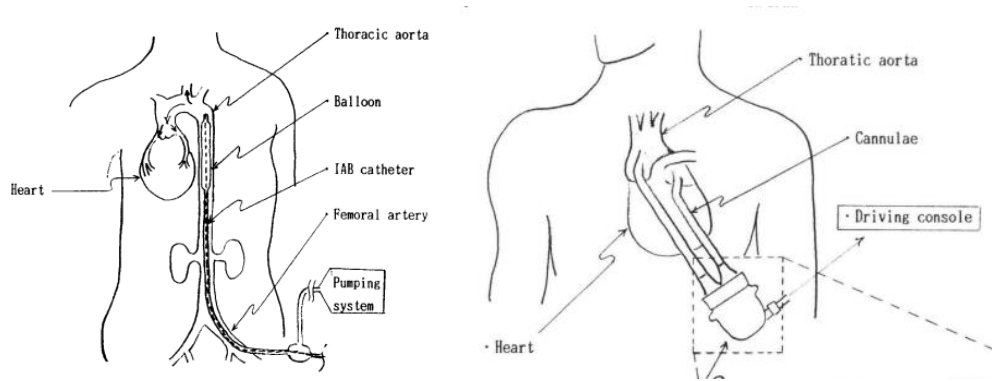
Los elastómeros son un gran avance y han servido de mucha ayuda en el campo de la salud, principalmente durante la última década, periodo en el que han tenido su máximo desarrollo. Estos materiales tienen un amplio abanico de aplicaciones en todos los aspectos médicos que se pueden tener en cuenta, desde aplicaciones para el sistema cardiovascular hasta usos en cuidados médicos generales y específicos del campo odontología y oftalmología (12).

La gran importancia del uso de estos dispositivos radica en las características que estos poseen una vez entran en contacto con el cuerpo humano. Los ELRs son biocompatibles, es decir, que no generan ninguna reacción de inmunidad sobre el organismo en el que actúan. También tienen recalables propiedades físicas, como su fuerza, durabilidad, flexibilidad y estabilidad. Además, se trata de sustancias biodegradables, las cuales una vez empiezan a degradarse, los restos que se van desprendiendo no son tóxico ni nocivos para el individuo en el que se está empleando. Por último, podemos resaltar la gran variedad de procesos que hay a la hora de fabricar dichos elastómeros, así como las diferentes maneras que existen de esterilizarlos para asegurarse de que no generarán ninguna reacción alérgica (12)(17).

- Dispositivos cardiovasculares

Debido al aumento de esperanza de vida de la población en general, ha habido un aumento de casos de problemas cardiovasculares. Esto supone una carga económica para la sociedad, por lo que encontrar una solución a dicho problema es prioritario para el sector de la sanidad. Es entonces cuando surgen las prótesis vasculares y cardíacas. Principalmente, para los casos vasculares se emplean los materiales conocidos como Dacrón (polietileno tereftalato) y Gore-tex (politetrafluoroetileno), gracias a la compatibilidad que tienen estos en las cirugías de tejido periférico vascular, shunt arteriovenosos y reparaciones de aneurismas (15,16,(18).

De manera más específica, el órgano del corazón suele tener problemas en lo que se refiere a sus válvulas. Aquí la ingeniería tisular también tiene un papel protagonista con la creación y fabricación del balón intraaórtico y corazones artificiales. El más empleado es el primero, el cual se trata de un globo que permite la correcta salida de sangre del corazón sin la necesidad de realizar una cirugía. Esta bomba se infla y se deshincha de manera sincrónica con las fases de sístole y diástole del corazón. Consiste en un catéter de poliuretano que se implanta en la aorta torácica mediante una incisión percutánea a través de la arteria femoral (15,(19),(20)). Por otro lado, también tenemos los corazones artificiales, que permiten reconducir la sangre que entra y sale del corazón para una correcta oxigenación y bombeo, tal y como se muestra en la imagen contigua. El dispositivo más conocido es la Oxigenación por Membrana Extracorpórea (ECMO) (12).



(20) Figura 4: Representación de la colocación de un ECMO (izquierda) y un marcapasos (derecha).

- Prótesis

En este caso encontramos desde implantes hasta vendaje para heridas. Las siliconas son los polímeros sintéticos que mayor aplicación tienen en los implantes a largo plazo, aunque a pesar de su biocompatibilidad, hay casos en los que el organismo reacciona frente a su implante (21). Puede haber una gran variedad de implantes: materiales porosos para reconstrucción de menisco (22), cartílago articular (23), aislamiento y biosensores en pequeños dispositivos eléctricos médicos (24), como materiales bioactivos en distintos mecanismos químicos (25), y vendas para heridas con sistema de distribución de fármacos para mejorar la recuperación del tejido (26). Como se ha dicho, estas son solo unas pocas de las muchas aplicaciones que estos materiales tienen en el campo de las prótesis y los implantes.

- Odontología

El principal material empleado es el polimetilmetacrilato (PMMA), y sus derivados, el cual se trata de un polímero acrílico que se caracteriza por su resistencia y propiedades mecánicas. También se usan siliconas y poliéteres para el desarrollo de coronas y procesos de impresiones (27). Por otra parte, para dispositivos de tensión y ligadura de ortodoncia se emplea el poliuretano. El control del movimiento de los dientes ha sido siempre un aspecto muy importante que abordar en la odontología, de ahí que se hayan creado mecanismos específicos de selección de propiedades y diseño de materiales (28).

- Oftalmología

En este campo la principal aplicación es para la fabricación de lentes intraoculares y lentes de contacto, cuyo principal material es el PMMA y polipropileno. Aun así, el gran desarrollo de los últimos años ha dado lugar a nuevos materiales que también se pueden emplear en la oftalmología (12).

Por otro lado, materiales como la silicona, se ha conseguido mejorar la humectabilidad mediante un procesamiento con moldes de plástico polar (29). Del mismo modo, se han diseñado siliconas que contienen cromóforos de luz ultravioleta (UV) para la creación de lentes intraoculares (15). Al igual que en casos anteriores, la oftalmología y la ingeniería

biomédica están destinados a caminar de la mano para conseguir el máximo beneficio mutuo.

- **Distribución de Fármacos**

Otro aspecto de gran importancia en el uso de los elastómeros es la distribución de fármacos en el organismo. La homeostasis es la capacidad de un individuo de mantener su medio interno estable compensando los cambios constantes que se producen. Este mecanismo está altamente regulado y controlado, siendo muy preciso a la hora de actuar y responder a los diferentes estímulos. Hay personas en las que este sistema de regulación no funciona correctamente, por lo que es necesario el empleo de sustancias suplementarias que permitan al individuo este manejo en su control del medio interno. Es entonces cuando surge la idea de la distribución de fármacos: pequeñas moléculas que contienen fármacos que son capaces de interactuar con el medio de una manera muy similar a como lo harían en condiciones naturales (30).

- **Productos de cuidado generales**

En este grupo englobamos todos los materiales de hospital, desde aquellos productos que encontramos en los quirófanos hasta los de las oficinas. Se tratan de materiales que se emplean una única vez y posteriormente se reciclan y desechan. Los dispositivos más empleados son los catéteres, tubos de intubación, bolsas de fluidos, cierres farmacológicos (15), guantes (31), agujas y jeringuillas (32), etc.

1.2. MICROFLUÍDICA

La microfluídica es una técnica que combina la tecnología y la ciencia para el estudio y manipulación de cantidades nano y microscópicas (de 10^{-6} a 10^{-9} litros) de microfluidos. A la hora de explicar qué es la microfluídica nos apoyaremos en cuatro pilares, los cuales son la base de esta rama científica (33).

En primer lugar, tenemos el análisis molecular. Mediante este proceso de laboratorio se emplea un tejido, sangre o líquido corporal con el objetivo de, como dice su propio nombre, analizar y observar la presencia o ausencia de proteínas, genes u otras moléculas. (28,(34). Debido a la necesidad de conocer más a fondo como interactúan las micropartículas de algunos de estos medios líquidos, surge la microfluídica, ya que permite realizar ensayos de manera precisa y empleando pequeñas cantidades de reactivos.

En este segundo pilar podemos encontrar la biodefensa. Desde hace siglos se tiene constancia de que el ser humano ha empleado armas biológicas como ataque en determinados conflictos bélicos. Así pues, podemos verlo reflejado en el uso de cadáveres con peste dentro de las murallas que empleaban los tártaros en el siglo XIV, y el envío de pañuelos por parte de los británicos a las tribus indias de Delaware, los cuales habían sido usados por enfermos con viruela previamente. Sin embargo, no fue hasta el final de la Guerra Fría, en el año 1991, cuando se empezó a plantear de manera más seria la posibilidad de usar agentes biológicos y químicos como armas. A partir de este punto, la

Agencia de Proyectos de Investigación Avanzada de Defensa (DARPA) del Departamento de Defensa de los Estados Unidos de América desarrolló diferentes programas para la creación de sistemas microfluídicos con el objetivo de detectar posibles amenazas. Es esta la razón por la que la microfluídica empezó su potente desarrollo, el cuál sigue vigente hoy en día (33,35,36).

Otra de las causas que encontramos en el desarrollo de la microfluídica proviene de la biología molecular. Esto se debe principalmente a que en la década de los 80 se comenzó el conocido Proyecto del Genoma Humano. El objetivo era secuenciar los 3000 millones de nucleótidos que componen el genoma del ser humano. Para ello se empezaron a desarrollar diferentes técnicas y métodos las cuales sirvieron de trampolín a la biología molecular que conocemos hoy en día. Finalmente, en el febrero de 2001, se publicó en la revista *Nature* que se había secuenciado el 90 por ciento de la secuencia completa de nuestro genoma (2). La necesidad de trabajar con reacciones a escalas tan pequeñas dio pie a la creación y desarrollo de instrumentos microfluídicos.

Por último, encontramos la microelectrónica. Métodos para la formación de imágenes como la fotolitografía y procesos que emplean silicio han servido de base para la expansión de la microfluídica. Aunque en un primer lugar se empezara por estos materiales como el vidrio o el silicio, poco a poco fueron desplazados por los plásticos. El principal motivo es la relación existente entre utilidad y precio, pues eran procesos muy caros y a menudo estos materiales no cumplían con los requisitos esperados (28,(37).

Para el desarrollo de la microfluídica se creó a cabo un polímero, poli(dimetilsiloxano) o PDMS, con características diferentes a las del silicio. Se trata pues de un elastómero suave, ópticamente transparente y fácilmente manejable, lo que le ha convertido en el principal material para la investigación de microfluidos (38).

A pesar del gran número de avances e innovaciones que han surgido en las últimas décadas, este campo está aún en desarrollo y se espera que próximamente tenga un impacto revolucionario sobre la ciencia.

1.2.1. ESTRUCTURA DE LOS SISTEMAS DE MICROFLUÍDICA

Como hemos visto anteriormente, la microfluídica es el resultado de la evolución y combinación de diferentes campos de la biología y la ingeniería. A la hora de trabajar con fluidos a escala nano y micrométrica es necesario emplear los instrumentos adecuados que nos permitan realizar la investigación de la manera más precisa posible.

Aunque hay un amplio abanico de diferentes tipos de chips de microfluídica, todos ellos deben tener unas estructuras comunes para llevar a cabo los siguientes procesos:

- Métodos de introducción de reactivos y muestras: normalmente fluidos, aunque hay cierta discusión en el ámbito científico, pues algunos expertos consideran que es preferible el uso de polvos. Debido a que no se dispone ni de la experiencia ni de los materiales necesarios para emplear polvos en lugar de fluidos, en todos los ensayos mostrados en este documento se emplearán reactivos líquidos (43).
- Métodos para mover dichos fluidos alrededor del chip y conseguir que reaccionen. Para ello se usan bombas o cualquier otro dispositivo que ejerza una fuerza que

permita mover el fluido. En nuestro caso usaremos las bombas PHD 2000 de Harvard Apparatus y la bomba ISM833C de ISMATEC (43).

- Métodos para otras actividades, como el microanálisis y otras técnicas de estudio del material obtenido. Esta última parte puede estar unida o separada del resto de componentes, ya que es posible manipular las gotas una vez formadas o almacenarlas para posteriormente trabajar con ellas (43).

A lo largo de este estudio se emplearán dos Microchips Droplet Junction de la empresa Dolomite, los dos con la misma configuración y tamaño de canales, pero con la diferencia de que las paredes de uno son hidrofóbicas y las del otro hidrofílicas. Antes de explicar las características propias de cada chip, debemos estudiar los fundamentos y la teoría en la que se basa la microfluídica para un funcionamiento correcto, preciso y sutil.

1.2.2. MICROGOTAS

Tras haber estudiado los dispositivos de microfluídica, nos centraremos en los fundamentos en los que esta se basa la microfluídica, cuáles son las operaciones básicas que se realizan con las esferas obtenidas y la posible aplicación de estas.

1.2.2.1. FUNDAMENTOS DE LA MICROFLUÍDICA.

Para empezar, se van a ver tanto las distintas expresiones matemáticas que explican la microfluídica como las distintas configuraciones que existen a la hora de generar microgotas con dispositivos de microfluídica.

1.2.2.1.1. EXPRESIONES MATEMÁTICAS DE LA MICROFLUÍDICA

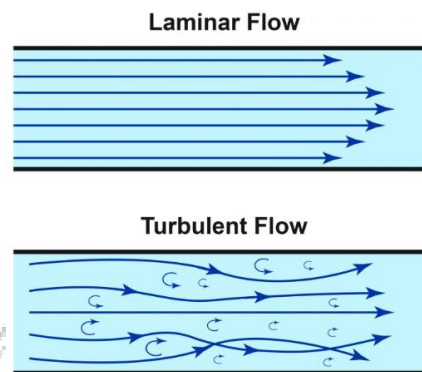
Desde el origen de la microfluídica en la década de los 80 ha habido un aumento en el interés y desarrollo de herramientas de manipulación de fluidos a escala micro y nanométrica. Como se ha comentado, se trata de un campo multidisciplinar por lo que son varias las áreas que están tratando de llevar a cabo innovaciones en este tema. Para ello, no debemos olvidar que estamos tratando con fluidos, y por lo tanto hay que tener presente los principios por los que estos se rigen.

- Número de Reynolds

Dentro de la cantidad de modalidades en las que puede emplearse la microfluídica, podemos encontrar la basada en gotas (39,40). Esta se centra en el objetivo de generar volúmenes discretos, las gotas, a diferencia de los campos en los que se trabaja con flujos continuos. La principal característica y quizá la más importante la encontramos en el número de Reynolds, el cuál ha de ser bajo para permitir el flujo laminar dentro de nuestro chip (41).

Se trata de un número adimensional que se emplea para caracterizar el movimiento de un fluido. En función del valor que tome este, tendremos conocimiento acerca del comportamiento de un fluido a la hora de moverse, lo cual es importante durante su estudio (41).

Podemos distinguir en primer lugar entre flujo laminar y flujo turbulento. En el primer caso, podemos apreciar como el fluido se mueve en capas, láminas, y se suele dar en ocasiones en las que va a velocidad baja. A medida que vamos dotando de velocidad al fluido nos vamos acercando a la velocidad crítica. Cuando el fluido va a esta velocidad, se puede empezar a apreciar determinadas ondulaciones, las cuales irán aumentando junto con la velocidad. Es entonces cuando diremos que el flujo es turbulento. Para poder distinguirlo mejor se adjunta una ilustración en la cual se puede observar la diferencia clara entre flujo laminar (arriba) y turbulento (abajo) (41).



(42) Figura 5: Clasificación según el Número de Reynolds entre flujo laminar (superior) y turbulento (inferior).

Se trata de un número adimensional que indica la relación entre diferentes variables: diámetro del tubo (D), velocidad del líquido (v), densidad del líquido (ρ) y viscosidad del líquido (μ). Así pues, podemos establecer esta ecuación de la siguiente manera: (41)

$$Re = \frac{D * v * \rho}{\mu}$$

En función del valor que adquiera este número, podremos clasificar el fluido en dos grupos distintos:

- $Re \leq 2000$, el flujo será estacionario y laminar, tal y como se ha explicado anteriormente (41).
- $2000 \leq Re \leq 4000$, se pueden apreciar unas pequeñas oscilaciones, pero manteniéndose aún delgadas, sin demasiada importancia (41).
- $4000 \leq Re$, en el flujo veremos fuertes oscilaciones que influirán en su comportamiento (41).

Estos valores son meramente de referencia, ya que debido a los errores experimentales y las numerosas condiciones de estudio que hay estos datos oscilan ligeramente. Algunos estudios únicamente defienden dos grupos, turbulento y laminar, mientras que otros apoyan los tres ya mencionados, siendo la causa de esta diversidad la variación en el número debido a las condiciones y el entorno del estudio (42).

Es importante conocer el número de Reynolds de un fluido por las características que puede presentar dicha sustancia. En nuestro caso, nos vamos a centrar en la capacidad del flujo laminar en crear gradientes precisos de concentración, lo cual ha sido empleado en estudios sobre la migración celular (43).

Como se ha comentado, el número de Reynolds permite diferenciar un flujo laminar de uno turbulento. La microfluídica basada en gotas, a diferencia de la de flujo continuo, nos permite un mayor control y precisión a la hora de generar las gotas, llegando a poder moldear cada gota de manera independiente (43). A lo largo del presente siglo, se han desarrollado distintos proyectos en los cuales se ha empleado la microfluídica de gotas para generar microcápsulas huecas (44), dobles emulsiones (45), microburbujas (46) y partículas irregulares (47).

- **Difusión**

Es el proceso mediante el cual dos o más grupos de partículas concentrados en un volumen se dispersan, generando que la concentración media de estas en todo el volumen sea constante. Viene dada por la siguiente expresión, en la cual la d es la distancia que recorres una partícula en un tiempo t , y D es el coeficiente de difusión de la partícula:

$$d^2 = 2 \times D \times t$$

Podemos apreciar que la variable de la distancia está elevada al cuadrado, lo que indica la importancia de la distancia en microescalas (42).

- **Resistencia Microfluídica**

Como todo fluido que se desplaza por cualquier superficie, su capa externa ejerce una resistencia sobre la superficie por la que fluye. En el caso de la microfluídica tiene mayor importancia. Considerando que la geometría del tubo es circular, pues simula la forma de arterias y venas que transportan sangre, la resistencia puede calcularse como:

$$R = \frac{8 \times \mu \times L}{\pi \times r^4}$$

en la cual μ es la viscosidad, r el radio de la tubería y L la longitud de este. Podemos apreciar la especial importancia que tiene la viscosidad, ya que esta determinará en gran parte la resistencia que ejerce el fluido sobre la pared, y por ende, dificultará o no la formación de microgotas.

1.2.2.1.2. DISPOSITIVOS Y GENERACIÓN DE GOTAS

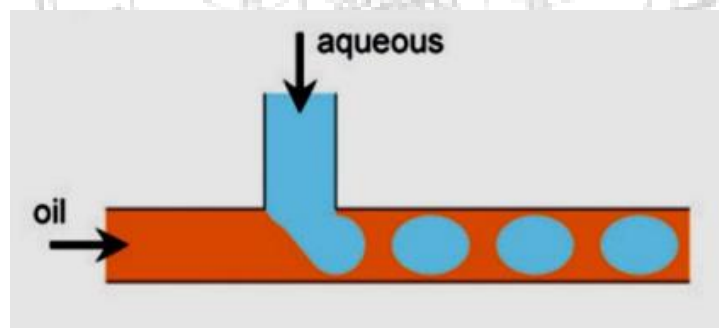
Para generar estas microesferas, hay que tener en cuenta un gran número de factores. Quizá el más importante e influyente es el material usado para fabricar el dispositivo, así como los fluidos empleados para la generación de gotas. Tal y como se ha explicado, tras una larga evolución y numerosas investigaciones, se ha llegado a la conclusión de que el PDMS (poli(dimetilsiloxano)) es, hasta el momento, el material más adecuado para construir estos instrumentos. A mayores también podemos encontrar dispositivos con vidrio (44), tolueno y silicio (40,48,49).

En el momento de la creación de gotas mediante microfluídica, es necesario tener un control muy preciso sobre forma, uniformidad y tamaño de estas. Se han desarrollado

estudios acerca de la combinación de agua y aceite, así como los sistemas que combinan aire y líquido (50). Además, cabe destacar la importancia que tiene la química de la superficie y la geometría a la hora de desarrollar gotas (40,51).

Actualmente los procesos que más se emplean en la fabricación de microgotas son cuatro: cruce en T de dos canales (T-junction), cruce en X de tres canales (X-junction) o enfoque de flujo (Flow-focussing), dielectroforesis (DEP) y electrohumidificación dieléctrica (EWOD). Estos los podemos dividir en dos grupos bien diferenciados: los dos primeros se centran en el control sobre la formación de las gotas gracias a la geometría de los canales del dispositivo microfluídico, y los dos últimos se basan en las nuevas tecnologías y el control electrónico sobre los diferentes fluidos (33). A continuación, se explicarán brevemente cada uno de estos procesos.

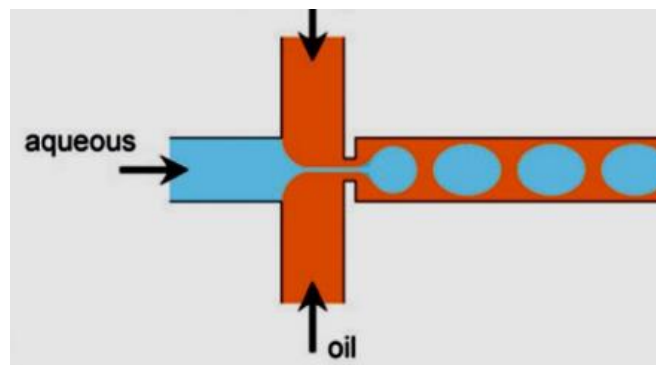
- A. T-junction.** Llamada así porque los tubos que llevan los fluidos, los cuales llamaremos fase discreta y continua, se juntan formando un ángulo de 90 grados, adquiriendo forma de T (51). A medida que la fase continua llega a la unión, este se junta con la fase dispersa, formando las gotas que se mueven por el canal principal, tal y como se muestra en la siguiente figura. El motivo por el cual se produce este paso de flujo continuo a disperso es la actuación de las fuerzas de cizallamiento causadas por la fase continua y el gradiente de presión (49). El tamaño de las gotas es posible modificarlo al emplear un mayor o menor flujo de la fase continua: a mayor flujo las gotas serán más pequeñas, y viceversa, a menor flujo mayor tamaño de gotas (33). Las T-junction pueden tener más de una entrada y no solo son usadas en microfluídica, sino que también se emplean en reacciones químicas (52) y para la formación de gotas más complejas (53).



(54) Figura 6: Representación de la unión en T de un dispositivo microfluídico.

- B. Flow-focussing o X-junction.** Más conocido por este segundo nombre, se trata de un proceso que se caracteriza por tener una zona muy estrecha una vez los fluidos que tenemos se juntan. Esta región va a permitir que las gotas obtenidas sean mucho más estables pues la fuerza de cizalladura que se ejerce es simétrica en ambos polos de la gota. El tamaño de las gotas se puede modificar en función del flujo que empleemos tal y como se explicó anteriormente: a mayor flujo menor tamaño de gotas y viceversa (40,49).

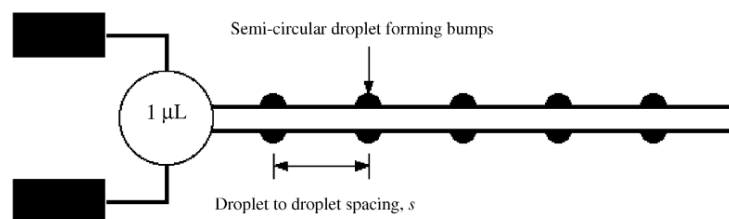
La fase dispersa es inyectada por el canal central y la continua es la encargada de envolver a esta, dando lugar a la microesfera o microgota (47). Esta técnica se ha empleado en numerosos estudios para la generación de microburbujas (54) y dobles emulsiones (40,49,55). Podemos encontrar dos configuraciones diferentes.



(54) Figura 7: Representación de la unión en X de un dispositivo microfluídico.

C. Dielectroforesis (DEP). Se trata de uno de los muchos procesos electrohidrodinámicos (EHD) que existen a la hora de generar gotas por microfluídica. La dielectroforesis se usa para generar gotas uniformes extrayendo dichas gotas de un reservorio de fluido (56). La diferencia con el resto de los procesos EHD radica en que en la dielectroforesis el fluido empleado puede ser eléctricamente neutro y la fuerza ejercida sobre el mismo es causada por un campo eléctrico no uniforme (42).

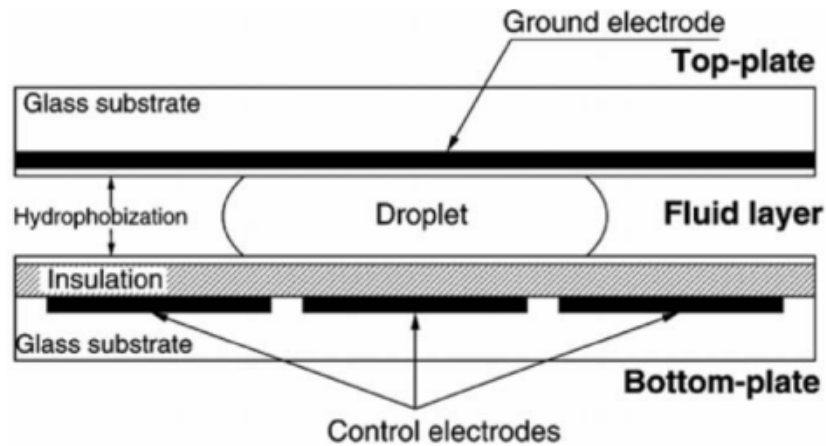
La formación de microgotas puede controlarse mediante el uso de impulsos eléctricos periódicos generados por electrodos coplanares, los cuales deben estar separados según la ley de Rayleigh. Esta determina que la cantidad de señal electromagnética que se dispersa en un dieléctrico es proporcional a la cuarta potencia de la frecuencia de la señal e inversamente proporcional al tamaño de las partículas que forman el dieléctrico. Dicho de otro modo, a mayor frecuencia de la señal y menor sea el tamaño de las partículas del material dieléctrico, mayor será la dispersión que se produzca (57).



(58) Figura 8: Generación de microgotas empleando la dielectroforesis, señalando la distancia que debe existir entre los distintos electrodos.

D. EWOD. Electrowetting on a dielectric. Esta técnica emplea de nuevo campos eléctricos (EHD) para la generación de microgotas (58). Estos dispositivos pueden estar compuestos por uno o dos planos, siendo más común el segundo (42). Este último posee el electrodo de tierra (encargados de conducir y disipar las corrientes

de fuga (tierra)) en la capa superior y los de control en la capa inferior, ambos separados de las gotas por capas aislantes (33,42,(59). La principal diferencia entre DEP y EWOD radica en que este último estudia la relación existente entre cómo un campo eléctrico influye sobre la superficie y un fluido que esté en contacto con ella, mientras que el primero se centra en la generación de microgotas mediante el uso de impulsos electromagnéticos (60,61).



(48) Figura 9: Proceso EWOD (Electrowetting on a dielectric), para la generación de microgotas empleando corrientes eléctricas.

El funcionamiento es el siguiente: al activarse los electrodos el fluido empieza a adquirir forma de dedo, causado por la acción eléctrica. Al apagarse de nuevo estos electrodos la superficie se vuelve hidrofóbica, provocando que el “dedo” se separe de nuestro instrumento dando lugar a la gota. El tamaño dependerá de las características del impulso eléctrico empleado. Así pues, a mayores frecuencias se generarán gotas más pequeñas mientras que a medida que la frecuencia disminuye las gotas irán creciendo (40). También podemos controlar el número de gotas según la potencia de la electricidad ejercida por el campo eléctrico (62).

- **Generación de microburbujas**

Hasta el momento hemos visto técnicas para la fabricación de microgotas, pero nuestro proyecto se centra en la creación de esferas huecas por dentro, por lo tanto, debemos emplear estas técnicas, pero estudiando cómo es posible aplicarlas para generar microburbujas. Estas se diferencian de las gotas principalmente en la relación gas-líquido que tienen las microburbujas en comparación con la fase líquido-líquido de las gotas.

En los dispositivos de creación de microburbujas tiene un papel muy importante la presión de Laplace. Esta fórmula demuestra que hay una presión en el interior de una superficie esférica la cual es mayor que la existente en el exterior de esta (63). Cuando se reduce el tamaño de burbuja, la diferencia de presión aumentará. Lo mismo pasa al contrario, al aumentar el tamaño de la superficie esférica, la presión diferencial será menor. De esta manera se consigue una presión igual a cero cuando el radio es infinito, es decir, una superficie plana (64).

Los dispositivos de generación de microburbujas incluyen uniones en T (54) y capilares (65). Además, al igual que ocurría con las microgotas, el tamaño y cantidad de microburbujas generadas dependerá de velocidades de las fases gaseosa y líquida, así como su viscosidad y geometría del canal.

1.2.2.2. MANIPULACIÓN DE MICROGOTAS

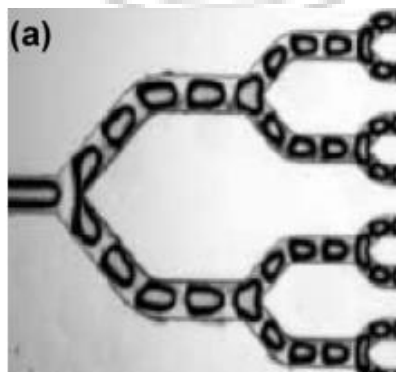
Hasta el momento se ha visto cuáles son sus fundamentos y métodos más destacados para la generación de microgotas, pero la importancia de esto radica en qué hacer con estas una vez creadas. A continuación, se van a exponer las principales transformaciones que pueden sufrir estas estructuras una vez han sido creadas mediante microfluídica.

1.2.2.2.1. Fisión de microgotas

Es un proceso mediante el cual se consigue la división de una gota en múltiples subgotas. La importancia de este hecho radica en el objetivo de realizar numerosos experimentos de manera paralela. Dado que una gota parte como recipiente de reactivos, al dividirla en muestras más pequeñas, también se dividen los reactivos existentes en el interior de la gota original, por lo que se pueden desarrollar diferentes investigaciones a partir del mismo grupo de reactivos de una misma gota (66). Esta técnica también puede ser empleada para controlar la concentración del contenido de cada gota (40,67).

Dentro de la fisión de microgotas podemos clasificar los métodos en dos grupos: activos y pasivos. Los pasivos se centran en la división haciendo uso de las características geométricas del canal microfluídico, mientras que el activo usa electricidad para llevar a cabo esta separación (66,68).

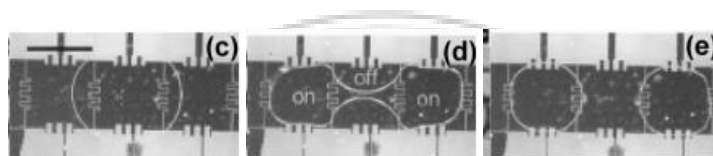
- **Fisión pasiva:** es un método que no emplea ningún tipo de fuente de energía, sino que la división se debe a las fuerzas debidas a la geometría del canal, dando lugar a secciones precisas y con volúmenes bien controlados. Esta división puede ser con canales en unión en T (67), bifurcaciones u obstrucciones del canal (66,69).



(40,62) Figura 10: Método pasivo de fisión de microgotas, ayudándose para ello de la geometría del canal.

Al igual que en casos anteriores, esta división se puede controlar variando el flujo y las resistencias de los canales (40,66). Esta técnica fue demostrada según el estudio de Link et al, en el cuál emplea un bloque PDMS para obstruir el canal (69). En otros estudios como el de Sato et al, se fabricó un microchip que contenía micromallas y uniones en T para la división de estas gotas (70).

- **Fisión activa:** a diferencia del pasivo, este método depende de factores externos como calor, potencia o sistemas de electricidad. En este caso también se emplean sistemas EWOD explicados anteriormente. Las gotas se encuentran en una superficie dieléctrica y es al activar los electrodos cuando dichas gotas se deforman hacia sus extremos, estirándose y provocando que estas se partan por la mitad (66). Al tratarse de electrodos, las gotas no se guían por geometrías de canales, sino que se mueven gracias a la colocación de los electrodos (49).



(61) *Figura 11: Sistema de fisión activa de microgotas haciendo uso de corrientes eléctricas.*

No solo se consigue este fin con campos eléctricos, sino que la influencia de la temperatura sobre la estructura de las microgotas tiene también importancia en la división de estas. Un aumento de la temperatura reducirá la viscosidad y la tensión interfacial de los líquidos, por lo que es posible aplicar este principio para atraer selectivamente un tapón acuoso a un canal de derivación calentado, generando el mismo efecto de atracción que un electrodo activado (40,71).

1.2.2.2. Fusión de microgotas

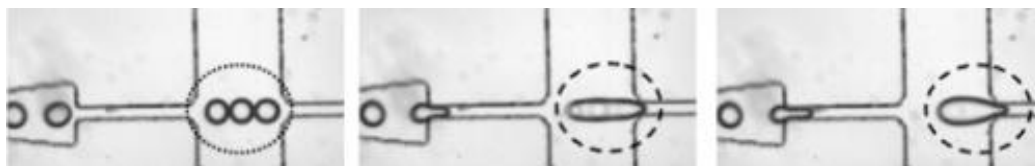
Mientras que en el proceso de fisión el objetivo era dividir una gota principal en subgotas más pequeñas, la fusión se centra en conseguir combinar y que reaccionen los diferentes contenidos de dos o más gotas distintas. Cuando estas se acercan y se dan unas condiciones determinadas, se forma una fina película que conecta las superficies de ambas gotas (72). Al producirse esto se generará un aumento de presión, dando lugar a un desequilibrio en la tensión superficial el cuál provocará que las películas de las gotas involucradas en la fusión se rompan, produciéndose así la unión y la gota final.



(72) *Figura 12: Fusión de dos gotas en una sola.*

Es necesario destacar que, en algunos casos, los reactivos deben estar separados en sus respectivas gotas hasta que, en el momento dado, se den las condiciones adecuadas (49). Al igual que en la fisión, podemos clasificar en dos grupos los diferentes procesos:

- **Fusión pasiva:** la fusión está controlada por el diseño y geometría de los canales por los que circulan los microfluidos. Esta fusión supone un reto, ya que para que sea adecuada debe coincidir la frecuencia de las gotas en condiciones de alto flujo (73). Para ello se ha demostrado que controlando el caudal y la geometría del canal se puede lograr esta sincronización de frecuencias, dando lugar a una mayor probabilidad de fusión correcta en el canal (74).



(76) Figura 13: Mecanismo de fusión pasiva de gotas ayudándose de la geometría del canal y variando el flujo.

- **Fusión activa:** la fusión activa se consigue gracias al empleo de fuentes de energía externas como es la electrohidrodinámica (EHD)(75). El mecanismo de funcionamiento es el siguiente: en primer lugar se colocan los electrodos de manera paralela al canal y se usa tanto corriente continua como alterna para fusionar las gotas (también suele emplearse el DEP)(76,77). Posteriormente se activan los electrodos de manera secuencial para guiar a la gota hacia otra con la cuál la queremos fusionar, produciéndose así la coalescencia (78).



(80) Figura 14: Fusión activa de gotas empleando corrientes eléctricas.

1.2.2.2.3. Mezclado de microgotas

Hasta el momento hemos visto los procesos de fusión y fisión, pero también existen otras maneras de trabajar con las microgotas, entre las cuales encontramos el mezclado o *mixing*. Se trata de una técnica que ha ido adquiriendo importancia con el paso de los años, ya que permite realizar y estudiar la cinética de diferentes reacciones químicas y biológicas (49). Esta técnica suele realizarse tras la fusión o la fisión y permite homogeneizar las sustancias que tenemos dentro de las gotas. Uno de los principales retos que se presentan a la hora de llevar a cabo esta técnica es la capacidad de superar las fuerzas interfásicas y promover la mezcla entre dos fluidos (40).

Para comprender un poco más el proceso de *mixing* hablaremos a continuación del número de Peclet. Este número se trata de un valor adimensional que relaciona el tiempo de advección (variación escalar de un punto por el efecto de un campo vectorial) con el

de difusión (flujo neto de átomos, iones o moléculas dentro de un material) (79). Puede ser calculado con la siguiente ecuación:

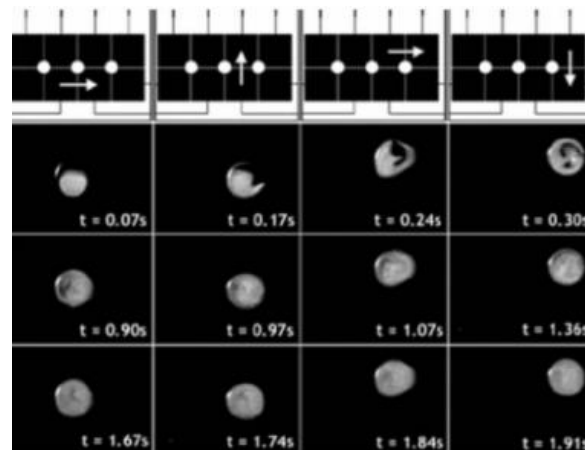
$$Pe = \frac{u * L}{D}$$

Donde u nos indica la velocidad, L la longitud y D el coeficiente de difusión (80). A esta conclusión es posible llegar si partimos del conocimiento de que el número de Peclet es el resultado de la multiplicación del número de Reynolds por el número de Prandtl. El primero es empleado en casos de transferencia de masa y nos indican la relación entre la difusividad del momento y la difusividad de masa. Por otro lado, el número de Prandtl se usa en transferencias de calor y nos da información acerca de la relación entre la difusividad del momento y la difusividad térmica. Si el valor del número de Peclet es menor que 1 la mezcla será perfecta, mientras que si este es mayor que 100 el flujo resultante es de tipo pistón (movimiento del gas en grandes burbujas dentro de un líquido continuo) (73,74).

Una vez tenemos esta herramienta para predecir y saber cómo será o es una mezcla de fluidos, veremos, al igual que en casos anteriores, la diferencia entre el *mixing* pasivo y activo:

- **Mixing pasivo:** la geometría de los canales microfluídicos ayudan a una mejor mezcla interna. A medida que la gota se va desplazando por dichos espacios las gotas sufren flujos de recirculación desiguales en sus mitades. Tanto el movimiento irregular como los giros bruscos a lo largo del circuito provocarán una buena mezcla ayudando a reorientar las gotas para un correcto mezclado (81).
- **Mixing activo:** esta mezcla se puede desarrollar empleando campos eléctricos. El control de estos puede implementarse con una matriz de electrodos o intercalando las gotas entre estos. También es posible que las gotas se sumerjan en aceite o aire sin estar en contacto directo con el electrodo, eso sí, separados siempre de estos por una capa dieléctrica hidrófoba (82).

Se ha conseguido demostrar la eficacia de este método para lograr dicha mezcla. Para ello, tras la fusión de las gotas, estas se mueven de manera lineal a lo largo de una matriz de electrodos. A medida que la gota se va desplazando dentro del campo eléctrico, se puede observar cómo se va homogeneizando la mezcla de su interior, dando lugar a un buen resultado final (40,83).



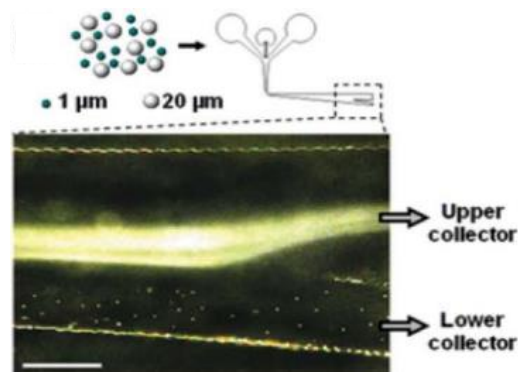
(40,85) *Figura 15: Proceso de mezclado activo producido en el interior de una gota.*

1.2.2.3. CLASIFICACIONES

Una vez creadas las microgotas podemos clasificarlas para así analizarlas de manera individual. Para ello se aislarán dichas microgotas y se llevarán a cabo los procedimientos deseados. Podemos encontrar dos formas de clasificar estas estructuras: de forma pasiva o activa. La primera es sencilla y se aplica un sesgo para clasificarlas, mientras que la activa, aunque sea más compleja, permite una mayor flexibilidad y control sobre los parámetros a ordenar (49). Esta última se centra en una gran variedad de características como la funcionalidad o el contenido de las partículas. A continuación, se van a explicar los principales métodos de clasificación de microgotas: de forma pasiva, geometría y gravedad, y activa, control eléctrico (40).

- Pasivo

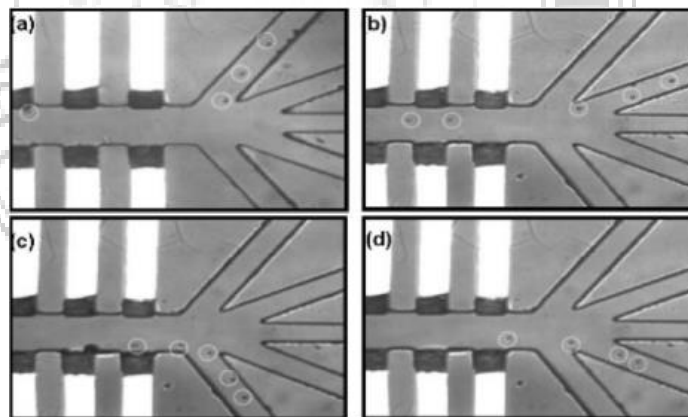
- **Geometría:** clasifica las gotas gracias a que las gotas más pequeñas, llamadas satélite, se mueven por el lateral del canal, mientras que las más grandes, o primarias, fluyen por el canal principal. Este proceso permitirá purificar las muestras, pues se eliminan las gotas satélites, consideradas subproductos indeseados de la creación de microgotas (67). Este sistema ha permitido diferenciar gotas del tamaño de 4 μm (82).
- **Gravedad:** se basa en el principio de que la velocidad de sedimentación de las partículas más grandes es mayor que en las partículas pequeñas, considerando la densidad de ambas igual y constante (40). Por otro lado, se puede aumentar este efecto ensanchando de manera asimétrica el canal de separación, el cual tiene una velocidad decreciente en función de su posición a lo largo del eje vertical (84).



(86) Figura 16: Clasificación de gotas en función de su tamaño.

- **Activo**

- **DEP:** los sistemas DEP pueden servir para la clasificación de microgotas, partículas o células individuales. Según el estudio de Ahn et al., se consigue la clasificación de estas cuando se encuentran sumergidas en hexadecano y se emplean electrodos de indio y estaño en los canales del chip de microfluídica de PDMS (85). El campo generado por los electrodos proporcionará la fuerza necesaria para dirigir las gotas hacia los canales de clasificación. Esta capacidad de distinguir y separar tipos de gotas va a permitir una detección adecuada para realizar cribados de alto rendimiento para diversas aplicaciones (40).



(87) Figura 17: Clasificación de las microgotas empleando dielectroforesis (DEP).

- **EWOD:** tal y como se explicó en apartados anteriores, EWOD permite modificar la energía de la interfaz gota-superficie para provocar el movimiento de la primera. Esto se puede aplicar para mover y clasificar gotas en función de su contenido. Para ello se separan los dos tipos de partículas en lados opuestos de una gota mediante electroforesis y posteriormente dividiendo dicha gota, obteniendo dos gotas hijas que se pueden mover por diferentes caminos y así clasificarlas a nuestro antojo (85,86).



(80) Figura 18: Clasificación de las microgotas empleando EWOD.

1.2.2.4. APLICACIONES ACTUALES DE LAS MICROGOTAS

Hemos visto como se forman estas microgotas, así como cuáles son las diferentes operaciones y procesos que se pueden realizar con estas. Una vez hemos procesado y trabajado sobre las estructuras creadas, podemos emplearlas en diferentes ámbitos y campos. Al tratarse de un mundo interdisciplinar, tal y como vimos al inicio de este documento, son varias las utilidades que se les puede dar a las microgotas. A continuación, se exponen las aplicaciones más comunes y que más interés han tenido en los últimos años.

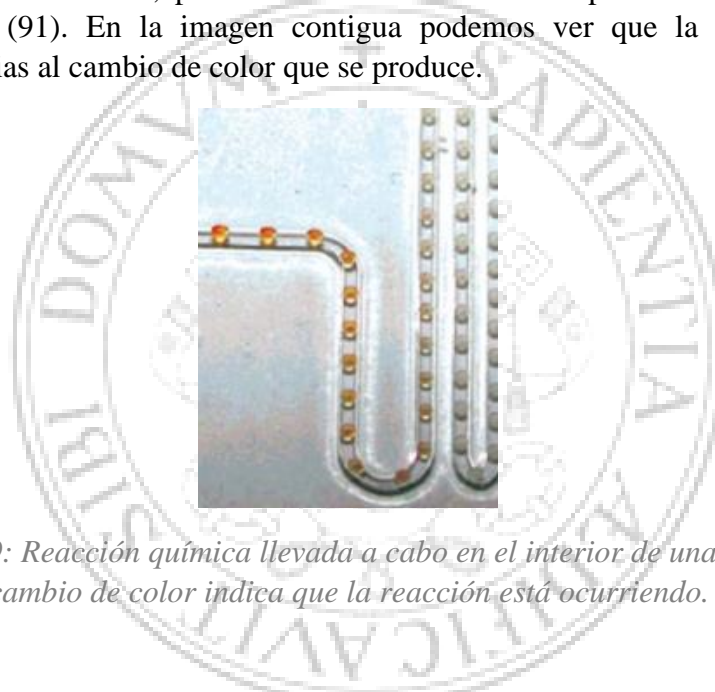
Para empezar, una de las tantas aplicaciones de la microfluídica, es la creación de microgotas para la **distribución de agentes terapéuticos**. La producción de partículas cuyo tamaño va desde femtolitros hasta nanolitros y que son fácilmente reproducibles hacen de las microgotas un interesante campo de investigación. De esta manera, es posible introducir en las gotas compuestos enzimáticos, fármacos o colorantes una vez creadas. Del mismo modo, el grado de liberación se puede ajustar de manera individual para cada una de las gotas mediante la manipulación del grosor y compuestos hidrófobos de estas (87). Por otro lado, también se ha investigado acerca de la distribución magnética de fármacos. Estas técnicas permiten cargar nanopartículas para guiarlas mediante campos magnéticos externos a zonas con tumores, en las cuales se irán acumulando (88).

En relación con el campo de las **imágenes médicas**, la microfluídica también tiene protagonismo. Así pues, podemos ver el uso de microgotas con agentes de contraste, las cuales han sido introducidas en el cuerpo del paciente y sirven como herramienta de diagnóstico prematuro de determinadas enfermedades. Su uso principal es en imágenes basadas en ultrasonidos. Las microburbujas van a aumentar la sensibilidad y especificidad, mejorando el contraste de las imágenes. Para lograr esto, es necesario aumentar la reflexión de las ondas. La reflectividad óptima con microburbujas es de entre 2 a 5 mm de diámetro. Cabe destacar también que el pequeño tamaño de estas estructuras permite su paso a través de los capilares pulmonares (89).

Si seguimos en el campo del diagnóstico, podemos encontrarnos con chips diagnósticos, conocidos como **Lab-on-a-chips**, encargados de identificar enfermedades centrándose en sistemas de microanálisis total (mTAS). Estos dispositivos surgen con el fin de simplificar costes de laboratorios y consumos de reactivos. En los últimos años se han desarrollado instrumentos para el procesamiento de reactivos celulares, proteínas y ADN (74). Las ventajas que esta técnica ofrece se centran sobre todo en la reducción del tiempo de trabajo, ya que, al estar todos los componentes más cercanos, la mezcla es más rápida y la distancia que separa a los reactivos es menor. Además, al ser fielmente reproducibles, es posible que con el mismo reactivo se puedan llevar a cabo varias pruebas de

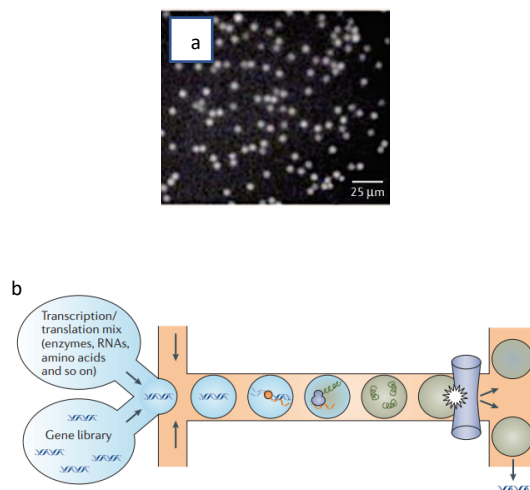
diagnóstico a la vez, reduciendo tiempo y costes (90). Un ejemplo lo encontramos en el estudio de Asgar et al., en el cual se desarrolló un chip capaz de detectar el hongo *Candida albicans* en apenas 1 o 2 horas, a diferencia de otros procesos que tardan entre 2 y 10 días (91).

Continuando con el hilo de **reacciones químicas**, también la microfluídica tiene un papel importante dentro de este ámbito. En todos aquellos procesos en los que existe una reacción química, ya sea la expresión de proteínas o la síntesis de compuestos orgánicos, es interesante mantener el entorno lo más protegido posible, evitando así que se contamine la reacción de interés con el exterior y pudiendo desarrollarse de maneras paralelas varios trabajos. Esta aplicación ofrece numerosas ventajas. Primero permite reducir tiempo y costes pues se reducen tanto las distancias como las cantidades de reactivos. Segundo, la geometría del canal y el movimiento de la propia gota va a permitir una mejor mezcla aumentando la calidad del resultado. Por último, aunque se ha comentado con anterioridad, permite desarrollar reacciones paralelas con el mínimo riesgo asociado (91). En la imagen contigua podemos ver que la reacción se ha completado gracias al cambio de color que se produce.



(52) Figura 19: Reacción química llevada a cabo en el interior de una microgota. El cambio de color indica que la reacción está ocurriendo.

Al igual que hemos visto la importancia de las microgotas en procesos de diagnóstico y distribución de fármacos, podemos ver el uso de estas microestructuras en la **síntesis biomolecular**. Esto abre un nuevo mundo para los biólogos e investigadores que tratan de entender la cinética y comportamientos de las células. Es más, no sólo se centran en la generación de biopartículas, sino que también se estudia la posibilidad de crear proteínas y ADN artificial (92). Un caso de lo comentado es un estudio desarrollado por Neiderholtmeyer et al., en el cual observaron que las células artificiales intercambian proteínas con las de su entorno (93). En la siguiente ilustración podemos apreciar en la imagen superior (a) una imagen de microscopia de fluorescencia de la expresión de la proteína verde fluorescente en un dispositivo microfluídico y en la inferior (b) la evolución de proteínas in vitro utilizando una plataforma microfluídica (87).



(89) *Figura 20: A. Imagen de microscopía de fluorescencia de la expresión de la proteína verde fluorescente en un dispositivo microfluídico. B. Esquema de la evolución de proteínas in vitro utilizando una plataforma microfluídica*

Por último, la microfluídica también se emplea en la **caracterización de macromoléculas**. La cristalización de proteínas ha sido estudiada con esta técnica, ya que el entorno de cristalización y las condiciones de almacenaje pueden manejarse gracias a las características que ofrecen los dispositivos microfluídicos (94). Por otro lado, la PCR con microgotas permite una detección de secuencias de ácidos nucleicos muy precisa, ya que como hemos visto que es posible la investigación paralela, reduce mucho tiempo y costes (95,96). Además, la PCR ha adquirido un gran papel en los últimos años a la hora de la producción y análisis de las muestras de ADN (97). Una de las más importantes quizá sea la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), la cual se ha podido modificar y adaptar a los dispositivos microfluídicos, denominándose dLAMP (droplet LAMP) (98). Para acabar, la microfluídica es usada en el ámbito de la secuenciación de ADN principalmente para desarrollar ensayos por ligadura FRET, la cual es capaz de distinguir aquellas secuencias que complementan las moléculas objetivo. Puede emplearse para la secuenciación arbitraria y desconocida, siendo el pilar de una forma rápida y económica de trabajar con el ADN (99).

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. OBJETIVOS

La generación de microsferas es un tema de investigación en diversas áreas, como la medicina, la industria textil o la ingeniería de materiales entre otras. Centrándonos en el mundo de la medicina, las microsferas son partículas pequeñas y esféricas, que se caracterizan por sus propiedades fisicoquímicas únicas, y que pueden ser utilizadas en una variedad de aplicaciones, tal y como se ha explicado previamente. En este contexto, el presente trabajo de investigación tiene marcados los siguientes objetivos:

1. Realización de una revisión bibliográfica exhaustiva sobre los diferentes métodos de microfluídica y síntesis de polímeros tipo elastina existentes en la literatura.
2. Selección y evaluación de la viabilidad de diferentes métodos de síntesis de microesferas de aceite en agua para su posterior aplicación para la generación de microesferas de ELRs.
3. Selección y caracterización de determinados polímeros, los cuales se disolverán en distintos medios con el objetivo de que reaccionen dando lugar a esferas estables y firmes.
4. Selección y evaluación de métodos para la síntesis de microesferas de ELRs, así como los procesos para obtener sus valores característicos sobre tamaño, biocompatibilidad, propiedades mecánicas, estructura, etc.
5. Optimización del proceso de síntesis de microesferas de ELRs observando y analizando cuáles pueden ser las claves que influyan en la formación de dichas partículas para poder manipularlas y obtener un resultado final de calidad.
6. Caracterización, de las microesferas generadas, mediante distintas técnicas como espectroscopia y análisis mecánico para su evaluación acerca de la morfología, composición química y propiedades mecánicas.
7. Análisis y exposición de los resultados experimentales, así como la elaboración de conclusiones sobre la eficacia de los distintos métodos utilizados en la síntesis de microesferas de elastómeros.
8. Visualización y redacción de posibles líneas futuras y de mejora con el objetivo de generar microesferas de manera más precisa y eficiente, planteando posibles mejoras tanto en técnicas como en materiales, que puedan ser utilizados en la síntesis de microesferas de elastómeros.

2.2. PLAN DE TRABAJO

Durante 5 meses se han llevado a cabo numerosos y variados ensayos en los cuales se ha tratado de encontrar, en primer lugar, una relación fiable entre el flujo empleado en cada una de las fases (continua y dispersa) y el tamaño obtenido de las gotas, y posteriormente, la búsqueda de polímeros concretos que reaccionen mediante química clic para la generación de microcápsulas de elastómeros.

2.2.1. Relación flujo-tamaño

Se pretende comenzar probando distintos tipos de aceite (aceite de sésamo, immersion oil, aceite de oliva) junto con agua destilada y miliQ, y distintos flujos en ambos medios. No debemos olvidar tampoco que el microchip Droplet Junction tiene 2 posibles configuraciones, en T y en X, por lo que también habrá que probar que figura permite una generación de gotas más estable.

Es posible que durante los distintos ensayos no salgan gotas o incluso existan problemas en cualquier punto de la investigación, por lo que tendremos contacto con la empresa Dolomite con el objetivo de que las dudas sean respondidas de la manera más rápida posible.

Una vez se obtengan gotas tras haber pasado por los distintos ensayos, se procederá a establecer una relación entre los flujos empleados y el tamaño de dichas microgotas con el objetivo de dejar plasmado que flujos, configuración y medios son los más fiables y eficaces. Estos ensayos se llevarán a cabo usando los dos microchips disponibles, empezando con el hidrofílico y posteriormente con el hidrofóbico.

2.2.2. Caracterización de los polímeros

Cuando se tenga la relación mencionada sobre el tamaño de las gotas, así como que flujos y aceites emplear, nos centramos en el uso de los polímeros para la creación de microcápsulas de elastómeros.

En primer lugar, se caracterizan los polímeros que se van a emplear en nuestra reacción: VKV ciclooctino y HRGD6-azida. Las pruebas a realizar serán la electroforesis, el DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido) y la espectroscopía infrarroja de Transformada de Fourier.

- Electroforesis: mediante esta prueba seremos capaces de conocer el tamaño y carga eléctrica de los polímeros. Gracias al empleo de dos electrodos (positivo y negativo), las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el polo negativo, y las negativas, hacia el positivo. La matriz por la que estas se mueven las irá reteniendo, permitiendo a las más pequeñas avanzar más rápidamente, siendo posible distinguir entre tamaños y cargas de las moléculas (100).
- DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido): dicha técnica nos permite saber cuál es la temperatura de transición de nuestros polímeros. Esta temperatura es la que provoca un cambio en las características mecánicas del polímero (101).
- FTIR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy): con la cual conseguiremos saber los enlaces presentes en cada uno de los polímeros. Se basa en la resonancia producida entre los enlaces moleculares, dado que, al exponer a estos a una radiación de frecuencia igual a su frecuencia de resonancia, la vibración intramolecular resultante amplificará la intensidad de la señal. En función de la energía liberada se tratará de un enlace u otro (102)(103).

2.2.3. Microgotas de ELRs

Una vez visto y estudiado tanto la relación entre el tamaño de las gotas y el flujo, y tras haber caracterizados los polímeros, nos dispondremos a tratar de generar microesferas de elastómeros disolviendo los polímeros en los fluidos y ver si mediante química click se consiguen estas microesferas.

En esta última etapa del proyecto se empleará principalmente el microchip hidrofóbico con el objetivo de que se creen microgotas de agua en aceite y así puedan reaccionar los polímeros.

Haciendo uso de los conocimientos y la información recogida a lo largo de este trabajo sobre microfluídica y polímeros, se tratará de diseñar microcápsulas de recombinámeros tipo elastina (ELRs) mediante microfluídica para aplicaciones biomédicas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En los siguientes apartados se van a exponer los distintos aparatos y métodos empleados a lo largo del trabajo de investigación. Todos ellos han sido fundamentales en el transcurso del proyecto, por lo que no se podría haber llevado a cabo con la falta de alguno de estos.

3.1. METODOLOGÍA CLICK

La metodología clic es una rama de la química cuyo origen se encuentra en 2001 y fue desarrollada por C. Barry Sharpless del Instituto de Investigación Scripps (104). Esta técnica describe un procedimiento químico a medida para generar la materia de forma rápida y segura. Esta técnica se inspiró en el hecho de que la naturaleza crea materia conectando pequeñas unidades modulares mediante un grupo de reacciones de formación de enlace carbono-heteroátomo altamente eficientes y relativamente sencillas de realizar (105,106).

Esta metodología reúne las siguientes características: es fácilmente modulable, tiene un amplio alcance y un rendimiento químico alto, genera subproductos químicos inofensivos y son fisiológicamente estables y fácilmente aislantes, emplean reactivos de fácil acceso, etc. Principalmente son estas dos últimas cualidades por las que se emplea dicha técnica en la generación de polímeros para uso biológico, ya que no suelen generar reacciones en el organismo y son biocompatibles (107).

A continuación, se exponen los ejemplos de reacciones más destacadas (108):

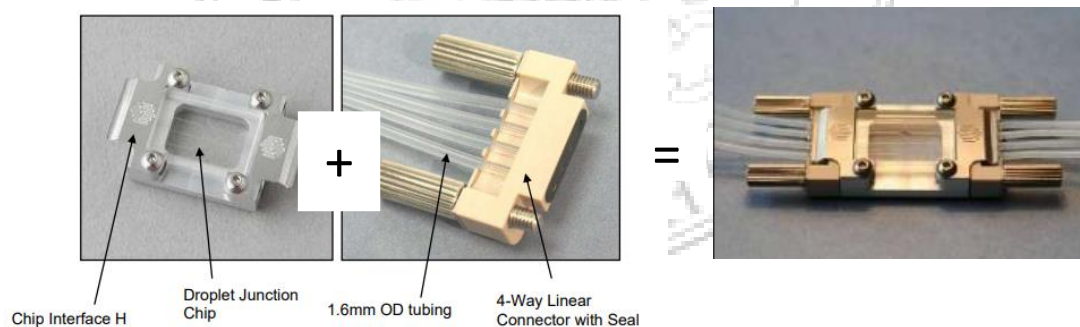
1. Reacciones de adición nuclear, excluyendo las condensaciones aldólicas (entre un grupo enol y un aldehído o acetona), como por ejemplo la formación de éteres, tioureas, ureas, heterociclos aromáticos, amida e hidrazonas (108).
2. Adiciones en enlaces múltiples carbono-carbono: como es el caso de las reacciones de dihidroxilación, epoxidación o adiciones de Michael (108).
3. Cicloadiciones de especie insaturadas como por ejemplo las cicloadiciones 1,3-dipolares y las reacciones Diels-Alder (108).

4. Reacciones de sustitución nuclear, lo que provoca la apertura de anillos muy tensionados como aziridina o epóxidos (109).

En los sistemas biológicos y bioquímicos, las proteínas se componen de unidades repetitivas de aminoácidos y los azúcares se componen de unidades repetitivas de monosacáridos. Las unidades de enlace se basan en enlaces carbono-heteroátomo C-X-C en lugar de enlaces carbono-carbono (106). Además, las enzimas que participan en las reacciones permiten que los procesos químicos puedan superar las barreras de entalpía, que en ocasiones suelen ser muy grandes, a través de múltiples reacciones, cada una de las cuales requiere solo una pequeña cantidad de energía. Con la química clic, si la empleáramos a la par que la química combinatoria (simulación de reacciones químicas por software), conseguiríamos un alto rendimiento químico, así como varios avances a la hora de realizar reacciones de manera rápida, eficiente y predecible (110).

3.2. MICROCHIPS DOLOMITE DROPLET JUNCTION

Explicaremos los dos chips a la vez, ya que como se comentó con anterioridad, ambos son iguales a excepción de la hidrofobicidad de sus canales. El Microchip Droplet Junction ha sido creado y comercializado por la empresa Dolomite. Este está formado por los siguientes elementos: un chip de unión de gotas donde se llevará a cabo la mezcla de los distintos fluidos, un chip de interfaz H, un conector lineal de 4 vías y 8 microtubos (diámetro 0.8 mm o 0.0625 mm) que sirve de unión para el transporte de fluidos entre el interfaz H y el chip de unión de gotas (112).

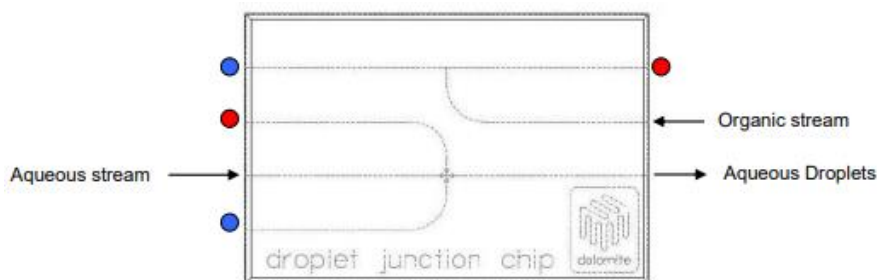


(60) Figura 22: Imágenes del Chip Droplet Junction de la empresa Dolomite.

Para obtener la estructura final, se deben juntar todas las piezas anteriores en una sola. En primer lugar, se insertan los tubos, tras cortarlos debidamente, en los conectores. Es importante colocar todos los tubos, incluso sino les vamos a dar uso. Luego se unen al chip de unión de gotas en la interfaz del chip, enroscando cada conector hasta que esté bien sujeto. Por último, conectamos los tubos y ya podemos empezar a usar el equipo. Si al empezar observamos alguna fuga, será necesario revisar debidamente todas las conexiones de los tubos y, si es oportuno, realizar nuevos cortes sobre estos. Es de gran importancia conocer el comportamiento del interior de los tubos en contacto con el agua. En este caso, conocemos que se trataban de superficies hidrofóbicas, lo cual es un dato vital a la hora de llevar a cabo los diferentes ensayos (112).

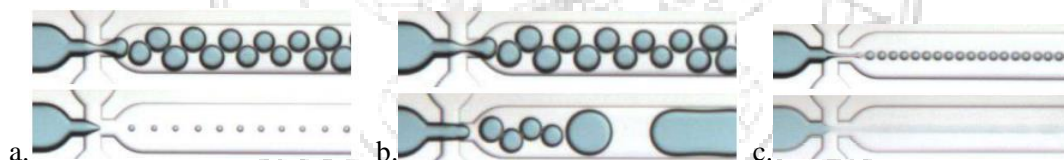
Este chip incluye uniones que hemos visto anteriormente: la unión en T y la unión en X, que se utilizan tanto para separar el flujo en dos y tres canales respectivamente como para poder generar microgotas.

Se ha comentado que es importante que se corten los tubos y que encajen perfectamente para evitar fugas y por tanto pérdida de flujo y presión. Del mismo modo es vital para una correcta generación de microgotas que el tamaño de los distintos tubos sea el mismo, o lo más parecido posible, para que tengan el mismo flujo y los ensayos sean fielmente reproducibles. A continuación, se expone la estructura del chip, en la cual vemos tanto una unión en T y como una unión en X.



(114) Figura 23: Distintas configuraciones posibles del Chip Droplet Junction de la empresa Dolomite.

Este dispositivo permite la variación de flujo (a), del nivel de surfactante (b) y de la viscosidad (c), dando lugar a una gran capacidad para modificar el tamaño de las gotas creadas con gran precisión.



(112) Figura 24: Distintos resultados de gotas variando condiciones de los ensayos según el manual del Chip Droplet Junction de la empresa Dolomite.

Esta configuración se repite en el microchip hidrofóbico de la empresa Dolomite pero cambiando la polaridad de sus canales, haciendo que estos tengan menor preferencia por el agua. Es importante destacar que las fases continua y dispersa será diferente en función del chip que se emplee. De este modo, si usamos el hidrofóbico la fase continua será el fluido orgánico (principalmente aceite) y la dispersa será el agua, y si el empleado es el hidrofílico, viceversa, la fase continua será el agua y la dispersa el fluido orgánico elegido. A continuación se muestra una imagen de ambos microchips y se puede apreciar que no existe diferencia a simple vista entre ambos, por lo que a la hora de guardarlos entre ensayos es muuy imporatnte el hecho de mantenerlos en cajas distintas para evitarlos equivocaciones.



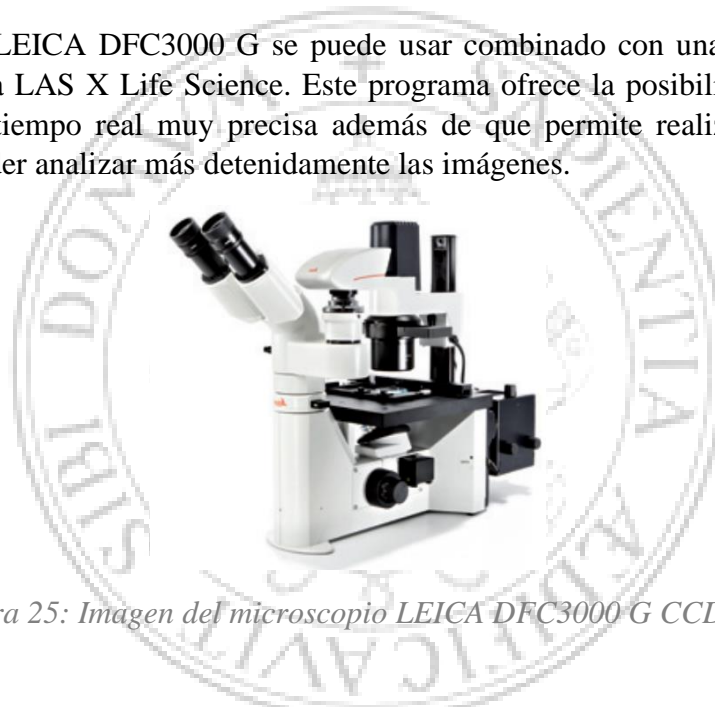
Figura 25: Comparativa entre los dos microchips de la empresa Dolomite empleados en el trabajo de investigación: hidrofílico (derecha) e hidrofóbico (izquierda).

3.3. LEICA DFC3000 G CCD MICROSCOPE CAMERA

Se trata de un microscopio de fluorescencia fabricado por la empresa Leica Camera. Posee una cámara monocromática y un objetivo que le da una gran sensibilidad, permitiéndole generar imágenes de gran precisión. También está dotado de un microscopio invertido, el cual puede ser manual o motorizado, que hace posible que las imágenes tomadas sean de una gran exactitud (113).

Este instrumento es capaz de generar imágenes en tiempo real de hasta 30 imágenes por segundo, lo que ofrece la capacidad de inspeccionar rápidamente y de manera fiable y segura diferentes muestras (113).

El microscopio LEICA DFC3000 G se puede usar combinado con una plataforma de software llamada LAS X Life Science. Este programa ofrece la posibilidad de obtener una imagen en tiempo real muy precisa además de que permite realizar capturas de pantalla para poder analizar más detenidamente las imágenes.



(115) Figura 25: Imagen del microscopio LEICA DFC3000 G CCD Camera.

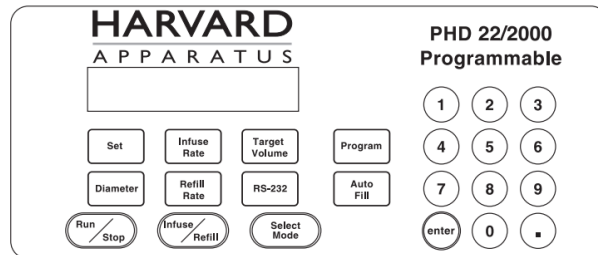
3.4. BOMBA PHD 2000 (HARVARD APPARATUS)

Para poder realizar las microgotas será necesario el empleo de bombas de flujo que nos permitan seleccionar y controlar el flujo de cada medio con el fin de crear las condiciones óptimas para la generación de gotas. Este instrumento ha sido lanzado al mercado por la empresa Harvard Apparatus y permite manejar el flujo de varias jeringuillas a la vez.

El funcionamiento del aparato es muy sencillo: se presiona el botón de encendido situado en la parte trasera del dispositivo y posteriormente se establecen los valores del diámetro de la jeringa y la velocidad a la que queremos que el fluido se desplace pulsando sobre el botón *SET* (114). Con estos dos datos podemos hallar el flujo al que va el líquido mediante la siguiente ecuación:

$$Q = A \cdot V ; (43)$$

Donde Q es el caudal, A el área que se obtiene gracias al diámetro y la V indica la velocidad, la cual puede estar en ml/h, ml/min, μ l/h y μ l/min. Una vez colocadas las jeringuillas en sus soportes correspondientes se pulsa el botón de RUN para que el flujo comience.



(116) Figura 26: Esquema del mando del control de la bomba PHD 2000 de la empresa Harvard Apparatus.

3.5. BOMBA ISM833C (ISMATEC)

Con el objetivo de poder emplear distintos flujos para la fase continua y dispersa, además de la bomba PHD 2000, utilizaremos la bomba ISM833C de la empresa ISMATEC. Se trata de una bomba peristáltica que regula el flujo gracias al número de revoluciones de su tambor central y a la presión que ejerce este sobre el tubo por el que circula el fluido. Dicho tubo está hecho de un material flexible para así poder reutilizarlo con otros flujos y no tener que cambiarlo cada vez que vayamos a cambiar de velocidad (115).

En el cuadrado verde se encuadra la rueda encargada de girar y mover el flujo de izquierda a derecha o viceversa. Esta rotará hacia uno u otro lado y ejercerá una presión determinada para que el flujo sea el seleccionado para el ensayo. Por otro lado, la línea roja simula por donde iría la parte del tubo que está dentro de la bomba, el cual sería el que recibe esa presión ejercida por la bomba.



(117) Figura 27: Imagen de la bomba ISM833C de la empresa ISMATEC.

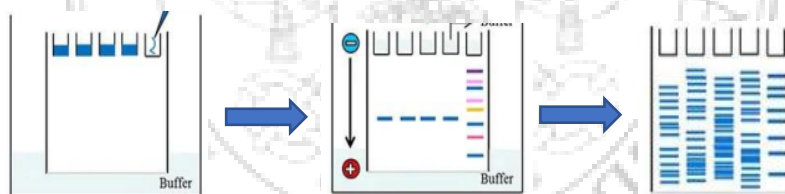
Una gran ventaja de esta bomba es que permite introducir varios tubos a la vez consiguiendo que todos estos lleven el mismo flujo. Sin embargo, esto supone un inconveniente, pues si se quiere otro flujo es necesario el empleo de una segunda bomba.

Su funcionamiento es muy sencillo: una vez colocado el tubo, se enciende la bomba pulsando en el interruptor de la parte superior. Seleccionamos el flujo deseado (en $\mu\text{L}/\text{min}$) con los botones del panel del control y tendríamos nuestra bomba preparada para trabajar. Por último, se presiona el botón “START/STOP”, el cual sirve también para parar el funcionamiento de la bomba.

3.6. ELECTROFORESIS SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

La electroforesis SDS-PAGE se trata de una técnica empleada para separar distintas proteínas según distintos factores como su peso molecular o su longitud de las cadenas polipeptídicas. De esta manera, si usamos una muestra conocida llamada *marker* y la comparamos con la que queremos saber su peso, podemos hacer una estimación aproximada sobre nuestra muestra (116, 118).

El proceso consiste en lo siguiente: se hace pasar las muestras por un gel poroso de poliacrilamida, aplicando una diferencia de potencial entre los bordes superior e inferior. El SDS es capaz de unirse a las proteínas desnaturalizándolas y deshaciendo su estructura tridimensional. Como el SDS tiene carga negativa, todas las proteínas acabarán teniendo una relación carga-masa parecida. En función del peso de los polímeros, será posible variar la concentración del gel para obtener una separación más precisa de las proteínas (117,118, 126).



(120) Figura 28: Esquema del mecanismo de funcionamiento de la técnica de electroforesis.

En este estudio se empleó un gel de poliacrilamida al 12%. En función del número de pocillos que se hayan preparado en el gel, se introducirá en cada uno una cantidad diferente. Como en nuestro caso se hicieron 10 pocillos, en cada uno de ellos se echarán $5 \mu\text{L}$ de la muestra así como del marker (119). Una vez introducidas las muestras y el marker, se conectará la fuente de tensión a 25 mA (126).

El modelo de aparato que se ha empleado ha sido el MiniVe de HOEFER, especial para la electroforesis vertical. Como se ha comentado, se realizarán dos hidrogel para esta técnica: el stacking gel 4%, el cual servirá como recubrimiento del peine, y el resolving gel 12%, que proporcionará el transporte a nuestra muestra durante el proceso de electroforesis.

	marker	muestra
10 pocillos	$5\mu\text{L}$	$4\mu\text{L}$
15 pocillos	$4\mu\text{L}$	$2,4\mu\text{L}$

(120) *Figura 29: Tabla que indica la cantidad de muestra y marker que hay que echar en cada pocillo en función del número de canales.*

3.7. DSC (Differential Scanning Calorimetry)

La Calorimetría Diferencial de Barrido o DSC es una técnica muy útil empleada en física de materiales. Esta nos permite conocer el calor liberado o absorbido por una muestra durante un proceso determinado. De este modo es posible determinar temperaturas de transición de fase y estudiar la estabilidad térmica de materiales (120,126).

El equipo de DSC está compuesto de dos sondas de temperatura sobre las cuales se sitúan unos crisoles de aluminio (también llamados “lentejas”). Sobre un crisol se coloca la muestra deseada y con otro se tapa y se sella para llevar a cabo la medición. A la hora de manejar el aparato tenemos dos sustancias: la muestra y el blanco. Ambos han de tener la misma masa, ya que se estudiará la diferencia de intercambio de calor de estos dos. La célula de Peltier, la cual permite el intercambio de calor entre los crisoles que albergan la sustancia, generará una diferencia de potencial, que será proporcional a la diferencia de capacidades caloríficas entre los dos crisoles. Esto hace posible que dicha energía transferida se pueda representar en función de la temperatura (121,(126).

En este estudio se empleó un equipo de DSC Mettler Toledo 822e, con refrigeración mediante nitrógeno líquido. Una vez colocada la muestra en el sitio correspondiente, se elige el programa que queramos ejecutar. Hay gran variedad de estos e incluso es posible generar un programa individual y específico según las condiciones que uno necesite. De esta manera se va aumentando o disminuyendo la temperatura de manera constante: $\pm 1^\circ\text{C}/\text{min}$, $\pm 1^\circ\text{C}/5\text{min}$, $\pm 2^\circ\text{C}/\text{min}$, $\pm 10^\circ\text{C}/3\text{min}$, etc.

3.8. FTIR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy)

La Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier o FTIR una técnica empleada tanto para el estudio de la presencia de enlaces químicos como para los distintos grupos funcionales que encontramos en una muestra. Se basa en la resonancia producida entre los enlaces moleculares, dado que, al exponer los enlaces a una radiación de frecuencia igual a su frecuencia de resonancia, la vibración intramolecular resultante amplificará la intensidad de la señal (102). Esto es medible gracias a un interferómetro de Michelson: la intensidad obtenida se mide en función del desfase que presente el espejo móvil respecto a su posición inicial, de manera que, si realizamos la Transformación de Fourier, obtendremos los picos de intensidad para las distintas frecuencias de resonancia, consiguiendo conocer los enlaces de la muestra de interés (122). Algunas bandas pueden solaparse, por lo que es importante conocer la composición del material estudiado, ya que existen tablas de espectroscopía que nos indican qué espectro de picos es el esperado para nuestro material (123,124). De este modo es posible conocer como varían los espectros de materiales antes y después de una modificación, así como comprobar la calidad de muestras ya conocidas (125, 126).

Para este trabajo se ha empleado el equipo de Infrarrojo Tensor 27 del fabricante Bruker, que proporciona el software OPUS empleado en la toma de datos. Este modelo permite

realizar mediciones en longitudes de onda que van desde 600 hasta 4000 cm^{-1} (126). En primer lugar, se realizó una medida del ruido de fondo (*background*) seguida de la toma del espectro con el polímero de interés. Para ello, se limpió el sensor con acetona para posteriormente colocar una muestra de 5 mg sobre el sensor. Los datos obtenidos de espectroscopía infrarroja permitieron conocer determinados grupos químicos de los distintos polímeros estudiados.

3.9. RMN (Resonancia Magnética Nuclear)

Se trata de una técnica que estudia el comportamiento de los núcleos atómicos cuando se someten a un campo magnético externo. Es importante destacar que sólo se realiza sobre los núcleos que tienen un spin nuclear distinto de cero. La calidad y precisión de los resultados han hecho de la RMN una técnica fundamental y valiosa a la hora de caracterizar y estudiar moléculas en disolución (127–129).

Como se ha dicho, los núcleos se introducen en un campo magnético externo, el cual va a provocar un desdoblamiento de los niveles de energía del spin. Esto puede generar una transición entre dichos niveles causados por la absorción de una radiación electromagnética concreta, la cual se conoce como frecuencia de resonancia. Los parámetros que intervienen en esta prueba (energía de absorción, frecuencia de resonancia e intensidad de la señal) serán proporcionales a la fuerza que tenga el campo magnético (127–129).

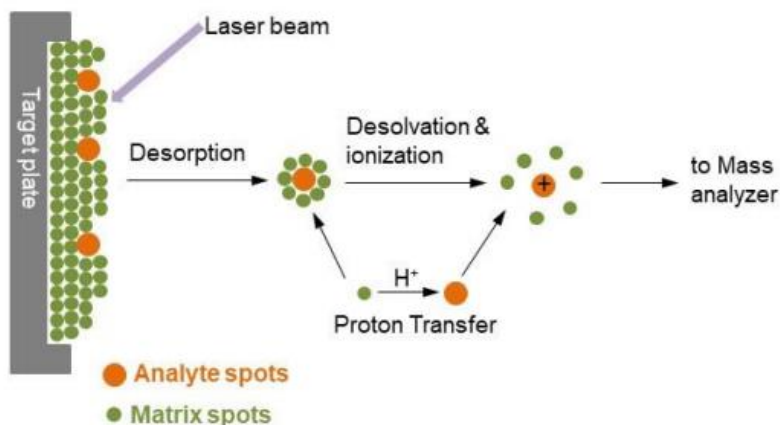
Esta técnica proporcionará información de importancia acerca de los pesos moleculares de los distintos núcleos presentes en la muestra que se evalúe. Se encarga de medir la disposición de los niveles de energía de los núcleos en función de la interacción entre ellos y de su entorno eléctrico (127–129).

3.10. MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight)

Técnica analítica que ofrece resultados tanto cualitativos como cuantitativos del peso molecular del compuesto que analicemos. En ella, se ionizan en moléculas cargadas las muestras pudiendo obtener una relación masa/carga (m/z). Como se ionizan las muestras, la prueba en sí se realiza con iones en forma gaseosa (118,129,130).

Un espectrómetro de masas cuenta con las siguientes partes: una entrada donde depositar la muestra (μg) y vaporizarla en casi de que no este en estado gaseoso, una fuente de iones para fragmentar la muestra, un analizador que ‘guiará’ a los iones según su masa y velocidad con distintos campos eléctricos y magnéticos, y por último un detector que se encargará de la detección de los iones generados a partir de las muestras introducidas (118,129,130).

En resumen, MALDI consiste en una ionización en la que un láser golpea una matriz de moléculas provocando que entren en estado gaseoso sin llegar a descomponerlas ni fragmentarlas. Es una técnica muy apropiada para el análisis de lípidos, péptidos, polímeros y otras moléculas orgánicas (129).



(129) *Figura 30: esquema explicativo del proceso de ionización de la muestra introducida en el MALDI*

3.11. Datos analíticos

Todos los datos representados se obtuvieron de la repetición de al menos diez medidas. Estos se representan como media y desviación estándar.

4. RESULTADOS

4.1. RELACIÓN FLUJO-TAMAÑO

En esta primera parte de la investigación se investigó que relación existía entre la velocidad de los fluidos y los tamaños de las gotas obtenidas en las distintas uniones. En primer lugar, se planteó la cuestión de si el tamaño del tubo de salida del microchip podría influir en el tamaño de las gotas generadas. En función del tamaño de las gotas que quisiéramos crear, sería oportuno ver qué tubo de salida nos proporcionaba unas gotas más regulares y estables.

Como se ha explicado, el microchip viene con dos packs de tubos de distinto tamaño: 0.8 mm y 0.0625 mm. Se empleó la unión en T, el flujo del aceite (fase discreta) se mantuvo constante a 1 microlitro/minuto ($\mu\text{L}/\text{min}$) y variando el del agua (fase continua) desde 25 hasta 150 $\mu\text{L}/\text{min}$, se probó con los dos estilos de tubo de salida y se obtuvieron los siguientes resultados:

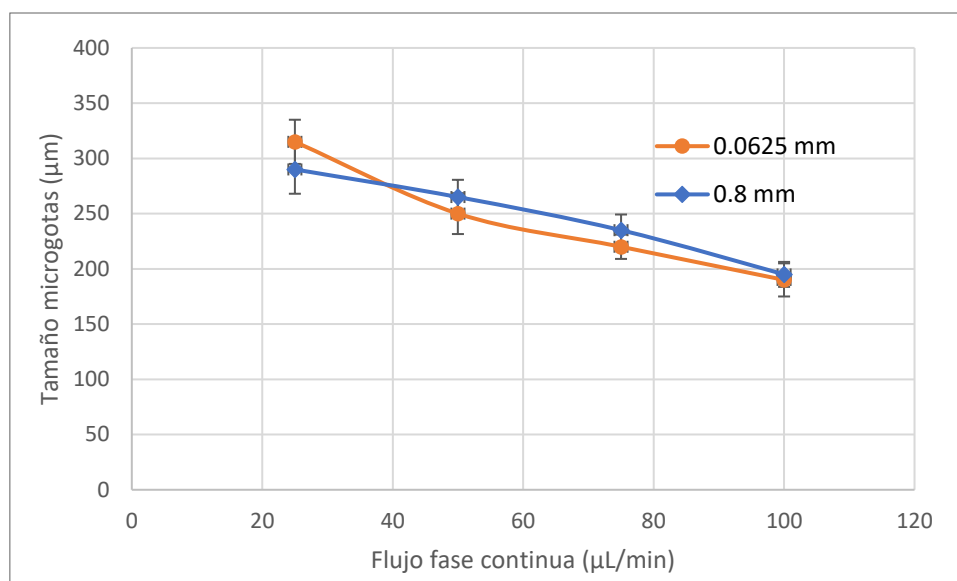


Figura 31: Gráfica comparativa entre el tamaño de del tubo de salida: 0.8 mm (naranja) y 0.0625 mm (azul).

Siendo la curva naranja la perteneciente al tubo pequeño y la azul al grande. Observándola minuciosamente, se puede llegar a la conclusión de que el diámetro del tubo no influye de manera significativa en el tamaño final de las gotas, por lo que a partir de este momento se decidió hacer uso de los tubos cuyo diámetro es 0.8 mm. Esta idea se trasladó también a la generación de microcápsulas usando la unión en X (3 canales). Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que el factor influyente en el tamaño de las gotas es la velocidad que llevan los fluidos al entrar en contacto en las diferentes configuraciones.

Posteriormente se realizaron estudios independientes del chip hidrofílico e hidrofóbico. En ellos se mantiene el flujo de la fase discreta y se varía el de la continua. Al acabar se aumenta el flujo de la fase discreta y se usan los mismos de la fase continua del caso anterior, y así sucesivamente hasta que se dejen de formar gotas. Cabe destacar que a partir de ciertas velocidades se producen fugas y normalmente en flujos muy altos (superiores a 150 $\mu\text{L}/\text{min}$), el medio continuo invade el canal de la fase discreta, impidiendo la formación de gotas.

4.1.1. MICROHIP HIDROFÍLICO

4.1.1.1. UNIÓN EN T (2 CANALES)

Una vez solventada la cuestión planteada con anterioridad, se exponen a continuación los diferentes flujos, tanto de la fase continua como de la discreta, junto a los respectivos tamaños de las gotas obtenidos. En cada apartado se varía el flujo de agua manteniendo constante el del aceite, el cual irá aumentando a medida que se vaya avanzando en los distintos ensayos. Obtenemos así cuatro distintos casos en función de la variación de la velocidad del aceite: 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$, 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 7.5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

A continuación, se exponen tanto las tablas de valores como su gráfica correspondiente:

Aceite	Agua ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Tamaños (μm)
1 $\mu\text{L}/\text{min}$	25	290 \pm 22
	50	265 \pm 15.6
	75	235 \pm 14.2
	100	195 \pm 11.3
	150	190 \pm 10.25
2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$	25	350 \pm 19.2
	50	320 \pm 17.4
	75	270 \pm 12.1
	100	230 \pm 14.9
	150	190 \pm 6.5
5 $\mu\text{L}/\text{min}$	25	450 \pm 21.7
	50	410 \pm 25.3
	75	310 \pm 12.4
	100	270 \pm 13.2
	150	220 \pm 9.8
7.5 $\mu\text{L}/\text{min}$	25	*
	50	400 \pm 16.1
	75	350 \pm 11.9
	100	300 \pm 8.8
	150	245 \pm 7.4

* Debido al alto valor del flujo del aceite, el flujo se divide y no existe la formación de gotas.

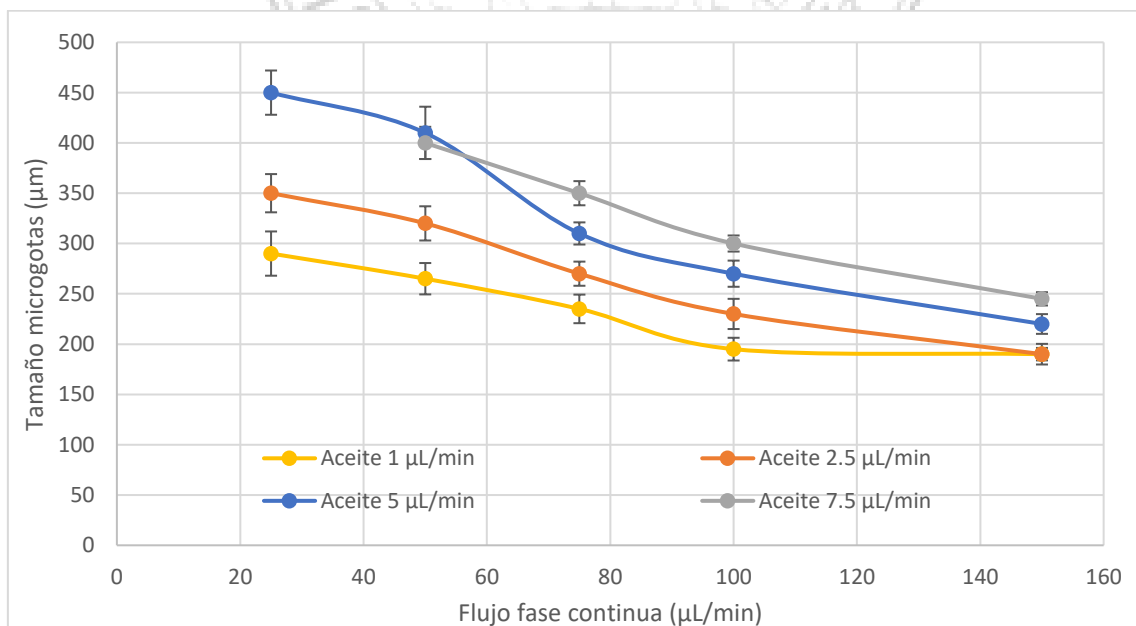


Figura 32: Tabla y gráfica que relaciona el tamaño de las gotas resultantes y el flujo empleado en la unión en T con el microchip hidrofílico.

Tras realizar estos ensayos, se observó que efectivamente al ir aumentando el flujo del agua con el del aceite constante se obtenían gotas de aceite en agua cada vez más pequeñas, mientras que si se aumentaba el flujo del aceite y se volvían a repetir las medidas con los mismos flujos de agua, las gotas cada vez irían siendo más grandes. Es decir, el tamaño es directamente proporcional al flujo de la fase discreta e inversamente proporcional al flujo de la fase continua. Esto es lo que se ilustra en la gráfica representada.

Hay casos en los que la dimensión del rango de medida es considerablemente grande en comparación con el tamaño de las gotas. Esto se debe a que la velocidad del aceite no es suficientemente baja y ni la del agua lo suficientemente alta, por lo que se generan gotas algo irregulares. Llevado al extremo esto se aprecia en la medida uno del último apartado, donde el agua va a 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ y el aceite a 7.5 $\mu\text{L}/\text{min}$, es entonces cuando se produce una división de flujo y no se forman gotas, tal y como se muestra en la imagen siguiente.

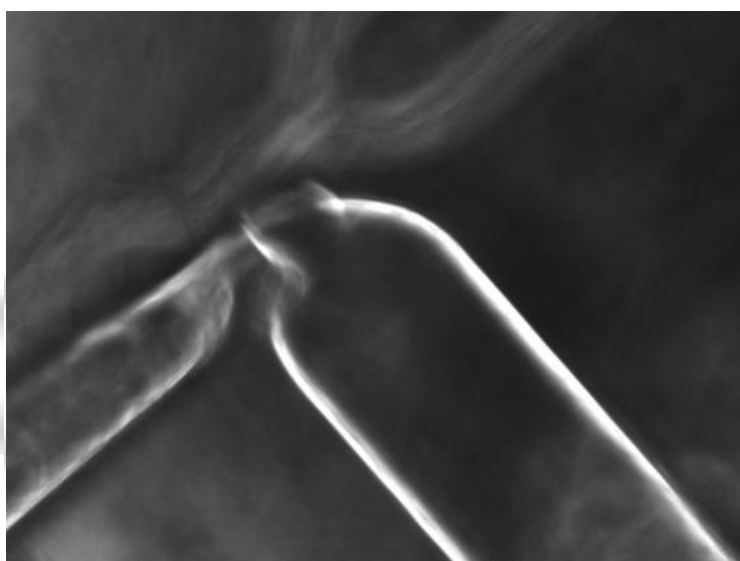


Figura 33: Imagen obtenida en el LEICA DFC3000 G en la que se observa la división del flujo entre el aceite (7.5 $\mu\text{L}/\text{min}$) y el agua (25 $\mu\text{L}/\text{min}$).

4.1.1.2. UNIÓN EN X (3 CANALES)

Continuamos con la configuración en X de tres canales de entrada: dos de agua y uno de aceite. Para conseguir el mismo flujo de agua empleamos una unión que venía incorporada con la bomba de Harvard Apparatus que se ha explicado anteriormente.

Aceite	Agua ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Tamaños (μm)
1 $\mu\text{L}/\text{min}$	25	300 \pm 21.9
	50	220 \pm 17.6
	75	185 \pm 9
	100	165 \pm 12.5
	150	110 \pm 8.7
	200	70 \pm 9.1

2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$	25	350 ± 18.3
	50	350 ± 20
	75	240 ± 12.2
	100	210 ± 10.6
	150	160 ± 9.8
	200	130 ± 11
5 $\mu\text{L}/\text{min}$	25	375 ± 15.8
	50	300 ± 12.1
	75	260 ± 13.7
	100	230 ± 14.3
	150	200 ± 16.5
	200	150 ± 10.7
7.5 $\mu\text{L}/\text{min}$	25	*
	50	360 ± 11.4
	75	340 ± 15.2
	100	250 ± 8.9
	150	220 ± 14.6
	200	195 ± 5.4
10 $\mu\text{L}/\text{min}$	25	*
	50	*
	75	360 ± 19.5
	100	320 ± 11.2
	150	290 ± 8.9
	200	260 ± 8.3

* Debido al alto valor del flujo del aceite, el flujo se divide y no existe la formación de gotas.

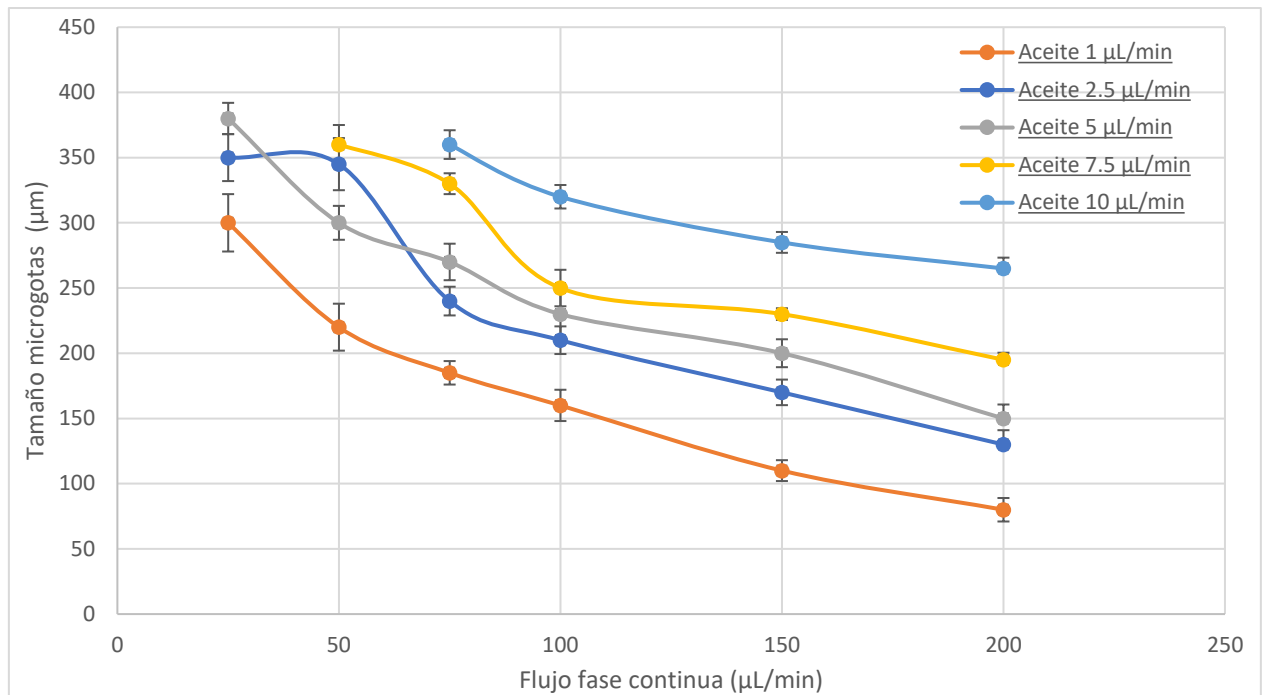


Figura 34: Tabla y gráfica que relaciona el tamaño de las gotas resultantes y el flujo empleado en la unión en X con el microchip hidrofílico.

En los casos en los que el aceite circula a 7.5 y 10 μL/min vemos que la recta no está completa:

- Flujo del aceite: 7.5 μL/min. A esta velocidad, y con el agua circulando a 25 μL/min, se produce una división del flujo, es decir, una separación entre agua y aceite que provoca que no se lleguen a formar microgotas.
- Flujo del agua: 10 μL/min. Al igual que en el caso anterior, se produce la división de flujo, pero esta vez cuando el agua va a una velocidad de entre 25 y 50 μL/min. Esto se debe a que el aceite va más rápido que en el caso anterior, lo que dificulta la generación de microgotas.

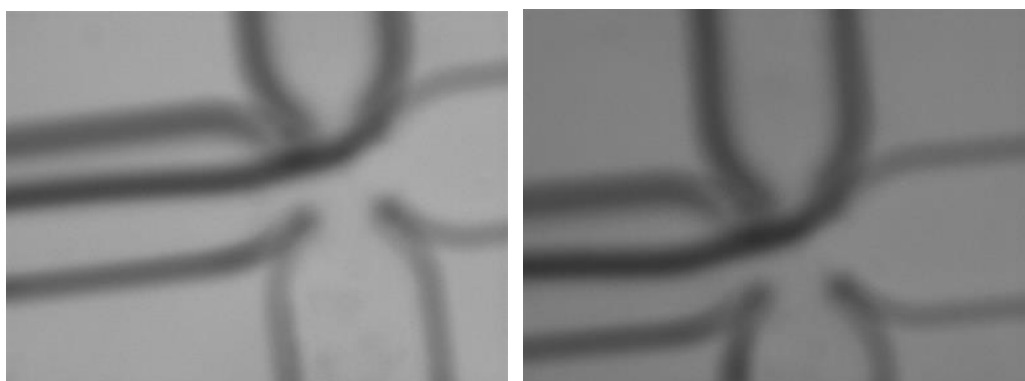


Figura 35: Imagen obtenida en el LEICA DFC3000 G en la que se observa la división del flujo entre el aceite y el agua, con los flujos 7.5-25 μL/min (izquierda) y 10-50 μL/min (derecha).

4.1.2. MICROHIP HIDROFÓBICO

Ya hemos visto la relación que existe entre la velocidad del flujo y el tamaño de las gotas de agua formadas para el chip hidrofílico. Hay que recordar que en el apartado anterior se formaban gotas de aceite en agua, mientras que en este se formarán gotas de agua en aceite. Al ser dos medios con distinta viscosidad no esperamos que la relación se mantenga, aunque usemos las mismas configuraciones y flujos. A continuación, se exponen los datos obtenidos de los ensayos realizados.

4.1.2.1. UNIÓN EN T (2 CANALES)

Comenzando con la configuración en T (2 canales) se sigue el mismo proceso que en los casos anteriores: mantenemos el flujo de la fase dispersa (agua) constante y variamos el flujo de la fase continua (aceite) aumentando el flujo desde 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ hasta 150, pasando por los valores mostrados en la siguiente tabla:

Agua	Aceite ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Tamaños (μm)
1 $\mu\text{L}/\text{min}$	15	175 \pm 19.2
	25	136 \pm 16.8
	35	125 \pm 12
	55	119 \pm 15.3
	75	110 \pm 6.1
	100	92 \pm 8
2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$	15	243 \pm 22.2
	25	222 \pm 15.6
	35	197 \pm 14.2
	55	168 \pm 11.3
	75	144 \pm 10.2
	100	111 \pm 14
5 $\mu\text{L}/\text{min}$	15	236 \pm 21.8
	35	205 \pm 25.4
	55	190 \pm 10.9
	75	155 \pm 13.2
	100	122 \pm 9.8
	150	114 \pm 10.9
7.5 $\mu\text{L}/\text{min}$	15	240 \pm 20.5
	35	226 \pm 10.7
	55	195 \pm 10.3
	75	184 \pm 9.8
	100	160 \pm 11
	150	133 \pm 5.1
10 $\mu\text{L}/\text{min}$	15	265 \pm 19.1
	35	215 \pm 15.9
	55	193 \pm 12

	75	160 ± 7.8
	100	144 ± 6.6
	150	122 ± 9
15 μL/min	15	310 ± 17.1
	35	275 ± 18
	55	250 ± 11.3
	75	200 ± 9.9
	100	185 ± 8.2
	150	157 ± 8

*En los primeros flujos del agua (1 y 2.5 μL/min) se paró el valor del flujo de la fase continua en 100 μL/min ya que con valores superiores no llegaba el agua al cruce y no se formaban las gotas.

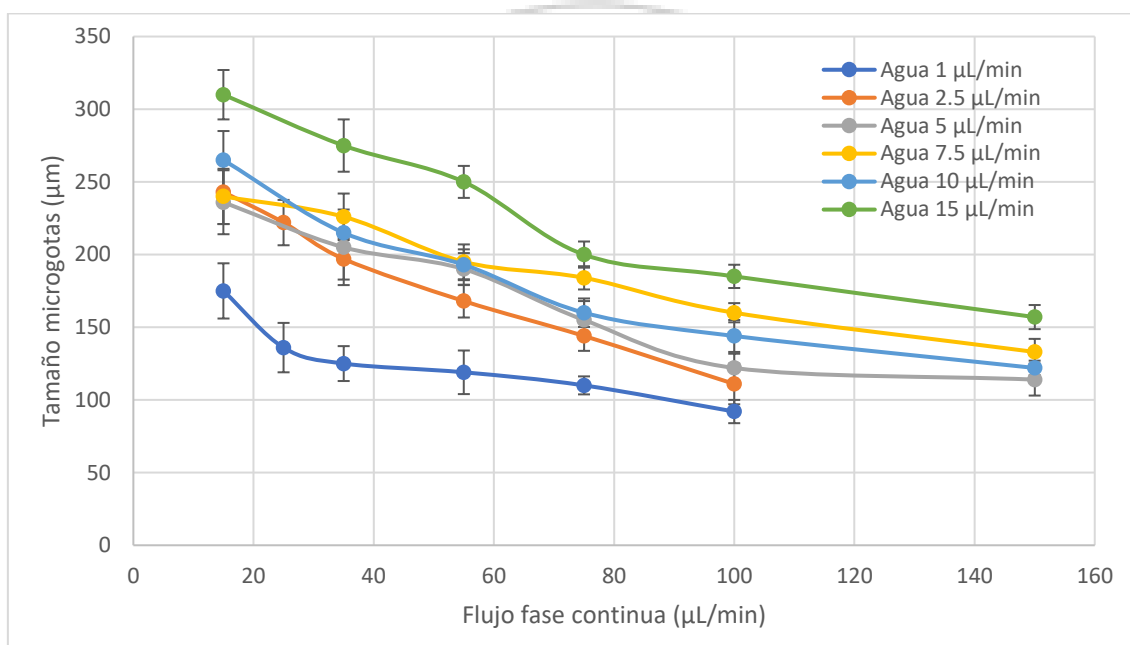


Figura 36: Tabla y gráfica que relaciona el tamaño de las gotas resultantes y el flujo empleado en la unión en T con el microchip hidrofóbico.

Tras realizar estos ensayos, se observó que efectivamente al ir aumentando el flujo del aceite con el del agua constante se obtenían gotas de aceite en agua cada vez más pequeñas, mientras que, si se aumentaba el flujo del agua y se repetían las medidas con los mismos flujos de aceite, las gotas cada vez fueron más grandes. Esto es lo que se ilustra en la gráfica representada. Cabe destacar, que ha habido casos en los que las gotas formadas de agua se fusionaban dando lugar a gotas más grandes y también se creaban macroburbujas que en su interior contenían las microgotas formadas, tal y como se muestra en la siguiente imagen:

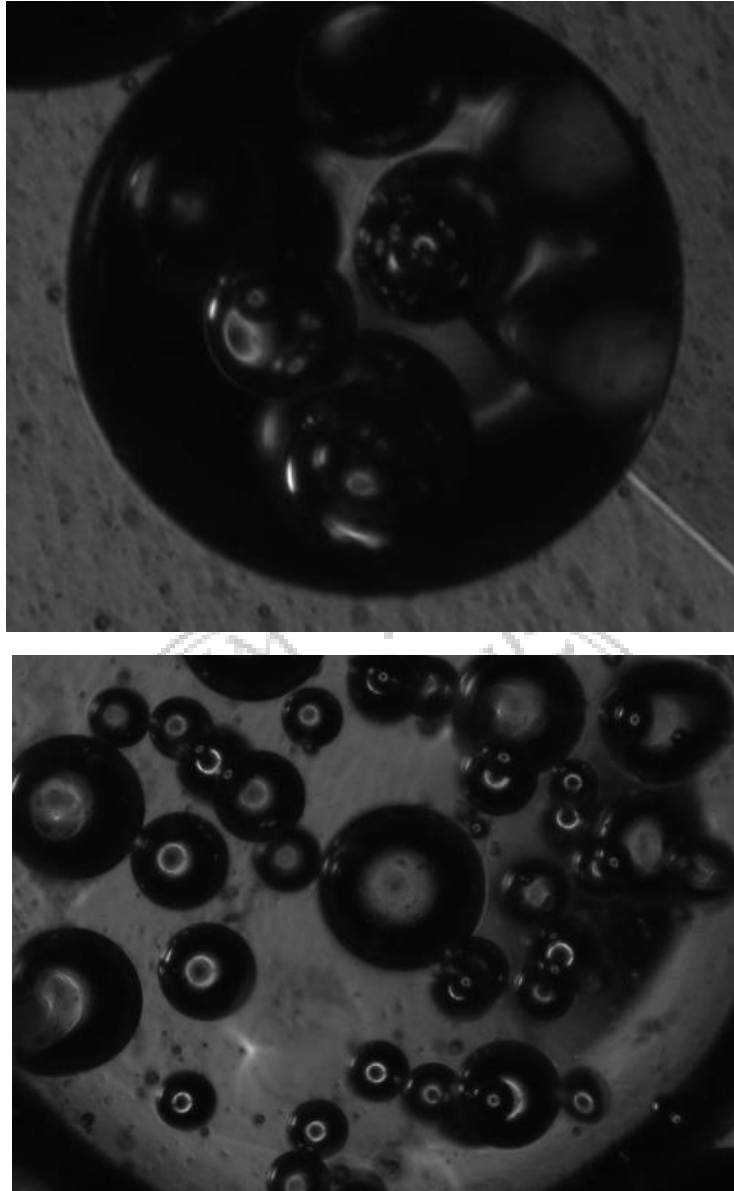


Figura 37: Macroburbujas que contienen en su interior microgotas de agua en aceite.

4.1.2.2. UNIÓN EN X (3 CANALES)

Se realizó el mismo procedimiento que en los ensayos anteriores y los resultados obtenidos son los siguientes. De nuevo, se vuelve a mostrar la media de las medidas tomadas:

Aceite	Agua ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Tamaños (μm)
2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$	25	140 \pm 17
	50	130 \pm 18.4
	75	105 \pm 11.1
	100	85 \pm 9

	125	80 ± 8.2
	150	75 ± 7.8
5 $\mu\text{L}/\text{min}$	25	190 ± 19.1
	50	170 ± 16.2
	75	150 ± 12
	100	140 ± 8.7
	125	130 ± 6.2
	150	100 ± 9
7.5 $\mu\text{L}/\text{min}$	25	210 ± 20.2
	50	160 ± 11.7
	75	150 ± 10.8
	100	133 ± 9.1
	125	115 ± 11.5
	150	90 ± 5.3
10 $\mu\text{L}/\text{min}$	25	240 ± 22.3
	50	170 ± 25
	75	150 ± 10.9
	100	130 ± 12.7
	150	125 ± 9.8
	200	111 ± 11
15 $\mu\text{L}/\text{min}$	25	260 ± 22.8
	50	180 ± 15.6
	75	175 ± 14.2
	100	160 ± 11.3
	150	145 ± 10.1
	200	122 ± 13.8

*** No se muestran los resultados con el flujo de agua de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ debido a que el aceite invadía el conducto central por el que fluía el agua y no se daba ni la oportunidad de que el agua llegase a la intersección.**

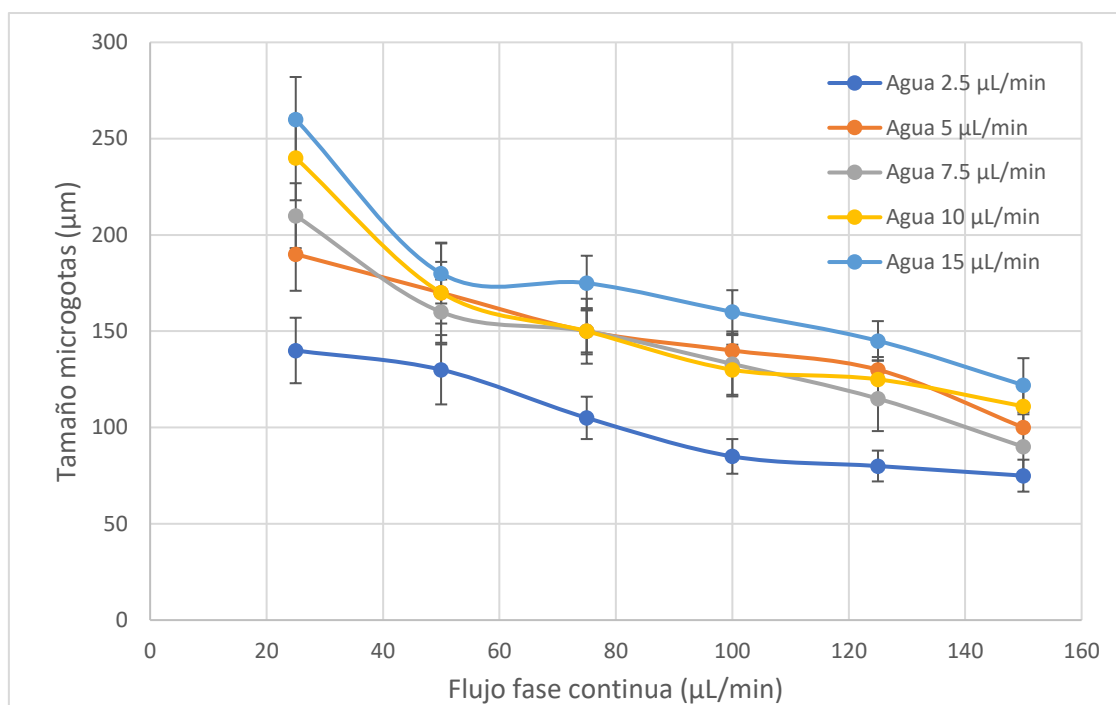


Figura 38: Tabla y gráfica que relaciona el tamaño de las gotas resultantes y el flujo empleado en la unión en X con el microchip hidrofóbico.

4.2. CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS

Obtenidas las relaciones entre tamaños y flujos, realizaremos las pruebas correspondientes para caracterizar los polímeros que emplearemos. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

4.2.1. ELECTROFORESIS SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)

Después de la generación de los hidrogeles explicada anteriormente y tras haber introducido la cantidad concreta de cada muestra en su pocillo, obtenemos la siguiente imagen. Sólo tendremos en cuenta las marcas encuadradas, ya que para ahorrar material y sustancias se realizó juntamente con muestras pertenecientes de otro proyecto.

Para conocer el peso exacto se utilizó otra técnica llamada RM. Esta nos permite conocer el valor aproximado del peso del polímero y gracias a ello podemos guiarnos en la electroforesis y saber cuál es la banda representante de cada muestra.

Como vemos en la imagen, los valores de ambos polímeros están por debajo de la marca de 66.2 KDa del *marker*, estando dentro de la franja en el que se encuentra el peso molecular esperado, por lo que podemos concluir que el lote de ambos polímeros es de buena calidad y se puede emplear en ensayos. Como apenas se observan franjas adicionales, podemos confirmar una buena pureza del polímero.

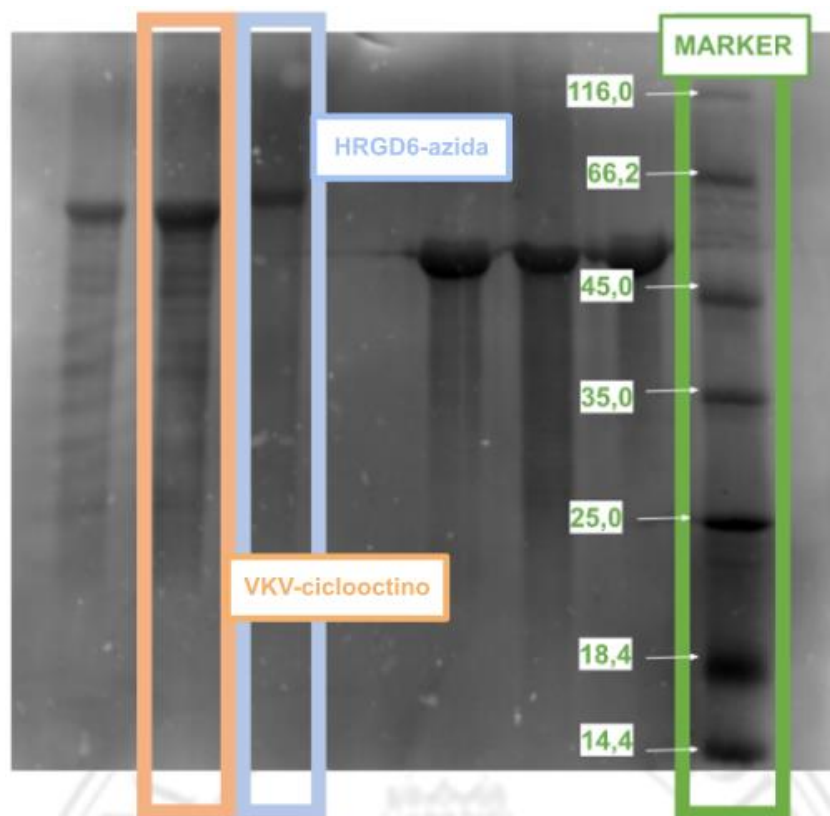


Figura 47: Imagen obtenida de la electroforesis realizada con VKV ciclooctino (naranja) y HRGD6-azida (azul).

Como se esperaba, el HRGD6-azida tiene un peso mayor (alrededor de 60 KDa), mientras que el del VKV-ciclooctino es menor (aproximadamente 50 KDa). Al final de este apartado de *Caracterización de polímeros*, se mostrarán los valores obtenidos de los pesos moleculares mediante la espectrometría de masas (MALDI-ToF), el cual nos da una información más precisa.

4.2.2. MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight)

A partir de la espectroscopía de masas es posible determinar el peso molecular de un polímero siendo este muy preciso, a diferencia de la electroforesis.

- VKV-ciclooctino

Tras realizar la prueba correspondiente con el polímero VKV-ciclooctino, se obtuvo la siguiente gráfica. El último pico corresponde con el peso molecular de nuestro polímero, el cual es de 43952 Da, aproximadamente.



GTAR-CC Cy5
MALDI, DHAP
DMSO

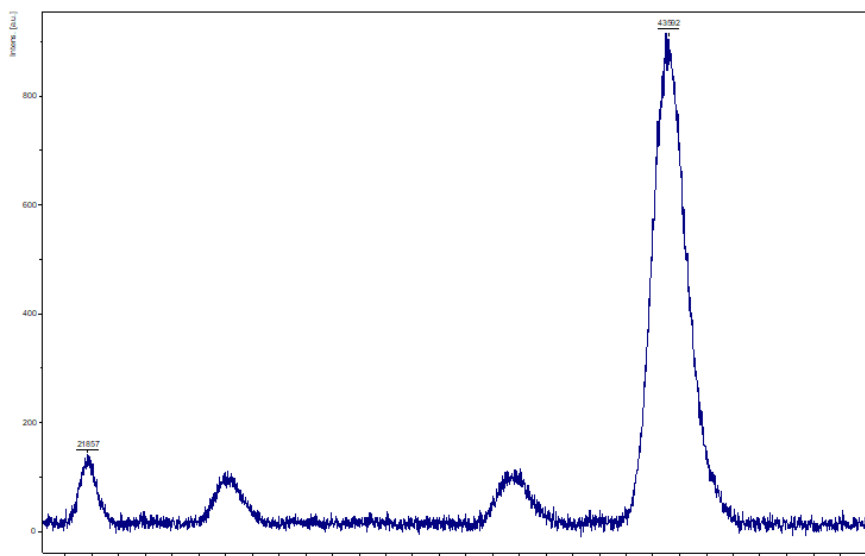


Figura 57: Espectro de masas MALDI-ToF de VKV-cilooctino.

- **HRGD6-azida**

Para el otro polímero, HRGD6-azida, el resultado fue el siguiente. El último pico es el que nos interesa, por lo que podemos concluir que nuestro HRGD6-azida tiene un peso molecular de 62183 Da, aproximadamente.



GTAR-CC Cy5
MALDI, DHAP
DMSO

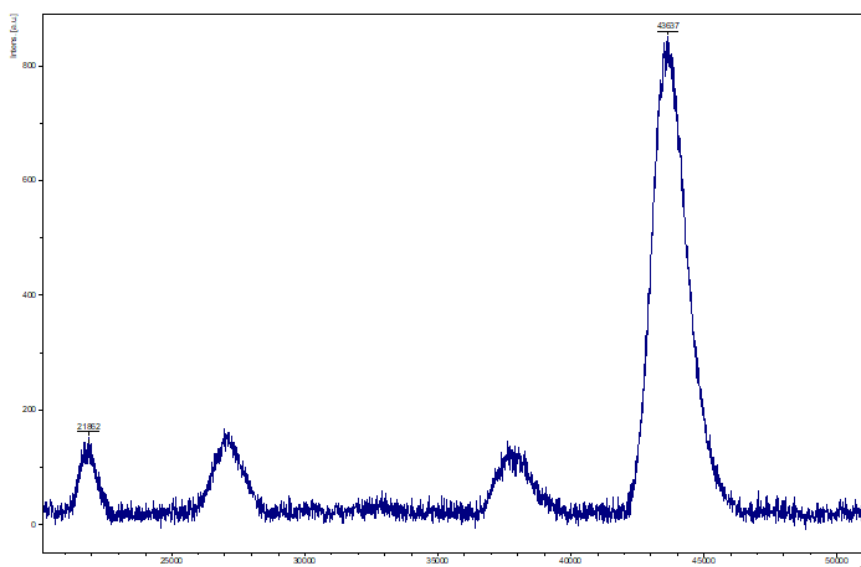


Figura 58: Espectro de masas MALDI-ToF de HRGD6-azida.

4.2.3. DSC (Differential Scanning Calorimetry)

Gracias al equipo de DSC Mettler Toledo 822e se consiguió obtener la temperatura de transición (T_t) de los polímeros que se han empleado en este estudio. En primer lugar se realizó el DSC del VKV ciclooctino y posteriormente del HRGD6-azida.

- VKV ciclooctino

Se realizaron tres medidas con el objetivo de calcular posteriormente la media y que el resultado fuese lo más preciso posible. Antes de preparar las muestras se midió el pH debido a la influencia que tiene este sobre la temperatura de transición. Así pues, en la muestra de VKV ciclooctino se midió un pH de 7,03. También se midió el peso de cada muestra que se introducía en el DSC, obteniéndose los siguientes valores: para la muestra 1 fue de 1.0060 mg, para la 2 de 0.9960 mg y para la 3 de 1.0065 mg.

Tras recoger los datos de las 3 señales, podemos observar que en el primer ensayo se obtuvo una temperatura de 19.67°C, en el segundo fue de 19.92°C y en el tercero de 20.08°C. Estas pequeñas variaciones pueden deberse a las distintas cantidades de peso y concentración que se hayan empleado para la medida. Con estos datos obtenidos es posible calcular la media y la desviación estándar:

$$T_t = \frac{19.67 + 19.92 + 20.08}{3} = 19.9 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$\text{Desviación estándar} = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}} = 0.16870$$

Temperatura de Transición del VKV ciclooctino

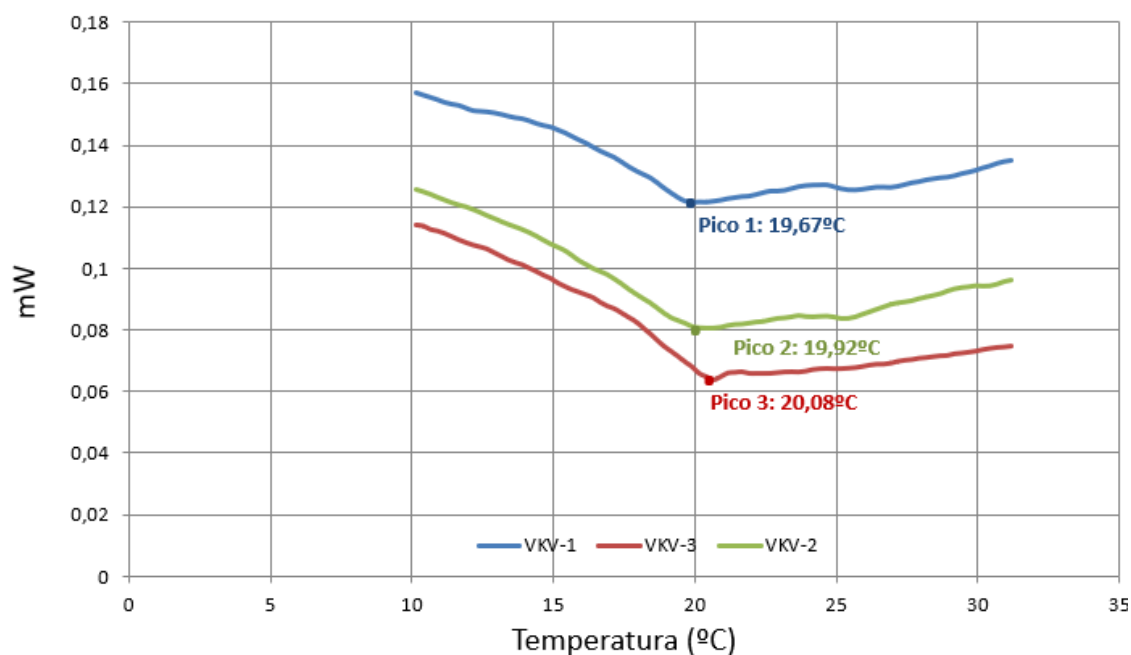


Figura 48: Gráfica obtenida con Excel de los datos sacados de la DSC realizada al VKV ciclooctino.

- **HRGD6-azida**

Al igual que con el polímero anterior, se realizaron tres medidas para calcular posteriormente la media. La muestra examinada tenía un pH de 7,71. Se midió el peso de cada muestra que se introducía en el DSC, y se obtuvieron los siguientes valores: para la muestra 1 fue de 1.055 mg, para la 2 de 1.015 mg y para la 3 de 1.022 mg.

Tras recoger los datos de las 3 señales, podemos observar que en el primer ensayo se obtuvo una temperatura de 16.33°C, mientras que en el segundo esta fue de 17.48°C y la del tercero de 16.87°C. Con estos datos obtenidos es posible calcular la media y la desviación estándar:

$$T_t = \frac{16.33 + 17.48 + 16.87}{3} = 16,893 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$\text{Desviación estándar} = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}} = 0.4697$$

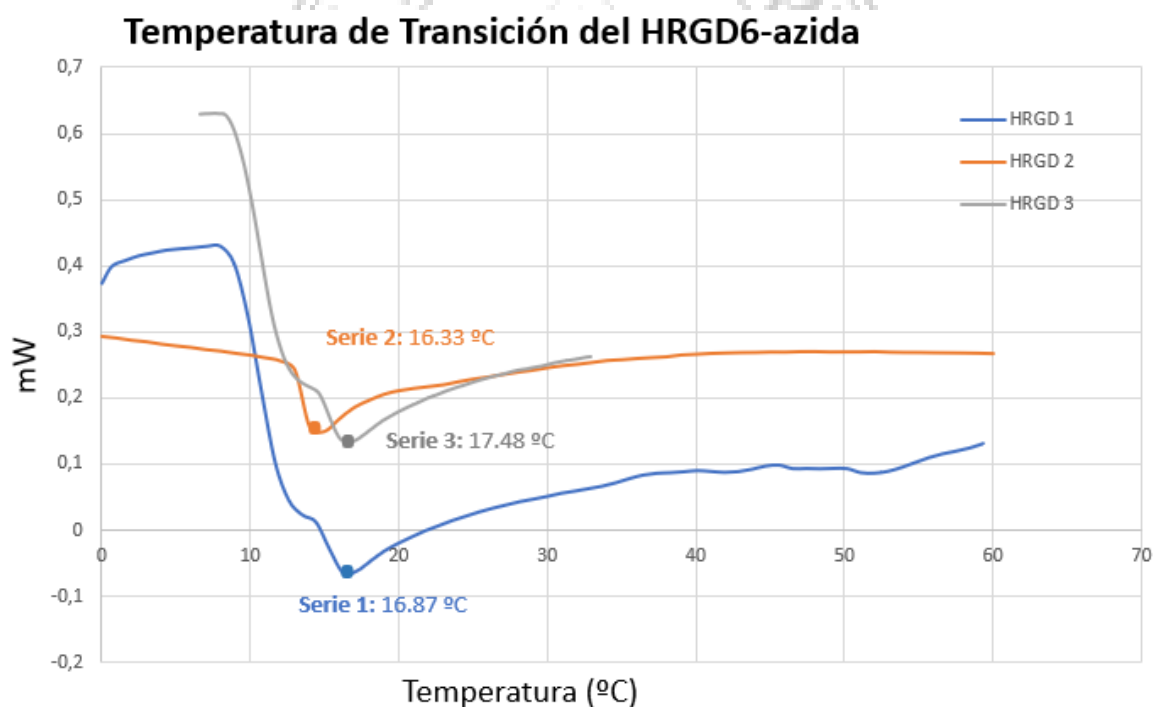


Figura 49: Gráfica obtenida con Excel de los datos sacados de la DSC realizada al HRGD6-azida.

4.2.4. FTIR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy)

Se realizó la espectroscopía de infrarrojos de la Transformada de Fourier para dos muestras: VKV ciclooctino y HRGD6-azida. A pesar de ser compuestos distintos, presentan muchos enlaces comunes con los espectros de proteínas. Todas las proteínas tienen gran parte del espectro infrarrojo en común, el cual se aprecia en nuestros polímeros también, por lo que podemos confirmar que se tratan de proteínas. El espectro

mencionado es el siguiente: para empezar, encontramos un pico en 3512.497 cm^{-1} correspondiente a la banda de tensión (stretching) de los enlaces N-H presentes en los grupos amida. También alrededor del $3069,741\text{ cm}^{-1}$, y tres picos posteriores en 2963.432 , 2935.083 y 2881.928 cm^{-1} , pueden indicarnos la presencia de hibridación sp^3 (C-C) y sp^2 (C=C) respectivamente. En 1631.023 y 1524.71 cm^{-1} , podemos observar picos muy pronunciados pertenecientes a la banda amida I que corresponden a un movimiento de tijereteo (scissoring) de los enlaces C=O, aunque también puede haber cierta contribución de los enlaces C=N. Alrededor de 1446.753 cm^{-1} se puede apreciar picos correspondientes con la banda de amida II provocados por enlaces N-C=O, y posiblemente también formados en parte por la presencia de grupos NH_3^+ . Por último, en 1393.599 , 1372.33 y 1336.9 cm^{-1} encontramos picos correspondientes a enlaces simples e incluso por la presencia de grupos NH_2 ($126,131,132$). A modo de resumen se pueden clasificar los distintos enlaces en los siguientes grupos, y cada uno de ellos ocupará una banda determinada:

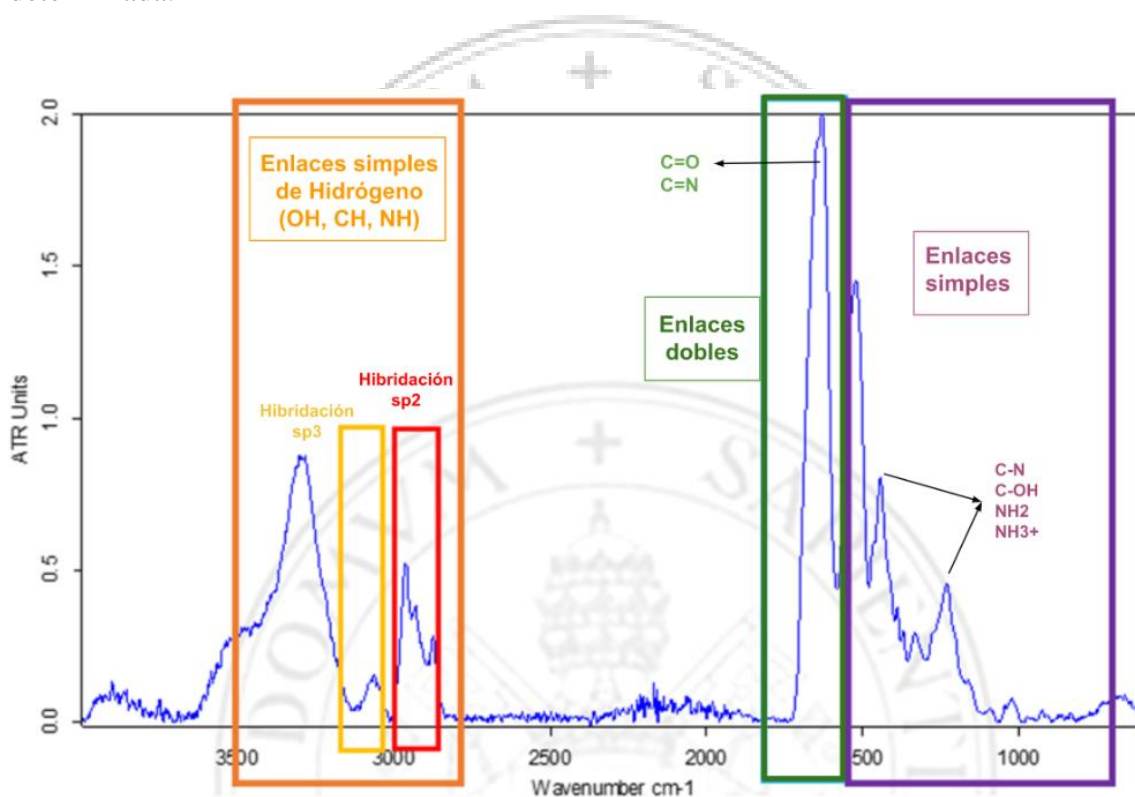


Figura 50: Espectroscopía infrarroja del VKV ciclooctino señalando los enlaces típicos en polímeros de tipo elastina.

- Enlaces simples de hidrógeno (OH, CH, NH) en el cuadro naranja. A parte de los enlaces N-H ya mencionados, podemos ver principalmente en el recuadro amarillo la energía proporcionada por la hibridación Sp^3 (enlace C-C) y en el rojo la hibridación Sp^2 (C=C).
- Enlaces dobles (C=O) en la zona azul. El pico mayor es provocado por el enlace C=O, aunque también es posible que tenga cierta influencia el enlace C=N.
- Enlaces simples (C-N y C-OH) en el cuadro morado. Aunque también existe cierta influencia por parte de cargas libres como el NH_2 y NH_3^+ .

La principal diferencia la observaremos en la banda 2000-2500 cm^{-1} , ya que en uno veremos la presencia del grupo azida y en el otro no veremos nada, pues está ciclado.

- VKV ciclooctino

En primer lugar, se muestra el resultado obtenido para el VKV ciclooctino. Vemos que en la banda que nos interesa, entre 2000 y 2500 cm^{-1} , no aparece energía, por lo que confirmamos que está ciclado. Esto es debido a que al ser el ciclooctino un anillo simétrico, no hay absorción a 2200 cm^{-1} por lo que no es posible ver la señal del triple enlace(129). Pero por otra parte, en la siguiente gráfica, se compara el VKV ciclooctino con otro polímero VKV sin modifica. Se aprecia que no existen diferencias empleando la espectroscopía de infrarrojos entre ambas muestras ya que el espectro sale igual en ambos, pues el ciclo no se observa. Para ver las diferencias habría que emplear otra técnica (133).

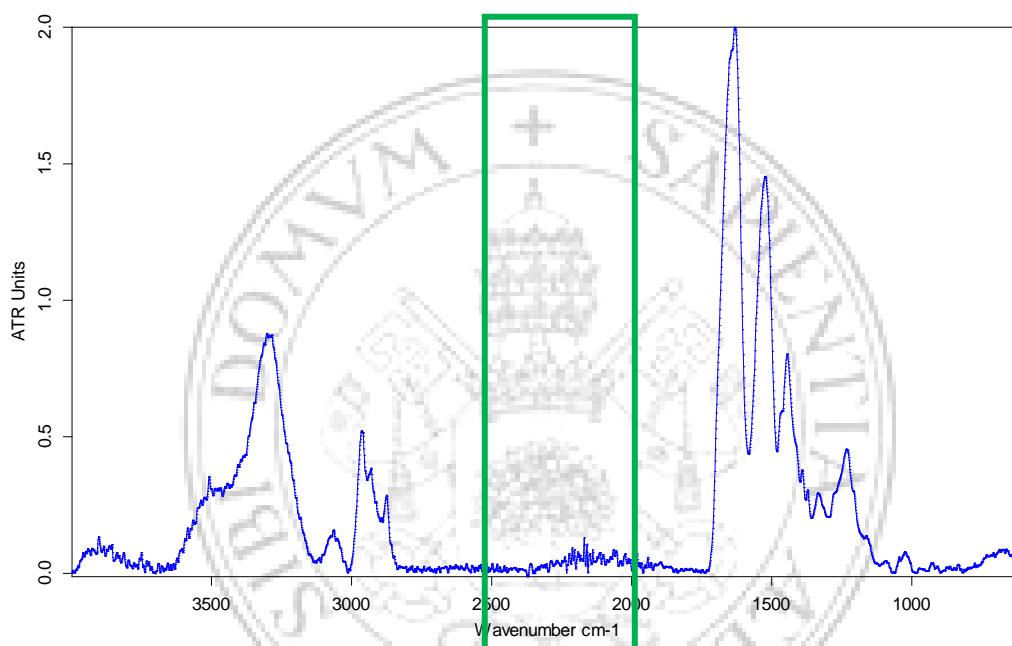
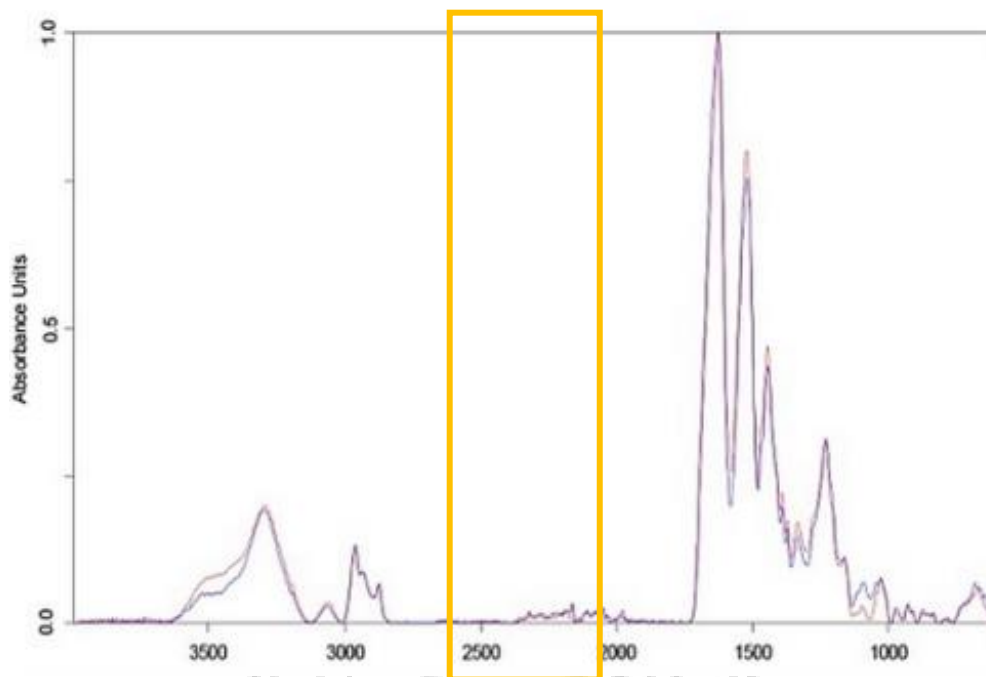


Figura 51: Espectroscopía de infrarrojos del polímero VKV ciclooctino obtenido con el equipo de Infrarrojo Tensor 27, Bruker.



(133) *Figura 52: Comparativa de espectroscopía de infrarrojos entre VKV sin modificar y VKV ciclooctino. Para poder distinguirlo sería necesario emplear otra técnica.*

- **HRGD6-azida**

Seguidamente se realizó otro ensayo, pero esta vez con la muestra del polímero HRGD6 cíclico. En este caso sí que es posible apreciar algo en la banda que nos ocupa. Observamos que existe un pequeño pico en 2105.871 cm^{-1} que nos indica la presencia del grupo azida ($\text{N}=\text{N}=\text{N}$). Si lo comparamos con otro polímero HRGD6 sin modificar, vemos que el pico correspondiente al grupo azida, aparece solo en el modificado (131,134).

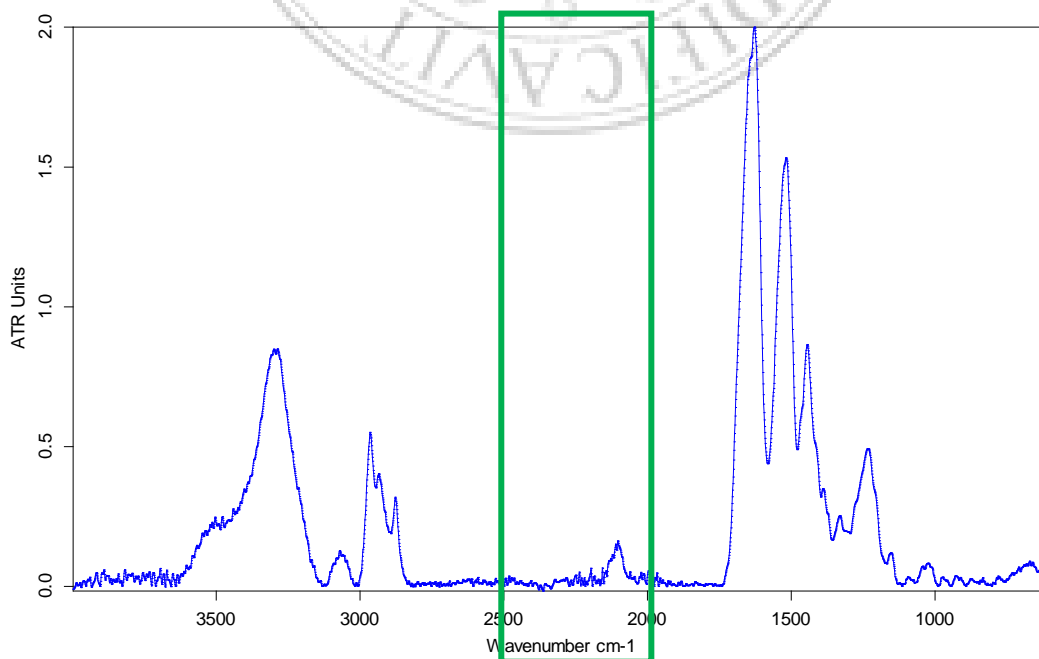
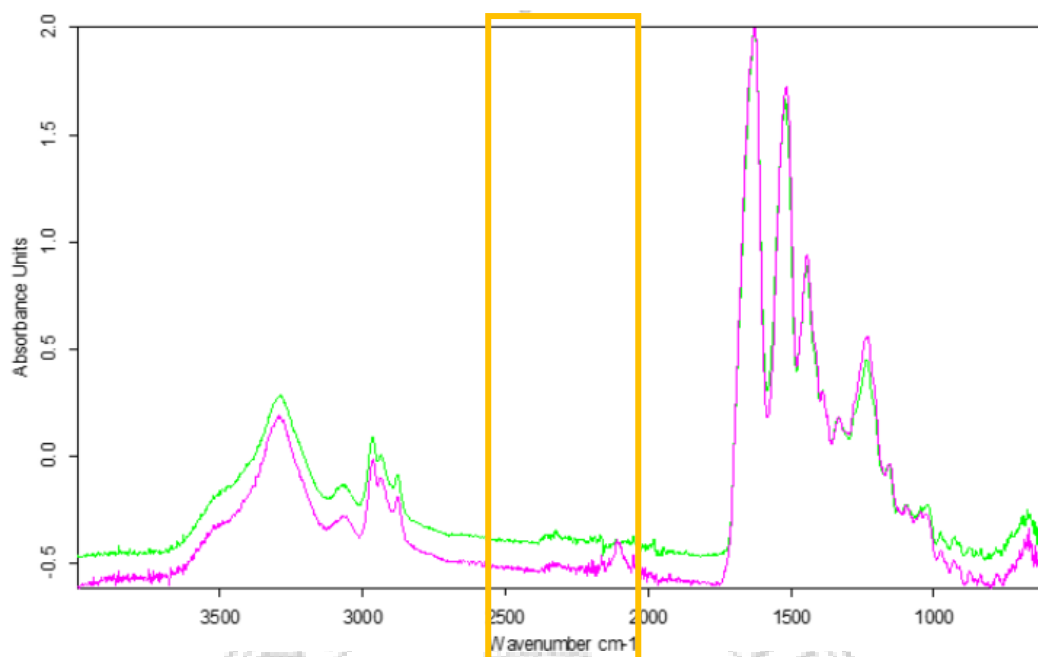


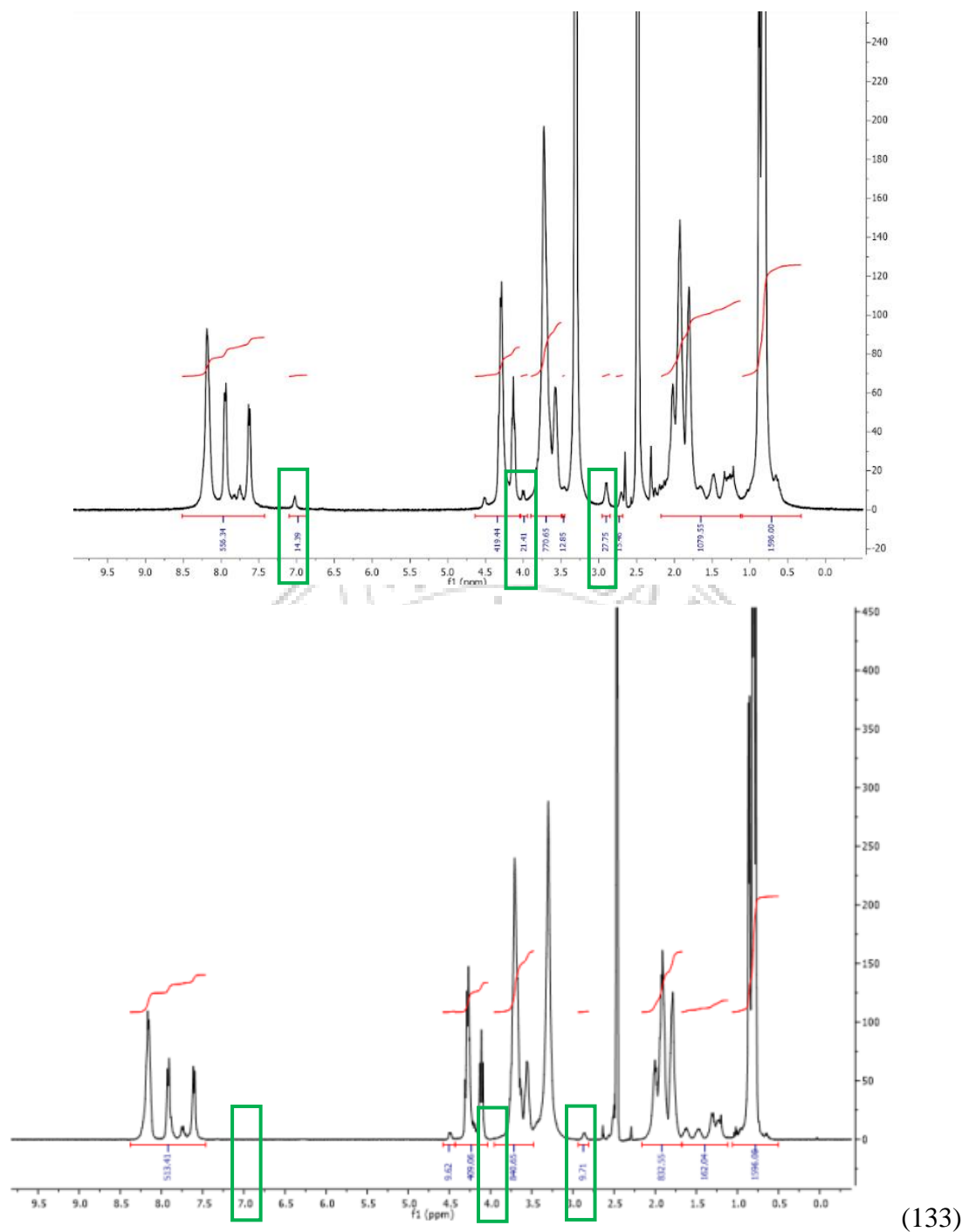
Figura 53: Espectroscopía de infrarrojos del polímero HRGD6-azida obtenido con el equipo de Infrarrojo Tensor 27, Bruker.



(135) Figura 54: Comparativa de espectroscopía de infrarrojos entre el polímero HRGD sin modificar y el HRGD6-azida.

4.2.5. RMN (Resonancia Magnética Nuclear)

A continuación, se muestran los espectros obtenidos la de RMN de los polímeros modificados empleados en este estudio. La primera gráfica corresponde al VKV-ciclooctino comparado con el VKVx24 puro y la segunda al HRGD6-azida comparado con el HRGD6 sin modificar.



(133)

Figura 55: Espectro RMN del VKV-ciclooctino (arriba) y RMN del VKVx24 (abajo)

En la figura anterior se muestra el espectro del RMN del VKV-ciclooctino, donde se ha integrado la señal para ver las lisinas modificadas. En nuestro espectro obtenido se aprecian diferencias con el del VKVx24 puro. Podemos apreciar tres picos adicionales en 3, 4 y 7 ppm que corresponden con la modificación del polímero. El pico visible en 7 ppm se debe a la sustitución de los protones en el grupo amina de la lisina por un protón adicional enlazado al grupo amida. Por otra parte, los picos 3 y 4 ppm indican otras modificaciones en la estructura del polímero debido a la introducción de grupos ciclooctino (133).

4.3. MICROESFERAS DE ELASTÓMEROS

Como se ha comentado a lo largo del documento, todos los procesos realizados nos conducen a este último apartado en el cual el objetivo será conseguir generar microesferas de elastómeros. Para ello se empleará la información obtenida tanto de la relación flujo-tamaño como de los elastómeros.

Se han llevado a cabo distintos ensayos con el objetivo de disolver en dos medios distintos los polímeros y una vez se junten en el interior del microchip, se formen las gotas de la fase discreta y los polímeros reaccionen entre sí mediante la química click, dando lugar a nuestras esferas de elastómeros. El estudio de referencia ha sido el realizado por Miguel González-Pérez, en el cual se conseguía la formación de membranas empleando VKV-ciclooctino y SKS-azida (en nuestro caso HRGD6-azida) disueltos en agua y DMSO/BuOH (23% de DMSO en BuOH). Se llevaron a cabo ensayos con distintas concentraciones: 10 mg/ml, 25 mg/ml y 100 mg/ml. A pesar de que el SKS es un polímero diferente al HRGD6, no supone una diferencia abismal, ya que lo que nos interesa es el grupo azida, pues será este el que reaccione para formar los enlaces. Se han llevado a cabo ensayos con distintas concentraciones: 10, 25, 50, 100, 150 y 200 mg/ml. Además, los flujos empleados son los que se obtuvieron en el estudio del microchip hidrofóbico, ya que nuestro objetivo es crear gotas agua. En todos los ensayos no se han empleado flujos excesivamente altos (todos menores a 100 $\mu\text{L}/\text{min}$) ya que a flujos superiores el DMSO/BuOH invadía el canal del agua y este no llegaba a la unión. También cabe destacar que se empleó únicamente la unión en T, ya que la unión en X de tres canales no había dado problemas de fugas a lo largo del proyecto, cosa que nos ocurrió con la de dos canales. Se muestran los resultados agrupados en función de sus características.

- **Concentraciones: 10, 25 y 50 mg/ml**

En el primer de estos ensayos, donde ambas concentraciones eran de 10 mg/ml, se pudo observar que ambos medios se juntaban y mezclaban entre sí, ya que su insolubilidad no es la idónea. Además, los polímeros no conseguían reaccionar ni formar estructuras a pesar de que los medios se disolviesen.

En el segundo caso, a 25 mg/ml, se llevó a cabo el mismo proceso, se introdujo por un canal el HRGD6-azida disuelto en el agua y el VKV-ciclooctino en el DMSO/BuOH. El resultado fue muy similar, los medios se mezclaban y no se formaba ningún tipo de estructura con los polímeros disueltos.

Como tercer ensayo se decidió probar a disolver el VKV-ciclooctino en agua y el HRGD6-azida en DMSO/BuOH, y se aumentó las concentraciones hasta 50 mg/ml. EL resultado, de nuevo, era la mezcla de ambos medios y la ausencia de estructuras formadas por la interacción entre ambos polímeros.

Visto que a estas concentraciones no se obtuvo ningún resultado bueno, se procedió a subir las concentraciones hasta 100 mg/ml.

- **Concentraciones: 100 mg/ml**

Se realizó una vez más el ensayo con concentraciones de 100 mg/ml, el VKV-ciclooctino disuelto en DMSO/BuOH y el HRGD6-azida en agua. A estas concentraciones y con los flujos obtenidos en el apartado de relación flujo-tamaño de las gotas, los flujos ya no se mezclaban, sino que se dividían, pero seguían sin formarse estructuras de ningún tipo. Por lo tanto, se ha conseguido que se mantengan separados ambos medios, pero no que reaccionen los polímeros inmersos en ellos. Esta es la razón por la que se decidió aumentar las concentraciones hasta 200 mg/ml.

- **Concentraciones: 200 mg/ml**

De nuevo, con los polímeros disueltos en agua (HRGD6-azida) y en DMSO/BuOH (VKV-ciclooctino), se probó con 200 mg/ml como concentración de ambos medios. El resultado fue la creación de estructuras de polímeros totalmente aleatorias y que taponaban la unión, tal y como se muestra en la imagen.

Debido a que estos medios sí que reaccionaban rápido al tener una alta concentración del polímero, se probó un último ensayo con concentraciones de 150 mg/ml para ver si al disminuir la concentración, se conseguía que se formaran estructuras más controladas.

- **Concentraciones: 150 mg/ml**

Para finalizar con este apartado, probaremos con los polímeros concentrados en ambos medios a 150 mg/ml. El objetivo, como se comentó con anterioridad, será el de formar estructuras (microesferas) más controladas y regulares. El resultado es muy similar al del caso anterior (concentración 200 mg/ml), ya que se forman estructuras poliméricas sin orden ni control y se bloquea el canal del microchip, por lo que es necesario limpiarlo antes de seguir con los ensayos. Esto ha ocurrido en cada prueba que se ha realizado, y se puede apreciar en la siguiente imagen como el producto creado por la reacción de ambos polímeros cubre y tapona gran parte de los canales interiores del microchip, impidiendo así una buena circulación y fluidez.

- **Concentraciones: 200 y 50 mg/ml**

Para finalizar con este apartado, probaremos con el HRGD6-azida 200 mg/ml en agua y el VKV-ciclooctino a 50 mg/ml en DMSO/BuOH. El objetivo, como se comentó con anterioridad, será el de formar estructuras (microesferas) más controladas y regulares. El resultado es muy similar al del caso anterior (concentración 150 mg/ml), ya que se forman estructuras poliméricas aleatorias que bloquean el canal del microchip, por lo que es necesario limpiarlo antes de seguir con los ensayos. La flecha amarilla indica el canal por el que circula el VKV-ciclooctino disuelto en DMSO/BuOH y la negra por donde fluye el HRGD6-azida disuelto en agua. El círculo azul marca la zona taponada del canal por los polímeros.

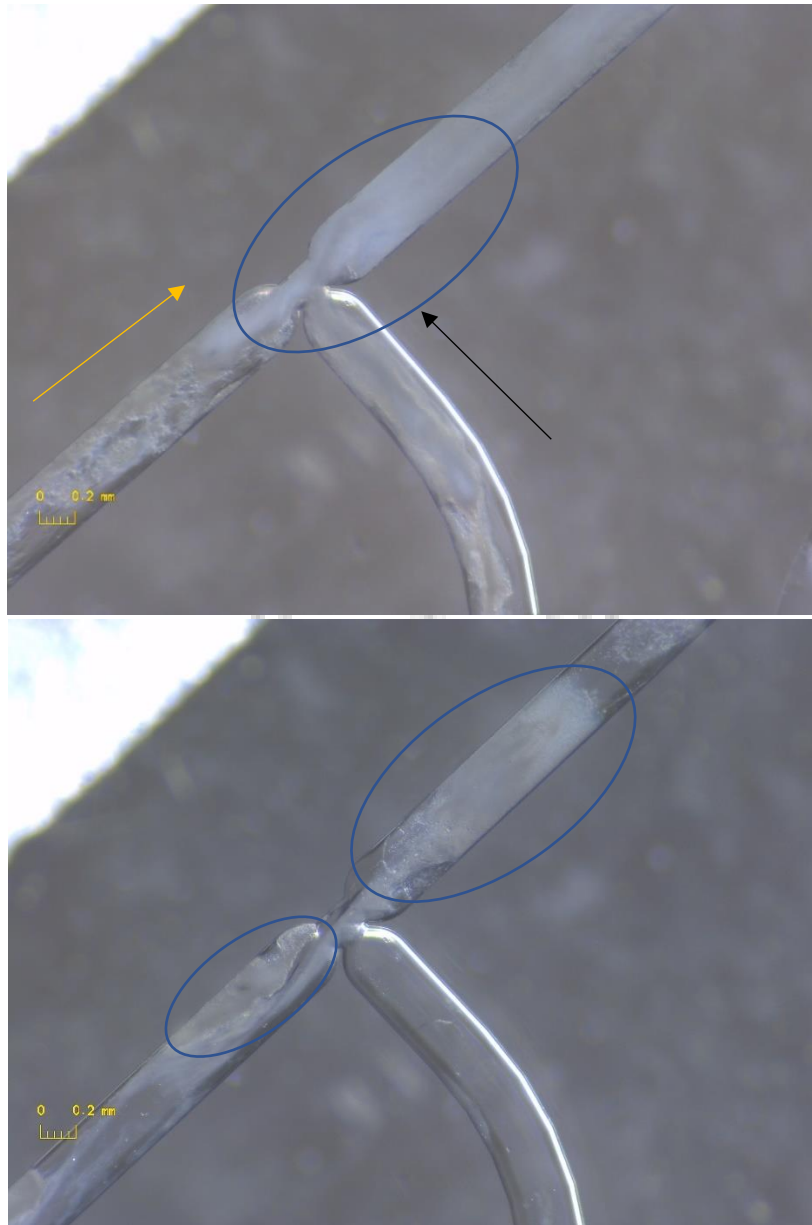


Figura 57: Formación de estructuras poliméricas no controladas (en blanco) en la unión en T al entrar en contacto ambos polímeros a 50 y 200 mg/ml.

Este último se ha realizado tanto a temperatura ambiente como en una cámara fría (20 y 5°C respectivamente). A pesar de que la temperatura ha cambiado, los resultados son los mismos y los polímeros reaccionan con gran rapidez obstruyendo el canal del microchip.

Por lo tanto, podemos concluir que con los primeros ensayos de 10, 25 y 50 mg/ml se observó que no había formación de gotas y que los flujos se separaban, por lo que para hacerlos más densos se decidió aumentar sus concentraciones. Posteriormente con concentraciones de 100 y 200 mg/ml se obtuvo respectivamente la división de flujo y formación de estructuras aleatorias que taponaban parte del canal. Por último, con 150 mg/ml se obtuvieron estructuras aleatorias que taponaban gran parte del canal del microchip y no se podía controlar ni su forma ni tamaño.

Vemos que en el estudio en estático (con flujos sin velocidad) de Miguel González-Pérez sí había reacción click y se formaban membranas. Por otro lado, en el estudio presente al introducir flujos sobre los medios no se consigue ninguna estructura polimérica, a no ser que sean concentraciones muy altas como 150 o 200 mg/ml. Por lo tanto, se ha llegado a la conclusión de que dichos medios con estos polímeros en concreto sólo reaccionan de manera controlada si se encuentran en condiciones estáticas, es decir, sin flujos ni movimiento.

5. CONCLUSIONES

Hemos visto que la microfluídica resulta muy interesante a la hora de elaborar estudios sobre polímeros a escala nanométrica y, a través de su aplicación, se ha logrado la manipulación de fluidos y avances significativos en la caracterización y análisis de procesos de síntesis y fabricación de microsferas de manera precisa.

En un primer lugar se demostró la idea de que el diámetro del tubo de salida del microchip no influye en el tamaño de las gotas, ya que estas se forman en la unión de los canales y en función del flujo que lleven los distintos medios se formarán gotas con un tamaño u otro.

En el caso del chip hidrofílico (donde la fase continua es el agua y la discreta el aceite) se llegó a la conclusión de que al ir aumentando el flujo de la fase discreta aumentaba también el tamaño de las gotas generadas, mientras que, si se aumenta el flujo de la continua, el tamaño de las gotas será menor. Por lo tanto, podemos decir que el tamaño de las gotas es directamente proporcional al flujo de la fase discreta e inversamente proporcional al flujo de la fase continua. Esto ocurría en las dos configuraciones del chip, tanto en la de dos como en la de tres canales. Pero también cabe destacar que en la unión en X (tres canales) las gotas obtenidas eran más pequeñas en relación con las obtenidas en la unión en T (2 canales), ya que el flujo de la fase continua era mayor y al mantenerse igual el de la fase discreta, las gotas son más pequeñas.

Si cambiamos el chip anterior por el hidrofóbico (donde la fase continua es el aceite y la discreta el agua), podemos apreciar que se forman gotas más pequeñas que en el hidrofílico debido a la viscosidad del aceite, el cual al llegar a la unión tiende a fluir por el conducto del agua, haciendo que las gotas se formen en tandas de manera periódica. Del mismo modo que en el caso del chip hidrofílico, existe una relación directamente proporcional del tamaño de las gotas con el flujo de la fase discreta e inversamente proporcional al flujo de la fase continua. Si nos centramos ahora en la unión de tres canales, ocurre lo mismo que en el chip anterior, las gotas formadas serán de menor tamaño debido a la mayor llegada de flujo por parte de la fase continua. Además, en este chip, se ha dado varias veces la formación de gotas grandes de agua que envuelven gotas de agua más pequeñas en un medio de aceite. Por último, en tres canales se empezó por 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ debido a que un flujo menor impide que el agua llegue a la unión y se formen gotas. También podemos ver que en ambos chips las mayores variaciones se producen a flujos de la fase continua de 25 y 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, mientras que a velocidades de 100 y 150 $\mu\text{L}/\text{min}$ esta desviación es menor.

Los polímeros empleados han sido modificados previamente por trabajadores del grupo de Bioforge, por lo que pata comprobar que el lote es bueno y la modificación es correcta, se realizaron distintas pruebas.

La primera de ellas fue la electroforesis, en la cual se obtuvo un valor del peso molecular aproximado de cada polímero, siendo más exacto en el HRGD6-azida que en el VKV-ciclooctino como veremos a continuación. Siguiendo con el peso molecular, tenemos el MALDI-ToF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight), que nos permite conocer el peso molecular de una manera más precisa que la electroforesis. De este modo se obtuvo que el peso del VKV-ciclooctino es de 43952 Da y el del HRGD6-azida es de 62183 Da.

Posteriormente se obtuvo la temperatura de transición gracias a la técnica de DSC (Differential Scanning Calorimetry), en el cual se tomaron tres medidas de cada polímero y se realizó la media de ellas, resultando la temperatura de transición del VKV-ciclooctino y del HRGD6-azida de 19.9°C y 16.89°C respectivamente. Después se estudió la composición química de cada polímero mediante el FTIR (Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy), en el que no podemos ver diferencias entre el VKVx24 puro y el VKV-ciclooctino. Esto no ocurre para el HRGD6-azida, ya que es posible apreciar que en la banda 2100 hay un pico que indica la presencia del grupo azida. Por último, se llevó a cabo la resonancia magnética nuclear (RMN), una técnica en la cual ya se pudo ver la presencia del ciclo en el VKV. Además, en ambos espectros las diferencias se aprecian en los puntos de 3, 4 y 7 ppm.

Por otro lado, a la hora elaborar y generar las esferas de elastómeros mediante la química click, es un campo en el cual hay que seguir trabajando y mejorar en determinados aspectos. La falta de un medio orgánico insoluble en agua y en el que sean solubles los polímeros ha dificultado mucho la capacidad de generar microesferas de elastómeros. También existe la posibilidad de que el método de fluídica empleando microchips no haya sido el más acertado pues había ocasiones, sobre todo al inicio del proyecto, en el que se sufrían fugas, por lo que había que volver a desmontar el chip, limpiar y volver a montar. Además, se ha planteado la posibilidad de que los polímeros no hayan sido los mejores para llevar a cabo el proyecto, pero es de los que más experiencia se tenía en el grupo, ya que en estudios previos se había conseguido crear membranas con VKV-ciclooctino y HRGD6-azida. A pesar de los inconvenientes, se consiguieron estructuras poliméricas aunque sin apenas control, únicamente por la simple reacción click entre el VKV-ciclooctino y el HRGD6-azida.

6. LÍNEAS DE MEJORA

Como se ha comentado con anterioridad, ha habido varios contratiempos y fallos a la hora de ejecutar el último paso, el diseño y generación de microcápsulas de recombinámeros tipos elastina.

El primero de ellos ha sido el propio chip. En algunos casos era necesario realizar de nuevo los experimentos porque existían fugas que impedían la correcta llegada del fluido a la unión. Además, a lo largo del trabajo, se han visto distintas formas de elaborar

microgotas de manera mucho más precisa, aunque algo más compleja, cara y de difícil acceso.

Por otro lado, tenemos los polímeros, los cuales, aunque sí se ha demostrado que reaccionan y se unen mediante la metodología click en casos en los que están en dos medios estáticos, no han reaccionado al introducirlos en nuestro microchip a bajas concentraciones. Al aumentar dichas concentraciones tenemos que la reacción es muy rápida, y por lo tanto se quedan restos en el canal que obstruyen la circulación. Por esto sería interesante emplear polímeros que tardasen un poco más en reaccionar para así poder recoger las estructuras en la salida del microchip.

Por último, el tema en el que sería apropiado y más importante avanzar sería en los medios en los cuales se disuelven los polímeros. Al inicio se empezó probando con aceite y agua pues eran con los que se caracterizó el tamaño de las gotas en relación con el flujo, pero se vio que ninguno se disolvía en aceite. Posteriormente, y como medios protagonistas en nuestros ensayos, se probaron con el DMSO/BuOH y el agua, los cuales sí se mantienen separados en condiciones estáticas, pero no cuando introducimos velocidades. Para conseguir esto, es necesario aumentar las concentraciones (>100 mg/ml) dando mayor densidad a los medios y haciéndolos más insolubles. Al inicio, al ver que estos se mezclaban a concentraciones de 10, 25 y 50 mg/ml, se estuvo probando con otros compuestos insolubles en agua como el tolueno, el acetato de etilo y el heptano, pero en ninguno de ellos se consiguió disolver alguno de los polímeros.

Por lo tanto, es necesario encontrar un medio que sea insoluble en agua y que permita disolver en él un polímero de tipo elastina. Además, para lograr la reacción click entre polímeros tipo elastina para generar microesferas aún queda mucho por aprender sobre cómo se comportan los medios y los polímeros cuando introducimos velocidades, ya que la mayoría de los estudios realizados se centran en sus características cuando carecen de movimiento.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Kim W, Chaikof EL. Recombinant elastin-mimetic biomaterials: Emerging applications in medicine. Vol. 62, *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010. p. 1468–78.
2. NIH. Breve Historia Del Proyecto Del Genoma Humano. NIH. 2016.
3. Ahmed T, Johnson B, Oppenheim C, Peck C. The 1953 Watson and Crick article on the structure of DNA * [Internet]. Vol. 61, *Budapest Scientometrics*. Kluwer Academic Publishers; 2004. Available from: <http://www.mimas.ac.uk>
4. Gil Trejo MJ, Laureano Viveros A, González-Salinas S. Historia y estructura del ADN. *TEPEXI Boletín Científico de la Escuela Superior Tepeji del Río*. 2018 Jul 5;5(10).
5. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. The Transcription of DNA.
6. Genético S, López Pérez MJ, Montoya J. CAPÍTULO II.
7. Polímero. Real Academia Española *Diccionario de la Lengua Española*.

8. Gustavo Martínez. Polímeros. REVISTA DE CULTURA CIENTÍFICA FACULTAD DE CIENCIAS, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
9. Elastómeros: qué son, tipos y aplicaciones. INFINITIA. 2021 Jul;
10. Meseguer-Valdenebro JL, Portolés A, Martínez-Conesa E, Meseguer-Valdenebro JL. TEACHING MAIN TYPES OF ELASTOMERS AND STANDARDIZED ASSAYS TO STUDENTS IN ENGINEERING Welding simulations View project Relational learning for sustainable development View project TEACHING MAIN TYPES OF ELASTOMERS AND STANDARDIZED ASSAYS TO STUDENTS IN ENGINEERING [Internet]. Vol. 42, Article in Journal of Materials Education. 2020. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/349366364>
11. Keeley FW, Bellingham CM, Woodhouse KA. Elastin as a self-organizing biomaterial: Use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin. Vol. 357, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2002. p. 185–9.
12. Yoda R. Elastomers for biomedical applications. J Biomater Sci Polym Ed. 1998 Jan 1;9(6):561–626.
13. Martín Maroto L. STIMULI-RESPONSIVE SYSTEMS BASED ON ELASTIN-LIKE RECOMBINAMERS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS.
14. Alonso Rodrigo José Carlos Rodríguez Cabello M. FACULTAD DE CIENCIAS DEPARTAMENTO DE FÍSICA DE LA MATERIA CONDENSADA, CRISTALOGRAFÍA Y MINERALOGÍA STIMULI-RESPONSIVE SYSTEMS BASED ON ELASTIN-LIKE RECOMBINAMERS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS.
15. Structure and Properties of Poly(vinyl alcohol) (PVA).
16. Kopeček J, Yang J. Hydrogels as smart biomaterials. Vol. 56, Polymer International. 2007. p. 1078–98.
17. Murayama T. Dynamic Mechanical Properties of Elastomers for Use in Circulatory Assist Devices.
18. Okano T, Aoyagi T, Kataoka K, Abe K, Sakurai Y, Shimada M, et al. Hydrophilic-hydrophobic microdomain surfaces having an ability to suppress platelet aggregation and their in vitro antithrombogenicity.
19. Stern T, Penhasi A, Cohn D. Derivatization of a new poly(ether urethane amide) containing-chemically active sites. Vol. 16, Biomaterials. 1995.
20. Karabanova L V., Sergeeva LM, Svyatyna A V., Yakushev PN, Egorova LM, Ryzhov VA, et al. Heterogeneity of glass transition dynamics in polyurethane-poly(2- hydroxyethyl methacrylate) semi-interpenetrating polymer networks. J Polym Sci B Polym Phys. 2007 Apr 15;45(8):963–75.
21. Kim CJ, Cho Sk, Moon AG. Elastomers properties and characteristics for biomedical applications. Journal of Microelectromechanical Systems. 2003 Feb;12(1):70–80.


22. De Groat JH, De Vrijer R, Pennings AJ, Klompmaker J, Veth RPH, Jansen HWB. Use of porous polyurethanes for meniscal reconstruction and meniscal prostheses. Vol. 17, *Biomaterials*. 1996.
23. WONG EWC. Development of a Biomedical Polyurethane. In 1981. p. 489–504.
24. 409 elps.
25. Kossovsky N, Freiman CJ. Review Physicochemical and immunological basis of silicone pathophysiology. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1995 Jan 1;7(2):101–13.
26. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. Vol. 453, *Nature*. Nature Publishing Group; 2008. p. 314–21.
27. Smith DC. RECENT DEVELOPMENTS AND PROSPECTS IN DENTAL POLYMERS.
28. Ardesna AP, Vaidyanathan TK. Colour changes of orthodontic elastomeric module materials exposed to in vitro dietary media. *J Orthod*. 2009 Sep;36(3):177–85.
29. Wang Y, Ma X, Ghanem BS, Alghunaimi F, Pinnau I, Han Y. Polymers of intrinsic microporosity for energy-intensive membrane-based gas separations. Vol. 3, *Materials Today Nano*. Elsevier Ltd; 2018. p. 69–95.
30. Carlos Rodríguez-Cabello J, Jesús Piña M, Ibáñez-Fonseca A, Fernández-Colino A, Javier Arias F, Carlos Rodríguez-Cabello J, et al. Nanotechnological approach to the therapeutic delivery using elastin-like recombinamers TITLE: Nanotechnological approaches to therapeutic delivery using elastin-like recombinamers [Internet]. 2015. Available from: <http://pubs.acs.org>
31. James D. Johnston SMTMJ and JCR. Hand Washing Quality among Biosafety Level 2 Research Laboratory Workers.
32. Vincent WW. Plastics in medical tubing applications-manufacturing considerations.
33. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. Vol. 442, *Nature*. 2006. p. 368–73.
34. NIH. NIH. INSTITUTO NACIONAL DEL CÁNCER. DICCIONARIO. NIH.
35. McMahon R. La Guerra Fría: Una breve introducción.
36. Jacintho da Silva L. Palavras-chave Bioterrorismo; Guerra Biológica; Varíola. Vol. 17.
37. Brest State University named after A.S. Pushkin. Иностранные языки и современный мир.
38. Ng JMK, Gitlin I, Stroock AD, Whitesides GM. Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems. *Electrophoresis*. 2002 Oct;23(20):3461–73.
39. Stone HA, Stroock AD, Ajdari A. Engineering flows in small devices: Microfluidics toward a lab-on-a-chip. *Annu Rev Fluid Mech*. 2004;36:381–411.
40. Teh SY, Lin R, Hung LH, Lee AP. Droplet microfluidics. Vol. 8, *Lab on a Chip*. Royal Society of Chemistry; 2008. p. 198–220.
41. David J, Díaz J, Alonso H, Bañol C. NUMERO DE REYNOLDS. 2015.

42. Beebe DJ, Mensing GA, Walker GM. Physics and applications of microfluidics in biology. Vol. 4, Annual Review of Biomedical Engineering. 2002. p. 261–86.
43. Li Jeon N, Baskaran H, Dertinger SKW, Whitesides GM, De Water L Van, Toner M. Neutrophil chemotaxis in linear and complex gradients of interleukin-8 formed in a microfabricated device. *Nat Biotechnol.* 2002;20(8):826–30.
44. Utada AS, Lorenceau E, Link DR, Kaplan PD, Stone HA, Weitz DA. Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device. *Science (1979).* 2005 Apr 22;308(5721):537–41.
45. Nisisako T, Okushima S, Torii T. Controlled formulation of monodisperse double emulsions in a multiple-phase microfluidic system. Vol. 1, *Soft Matter.* 2005. p. 23–7.
46. Xu JH, Li SW, Wang YJ, Luo GS. Controllable gas-liquid phase flow patterns and monodisperse microbubbles in a microfluidic T-junction device. *Appl Phys Lett.* 2006;88(13).
47. Nisisako T, Tonii T. Formation of biphasic janus droplets in a microfabricated channel for the synthesis of shape-controlled polymer microparticles. *Advanced Materials.* 2007 Jun 4;19(11):1489–93.
48. Pollack MG, Shenderov AD, Fair RB. Electrowetting-based actuation of droplets for integrated microfluidics. *Lab Chip.* 2002 May 1;2(2):96–101.
49. Sohrabi S, Kassir N, Keshavarz Moraveji M. Droplet microfluidics: Fundamentals and its advanced applications. Vol. 10, *RSC Advances.* Royal Society of Chemistry; 2020. p. 27560–74.
50. Zhao Y, Cho SK. Micro air bubble manipulation by electrowetting on dielectric (EWOD): Transporting, splitting, merging and eliminating of bubbles. *Lab Chip.* 2007;7(2):273–80.
51. Sugiura S, Nakajima M, Seki M. Effect of channel structure on microchannel emulsification. *Langmuir.* 2002 Jul 23;18(15):5708–12.
52. Cygan ZT, Cabral JT, Beers KL, Amis EJ. Microfluidic platform for the generation of organic-phase microreactors. *Langmuir.* 2005 Apr 12;21(8):3629–34.
53. Zheng B, Tice JD, Ismagilov RF. Formation of droplets of alternating composition in microfluidic channels and applications to indexing of concentrations in droplet-based assays. *Anal Chem.* 2004 Sep 1;76(17):4977–82.
54. Xu JH, Li SW, Chen GG, Luo GS. Formation of monodisperse microbubbles in a microfluidic device. *AIChE Journal.* 2006 Jun;52(6):2254–9.
55. Nie Z, Xu S, Seo M, Lewis PC, Kumacheva E. Polymer particles with various shapes and morphologies produced in continuous microfluidic reactors. *J Am Chem Soc.* 2005 Jun 8;127(22):8058–63.
56. Ahmed R, Jones TB. Dispensing picoliter droplets on substrates using dielectrophoresis. *J Electrostat.* 2006 Jul;64(7–9):543–9.
57. Vila NA. ¿QUIÉN PROPUSO LA FÓRMULA DE RAYLEIGH-JEANS? 2006;29:5–18.

58. Cho SK, Moon H, Kim CJ. Creating, transporting, cutting, and merging liquid droplets by electrowetting-based actuation for digital microfluidic circuits. *Journal of Microelectromechanical Systems*. 2003 Feb;12(1):70–80.
59. Berthier J, Clementz P, Raccurt O, Jary D, Claustre P, Peponnet C, et al. Computer aided design of an EWOD microdevice. *Sens Actuators A Phys*. 2006 Mar 13;127(2):283–94.
60. Jones TB. On the relationship of dielectrophoresis and electrowetting. *Langmuir*. 2002 May 28;18(11):4437–43.
61. Zeng J, Korsmeyer T. Principles of droplet electrohydrodynamics for lab-on-a-chip. *Lab Chip*. 2004;4(4):265–77.
62. Chiu DT, Lorenz RM, Jeffries GDM. Droplets for ultrasmall-volume analysis. Vol. 81, *Analytical Chemistry*. 2009. p. 5111–8.
63. Pellicer J, García-Morales V, Hernández MJ. On the demonstration of the Young-Laplace equation in introductory physics courses.
64. Weinhaus F, Barker W. On the equilibrium states of interconnected bubbles or balloons. *Am J Phys*. 1978 Oct;46(10):978–82.
65. Gañán-Calvo AM, Gordillo JM. Perfectly monodisperse microbubbling by capillary flow focusing. *Phys Rev Lett*. 2001 Dec 31;87(27 I):2745011–4.
66. Lu IL, Wong VL, Chin JK, Kusaari K. Water droplets translocation and fission in a 3D bi-planar multifurcated t-junction microchannels. *Processes*. 2020 May 1;8(5).
67. Tan YC, Fisher JS, Lee AI, Cristini V, Lee AP. Design of microfluidic channel geometries for the control of droplet volume, chemical concentration, and sorting. *Lab Chip*. 2004;4(4):292–8.
68. Ratner DM, Murphy ER, Jhunjhunwala M, Snyder DA, Jensen KF, Seeberger PH. Microreactor-based reaction optimization in organic chemistry - Glycosylation as a challenge. *Chemical Communications*. 2005 Feb 7;(5):578–80.
69. Link DR, Anna SL, Weitz DA, Stone HA. Geometrically Mediated Breakup of Drops in Microfluidic Devices. *Phys Rev Lett*. 2004;92(5):4.
70. Sato H, Matsumura H, Keino S, Shoji S. An all SU-8 microfluidic chip with built-in 3D fine microstructures. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. 2006 Nov 1;16(11):2318–22.
71. Nguyen NT, Ting TH, Yap YF, Wong TN, Chai JCK, Ong WL, et al. Thermally mediated droplet formation in microchannels. *Appl Phys Lett*. 2007;91(8).
72. Tan YC, Ho YL, Lee AP. Droplet coalescence by geometrically mediated flow in microfluidic channels. *Microfluid Nanofluidics*. 2007 Aug;3(4):495–9.
73. Hong Y, Wang F. Flow rate effect on droplet control in a co-flowing microfluidic device. *Microfluid Nanofluidics*. 2007 Jun;3(3):341–6.
74. Sims CE, Allbritton NL. Analysis of single mammalian cells on-chip. Vol. 7, *Lab on a Chip*. Royal Society of Chemistry; 2007. p. 423–40.

75. Ahn K, Agresti J, Chong H, Marquez M, Weitz DA. Electrocoalescence of drops synchronized by size-dependent flow in microfluidic channels. *Appl Phys Lett*. 2006;88(26).
76. Wang J, Lu C. Microfluidic cell fusion under continuous direct current voltage. *Appl Phys Lett*. 2006;89(23).
77. Singh P, Aubry N. Transport and deformation of droplets in a microdevice using dielectrophoresis. *Electrophoresis*. 2007 Feb;28(4):644–57.
78. Schwartz JA, Vykoukal J V., Gascoyne PRC. Droplet-based chemistry on a programmable micro-chip. *Lab Chip*. 2004;4(1):11–7.
79. Huysmans M, Dassargues A. Review of the use of Péclet numbers to determine the relative importance of advection and diffusion in low permeability environments. *Hydrogeol J*. 2005 Oct;13(5–6):895–904.
80. Tofteberg T, Skolimowski M, Andreassen E, Geschke O. A novel passive micromixer: Lamination in a planar channel system. *Microfluid Nanofluidics*. 2010 Feb;8(2):209–15.
81. Bringer MR, Gerds CJ, Song H, Tice JD, Ismagilov RF. Microfluidic systems for chemical kinetics that rely on chaotic mixing in droplets. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2004 May 15;362(1818):1087–104.
82. Tan YC, Ho YL, Lee AP. Microfluidic sorting of droplets by size. *Microfluid Nanofluidics*. 2008 Apr;4(4):343–8.
83. Paik P, Pamula VK, Fair RB. Rapid droplet mixers for digital microfluidic systems. *Lab Chip*. 2003;3(4):253–9.
84. Huh D, Bahng JH, Ling Y, Wei HH, Kripfgans OD, Fowlkes JB, et al. Gravity-driven microfluidic particle sorting device with hydrodynamic separation amplification. *Anal Chem*. 2007 Feb 15;79(4):1369–76.
85. Wang L, Flanagan LA, Jeon NL, Monuki E, Lee AP. Dielectrophoresis switching with vertical sidewall electrodes for microfluidic flow cytometry. *Lab Chip*. 2007;7(9):1114–20.
86. Xi HD, Zheng H, Guo W, Gañán-Calvo AM, Ai Y, Tsao CW, et al. Active droplet sorting in microfluidics: a review. *Lab Chip*. 2017 Mar 7;17(5):751–71.
87. Dittrich PS, Manz A. Lab-on-a-chip: Microfluidics in drug discovery. Vol. 5, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2006. p. 210–8.
88. Rezvantalab S, Drude NI, Moraveji MK, Güvener N, Koons EK, Shi Y, et al. PLGA-based nanoparticles in cancer treatment. *Front Pharmacol*. 2018 Nov 2;9(NOV).
89. DeMello J, DeMello A. Microscale reactors: Nanoscale products. Vol. 4, *Lab on a Chip*. Royal Society of Chemistry; 2004.
90. Qu BY, Wu ZY, Fang F, Bai ZM, Yang DZ, Xu SK. A glass microfluidic chip for continuous blood cell sorting by a magnetic gradient without labeling. *Anal Bioanal Chem*. 2008 Dec;392(7–8):1317–24.

91. Asghar W, Sher M, Khan NS, Vyas JM, Demirci U. Microfluidic Chip for Detection of Fungal Infections. *ACS Omega*. 2019 Apr 24;4(4):7474–81.
92. Noireaux V, Libchaber A. A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly [Internet]. 2004. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0408236101
93. Niederholtmeyer H, Chaggan C, Devaraj NK. Communication and quorum sensing in non-living mimics of eukaryotic cells. *Nat Commun*. 2018 Dec 1;9(1).
94. Zheng B, Tice JD, Roach LS, Ismagilov RF. A droplet-based, composite PDMS/glass capillary microfluidic system for evaluating protein crystallization conditions by microbatch and vapor-diffusion methods with on-chip X-ray diffraction. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2004 May 3;43(19):2508–11.
95. Schaerli Y, Wootton RC, Robinson T, Stein V, Dunsby C, Neil MAA, et al. Continuous-flow polymerase chain reaction of single-copy DNA in microfluidic microdroplets. *Anal Chem*. 2009 Jan 1;81(1):302–6.
96. Kiss MM, Ortoleva-Donnelly L, Reginald Beer N, Warner J, Bailey CG, Colston BW, et al. High-throughput quantitative polymerase chain reaction in picoliter droplets. *Anal Chem*. 2008 Dec 1;80(23):8975–81.
97. Alwathiqi FA. Molecular markers for direct testing of antifungal resistance in *Candida*. 2019.
98. Lin X, Huang X, Urmann K, Xie X, Hoffmann MR. Digital Loop-Mediated Isothermal Amplification on a Commercial Membrane. *ACS Sens*. 2019 Jan 25;4(1):242–9.
99. Abate AR, Hung T, Sperling RA, Mary P, Rotem A, Agresti JJ, et al. DNA sequence analysis with droplet-based microfluidics. *Lab Chip*. 2013 Dec 21;13(24):4864–9.
100. Rubén Megía González. Electroforesis: ¿Qué es y para qué sirve? *Genotipia*. 2022 Sep 1;
101. Temperatura de Transición Vítrea . NETZSCH Proven Excellence.
102. Berthomieu C, Hienerwadel R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Vol. 101, *Photosynthesis Research*. 2009. p. 157–70.
103. ¿Qué es la espectroscopía infrarroja y FT-IR? ¿Hay alguna diferencia? BRUKER.
104. Román P. The azide-alkyne 1,3-Dipolar 'click' cycloaddition.
105. Evans RA. The rise of azide-alkyne 1,3-Dipolar 'click' cycloaddition and its application to polymer science and surface modification. Vol. 60, *Australian Journal of Chemistry*. 2007. p. 384–95.
106. Hidalgo Misas Tutor A, Javier Arias Vallejo Raquel Muñoz Martínez F. Obtención de hidrogeles químicos, mediante metodología 'click', a partir de polímeros tipo elastina para liberación controlada de fármacos.
107. Hartmuth C. Kolb MGF and KBS. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions.
108. Díaz Díaz D, Finn MG, Barry Sharpless K, Fokin Craig J Hawker V V. Cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos. I: Principales aspectos sintéticos [Internet]. Vol. 104. 2008. Available from: www.rseq.org

109. del Barrio Jubete A. Modificación química de biopolímeros tipo elastina para recubrimiento de membranas porosas de PVDF de aplicación biomédica.
110. Bohacek RS, Mcmartin C, Guida WC. The Art and Practice of Structure-Based Drug Design: A Molecular Modeling Perspective.
111. Jewett JC, Bertozzi CR. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem Soc Rev.* 2010 Mar 22;39(4):1272–9.
112. Dolomite_DropletJunctionChipUserManual.
113. crisp fluorescence documentation for routine experiments LEiCa DFC3000 G From eye to insight.
114. PHD 22/2000 Syringe Pump Series User's Manual.
115. Masterflex® Ismatec® ISM833C Reglo Digital Variable-Speed Peristaltic Pump, 4-Channel, 6-Roller, 0.003 to 37 ml/min; 115/230 VAC.
116. Manns JM. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins. *Curr Protoc Microbiol.* 2011;(SUPPL. 22).
117. Molecular Cloning This is a free sample of content from Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th edition. Click here for more information or to buy the book [Internet]. 2012. Available from: www.cshlpress.org
118. Del Barrio Jubete A. Modificación química de biopolímeros tipo elastina para recubrimiento de membranas porosas de PVDF de aplicación biomédica.
119. Ali I, Aboul-Enein HY, Singh P, Singh R, Sharma B. Separation of biological proteins by liquid chromatography. Vol. 18, *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2010. p. 59–73.
120. Suriñach S, Baro MD, Bordas S, Clavaguera N, Clavaguera-mora MT. La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales.
121. Thomas LC. An Introduction to the Techniques of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated DSC®. 2005.
122. MKS Newport. Introduction to FTIR Spectroscopy.
123. Structure Determination of Organic Compounds.
124. Sigma-Aldrich. IR Spectrum Table & Chart by Frequency Range.
125. Tamm  LK, Tatulia SA. Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers.
126. Gila Herranz P. Estudio de transiciones líquido-líquido en disoluciones acuosas de polipéptidos sensibles a estímulos.
127. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear [Internet]. [cited 2020 Apr 2]. Available from: <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisisquimicos/espectroscopa-de-resonancia-magntica-nuclear>.

128. Espectrometría de resonancia magnética nuclear [Internet]. [cited 2020 Apr 2]. Available from: https://www.espectrometria.com/espectrometra_de_resonancia_magntica_nuclear.
129. Pastor Calvo P. Recubrimiento de membranas de PVDF utilizando recombinámeros tipo elastina, ELRs, para diferenciación osteogénica.
130. Espectrometría de masas MALDI-TOF - Creative Proteomics [Internet]. [cited 2020 Jun 24]. Available from: <https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tofmass-spectrometry.htm>.
131. LibreText. Infrared Spectroscopy Absortion Table.
132. Arias FJ, Purificación V, Curto C. MODIFICACIÓN DE SOPORTES POLIMÉRICOS PARA LA DOSIFICACIÓN DE FÁRMACOS MEDIANTE NANOPARTÍCULAS Autora: Marta del Val Armesto Tutor/es.
133. Hidalgo Misas Tutor A, Javier Arias Vallejo Raquel Muñoz Martínez F. Obtención de hidrogeles químicos, mediante metodología 'click', a partir de polímeros tipo elastina para liberación controlada de fármacos.
134. Matilde D, Rodrigo A, Carlos J, Cabello R. TESIS DOCTORAL: BIOFUNCTIONAL HYDROGELS BASED ON ELASTIN-LIKE RECOMBINAMERS AS EXTRACELLULAR MATRIX ANALOGUES.
135. Triviño AR, Carlos J, Cabello R. Mechanics of Elastin-like Recombinamers hydrogels under mechanical wave pressure. Mechanics of Elastin-like Recombinamers hydrogels under mechanical wave pressure. Trabajo Fin de Master.

ANEXO

A1. TABLA RELACIÓN CODONES-AMINOÁCIDO

Segunda Letra

		U		C		A		G		
Primera Letra	U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
		UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys	C
		UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	STOP	UGA	STOP	A
		UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	STOP	UGG	Try	G
	C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
		CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg	C
		CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg	A
		CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg	G
	A	AUU	Iso	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
		AUC	Iso	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser	C
		AUA	Iso	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	Arg	A
		AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	Arg	G
	G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
		GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly	C
		GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly	A
		GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly	G

Tercera Letra

©BIOINNOVA
innovabiologia.com

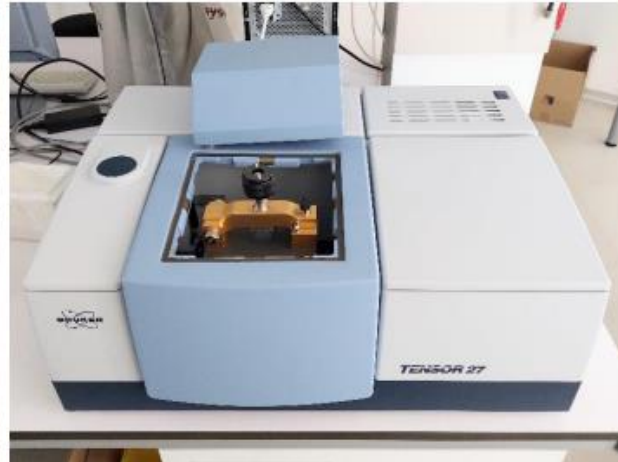
A2. TABLA DEL LABORATORIO PARA LA FORMACIÓN DE GELES DE ELECTROFORESIS.

	ONE GEL	RESOLVING GEL				STACKIN GEL
		7.5%	10%	12%	15%	4%
1	MQ	4.10 ml	3.63 ml	3.25 ml	2.69 ml	1.585 ml
2	Tris 1.5M pH 8.8	1.88 ml	1.88 ml	1.88 ml	1.88 ml	-
	Tris 0.5 pH 6.8	-	-	-	-	625 ul
3	Acrylamide 40%	1.4 ml	1.875 ml	2.25 ml	2.81 ml	250 ul
4	SDS 10%	75 ul	75 ul	75 ul	75 ul	18.75 ul
5	Persulfate 10%	37.5 ul	37.5 ul	37.5 ul	37.5 ul	18.75 ul
6	TEMED	3.75 ul	3.75 ul	3.75 ul	3.75 ul	2.35 ul

A3. EQUIPOS EMPLEADOS EN LA CRACATERIZACIÓN DE POLÍMEROS



Gel Doc EZ Imager, BIO-RAD



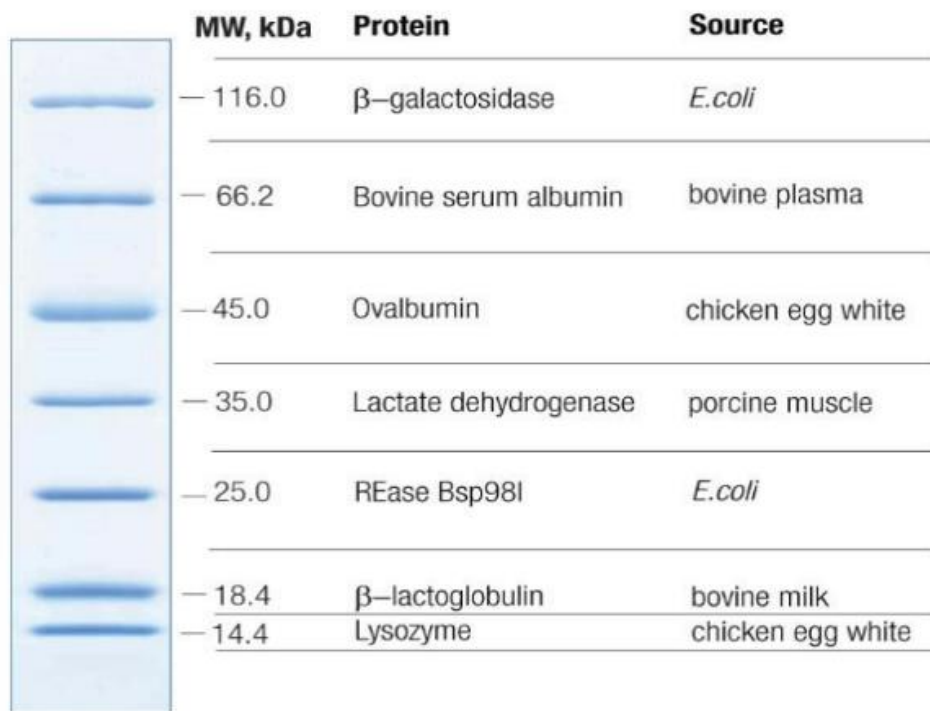
Equipo de Infrarrojo Tensor 27, Bruker



Equipo de DSC Mettler Toledo 822e

A4. REFERENCIA DEL LABORATORIO DEL MARKER CON PESOS CONCRETOS PARA LA ELECTROFORESIS

Unstained Protein Molecular Weight Marker

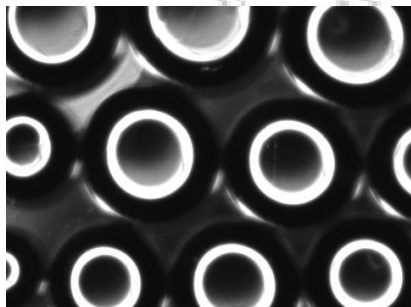


8-16% Tris-glycine SDS-PAGE

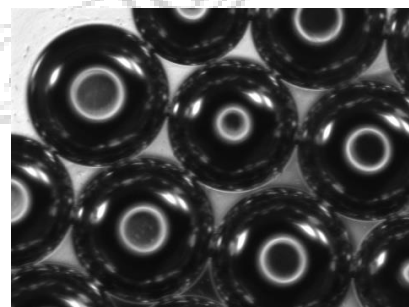
A5. FOTOS DE LAS MICROGOTAS DE ACEITE EN AGUA OBTENIDAS A LOS DISTINTOS FLUJOS (CHIP HIDROFÍLICO)

* Imágenes tomadas con ayuda del programa Las X y el microscopio Leica DFC3000 G CCD

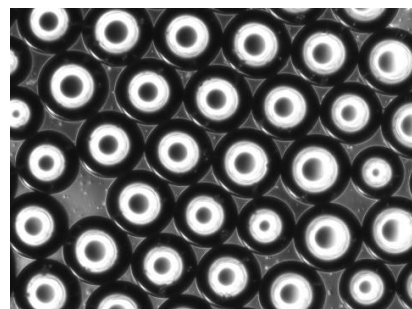
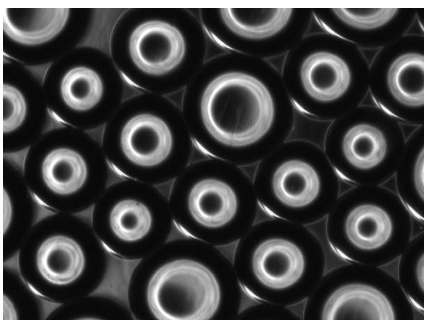
Unión en T (flujo aceite [μ L] – flujo agua [μ L])



2.5 – 50



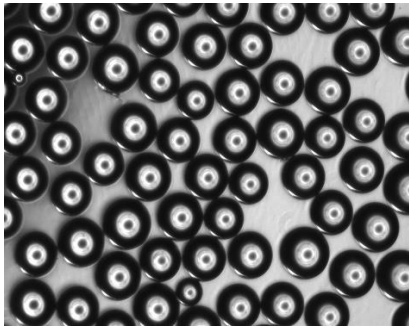
5 - 100



7.5 – 150

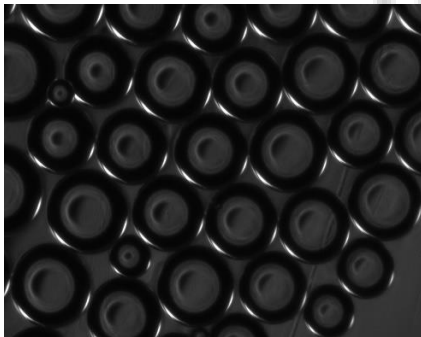
1 – 150

Unión en X (flujo aceite [μ L] – flujo agua [μ L])



1 – 150

2.5 – 75



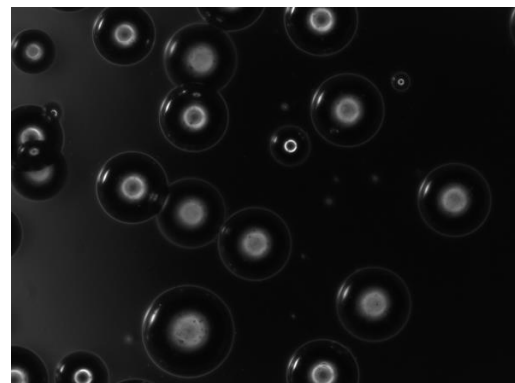
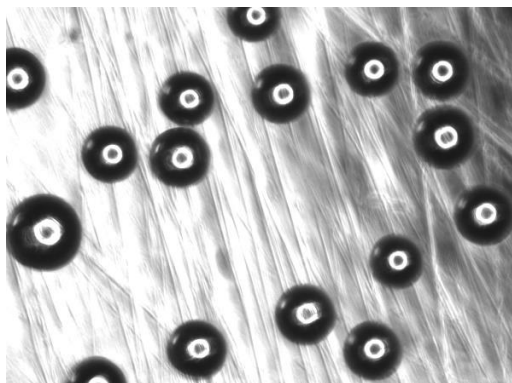
7.5 – 150

5 - 150

A6. FOTOS DE LAS MICROGOTAS DE AGUA EN ACEITE OBTENIDAS A LOS DISTINTOS FLUJOS (CHIP HIDROFÓBICO)

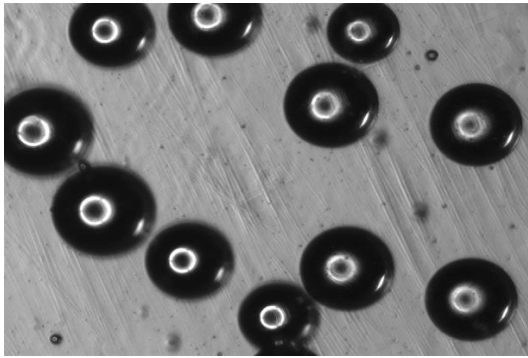
*** Imágenes tomadas con ayuda del programa Las X y el microscopio Leica DFC3000 G CCD**

Unión en T (flujo agua [μ L] – flujo aceite [μ L])

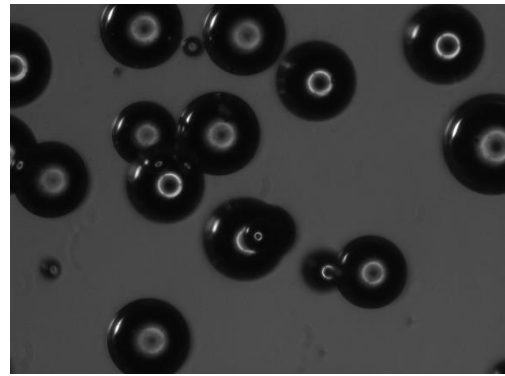


1 – 55

2.5 – 55

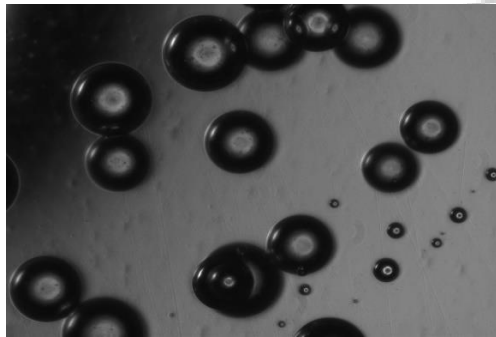


5 – 35

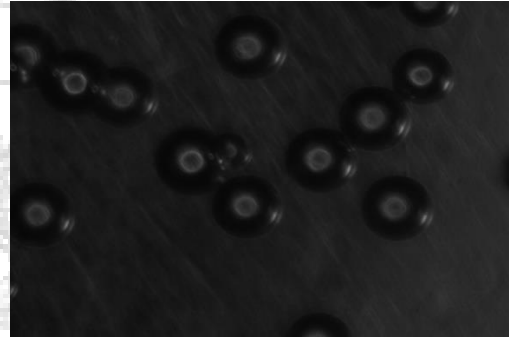


7.5 - 55

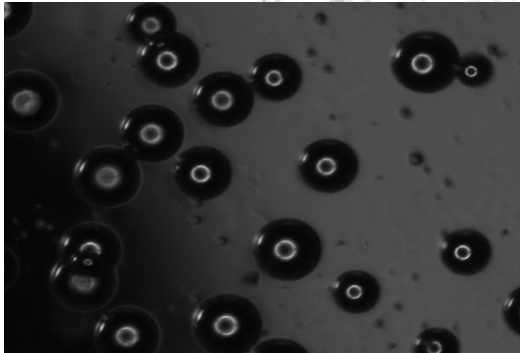
Unión en X (flujo agua [μL] – flujo aceite [μL])



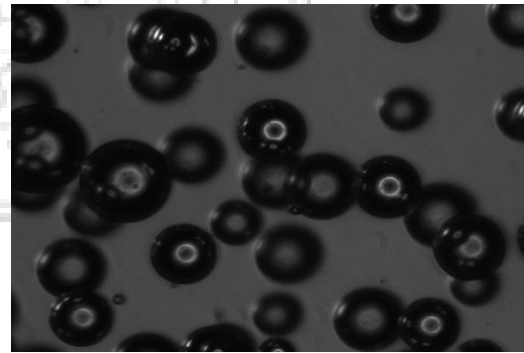
2.5 – 15



5 – 75



10 – 150



15 – 150

A7. pH-METRO Y MICROBALANZA



pH-metro Meter 20+ CRISON

Microbalanza METTLER TOLEDO



A7. PRENSA METTLER TOLEDO PARA SELLAR LAS LENTEJAS DEL DSC Y LENTEJAS DEL DSC



Pareja de lentes del DSC: parte superior (izquierda) y parte inferior (derecha)

Prensa METTLER TOLEDO para sellar la muestra introducida en el DSC

A8. INSTRUMENTOS DEL LABORATORIO EMPLEADOS PARA HACER DISOLUCIONES Y ENSAYOS



Jeringuilla de 2 ml



Eppendorfs de 1.5 y 5 ml



Falcon de 50 ml



Pipetas de 200-1000 μ L y de 20-100 μ L



Puntas para pipetas de 10-100 μ L



gPuntas para pipetas de 100-1000 μ L