



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Física

Optimización de un sistema de microfluídica para su uso como dispositivo biomédico

Autor: Víctor García Chico
Tutores: Julio Fernández Fernández,
Javier Pinto Sanz

Año 2023

Índice

1. Introducción	1
1.1. Microfluídica	1
1.1.1. Número de Reynolds y flujo laminar	1
1.1.2. Difusión	2
1.1.3. Resistencia fluídica	3
1.1.4. Tensión superficial y fenómenos de superficie	3
1.1.5. Relación de superficie-volumen	4
1.1.6. Miscibilidad	4
1.1.7. Surfactantes	5
1.1.8. Recubrimiento de las paredes del canal	6
1.1.9. Viscosidad	6
1.2. Biomateriales	7
1.2.1. Polímeros recombinantes de tipo elastina (ELRs)	8
1.3. Objetivos	10
2. Materiales y métodos experimentales	11
2.1. Lab on a Chip y material empleado en microfluídica	11
2.1.1. Tipos de convergencias de flujo	13
2.2. Realización experimental	13
2.2.1. Limpieza y cuidado del LoC	13
2.2.2. Montaje del sistema	14
2.2.3. Generación de microgotas	15
2.3. Polímero recombinante de tipo elastina empleado	16
2.4. Caracterización del ELR	17
2.4.1. Electroforesis SDS-PAGE	17
2.4.2. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)	18
2.4.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	19
2.5. Generación de microestructuras de ELR en el interior de las gotas	20
3. Discusión de resultados	22
3.1. Generación y estudio de gotas	22
3.1.1. Dispositivo hidrofílico	22
3.1.2. Dispositivo hidrófobo	25
3.1.3. Comparación de ambos dispositivos	25
3.2. Estimación del peso molecular	26
3.3. Espectroscopía infrarroja	27
3.4. Medida de la temperatura de transición inversa	29
3.5. Generación de microestructuras de ELR	30
4. Conclusión y futuras líneas de investigación	32
Anexo	33

Resumen

La técnica de generación de gotas mediante dispositivos de microfluídica implica el control y la manipulación de volúmenes muy pequeños de líquidos en forma de gotas en un entorno microscópico. Este campo de estudio converge con los biomateriales en el desarrollo de sistemas microfluídicos que encapsulan biomateriales en forma de gotas. Esta combinación permite la creación de estructuras a escala micro que tienen aplicaciones en biología, medicina, ciencias de los materiales y otros campos relacionados. Estos avances tienen el potencial de transformar la medicina regenerativa, la terapia génica, la ingeniería de tejidos y la investigación biomédica en general. En este informe se realiza un estudio de estos dispositivos microfluídicos junto a la caracterización de un polímero de tipo recombinante basado en la elastina (*ELR*) dando como último paso la aplicación de dicha técnica microfluídica para la obtención de microestructuras de este biomaterial.

The technique of droplet generation using microfluidic devices involves the control and manipulation of very small volumes of liquid droplets in a microscopic environment. This field of study converges with biomaterials in the development of microfluidic systems that encapsulate biomaterials in droplet form. This combination enables the creation of micro-scale structures that have applications in biology, medicine, materials science and other related fields. These advances have the potential to transform regenerative medicine, gene therapy, tissue engineering and biomedical research in general. In this report, a study of these microfluidic devices is carried out together with the characterisation of a recombinant elastin-based polymer (*ELR*) with the final step being the application of this microfluidic technique to obtain microstructures of this biomaterial.

1. Introducción

Durante este trabajo se realizó una labor de optimización y puesta a punto de chips de microfluídica con el objetivo de utilizar esta técnica para su uso en conjunto a los biomateriales conocidos como proteínas recombinantes, más concretamente los basados en la elastina. En esta sección se presentan los fenómenos físicos que cobran mayor importancia en el campo de la microfluídica así como la descripción y características de las proteínas de tipo recombinante basadas en la elastina.

1.1. Microfluídica

La microfluídica es la manipulación y el análisis de fluidos en estructuras de escala micrométrica. En la microescala dominan fuerzas diferentes de las que se experimentan en los rangos de la macroescala [1]. Debido a la escala en la que buscamos operar, la simple reducción de los dispositivos existentes y la esperanza de que funcionen de manera eficiente a microescala no suele ser efectiva [2]. En su lugar, es necesario desarrollar nuevos diseños que aprovechen de manera óptima las fuerzas que actúan a nivel microscópico. Los efectos que se vuelven dominantes en campo de los fluidos a microescala son:

1.1.1. Número de Reynolds y flujo laminar

Para poder describir bien el funcionamiento de nuestros fluidos debemos hacer uso del *Número de Reynolds* [3]. Este dato nos da cuenta del régimen de flujo del fluido: laminar o turbulento.

El flujo laminar es una condición que dicta si una partícula en una corriente de fluido no es una función aleatoria del tiempo, mientras que el flujo turbulento es caótico e impredecible, por lo que no se puede predecir la posición de una partícula en la corriente del fluido en función del tiempo [4]. Una consecuencia del flujo laminar es que dos corrientes que fluyen en contacto no

se mezclan, exceptuando la difusión [4]. Otra técnica que permite el flujo laminar es la creación de paquetes de fluido que, excepto por efectos de difusión, permanecen bien formados (Figura 1).

El número de Reynolds viene dado por la siguiente expresión [4]:

$$Re = \frac{\rho v D_h}{\mu}. \quad (1)$$

Donde ρ es la densidad de nuestro fluido, v es la velocidad característica del fluido, μ es la viscosidad y D_h es el diámetro hidráulico, el cual se trata de un término usualmente empleado cuando se manejan fluidos en canales y tubos no circulares. En este caso, los canales son circulares por lo que el diámetro hidráulico es igual al diámetro del canal. Debido a la linealidad que presenta el número de Reynolds con el diámetro hidráulico cuando este se reduce al orden de los μm el flujo es siempre laminar [5] en condiciones comunes.

Mientras se mantenga un $Re < 2300$ estaremos trabajando en un régimen de flujo laminar. Cuanto más nos acerquemos a 2300 el flujo empezará a mostrar signos de turbulencia, y cuando Re es superior a 2300 se considera que el flujo es turbulento [4].

En el presente estudio, se ha llevado a cabo una investigación utilizando agua y un aceite de inmersión de baja viscosidad. Se ha observado que los caudales utilizados resultan en números de Reynolds que no exceden las decenas, lo que indica la presencia de flujos laminares afirmando el hecho de que para canales de tamaño muy reducido el flujo es siempre laminar [5].

1.1.2. Difusión

La difusión es el proceso por el cual un grupo concentrado de partículas en un volumen se dispersará con el tiempo debido al movimiento browniano, de forma que la concentración media de partículas en el volumen permanecerá constante. La difusión puede modelizarse en una dimensión mediante la ecuación [4]:

$$d^2 = 2Dt, \quad (2)$$

siendo d la distancia que recorre la partícula en un tiempo t , y D es el coeficiente de difusión de la partícula. Vemos que la distancia d varía al cuadrado por lo que la difusión adquiere una gran importancia a escala micrométrica.

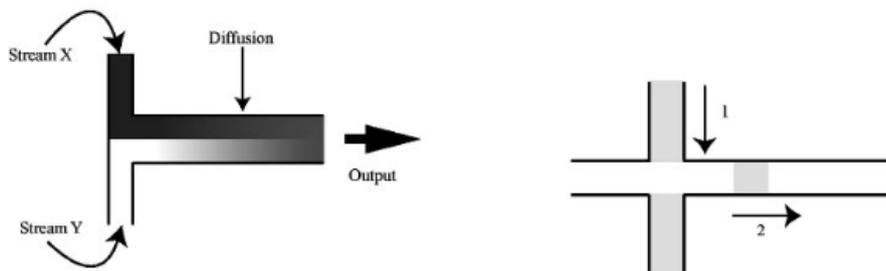


Figura 1: Diagrama de dos corrientes fluyendo en contacto sin mezclarse, excepto por el efecto de difusión (izquierda) y tres corrientes formando paquetes de un fluido incidiendo perpendicularmente al flujo principal (derecha) [4].

Un claro ejemplo de esto es la hemoglobina, que cuenta con un coeficiente de difusión $D = 7 \cdot 10^{-7} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. Esta tarda 10^6 segundos en difundirse en 1cm de agua, pero tan solo 1 segundo en difundirse en $10\mu\text{m}$. Esto implica que en un canal de 1 cm de diámetro, la difusión de la hemoglobina no es apreciable, sin embargo en uno de $10\mu\text{m}$ la distancia recorrida debido a la difusión si es relevante [4]. Como los tiempos de difusión pueden ser realmente pequeños en la microescala, los dispositivos de microfluídica pueden utilizarse para crear gradientes de concentración [6][7].

Los efectos de difusión en este estudio no van a aparecer debido a que el enfoque se centra en la emulsificación controlada de gotas micrométricas utilizando dos fluidos inmiscibles.

1.1.3. Resistencia fluídica

El concepto de resistencia fluídica, también llamada resistencia hidrodinámica o simplemente resistencia microfluídica, corresponde a la oposición que un elemento fluídico, como una tubería, ofrece a un flujo a través de sí mismo [8]. Cada elemento de un circuito microfluídico ofrece cierta resistencia al flujo que se traduce en una caída de presión. Gracias a ello se puede calcular fácilmente la presión necesaria de su bomba para alcanzar el caudal deseado en su sistema mediante la ecuación de *Hagen-Poiseuille*, la ley de Ohm análoga a la fluídica para la resistencia eléctrica [8]:

$$\Delta P = Q \cdot R_H, \quad (3)$$

donde ΔP es la variación de la presión, Q el caudal y R_H la resistencia fluídica.

La resistencia que ofrece un tubo de sección circular es [4]:

$$R_H = \frac{8\mu L}{\pi r^4} \quad (4)$$

Como podemos observar en la ecuación 4, la resistencia fluídica es proporcional a r^{-4} por lo que en el dominio de la microfluídica podremos observar grandes caídas de presión si los canales por los que circulan las corrientes empleadas son demasiado grandes. Para reducir este impacto se procura utilizar tubos que conecten las bombas con el chip de un diámetro elevado (en términos de microfluídica) y de la menor longitud posible.

1.1.4. Tensión superficial y fenómenos de superficie

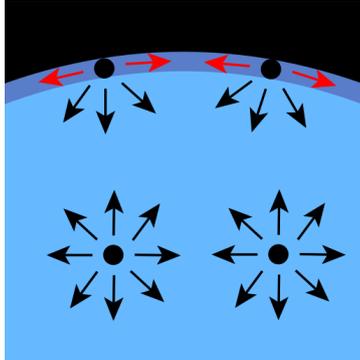
En el dominio de la microfluídica la tensión superficial toma un notorio papel. Además, en el campo concreto de la microfluídica que se abarca en este informe para la producción controlada de microgotas emulsificadas es necesario entender bien su funcionamiento y las consecuencias que tiene en los experimentos.

Las fuerzas de cohesión son las fuerzas entre moléculas de misma sustancia mientras que las *fuerzas de adhesión* son las fuerzas entre moléculas de distinta sustancia [9]. El balance entre las fuerzas de cohesión del líquido y las de adhesión que presenta con otras sustancias determinan propiedades como la tensión superficial y el ángulo de contacto [10].

Este balance da como resultado una fuerza resultante neta hacia el interior del líquido, la cual tiende a minimizar la superficie libre. Esto explica que las gotas de un líquido adopten forma esférica, debido a que es la figura geométrica que presenta la mínima superficie para un volumen dado. Este fenómeno físico da como resultado que la capa de nuestro líquido en contacto con otra fase se comporte como una lámina elástica que ofrece resistencia a aumentar su superficie

[9], definiendo así la *tensión superficial* como la cantidad de energía necesaria para aumentar la superficie de un líquido por unidad de área [11].

En la Figura 2 se ve un diagrama de las fuerzas que dan origen a la tensión superficial (2a) y una imagen de una aguja de metal en la que, a pesar de ser mas densa que el agua, la tensión superficial actúa como una capa elástica del líquido y hace que no se hunda (2b).



(a) Diagrama de fuerzas de cohesión [12].



(b) Ejemplo de tensión superficial sobre una aguja de metal [13].

Figura 2: Diagrama y efectos de la tensión superficial.

Los fenómenos de interfase producidos por las fuerzas de cohesión y adhesión tendrán también un papel crucial a la hora de la generación de micro-gotas en función de si los canales internos son hidrófobos o hidrofílicos. La *capacidad de mojado* de un líquido sobre una superficie se debe a estas fuerzas. Cuando la fuerza de adhesión de un líquido es superior a las fuerzas de cohesión de las moléculas se dice que el líquido es capaz de “mojar” la superficie. La capacidad de mojado de un líquido sobre una superficie se determina mediante el ángulo de contacto; cuando este es menor de 90° se dice que moja, mientras que si es superior de 90° no moja. Cuando una superficie tiene un ángulo de contacto pequeño con el agua se dice que es hidrofílica, pero si posee un ángulo de contacto elevado se dice que es hidrófobo.

En las siguientes secciones se mostrará que para generar gotas de agua en aceite necesitaremos paredes hidrófobas mientras que si queremos gotas de aceite en agua necesitaremos paredes hidrofílicas.

1.1.5. Relación de superficie-volumen

La *relación superficie-volumen* es otro factor que se vuelve importante en la microescala, un canal con unas dimensiones de $50\mu\text{m}$ de alto, $50\mu\text{m}$ de ancho y 30mm de largo contiene un volumen de 75nL dando una relación de superficie-volumen de 800cm^{-1} [4]. Un ejemplo de la ventaja de aumentar la relación superficie-volumen es que la electroforesis capilar es más eficiente en microcanales al eliminar el exceso de calor más rápidamente, aunque desafortunadamente cuando se transportan fluidos mediante un flujo electrocinético [14], la gran relación S-V permite a las macromoléculas difundirse con mayor velocidad y retenerse en las superficies de los canales reduciendo así la eficiencia del bombeo [15].

1.1.6. Miscibilidad

La *miscibilidad* es la propiedad que poseen dos sustancias diferentes de mezclarse en todas las proporciones, es decir, de disolverse completamente una en otra a cualquier concentración

formando una mezcla homogénea, es decir, una solución. Por el contrario, cuando dos sustancias no son capaces de formar una mezcla homogénea de ambas, se dice que son sustancias *inmiscibles* tal y como se observa en la figura 3.

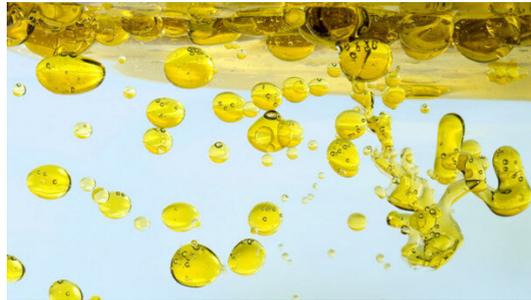


Figura 3: Foto de una mezcla de agua y aceite en la que se observa su inmiscibilidad [16]

En el caso del agua y el aceite la inmiscibilidad se debe a la polaridad. El agua está constituida por moléculas polarizadas mientras que los aceites están constituidos por moléculas no polarizadas. Cuando estas dos sustancias se mezclan, la atracción de las moléculas polarizadas aleja a las no polarizadas haciendo imposible su disolución. Nuestro primer objetivo es conseguir pequeñas gotas de agua en aceite o de aceite en agua y que sean estables. Por ello vamos a necesitar un tensioactivo que modifique la tensión de interfase de ambos.

1.1.7. Surfactantes

Los *tensioactivos*, o surfactantes (del inglés surfactant que a su vez es una abreviación de *surface active agent*), son sustancias que, por medio de la tensión superficial, influyen en la superficie de contacto entre dos fases [17]. Estos cuentan con dos partes diferenciadas: una hidrofílica y una hidrófoba. De esta manera, al generarse las gotas de dos líquidos inmiscibles, el surfactante se encargará de mantener las dos fases en forma de gotas de manera estable haciendo que no se produzca coalescencia (unión de dos o más gotas pequeñas en una más grande con el objetivo de reducir su área interfacial).

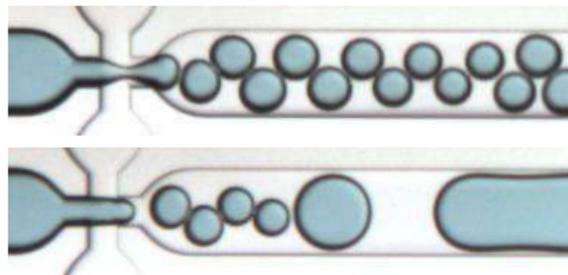


Figura 4: Formación de gotas añadiendo un surfactante y sin añadirlo [18]

En la figura 4 se puede observar cómo, al hacer uso del surfactante, se obtiene una formación controlada y estable de gotas. Por otro lado, al no añadir el surfactante, las gotas empiezan a agregarse rápidamente con el fin de reducir la superficie de interfase y se genera una situación de inestabilidad.

1.1.8. Recubrimiento de las paredes del canal

Como se había adelantado en la sección 1.1.4, la hidrofobicidad de las paredes de los canales limitará la generación de gotas. Esto se debe a que, cuando intentamos formar gotas de agua (fase dispersa) en un medio oleoso (fase continua) en la convergencia de los flujos el agua, en caso de tener un recubrimiento hidrofílico, tenderá a adherirse a las paredes resultando imposible la formación de gotas. En caso de que el recubrimiento de las paredes sea el incorrecto se obtendrá bien una división de flujo, o bien un caso contrario al buscado en el que la fase que buscamos que sea dispersa será la continua. De igual manera en el caso de formación de gotas de aceite en agua es necesario que el recubrimiento de las paredes sea hidrofílico pues se busca que el agua se adhiera a las paredes del canal repeliendo al aceite de las mismas y permitiendo la formación de gotas (Ver figura 5).

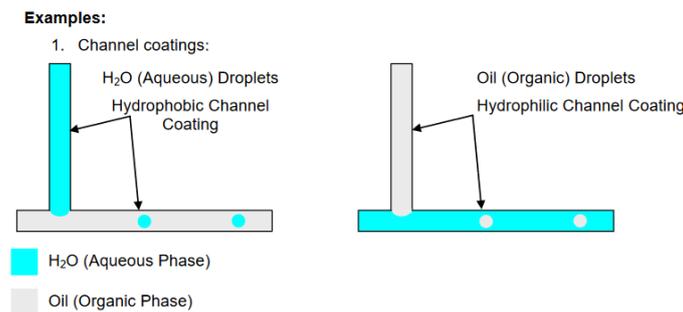


Figura 5: Formación de gotas en función del recubrimiento de las paredes [18]

1.1.9. Viscosidad

La *viscosidad* es una propiedad física de los fluidos que representa la resistencia a fluir, es decir, la medida de su resistencia a las deformaciones graduales producidas por las tensiones cortantes o de tracción que se aplican a dicho fluido [19]. En los experimentos de formación de microfluídica se puede observar que en algunas ocasiones que el flujo se divide en vez de formar gotas de manera estable. Esto se debe a que la viscosidad de la fase dispersa es demasiado alta para el flujo empleado puesto que no da tiempo a formar gotas y estas establecen un flujo estacionario en el canal de salida, como se puede ver en la figura 6.

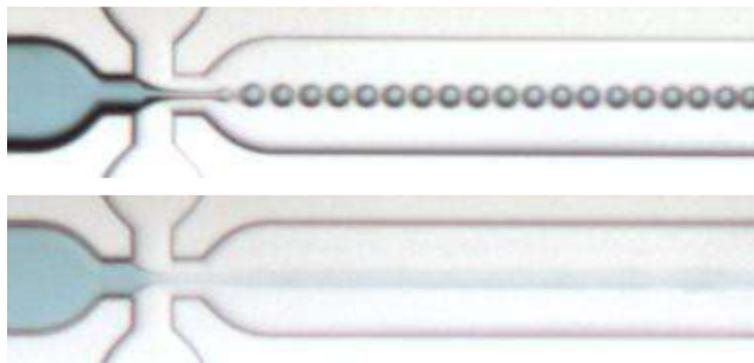


Figura 6: La imagen superior muestra un ejemplo de gotas formadas cuando la fase dispersa tiene un viscosidad de 1cP y la fase portadora tiene una viscosidad de 50cP. La imagen inferior muestra el impacto de aumentar la viscosidad de la fase de gota a 50cP [18].

En las situaciones en las que se presente este fenómeno se debe bajar el flujo de la fase dispersa

para solucionar el problema. Este suceso indica que la formación de gotas tiene un límite para los caudales en función de la viscosidad de la fase dispersa.

La viscosidad tiene otros efectos importantes en el campo de la microfluídica. Se ha demostrado que el número capilar se puede usar para predecir las condiciones necesarias para formar tapones de manera fiable [20]. Cuando los flujos presentan un contraste entre viscosidades de ambos fluidos, los valores umbral del número de capilaridad difieren de los valores umbral del número de capilaridad de flujos de fluidos con viscosidades equivalentes [20].

La microfluídica ha demostrado ser una herramienta poderosa en combinación con biomateriales, generando numerosas posibilidades en diversas aplicaciones. Una de las áreas más destacadas es la ingeniería de tejidos, donde la microfluídica permite crear entornos de cultivo tridimensionales altamente controlados y reproducibles, utilizando biomateriales como andamios o matrices que imitan el entorno natural del tejido [21]. Esto facilita la diferenciación y crecimiento celular, así como la generación de estructuras tisulares funcionales. Además, la microfluídica en conjunto con biomateriales ha revolucionado el campo de la medicina regenerativa. Mediante la combinación de microcanales y biomateriales, es posible crear sistemas de administración de fármacos y terapias celulares precisas y personalizadas [22]. Los dispositivos microfluídicos pueden encapsular y liberar células terapéuticas de manera controlada, maximizando su eficacia y minimizando posibles efectos secundarios [23]. Estas y otras potenciales aplicaciones aseguran la importancia de la incorporación de técnicas basadas en microfluídica en el campo de los biomateriales.

1.2. Biomateriales

Cualquier organismo es susceptible de sufrir enfermedades y dolencias. En tiempos antiguos de la medicina una práctica común ante problemas médicos era la amputación o extirpación de un tejido orgánico. Los primeros biomateriales empleados por la humanidad fueron materiales naturales como la madera, el vidrio o el marfil [24]. Su finalidad era sustituir partes del cuerpo humano. Después de la finalización de la Segunda Guerra Mundial, la situación experimentó un cambio radical debido a la irrupción de desinfectantes, fármacos antibacterianos, inmunizaciones y prácticas sanitarias en los centros médicos. En ese instante, se inició el uso de sustancias químicas de gran flexibilidad como los polímeros en el campo de la medicina para la fabricación de lentes de contacto, mientras que los metales se emplearon para asegurar fracturas mediante la inserción de clavos [25]. A pesar de estas aplicaciones, el objetivo principal era garantizar que el material no representara un peligro o resultara tóxico para los seres humanos. Con el paso del tiempo, surgieron los materiales bioactivos, biodegradables o reabsorbibles, es decir, aquellos que promovieran su integración en el entorno biológico o indujeran una respuesta adecuada. [25]. La definición más extendida de biomaterial viene recogida por la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) y corresponde a “aquellos materiales explorados en contacto con tejidos, organismos o microorganismos vivos” [26]. Al estudio de los biomateriales se le denomina *ciencia de los biomateriales*.

Una de las ramas de estudio de biomateriales más importantes es la de los polímeros de tipo recombinante. Estos son proteínas similares a las que se encuentran en los organismos de los seres vivos con la diferencia de que se ha cambiado uno o varios aminoácidos de su secuencia empleando técnicas de ADN recombinante con el objetivo de cambiar, mejorar o implementar nuevas propiedades [27]. Gracias a estos avances, se han creado diversas aplicaciones en diferentes áreas, como la regeneración de tejidos [28] o la nanomedicina [29]. Entre estas aplicaciones se encuentran la producción de capas protectoras, membranas, paredes y micelas que

tienen la capacidad de formar estructuras de soporte o liberar fármacos de manera controlada. Estas estructuras pueden penetrar en tejidos específicos según su tamaño y alcanzar órganos específicos según su solubilidad característica. Además, el recubrimiento proteico proporciona protección al medicamento contra el entorno externo [30].

1.2.1. Polímeros recombinantes de tipo elastina (ELRs)

Este estudio se centra en un tipo de biomaterial en concreto, los polímeros recombinantes de tipo elastina. La *elastina* es una proteína estructural que se encuentra en los tejidos conectivos del cuerpo humano y otros organismos vertebrados. Es un componente esencial de los tejidos elásticos, como la piel, los vasos sanguíneos, los pulmones y los ligamentos, y que les confiere su capacidad de estiramiento y recuperación elástica [31]. También desempeña un importante papel en la modulación del comportamiento celular y la reparación de los tejidos [32].

La secuencia primaria de la elastina tiene regiones gobernadas por motivos de repetición, como VPGG, VPGVG, APGVG y VGVAPG, estructura que les permite soportar deformaciones grandes sin llegar a romperse y con un comportamiento reversible [33]. Además este proceso tiene como peculiaridad que se produce sin que exista una pérdida de energía, debido a que la energía empleada en estirar una proteína es recuperada cuando vuelve a su estado original, dando como resultado que las fibras elásticas sean capaces de someterse a más de mil millones de ciclos de relajación-estiramiento.

Los polímeros similares a la elastina (*ELP*) son cadenas de polipéptidos artificiales similares a la secuencia de la tropoelastina humana VPGVG sustituyendo la segunda valina por otro aminoácido a excepción de la L-prolina [34]. El avance y desarrollo en técnicas de ADN recombinante ha permitido sintetizar estos materiales, manteniendo un preciso control de su complejidad, longitud, estequiometría y monodispersidad de la cadena. Para evocar todas estas propiedades se desarrolla un nuevo término: *ELR* (del inglés *Elastine-Like Recombinamers*) [35], donde se introduce la palabra “recombinámeros” para enfatizar el hecho de que dichos polímeros tienen una naturaleza tanto oligomérica como recombinante [34].

Los ELRs, debido a sus propiedades inherentes como la biocompatibilidad (ya que los sistemas inmunitarios de los organismos no son capaces de distinguir entre la elastina y un ELR), la naturaleza inteligente y las cualidades mecánicas, hacen que sean adecuados para su uso en una amplia selección de aplicaciones biomédicas y nanotecnologías como la ingeniería de tejidos, los nanodispositivos inteligentes, la administración de fármacos y la purificación de proteínas [34]. El objetivo del estudio y desarrollo de los ELRs no solo se basa en copiar los sistemas ya presentes en la naturaleza, sino también mejorarlos creando compuestos bioinspirados mejorando las propiedades carentes en los materiales naturales [36].

Se pueden crear entonces nuevos polímeros con propiedades exclusivas manteniendo las de la propia elastina como la capacidad de autoensamblaje que presentan o el comportamiento termosensible. Este último da lugar a que los polímeros de tipo elastina presenten una transición de fase reversible a nivel molecular por encima de una determinada temperatura a la que se denomina *temperatura de transición inversa* (T_i) [37]. En solución acuosa y por debajo de esta temperatura la cadena peptídica permanece hidratada y rodeada de estructuras de agua de clarato que rodean los grupos apolares. Esta es una estructura ordenada en la cual las moléculas de agua forman enlaces de hidrógeno entre sí pero presentan interacciones débiles con el grupo apolar creando estructuras de forma pentagonal (Ver figura 8a) con las que recubre dicho resto apolar [38].

Una vez se supere la temperatura de transición, el agua de clatrato comienza a excitarse y su organización de alto nivel desaparece [39]. El polímero se pliega entonces hidrofóbicamente y se ensambla formando una fase separada adoptando estructuras agregadas, mezcla de dos tipos de configuraciones diferentes: configuraciones desordenadas (*random coils*), y adoptando las cadenas una configuración de estructura regular, dinámica y no aleatoria denominada espiral β formada por una sucesión de horquillas β [40] (Ver figura 8).

En la figura 7 se puede ver un diagrama de las cadenas extendidas y desordenadas y plegadas y ordenadas.

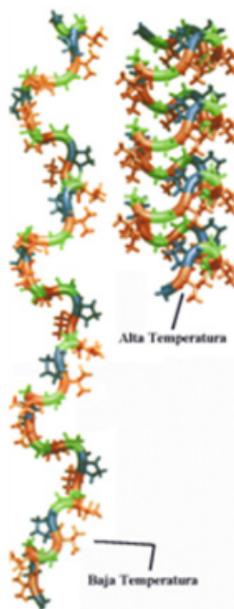
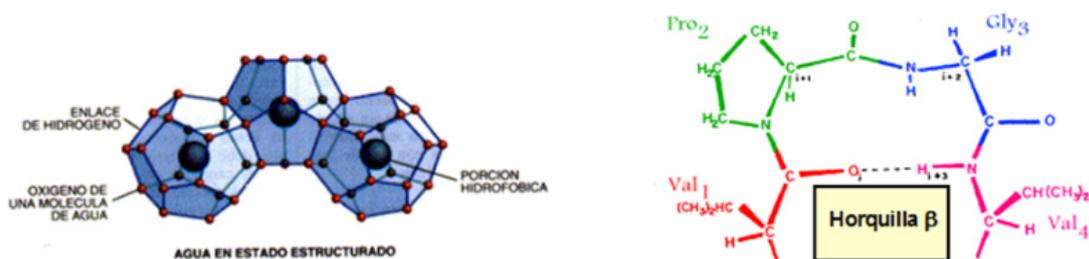


Figura 7: Cadenas poliméricas de un ELR. Extendida y desordenada (izquierda) por debajo de la T_t y plegada y ordenada (derecha) por encima de dicha temperatura [40].



(a) Representación de una estructura tipo clatrato que forma el agua alrededor de restos apolares. (b) Esquema atómico de una horquilla β característica de los ELR.

Figura 8: Esquemas de las estructuras presentes en los ELR [40]

Es destacable observar que los elastómeros basados en secuencias de repeticiones elásticas (ELRs) exhiben una capacidad notable para adquirir estructuras más ordenadas a medida que se incrementa su temperatura. Esto es debido a que en la mayoría de las proteínas el aumento de temperatura conlleva su desplegamiento y desnaturalización. Para comprender este proceso

desde la perspectiva termodinámica, es necesario considerar el sistema en su totalidad. Durante el proceso de calentamiento, el polímero se pliega de forma hidrofóbica, lo que resulta en un incremento del orden a nivel local. No obstante, la cantidad de orden generado se ve ampliamente superada por el desorden causado por la ruptura de las estructuras de agua de clatrato, que ocurre debido a la agitación térmica. Por lo tanto, es este aumento en la entropía el que actúa como la fuerza impulsora detrás del plegamiento [40].

La cantidad de energía térmica que es requerida para desencadenar este proceso depende de la relación entre el agua y el polímero; parámetros como la concentración polimérica [41], la longitud del ELR, la composición de aminoácidos [42], el pH [39] o la fuerza iónica [43] modulan dicha relación determinando la formación de clatratos de diferente grado de perfección.

1.3. Objetivos

El objetivo de esta investigación consiste en aplicar las técnicas establecidas de generación de microgotas mediante microfluídica (Figuras 4 y 5) en el área de los recombinámeros de tipo elastina (ELR). Con este propósito, se pretende crear dichas microgotas utilizando una solución polimérica y evaluar los resultados obtenidos. El esquema de trabajo propuesto se describe a continuación:

- Puesta a punto de los diferentes chips de microfluídica, para ello se caracterizará el tamaño de las gotas resultante en función de los caudales de la fase dispersa y la fase continua. Se pretende también observar cual es el efecto de la viscosidad en estos dispositivos. Con ello se pretende recopilar los resultados obtenidos para su replicación en futuros experimentos.
- Caracterización de una proteína recombinante basada en la elastina. Se caracterizará su peso molecular, se comprobará su carácter proteico mediante un estudio de su espectro infrarrojo y se hallará su temperatura de transición característica.
- Por último se estudiará el empleo de dicha proteína recombinante en la técnica de formación de gotas con microfluídica para la creación de estructuras a microescala en el interior de las emulsificaciones.

2. Materiales y métodos experimentales

En esta sección, se proporcionará una descripción detallada de los materiales y métodos utilizados a lo largo de todo el procedimiento experimental. Se presenta una descripción de los componentes y materiales usados para llevar a cabo los experimentos de microfluídica entre los que se incluyen los chips y sus tipos de convergencia de flujo. También se muestran los pasos a seguir del montaje de los mismos así como las técnicas empleadas para su limpieza. Finalmente se describe la proteína recombinante a estudiar y los métodos empleados para conocer su temperatura de transición, su peso molecular y su espectro infrarrojo. Como último paso se describe el montaje del sistema para la incorporación de dicha proteína en un experimento de microfluídica además de la descripción del mismo.

2.1. Lab on a Chip y material empleado en microfluídica

Una vez conocidos los fundamentos sobre microfluídica se procede a exponer los dispositivos y materiales necesarios con el fin de realiza los experimentos de microfluídica.

Un LoC (*Lab on a Chip*) es un dispositivo único en cuyo interior se va a realizar todo el experimento de microfluídica. El término es utilizado en este caso debido a que se asemeja a un laboratorio en miniatura, en el cual se lleva a cabo la totalidad del experimento [44]. Nos referiremos a él como LoC o simplemente como chip. Se han empleado dos dispositivos *Large Droplet Junction Chip* de *Dolomite* con un tamaño de canal de $190\mu\text{m}$ (<https://www.dolomite-microfluidics.com/product-category/microfluidic-components/microfluidic-chips/>), uno de recubrimiento hidrofílico y otro de recubrimiento hidrófobo.

Estos cuentan con dos tipos de uniones para la convergencia de flujos diferentes: una unión de flujo cruzado (*cross-flow* en forma de T) en la que el el flujo incidente de la fase dispersa incide de manera perpendicular a la fase continua, y una unión de enfoque de flujo (*flow-focusing*) en forma de X en la cual la fase continua incide por dos canales de manera perpendicular sobre la fase dispersa. Pueden verse ambas uniones en la figura 9. Se ha procedido a la caracterización de ambos empleando agua y un mismo aceite. Esto permitirá sacar conclusiones respecto a los efectos de la viscosidad en la generación de microgotas.



Figura 9: LoC empleado en los experimentos señalando cada una de sus uniones de convergencia de flujos.

Sin embargo, es importante destacar que se requieren múltiples dispositivos adicionales para el funcionamiento adecuado del chip. Estos dispositivos incluyen:

- Dos bombas capaces de mover flujos de caudales de al menos, el orden de los $\mu\text{L}/\text{min}$. Es necesario el uso de 2 bombas independientes ya que se busca caracterizar el tamaño de las

gotas resultantes en función de la tasa entre el flujo de la fase dispersa y la fase continua. Se han utilizado una bomba de jeringas *Harvard PHD2000 Programmable*, que usualmente se empleará para la fase dispersa puesto que es capaz de llegar a flujos muy pequeños (al menos de $1\mu\text{L}/\text{min}$), y una bomba peristáltica *Masterflex Ismatec ISM596D*, que se usará de manera habitual para la fase continua debido a que el caudal más pequeño que es capaz de producir es de $14\mu\text{L}/\text{min}$.

- También es necesario el uso de tubos que conecten nuestras bombas con el LoC. Se han empleado tubos de politetrafluoroetileno (PTFE) más comúnmente conocido como teflón *Dolomite PTFE Tubing, 1/16" OD x 0.8mm ID*, es decir, de 0,8mm de diámetro interno.
- Para poder utilizar el chip son necesarios una interfaz de chip en forma de H, en la cual se encaja el chip, y 2 conectores lineales de 4 vías para poder conectar los tubos al chip de la marca *Dolomite* que se atornillan a la interfaz.
- Para la visualización de las gotas se ha empleado un microscopio óptico *Leica DFC 3000G*. Este mismo microscopio cuenta con una cámara digital capaz de visualizar en directo las muestras que se quieran observar a través del programa *LAS X*; con el que además se han tomado las distintas imágenes de las gotas.

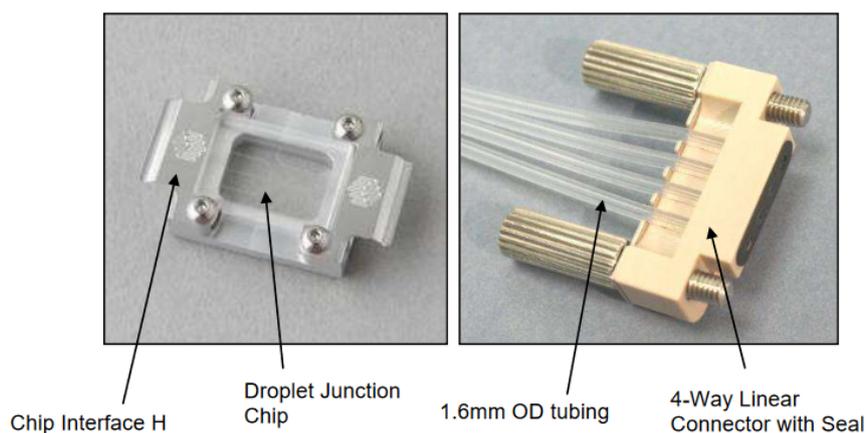


Figura 10: Componentes del dispositivo de microfluídica: La interfaz de Chip en H, el Chip, los tubos de conexión con las bombas y uno de los 2 conectores lineales [18].

Además de los distintos dispositivos para el montaje completo del sistema se ha hecho uso de los siguientes fluidos:

- Agua destilada.
- Aceite de inmersión *Sigma Immersion oil 56822* el cual posee una viscosidad de 100-120 mPa.s a temperatura ambiente.
- Surfactante SDS en una concentración de 10% en la fase acuosa.

En todos los experimentos se ha empleado una mezcla de agua destilada y surfactante SDS con una concentración del 1%, tanto en la generación de gotas de agua como en las de aceite tal y como nos indicó el fabricante. En caso de observarse coalescencia de las gotas se debería aumentar la concentración del tensioactivo.

2.1.1. Tipos de convergencias de flujo

Los chips utilizados en los experimentos cuentan con dos tipos de confluencias de flujo: en forma de T y en forma de X.

Unión en T (Cross-Flow). En los dispositivos de Cross-Flow el líquido presente en la fase dispersa obstaculiza parcialmente el flujo constante del líquido principal, lo que da lugar a un gradiente de cizallamiento que provoca el estiramiento de la corriente de líquido disperso y su fragmentación en pequeñas gotas (ver figura 11). El tamaño de estas gotas está determinado por las velocidades de flujo, las dimensiones de los canales microscópicos y las viscosidades de los líquidos inmiscibles. Los dispositivos de generación de gotas mediante flujo cruzado producen gotas de tamaño uniforme y son de fácil manejo [45]. Son ideales para experimentos simples de microfluidica y es el tipo de generador que se ha empleado en este informe para la generación de gotas con ELR disuelto.

Unión en X (Flow-Focusing). En los dispositivos de Flow-Focusing los líquidos de fase continua y dispersa fluyen coaxialmente a través de una zona de constricción de tal manera que la corriente del líquido a emulsionar está rodeada por las dos corrientes del fluido en fase continua (ver figura 11). Además, la estabilidad del proceso de emulsificación depende también de la humectación preferencial de las paredes del Chip por el líquido de fase continua. En general, los generadores de gotas de enfoque de flujo se utilizan para la generación de alta frecuencia de gotas con dimensiones en el rango de decenas a cientos de micrómetros [45].

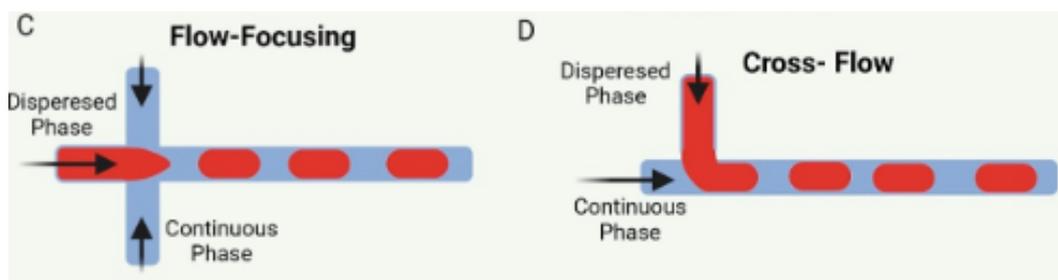


Figura 11: Esquema de funcionamiento de Flow-Focusing y Cross-Flow para la generación de gotas en microfluidica [45].

2.2. Realización experimental

Esta sección consiste en el estudio de las técnicas de formación de gotas mediante técnicas de microfluidica; a continuación se expondrán los pasos que se siguieron para poder llegar a los resultados esperados. Tanto en el caso hidrofílico como el hidrófobo el montaje del dispositivo y la realización del experimento es igual, a excepción de los fluidos que forman cada fase (dispersa y continua) por lo que durante todo el desarrollo de la sección se utilizará solo los términos de *fase dispersa* para el fluido que vaya a formar las gotas y *fase continua* para aquel en el que se van a encontrar estas últimas emulsificadas.

2.2.1. Limpieza y cuidado del LoC

El chip de microfluidica es tan solo un pequeño dispositivo de cristal de pocos cm^2 , de un tamaño menor al de una moneda; esto implica que es un dispositivo ciertamente delicado y hay que tener cuidado a la hora de tratarlo. Se realizaron los siguientes pasos para su limpieza

debido a que en su utilización previa a este trabajo se formaron bloqueos en el interior de sus canales:

- *Limpieza con etanol*: lo primero que se intentó para eliminar restos de polímero fue hacer fluir por los canales una disolución de etanol y agua 70 % aplicando flujos altos por los canales. Con esto se consiguió eliminar los taponamientos de mayor tamaño pero no se consiguió eliminar el material más adherido a las paredes.
- *Limpieza con aire comprimido*: Tras esto se empleó un compresor de aire para hacer circular aire a presión por los canales con cuidado de no sobrepasar los 10 bar de presión que indica el fabricante [18]
- *Limpieza con ácido clorhídrico*: Tras varios intentos con alcohol y aire comprimido (y un intento con acetona) se consultó al fabricante la utilización de ácido. Se utilizó una disolución de un 10 % en agua de ácido clorhídrico y se hizo fluir por todos los canales. Tras esto el chip quedó libre de obstrucciones y suciedad en su interior y se pudo proceder a la búsqueda de la creación de microgotas.

Como labores cotidianas de limpieza se empleó una máquina de ultrasonidos posteriormente a toda utilización del chip para evitar que se formasen nuevas obstrucciones o se ensuciasen las paredes del chip. También se limpia con etanol antes de guardarlo.

2.2.2. Montaje del sistema

Se describe a continuación todos los pasos necesarios para poder empezar el experimento y obtener de manera satisfactoria una formación controlada de gotas, empezando por el montaje.

Como primera consideración cabe destacar que el chip y los distintos componentes que componen el dispositivo de microfluídica deben estar secos. Las gotas de los distintos fluidos utilizados que queden en las superficies de contacto entre los distintos dispositivos pueden hacer que no se logre un buen sellado entre las conexiones que conectan los tubos con los canales del chip; en caso de tener que desmontar el chip por alguna razón se debe proceder a una limpieza de todos los componentes con alcohol y su posterior secado con la finalidad de limpiar los restos de aceite y agua que queden impregnados por los distintos componentes y proceder de nuevo a su montaje.

Se coloca el chip en el interior de la interfaz en H (ver figura 10) y se procede a atornillar los conectores lineales a dicha interfaz. Es importante colocar tubos en todas las conexiones de los conectores lineales para evitar fugas tal y como indica el fabricante [18].

Posteriormente debe ser conectado a las bombas. Dependiendo de qué unión de flujo de las 2 disponibles (Figura 12) queramos utilizar el montaje variará ligeramente. En dicha figura se ha añadido un nombre a cada canal con el objetivo de indicar con mayor facilidad su indicación en la descripción del montaje del sistema.

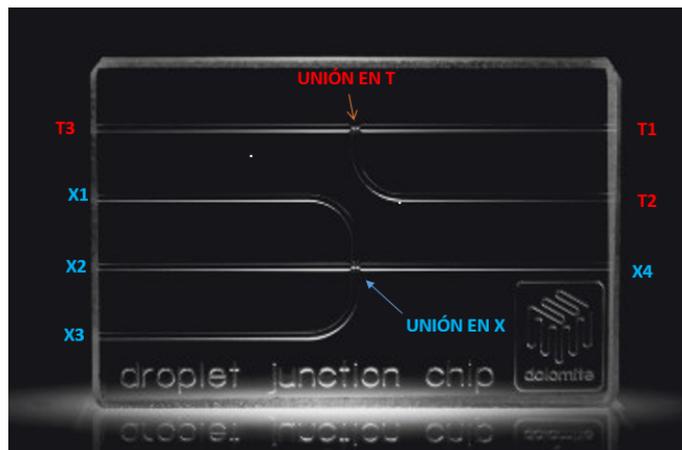


Figura 12: Chip utilizado en los experimentos indicando las 2 uniones de flujo.

En el caso de la unión en T se colocan 2 tubos de igual tamaño en ambas entradas del chip (T1 y T2, ver figura 12) y un último tubo lo suficientemente largo para recoger las gotas en una placa petri. En el resto de entradas de los conectores lineales se colocan pequeños tubos tal y como se ha indicado con anterioridad. El tubo conector de la fase dispersa (T2) se conecta mediante una aguja del mismo tamaño que el interior del canal a una jeringuilla de 7,6mm de diámetro; esta se coloca en la bomba para jeringuillas *Harvard PHD2000*. El tubo saliente de T1 debe conectarse mediante una unión al de la bomba peristáltica; este conector es un dispositivo que se introduce a presión en el tubo de la bomba peristáltica y se conecta a rosca con el tubo del chip al que se le ha añadido un pequeño cabezal de plástico que se coloca en el extremo del tubo para que no existan fugas en la conexión. Sin embargo este cabezal con el uso hace que vaya cogiendo cierta soltura y pueda presentar fugas.

En cuanto al montaje del dispositivo en la configuración en X es similar al cross-flow; con la diferencia de que, debido a limitaciones en la bomba peristáltica, tenemos que utilizar un divisor de flujo en forma de T. Este tiene un funcionamiento muy similar al dispositivo de conexión entre la bomba y el tubo que conecta con el chip. Ambos tubos de la fase continua (X1 y X3) deben conectarse a este divisor de flujo el cual, mediante el empleo de otro tubo, se conectará a la bomba peristáltica de igual manera que en el caso anterior. De nuevo en este conector se conectan los tubos con los mismos cabezales que en la conexión con la bomba. Hay que tener en cuenta que como se divide el flujo por 2 canales, por cada uno de estos ahora fluye una corriente aproximadamente de la mitad del flujo que produce la bomba.

El principal problema que presenta este tipo de montaje es que hemos añadido tres conexiones que pueden presentar pequeñas fugas que dan lugar a caídas de flujo por lo que es habitual tener que desmontar el chip y las conexiones para poder secarlo y cambiar los tubos o los propios cabezales.

2.2.3. Generación de microgotas

El objetivo principal de esta sección es ver como varía el tamaño de las gotas de manera dependiente del flujo de ambas fases. También se hará una comparativa entre los dispositivos hidrofílico e hidrófobo viendo como cambia el tamaño de las gotas intercambiando las fases dispersa y continua. Una vez tengamos el dispositivo en cualquiera de sus versiones y en cualquiera de sus 2 configuraciones de unión de flujo los pasos a seguir siempre son los mismos:

- Primero se coloca el dispositivo en un microscopio óptico para poder visualizar bien la formación de gotas en tiempo real. Se ha empleado un microscopio óptico en vez de una lupa digital, ya que usualmente los flujos son lo suficientemente altos como para que la tasa de refresco de captura de imágenes de una lupa digital no sea lo suficientemente rápida como para apreciar la formación de gotas en tiempo real en el canal de salida.
- Una vez el sistema esté acomodado encendemos las bombas y se ponen a flujos relativamente altos (de unos $100\mu L/min$) para llenar todos los tubos y los canales y ver que el dispositivo no presenta fugas.
- Una vez comprobado que el dispositivo funciona correctamente y no presenta fugas se detiene el flujo de la fase dispersa o se baja a un ratio muy pequeño y de igual manera con el de la fase continua (usualmente a $15\mu L/min$).
- Posteriormente se realiza un barrido de flujos dejando un espacio de tiempo prolongando el chip generando gotas. Esto se hace con la finalidad de tener suficientes gotas y observarlas fácilmente en el microscopio. Además así puede verse una gran cantidad de gotas y saber si las gotas de un mayor o menor tamaño a la media son comunes o poco frecuentes.
- Como último paso se ha procedido a usar el programa *LAS X* del microscopio para visualizar las gotas generadas por el chip y poder realizar las medidas de las mismas. Esto se ha llevado a cabo midiendo una por una varias de las gotas generadas con la herramienta de regla del propio programa.

En este estudio no se ha procedido a efectuar un conteo de gotas generadas, es decir, un estudio del número gotas generadas por unidad de tiempo en función de los flujos aplicados. Aún así, existen diferentes métodos de conteo de gotas; entre ellas la detección por láser. En esta la detección óptica se basa en una fuente de luz dirigida que ingresa a los microcanales y detecta gotas. Las gotas se pueden detectar añadiendo un material fluorescente a estas que procede a excitarse y detectando la luz dispersada hacia atrás o hacia adelante o incluso reflejada [46]. También son relevantes las técnicas eléctricas para la detección de gotas microfluídicas [46].

2.3. Polímero recombinante de tipo elastina empleado

El ELR fue producido mediante técnicas recombinantes por el grupo de investigación BIO-FORGE. En la sección 1.2.1 se ha especificado que los biomateriales ELR poseen una secuencia similar a la de la tropoelastina humana sustituyendo la segunda Vanila (V) por un aminoácido invitado X (*VPGXG*) [34] capaz de cambiar la temperatura de transición y como consecuencia sus propiedades fisico-químicas. Las propiedades adquiridas van a depender de los caracteres de cada aminoácido. En este caso se ha trabajado con el polímero $K_{48}I_{60}$, el cual se trata de un polímero anfifílico; es decir, posee un extremo hidrófobo y otro hidrofílico. Está compuesto por los bloques I_{60} hidrofílico y K_{48} hidrofóbico (que dan lugar al nombre del propio polímero)

- I_{60} : (*VGIPG*)₆₀V, siendo la Isoleucina (I) el aminoácido invitado.
- K_{48} : (*VGKPG*)₄₈V, siendo la Lisina (k) el aminoácido invitado.

La principal característica de este polipéptido es que el bloque K_{48} está cargado positivamente a un pH neutro, dado que la lisina (K) está ionizada con un grupo amino. Esta característica le proporciona aplicaciones muy interesantes como el co-autoensamblado con otros polipéptidos como el $E_{50}I_{60}$ [47], el cual es otro polímero recombinante anfifílico que contiene ácido glutámico E que está ionizándolo negativamente con un grupo carboxilo a un pH neutro.

La combinación de varios polímeros aplicados al campo de la generación de gotas mediante técnicas de microfluídica posee un alto interés debido a las interacciones que realizan entre estos y que, al poder poseer temperaturas de transición desiguales, pueden generar estructuras con geometrías complejas [48]. Con estas estructuras se espera la capacidad de encapsular células, la fabricación de células sintéticas y orgánulos sin membranas entre otras.

2.4. Caracterización del ELR

En esta sección vamos a ver los métodos experimentales empleados para caracterizar el polímero recombinante mediante diversas técnicas. Con ellas podremos analizar su estructura, composición y propiedades como la temperatura de transición. Nuestro objetivo en esta sección es comprobar que el lote del polímero es correcto comprobando que coincida con el peso molecular, el espectro infrarrojo y la temperatura de transición teóricas tal y como se ha indicado en la sección 1.3.

2.4.1. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis es un método de separación de biomoléculas, ya sean ácidos nucleicos o proteínas, según su movilidad y características en un campo eléctrico. Esta separación ocurre en una matriz porosa, cuya composición varía dependiendo del tipo de biomolécula que se está analizando[49].

En particular, la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) es una técnica que aprovecha la carga eléctrica de las moléculas para moverlas a través de un gel, el cual se encarga de desnaturar las proteínas y hacerlas lineales. Este proceso es valioso para analizar la composición de las subunidades proteicas, verificar la uniformidad de una muestra de proteínas y purificarlas para su uso en otras aplicaciones [50]. Con este método podemos dividir las proteínas en función de su tamaño y peso molecular. Mediante el uso de una muestra conocida o *maker*, por comparación con nuestra muestra a analizar, podemos estimar su peso molecular.

El SDS se trata de un detergente aniónico (cargado negativamente) capaz de disolver moléculas hidrofóbicas y desnaturar estructuras secundarias y terciarias. Las proteínas que se disuelven en SDS presentan una estructura primaria y una carga negativa con una relación similar entre carga y masa para todas las proteínas. Esto hace que, en presencia de un campo eléctrico, migren hacia el ánodo, es decir, hacia el polo positivo. Por otro lado, la poliacrilamida, que es un polímero compuesto por monómeros de acrilamida, forma una matriz de gel que actúa como un tamiz [50]. Esta matriz ralentiza la velocidad de migración de las moléculas más grandes de manera más significativa que la de las moléculas más pequeñas. Bajo la aplicación de un campo eléctrico, las proteínas migran a través de los poros de la matriz. El tamaño de los poros viene determinado por la concentración de la acrilamida de manera que a mayor concentración de esta, menor será el tamaño de los poros generados. La velocidad de migración de una proteína durante la electroforesis está influenciada por varios factores, como el tamaño de los poros en el gel, así como la carga, tamaño y forma de la proteína misma. Tras el paso de un período de tiempo determinado, dependiendo del voltaje aplicado al gel, las proteínas comenzarán a migrar de manera diferencial de modo que las proteínas más pequeñas se desplazarán hacia regiones más bajas del gel, mientras que las proteínas más grandes se mantendrán más cerca del punto de origen debido a que les resulta más difícil atravesarlo [50].

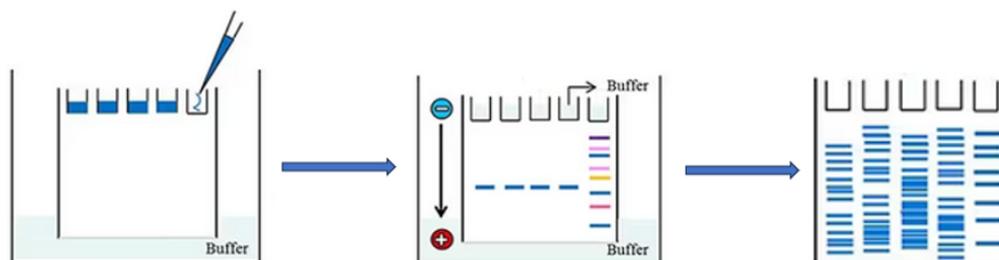


Figura 13: Esquema de funcionamiento de una electroforesis SDS-PAGE [51].

En cuanto a la realización de la electroforesis los pasos a seguir son los siguientes:

Primero se prepara una disolución de los polímeros con una concentración de 1mg/mL en agua MiliQ. Tras esto se extrae $16\mu\text{L}$ de disolución y los teñimos con $4\mu\text{L}$ de un buffer “Protein Loading x5” obteniendo así una muestra tintada de un total de $20\mu\text{L}$ para poder tener una clara visualización de la muestra, como se muestra en la figura 13.

Posteriormente se prepara el propio gel de poliacrilamida. Dependiendo del peso de los polímeros a estudiar es necesario escoger una concentración determinada del gel de poliacrilamida; en nuestro caso se utilizó una concentración del 12% siguiendo el protocolo indicado, ver figura 31 en el anexo.

Una vez hecho el gel y la disolución muestra del polímero se introduce un total de $4\mu\text{L}$ en cada uno de los pequeños pozos del peine y $5\mu\text{L}$ del maker.

El último paso consiste en conectar a una fuente de 25mA de corriente. El gel se encuentra sumergido en una solución que contiene una cantidad abundante de electrolitos para que se transmita la corriente y se mantenga un pH constante. Tras 80 minutos se hace una fotografía al resultado. El modelo empleado en el experimento fue un *Gel Doc EZ Imager*, del fabricante *BIO-RAD*.

2.4.2. Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia infrarroja es la medida de la absorción (o transmisión) de radiación infrarroja por un material en función de la longitud de onda (o frecuencia). El resultante de la absorción (o transmisión) en función de la longitud de onda se trata del *espectro infrarrojo*. Las moléculas poseen un patrón de bandas característico (asociado a las vibraciones entre átomos [52]) de absorción de infrarrojos correspondiente a las vibraciones de los enlaces moleculares que poseen [53].

La espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier o FT-IR (*Fourier-Transform Infra-Red Spectroscopy*) es una técnica empleada para estudiar la presencia de enlaces químicos en distintos materiales y los grupos funcionales presentes en este. Haciendo incidir radiación infrarroja sobre nuestro material, si esta coincide con la frecuencia de resonancia del mismo, la vibración molecular amplificará la intensidad de la señal dando lugar a un pico en el espectro infrarrojo [54]. Podemos analizar esto con el empleo de un interferómetro de Michelson. Con el uso de un espejo fijo y otro móvil situamos nuestra muestra en el detector de salida del sistema. El haz de radiación incidente entra al sistema e incide sobre el divisor del haz, este separa la radiación y la divide, una hacia el espejo móvil y otra al espejo fijo. Tras esto el haz

se recombina generando una interferencia y llega al detector pasando por la muestra.

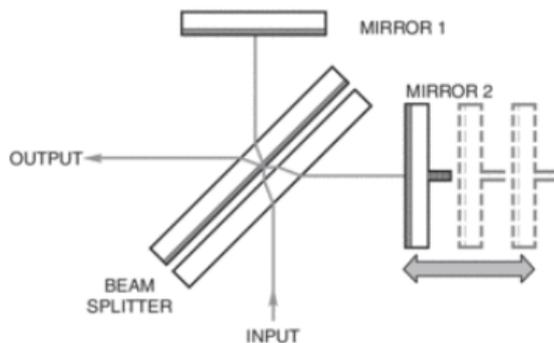


Figura 14: Esquema de un interferómetro de Michelson usado en espectroscopia infrarroja [55]

El resultado es un interferograma que representa la intensidad en función del tiempo. La intensidad resultante se evalúa en relación al desplazamiento del espejo móvil en comparación con su posición inicial. De esta manera, al aplicar una Transformación de Fourier, se pueden identificar los puntos máximos de intensidad correspondientes a las diferentes frecuencias de resonancia. Esto permite determinar las conexiones o vínculos presentes en la muestra analizada. [55].

Sin embargo existe el problema de que algunas bandas pueden llegar a solaparse, esto hace que, de manera general, el espectro IR no sea suficiente para identificar el origen de los diferentes picos de una muestra. No obstante se trata de una técnica excelente para comprobar la calidad de nuestro material si conocemos la composición que debería tener. Mediante el uso de tablas de espectroscopia [56] podemos saber si nuestro espectro corresponde al que debería según el material con los enlaces concretos que posee. En el caso de los ELR, al tener una estructura muy similar al de la elastina deben presentar un espectro infrarrojo muy similar a esta. También es una técnica muy útil para comparar el espectro de un material concreto tras realizarle una modificación química [57].

Se ha utilizado un equipo de espectroscopia infrarroja *Bruker modelo 27 Tensor* equipado con un dispositivo de reflexión total atenuada (ATR). Gracias a dicho dispositivo ATR se logra que la radiación infrarroja penetre en un material de alta refracción y experimente una reflexión interna total. Durante este proceso, parte de la radiación infrarroja es absorbida por la muestra, que se encuentra en contacto con el material, lo cual asegura que la radiación solo afecte a una pequeña porción de la muestra, evitando así su degradación. Además, se pueden obtener espectros sin requerir preparación previa de la muestra.

Se procedió a limpiar con acetona el lugar en el que se deposita la muestra con el fin de eliminar resto de otras pruebas y polvo. El programa utilizado para la toma de datos es el software OPUS 6.5 el cual nos permite tomar mediciones en un rango de 600 a 4000cm^{-1} . Se realizó una medida de la radiación fondo tras la cual se colocó una pequeña muestra de material (de entorno a 5mg) liofilizado. Finalmente se tomó la medida del espectro de nuestro biomaterial mediante 64 medidas con una resolución de 2cm^{-1} .

2.4.3. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido o DSC (*Differential scanning calorimetry*) es una técnica experimental ampliamente utilizada en ciencia de materiales. Nos permite determinar la

cantidad de calor que una sustancia absorbe o libera cuando se mantiene a una temperatura constante durante un período de tiempo específico, o cuando se calienta o enfría a una velocidad constante dentro de un rango de temperaturas determinado. Gracias a esto podemos determinar temperaturas de transición de fase de los materiales y su estabilidad térmica [58].

El funcionamiento de un dispositivo DSC consiste en la disposición de dos cápsulas denominados crisoles; en una de ellos se alberga la muestra a analizar mientras que en el otro una muestra de referencia. En este caso dentro de la cápsula de referencia se coloca el disolvente empleado para disolver el polímero: agua ultrapura MiliQ. Los dos crisoles deben contener la misma masa debido a que el dispositivo va a analizar los intercambios de calor entre ellos. El DSC cuenta con dos calentadores para cada uno de los dos crisoles y un sistema encargado de controlar que la velocidad de calentamiento sea la misma. Si se detecta cualquier diferencia de temperatura, los calefactores individuales se corregirán de tal manera que la temperatura se mantendrá igual en ambos crisoles. De esta manera cuando tiene lugar un proceso endotérmico o exotérmico el dispositivo se encargará de compensar la energía necesaria para mantener la misma temperatura [58].

Podemos obtener así un termograma que represente la energía transferida como variación de calor en función de la temperatura y con esto determinar temperaturas a las que ocurren determinados procesos térmicos. En nuestro caso vamos a utilizar el DSC para determinar la temperatura de transición inversa T_t del polímero a caracterizar ($K_{48}I_{60}$).

En este informe se empleó un dispositivo *DSC Mettler Toledo 822e* refrigerado mediante nitrógeno líquido. Se realizó una disolución del polímero a estudiar de 50mg/mL y se mantuvo en agitación a unos 4°C. Como indicamos anteriormente el pH influye a la hora de establecer la temperatura de transición de un ELR [39]. En este caso el pH es de 7,4. Para la toma de medidas se añadió a cada uno de los crisoles 20mg gracias al uso de una balanza de precisión *XS105 Mettler Toledo* colocada sobre una mesa anti-vibraciones de granito. En uno de ellos se añadió la disolución muestra y en el otro el disolvente referencia. Las muestras se mantuvieron en frío durante todo el proceso de pesaje y medida del pH.

Con el software *Mettler* se procedió a las medidas para localizar la temperatura de transición. Es importante destacar que el programa está configurado de manera que los picos endotérmicos apunten hacia abajo. Más adelante se presentarán los resultados obtenidos.

2.5. Generación de microestructuras de ELR en el interior de las gotas

Una vez terminada la caracterización del ELR se procede a trabajar con dicha proteína recombinante en el dispositivo de microfluídica siendo el objetivo crear estructuras dentro de las gotas de agua. El procedimiento a seguir ha sido el siguiente:

Primero se realiza un intercambio entre las bombas debido a que la disolución debe estar a baja temperatura, de manera que se encuentre por debajo de su temperatura de transición y el ELR se encuentre disuelto en el agua. (Figura 7).

Con esta configuración se utiliza la bomba peristáltica para la fase continua ya que esta adquiere el fluido directamente de un recipiente que vamos a mantener en frío. Durante la realización del experimento el cabezal encargado de sellar la conexión entre el tubo que conecta con el chip y la bomba empezó a presentar fugas. La sustitución de nuevos cabezales para intentar solventar el problema dieron lugar al mismo resultado, por lo que ha sido imposible determinar

el flujo concreto de la fase continua, puesto que aunque la bomba funcionase a su mínimo valor no sabemos que parte del flujo se pierde en la conexión.

Debido a que la disolución debe estar por debajo de la temperatura de transición hasta la formación de las microgotas se introduce la disolución en un eppendorf introducido en hielo y tanto el tubo por el que circula la disolución como el canal del chip de esta son enfriados previamente haciendo fluir por ellos agua destilada con surfactante. De esta manera se asegura que el polímero no transicione antes de tiempo. Se coloca el eppendorf encargado de recoger la muestra en un calentador a 37°C con la finalidad de que transicione lo antes posible y genere las estructuras deseadas dentro de las gotas.

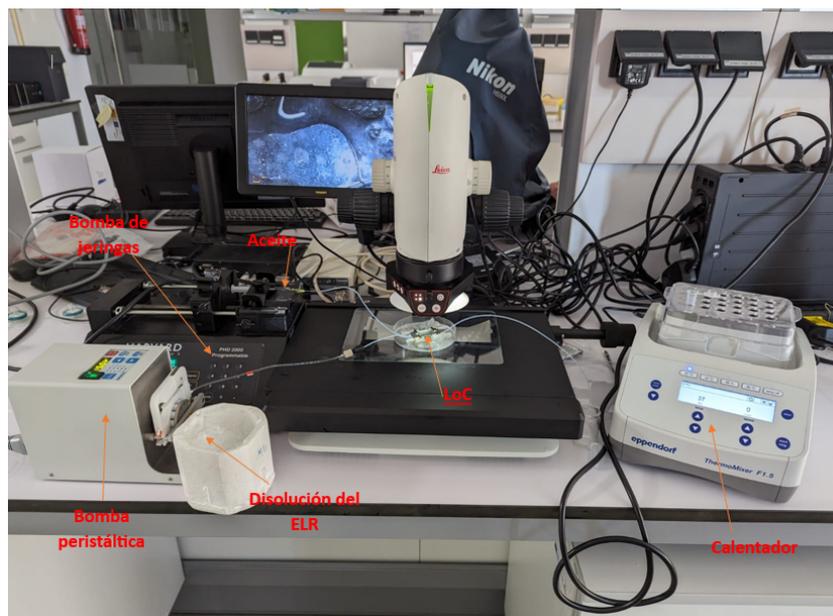


Figura 15: Imagen del sistema de microfluídica para generar gotas de agua con ELR e indicación de sus distintos componentes. El chip está situado en una lupa digital *Leica* para comprobar que el polímero no transicionase antes de tiempo en el interior del canal.

Para este experimento se ha utilizado una disolución de 20 mg/mL de ELR en agua ultrapura MiliQ con un 1% de surfactante SDS y como fase dispersa de nuevo se ha empleado el aceite *Sigma Immersion oil*.

3. Discusión de resultados

3.1. Generación y estudio de gotas

Como ya se había indicado, gran parte de este trabajo se centra en el estudio del funcionamiento de un chip de microfluídica para la generación de gotas mediante la emulsión controlada de dos líquidos inmiscibles; en esta primera sección de resultados se presentan los obtenidos de las distintas mediciones y su análisis.

3.1.1. Dispositivo hidrofílico

Una vez realizado el montaje del sistema se procedió a la realización de un estudio completo del tamaño de las gotas en función del flujo de la fase continua y dispersa para ambos dispositivo. Primero se trabajó con el dispositivo de paredes interiores de los canales con recubrimiento hidrofílico, es decir, con aquel capaz de producir gotas emulsificadas de aceite en agua. En la figura 16 vemos como varían de tamaño las gotas en función del flujo de la fase continua fijando un flujo para la fase dispersa a emulsificar para la unión en T.

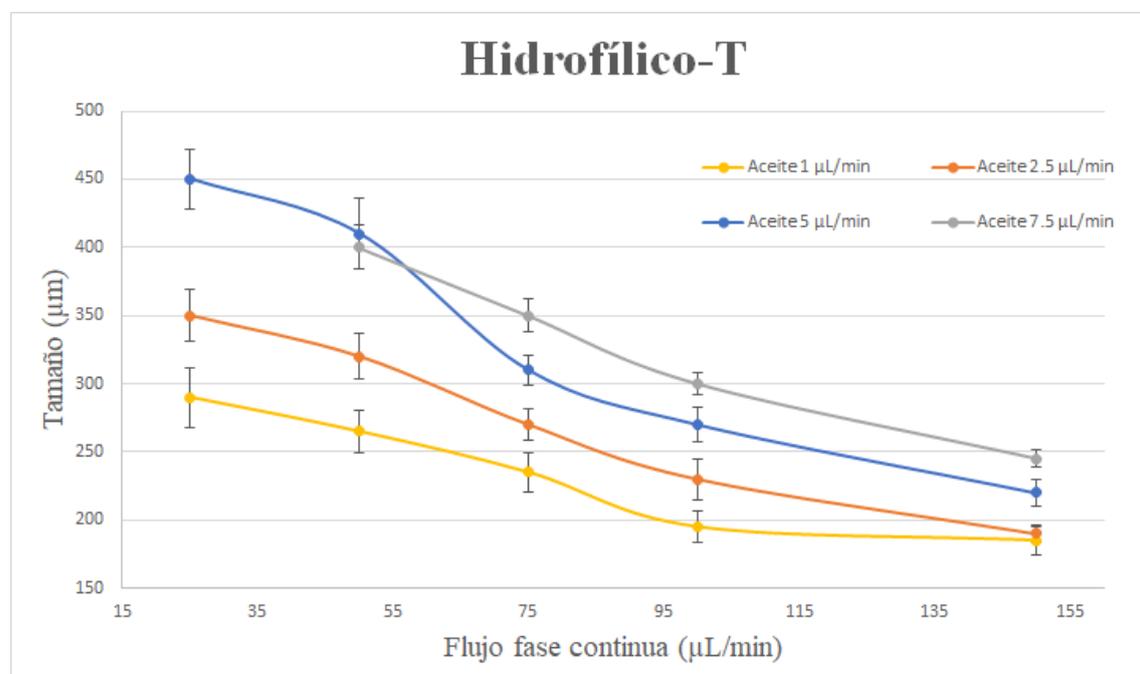
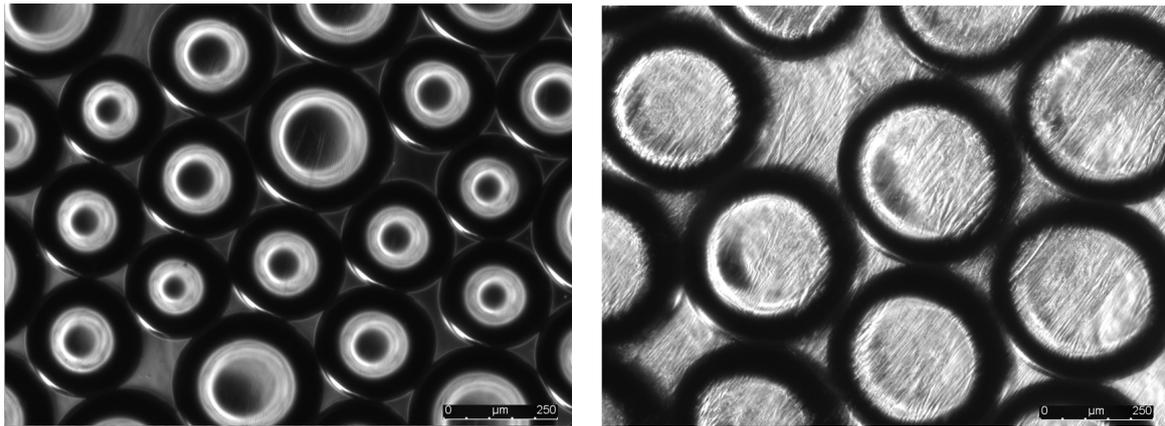


Figura 16: Variación del tamaño de las gotas en función del flujo de la fase continua para una emulsión de aceite en agua en configuración Cross-Flow (T).

Una de las primeras conclusiones que se obtienen del análisis de dicha gráfica es que, mientras que para flujos de 1, 2,5 y 5 $\mu L/min$ se forman gotas, con un flujo de 25 $\mu L/min$ cuando el aceite se fija a un caudal de 7,5 $\mu L/min$ no se forman las gotas y estamos en una situación de flujo dividido debido a la alta viscosidad de la fase a emulsificar. Esto verifica que si la viscosidad del aceite es demasiado grande flujos similares entre ambas fases no dan lugar a gotas. En la figura 17 podemos ver las gotas formadas para unos flujos de 7,5 $\mu L/min$ y 150 $\mu L/min$ (relación del 5% entre la fase continua y la fase dispersa), y para 5 $\mu L/min$ y 25 $\mu L/min$ (relación del 20% entre la fase continua y la fase dispersa).



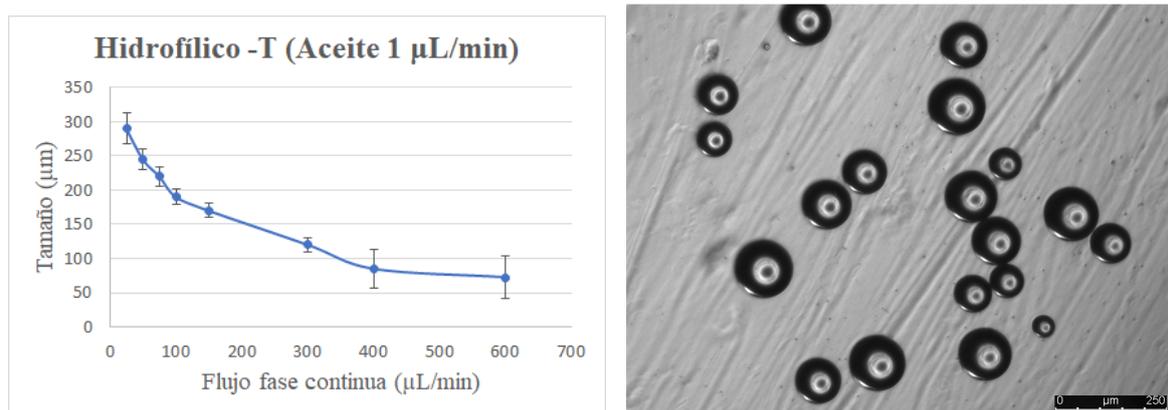
(a) Relación de Flujo 7,5/150

(b) Relación de Flujo 5/25

Figura 17: Imágenes de las gotas de aceite a diferentes relaciones de flujo.

Debido a la disposición que presentan los datos experimentales se puede realizar la hipótesis de que sigue un comportamiento lineal en función del flujo de la fase continua; sin embargo hay varios hechos experimentales que ponen en duda dicha afirmación.

- Si se realizan varios ajustes (tanto lineales como no lineales) se observa que el coeficiente de determinación es menor a 0,95 para un ajuste lineal. El ajuste que en todas las curvas da un valor más cercano a 1 de dicho coeficiente corresponde a uno polinómico de orden 2.
- La alta desviación en el tamaño de las gotas. Si nos fijamos en las barras de error de la figura 16 observamos que en algunas ocasiones son considerables (en el caso de aceite a $1\mu L/min$ vemos que la desviación es igual de grande que la diferencia entre flujos de 25 y $50\mu L/min$).
- La tercera y última evidencia que pone en duda dicha afirmación es el límite inferior del tamaño que presentan las gotas. Subiendo el flujo de la fase continua a valores muy altos y manteniendo un caudal pequeño en la fase dispersa, tal y como se observa en la figura 18a, a medida que vamos aumentando el flujo se va perdiendo la linealidad y la curva describe mejor a una función cuadrática. También cabe destacar los altos valores que adquiere la desviación debido a que se forman gotas en un rango de tamaños muy elevados según vamos disminuyendo la relación de flujos llegando a gotas de entre 35 y $110\mu m$ para la relación 1/600. Flujos más altos inducían a fugas en las conexiones del chip.



(a) Tamaño en función del flujo de la fase continua.

(b) Relación de Flujo 1/400

Figura 18: Pérdida de la linealidad a medida que se aumenta el flujo en la fase continua (18a). Imagen de las gotas a una relación de flujo elevada (18b).

Como última conclusión se observa que la generación de microgotas obtiene un rango óptimo de actuación, en cuanto a la relación entre el tamaño de las gotas y su dispersión, cuando estas se producen con un tamaño de en torno a $200\ \mu\text{m}$ de diámetro. Este resultado es previsible puesto que el canal de salida del chip es de $190\ \mu\text{m}$ por lo que cuando la relación de flujos presenta gotas de un diámetro similar al del canal se llega a un punto de mínima desviación.

Veamos ahora los resultados de realizar el mismo experimento con la unión de tipo Flow-Focusing (X). Los tamaños de las gotas en función de los flujos se muestran en la figura 19.

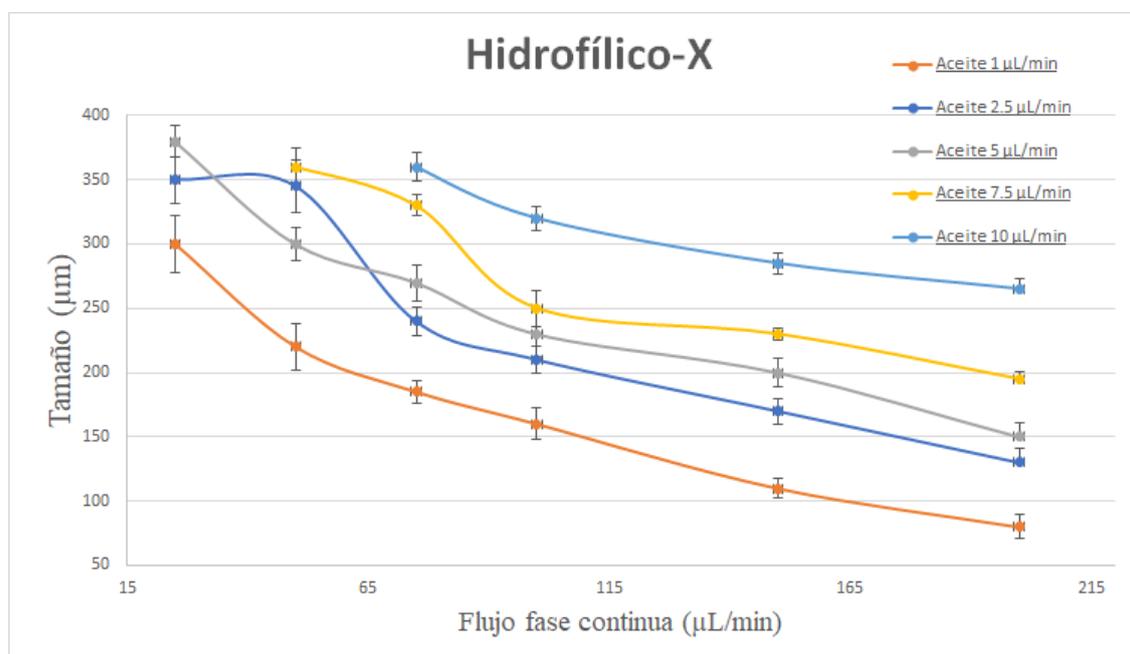


Figura 19: Variación del tamaño de las gotas en función del flujo de la fase continua para una emulsión de aceite en agua en configuración Flow-Focusing (X).

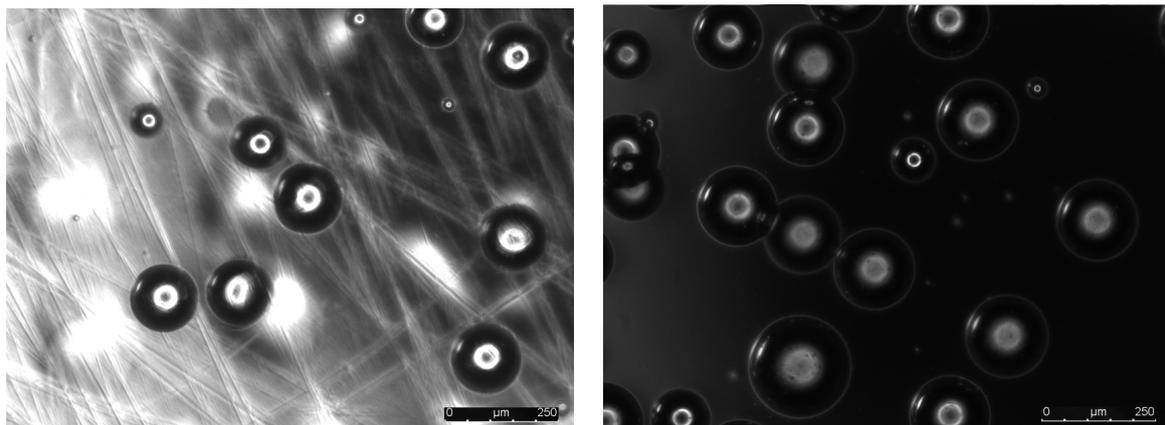
Las evidencias experimentales del anterior caso en cuanto a la falta de linealidad se mantienen por lo que nos centraremos en comparar ambos métodos de confluencia de flujo. La principal

diferencia que se encuentra es que para mismas relaciones de flujo entre fases el diámetro es menor, para la gran mayoría de casos, en la unión en X. Esto se debe a que la incidencia del flujo de la fase continua para la unión en X tiene más superficie de contacto con las gotas que se están formando y debido a la poca adhesión con la superficie del canal, necesita menos esfuerzo para generar las gotas.

Como último experimento con el dispositivo hidrofílico se hizo una comparación entre 2 tubos de salida de distinto diámetro para comprobar que (al menos en el caso de las gotas de mayor tamaño) estas no se agregasen a la salida del chip. Se empleó un tubo de mismas características pero de un diámetro interno de 0,065mm y se vio que el tamaño de las gotas resultantes era muy similar. Ver figura 33 en el anexo.

3.1.2. Dispositivo hidrófobo

Los resultados y conclusiones de ambos dispositivos son muy similares con la única excepción de que, en este caso, al ser la fase dispersa agua y la continua aceite, no estamos en la situación de tener una fase dispersa de una alta viscosidad en comparación con la continua por lo que la división de flujos es mucho menos frecuente y con flujos similares (o iguales) también se produce una emulsificación controlada, ver figuras 34 y 35 en el anexo. En la figura 20 se pueden observar las gotas generadas con flujos de $1\mu L/min$ y $55\mu L/min$ (relación del 1,82 % entre la fase continua y la fase dispersa), y de $2,5\mu L/min$ y $55\mu L/min$ (relación del 4,55 % entre la fase continua y la fase dispersa).



(a) Relación de Flujo 1/55

(b) Relación de Flujo 2,5/55

Figura 20: Imágenes de las gotas de agua a diferentes relaciones de flujo.

3.1.3. Comparación de ambos dispositivos

Una vez conocemos bien el funcionamiento de los dos chips veamos cuales son las diferencias en cuanto a la formación de gotas que existen entre ambos dispositivos. En la figura 21 se ve una comparativa entre el tamaño de las gotas de agua y aceite formadas fijando un mismo flujo para la fase dispersa y variando el de la fase continua. Se pueden ver más comparativas entre los dispositivos en la figura 36 del anexo.

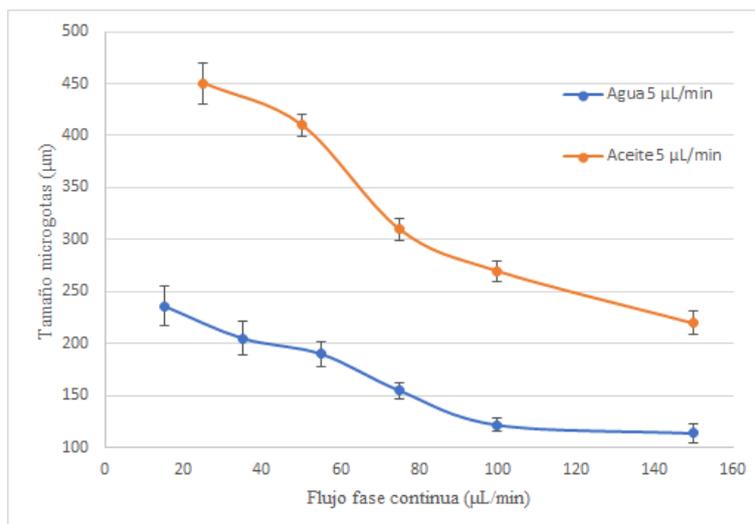


Figura 21: Comparación entre misma relación de flujo para ambos chips

Las gotas de agua en aceite son claramente inferiores; el origen de esta diferencia está en la viscosidad. Al ser el agua un fluido mucho menos viscoso que el aceite utilizado durante los experimentos opone una menor resistencia a la deformación (recordemos que la definición de viscosidad es la resistencia de un fluido a las deformaciones graduales producidas por las tensiones cortantes o de tracción que es lo que ocurre en este tipo de dispositivos de generación de gotas) por lo que a menor viscosidad tenga nuestro fluido a emulsionar menor será el tamaño de las emulsificaciones que presente derivado de una menor fuerza generada por el fluido para producir el goteo.

Una vez finalizados los experimentos de emulsificación de gotas en dispositivos microfluídicos se procede a la caracterización del ELR tal y como se indica en la sección 2.4

3.2. Estimación del peso molecular

El primer experimento realizado para la caracterización del ELR a estudiar ($K_{48}I_{60}$) es el uso de la electroforesis SDS-PAGE. Con esta se estima el peso molecular y la pureza del lote del bioproducto tal y como se ha indicado en la sección 2.4.1.

Primero se realiza el cálculo teórico del peso molecular del polímero. Para ello se introduce su secuencia en el software *ExpASy* arrojando un resultado de 47,274kDa. El kilodalton (kDa) es una unidad de medida comúnmente empleada en los campos de la biología, bioquímica y medicina para cuantificar la masa molecular de diversas macromoléculas biológicas, como proteínas y ácidos nucleicos. El dalton es una unidad de masa atómica que se define como una doceava parte de la masa de un átomo de carbono-12 en reposo y sin enlaces[59]. Es decir, el dalton corresponde a la unidad de masa atómica utilizada comúnmente en física nuclear.

En la figura se ve la imagen resultante de la electroforesis. Se observa que la muestra se encuentra ligeramente por encima del indicador de 45 kDa y considerablemente lejano al de 66,3 kDa, además el contraste en la franja es muy alto. Este resultado confirma la excelente calidad del grupo de muestras utilizadas, lo que indica que pueden ser utilizadas en futuros experimentos sin problemas.

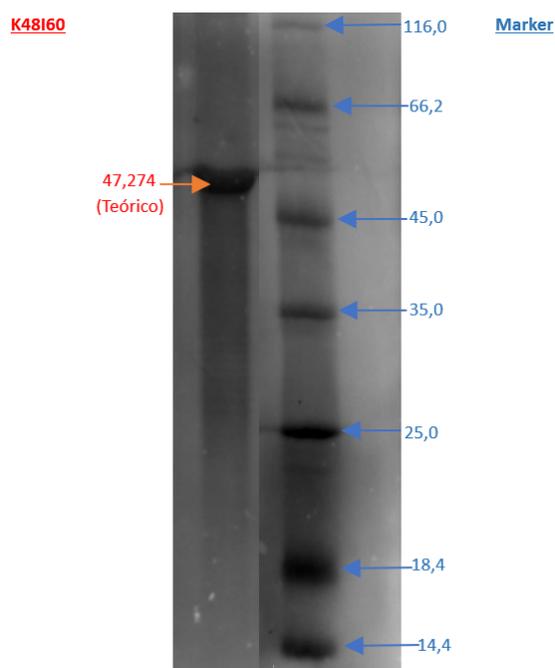


Figura 22: Fotografía del gel de electroforesis tras concluir el experimento, con la muestra de K48I60 a la izquierda y el maker a la derecha. En los márgenes se indican los pesos moleculares que corresponden a cada banda.

3.3. Espectroscopía infrarroja

Como se ha indicado en la sección 2.4.2, se realiza un estudio de la estructura química del polímero mediante la técnica de espectroscopía infrarroja FT-IR, ver figura 23.

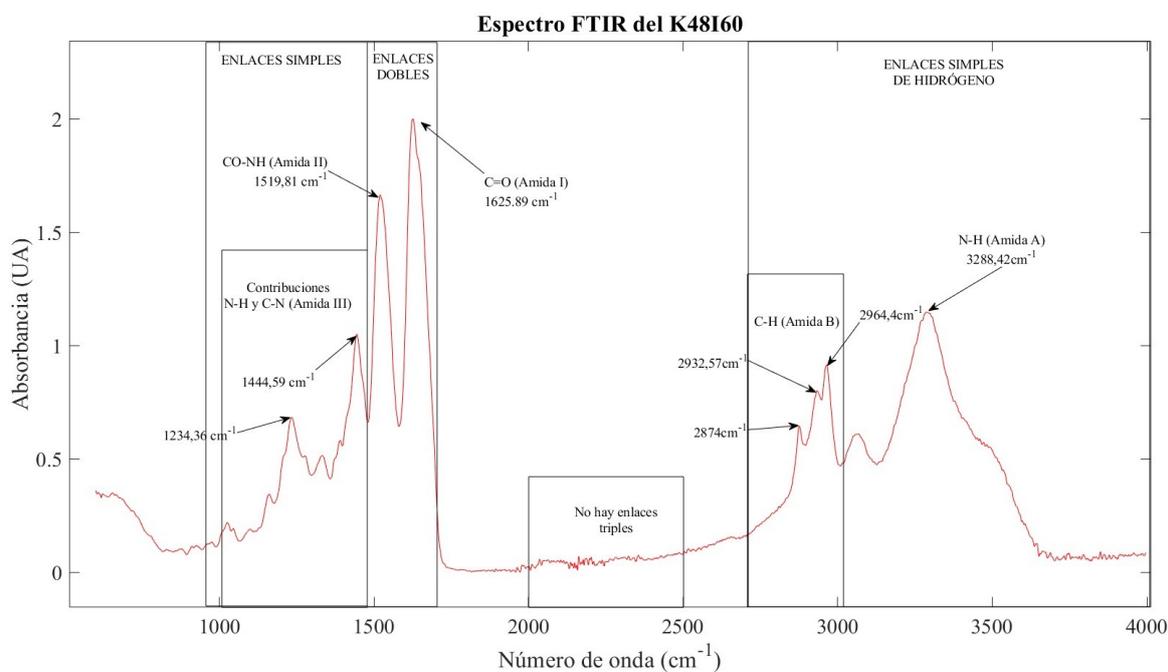


Figura 23: Espectro infrarrojo FT-IR del $K_{48}I_{60}$.

Si se observasen más espectros de distintas proteínas se vería que todos presentan un patrón muy similar. Esto es debido a que todos los polímeros derivados de las proteínas comparten las bandas concretas que se encuentran en las mismas ya que todos comparten una estructura química central; esta se encuentra formada por enlaces que vibran a la misma frecuencia [60]. Si se compara el espectro con el de alguna proteína como puede ser la propia elastina se ve rápidamente que es muy similar al presentado en la figura 23.

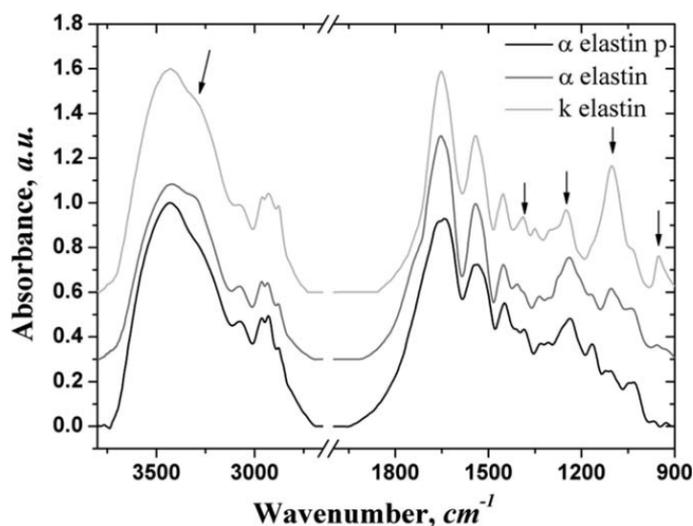


Figura 24: Espectro infrarrojo FT-IR de la elastina [60].

Veamos a qué corresponde cada uno de los picos del espectro. Utilizando una tabla de espectroscopia de absorción [61] vamos a intentar identificar cada uno de los picos. El pico cercano a los 3300cm^{-1} corresponde a la vibración stretching de un enlace N-H de la Amida A. Los tres picos entre los 2850cm^{-1} y 3000cm^{-1} corresponden a vibraciones stretching de enlaces C-H de la Amida B. La absorción asociada a la Amida I produce vibraciones de estiramiento en el enlace C=O de los grupos funcionales carboxílicos produciendo un pico en 1625cm^{-1} mientras que el pico 1520cm^{-1} pertenece a la Amida II que genera principalmente vibraciones de flexión en el enlace N-H del grupo CO-NH. Para finalizar los picos en 1234cm^{-1} y 1445cm^{-1} corresponden a vibraciones de los enlaces N-H y C-N en el modo amida III. En la figura 25 se puede ver un diagrama de los principales modos de vibración del enlace peptídico, los diferentes grupos Amida.

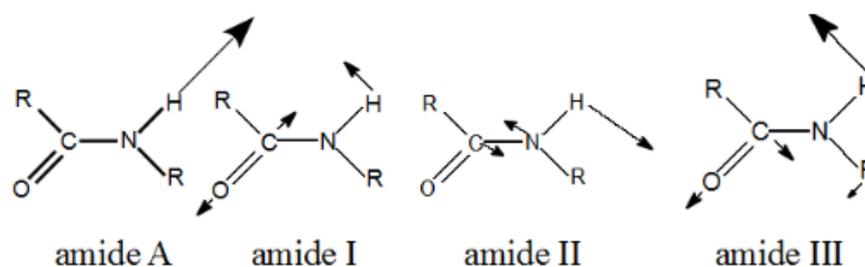


Figura 25: Los principales modos de vibración del enlace peptídico utilizados en las espectroscopias IR para dilucidar la estructura de proteínas y polipéptido [62].

3.4. Medida de la temperatura de transición inversa

Tal y como se ha detallado en la sección 2.4.3 el método utilizado para la medida de la temperatura de transición inversa del polímero a caracterizar es el uso de calorimetría diferencial de barrido; en este se miden los intercambios de calor entre dos crisoles. De esta manera, cuando existan fases endotérmicas o exotérmicas en el crisol muestra el DSC será capaz de representar el intercambio de energía que produce. Se han empleado una disolución con una concentración de 50mg/mL de ELR y con un pH de 7,4 en el crisol muestra y agua ultrapura MiliQ en el crisol referencia. Se realizó un barrido de 5 a 60 ° en ambas muestras a una velocidad de 5 °C/min, tras un periodo de estabilización en el que ambos crisoles se mantienen a 5°C durante 5 minutos. Se ha efectuado el experimento en dos ocasiones diferentes para verificar la efectividad de la medida de la temperatura de transición.

A continuación se presentan las 2 medidas tomadas del DSC para la proteína de tipo recombinante en la figura 26

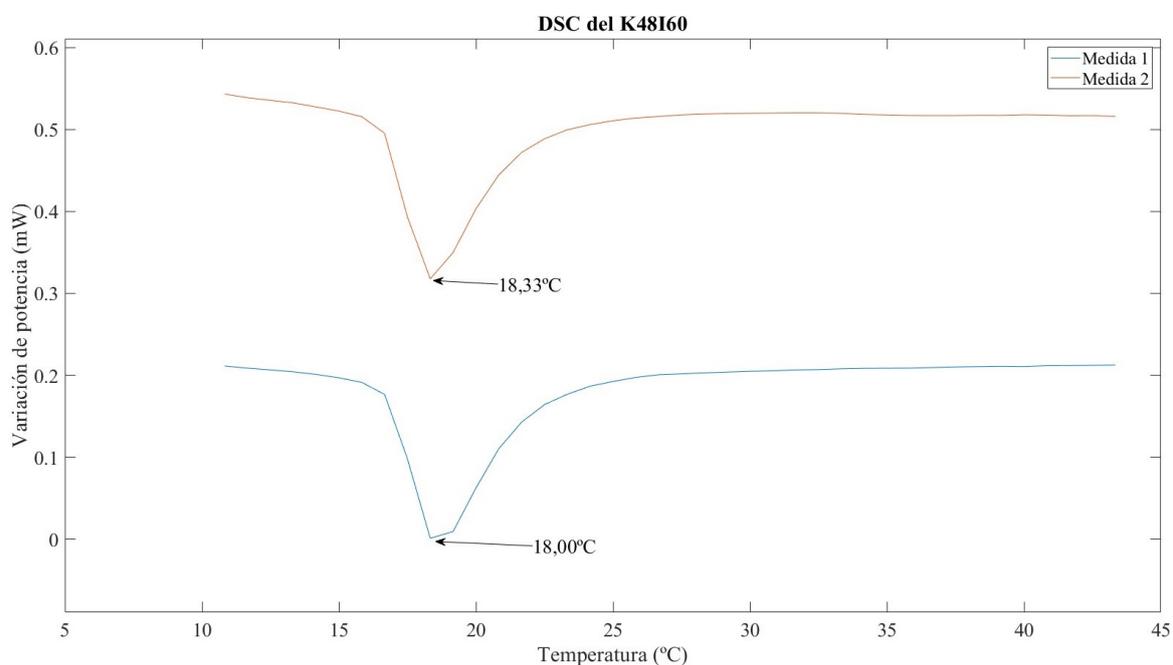


Figura 26: Calorimetría diferencial de barrido del $K_{48}I_{60}$

$K_{48}I_{60}$ disuelto	Temperatura del pico (°C)
Medida 1	18,00
Medida 2	18,33
Media	18,17
Desviación	0,23

Tabla 1: Medidas de la temperatura de transición inversa.

La temperatura de transición medida es de 18,16°C por lo que el polímero se autoensambla a una temperatura inferior a los 37°C, es decir, en condiciones fisiológicas. Esto permitiría al polímero ser depositado en el interior del cuerpo humano en frío y, debido a la temperatura

fisiológica, agregarse su interior.

En el caso de este trabajo conocer la temperatura de transición es importante puesto que, en las emulsificaciones de ELR este debe estar disuelto en el agua para formar estructuras uniformes. Cuando se busque la creación de estos esferoides de ELR la disolución debe encontrarse siempre por debajo de esta temperatura de transición.

3.5. Generación de microestructuras de ELR

Finalmente, como ultima etapa experimental, se comprueba la formación de gotas de disolución al disolverse en agua MiliQ (a 20mg/mL) y utilizar dicha disolución en el dispositivo microfluídico como se ha especificado en la sección 2.5. En dicha sección se especificó que en esta última fase del experimento el dispositivo de unión (cabezal) de la bomba peristáltica y el tubo que conecta con el chip, presentó fugas; por lo que no se tuvo un flujo controlado de la fase dispersa. Como consecuencia, no se ha podido realizar un estudio en profundidad del tamaño de las gotas en función de los flujos, ya que el flujo no es el indicado y la presencia de fugas no se puede modelar como una pérdida de flujo constante, por lo que el tamaño de las gotas es muy dispar. Esta sección se centra en si es posible la formación de estas estructuras dentro de las gotas y en una visualización de las mismas.

Para la visualización de las gotas se ha calentado una placa petri a 42°C con el objetivo de asegurarse de que el polímero estuviese transicionado y no disuelto. En la imagen tomada con el microscopio óptico de la Figura 27 se ve que con este método de visualización no se aprecian diferencias (a excepción de que muestran ser un poco más opacas, ver figura 20) a las gotas formadas en agua y no se distingue bien si el polímero ha formado estructuras en su interior o no. La visualización de las gotas a temperaturas bajas (recolectando las gotas en un eppendorf en frío y manteniendo la placa petri fría previo a la medida) arrojaron resultados similares, se apreciaban gotas como en los experimentos sin disolución.

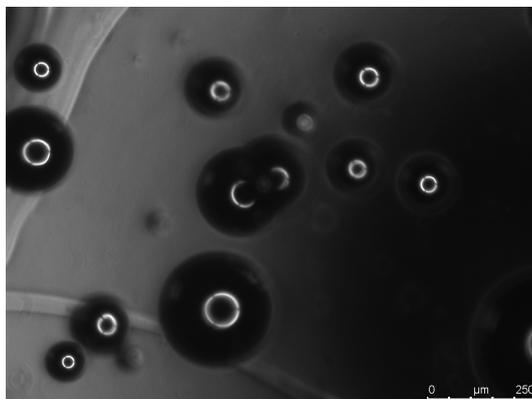


Figura 27: Varias gotas de agua con ELR emulsificadas en aceite.

Una continuación de este estudio es la aplicación de un ELR con fluorescente. Esto nos permitiría observar las estructuras generadas en el interior de las emulsificaciones.

La formación de estas estructuras podría emplearse para generar estructuras de tipo corteza hueca. Estas se consiguen con una doble emulsificación de las gotas, como se indica en la figura 28, añadiendo 2 conexiones en X contiguas [63]. De esta manera, al sustituir agua por una disolución de una proteína recombinante podríamos conseguir microcápsulas de ELR. En

estas, una vez eliminado el aceite en su interior, se obtiene un pequeño espacio óptimo para la supervivencia de células debido a su alta biocompatibilidad o la capacidad de encapsulación de fármacos [44].

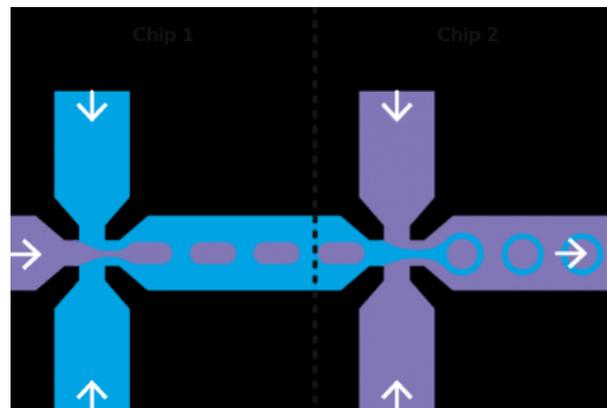


Figura 28: Esquema de funcionamiento de una doble emulsión [63].

4. Conclusión y futuras líneas de investigación

En conclusión, los dispositivos de microfluídica de generación de gotas y los polímeros recombinantes de tipo elastina son dos áreas de investigación prometedoras que, combinadas, pueden ofrecer numerosas aplicaciones en diversos campos.

La generación de microemulsificaciones en forma de gotas puede ser controlada mediante los flujos y las viscosidades de los líquidos a utilizar. Un estudio más extenso sobre esta técnica analizando el tamaño con varios líquidos de distintas viscosidades podría modelizar de manera teórica el tamaño esperado de las emulsificaciones en función de esta última magnitud y sus caudales. En el caso de este informe se concluye:

- El tamaño de las gotas decrece linealmente aumentando la relación de flujo entre la fase continua y la dispersa y posee un límite proporcionado por el dispositivo a utilizar arrojando un tamaño de gotas de hasta unas pocas decenas de μm .
- El rango de actuación más óptimo de un dispositivo de generación de gotas es aquella relación de flujos que den lugar a un tamaño de gotas similares a las del diámetro interno del canal de salida.
- La disposición de Flow-Focusing genera un tamaño de gotas menor a una igual relación de flujos que la configuración Cross-Flow debido a la incidencia del flujo sobre la gota en formación ya que dispone de un mayor área de actuación.
- Una mayor viscosidad de la fase dispersa a emulsificar presenta un mayor tamaño de las gotas generadas. Además, si la viscosidad de la fase continua es muy alta, no se producen gotas a flujos de la fase continua similares a los de la dispersa.

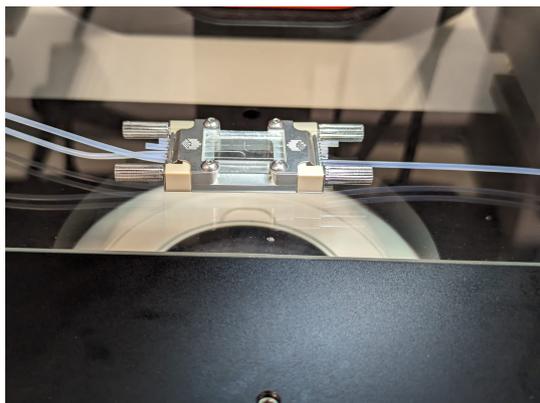
En cuanto a la caracterización de este polímero recombinante de tipo elastina se ha comprobado la calidad del lote utilizado examinando que sus características coincidiesen con las esperadas teóricamente. Se ha verificado un peso molecular en torno a los 47,274 kDa esperados teóricamente, mediante una electroforesis SDS-PAGE; también se han comprobado sus enlaces mediante una espectroscopia FT-IR garantizando que posee una gran similitud a la de la elastina. Se ha comprobado que el ELR posee una temperatura de transición inferior a la fisiológica dando un resultado experimental de $18,17 \pm 0,23^\circ C$.

Finalmente se ha observado la capacidad de generar microestructuras de ELR formadas en el interior de las emulsificaciones de gotas en microfluídica. Realizando de nuevo un experimento de microfluídica cambiando el agua destilada por una disolución de ELR y manteniéndolo por debajo de su temperatura de transición se ha verificado la capacidad de generar gotas de manera controlada de disolución. Como futura línea de investigación se presenta la posibilidad de observar detalladamente la forma de estas estructuras en el interior de estas emulsificaciones agregando un fluorescente al ELR utilizado.

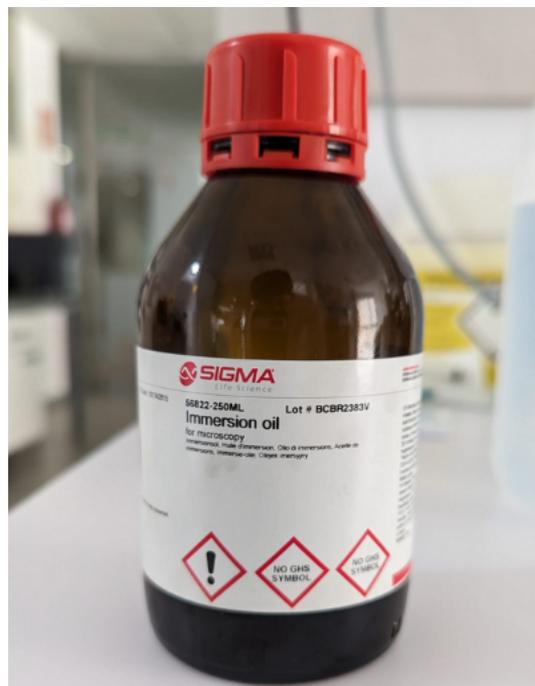
La principal línea futura de investigación de este informe consistiría en la obtención de estructuras basadas en más de un ELR y en la producción, mediante la técnica de doble emulsificación, de esferas huecas de ELR. Estos biomateriales aseguran un entorno favorable para el crecimiento y la supervivencia celular debido a su alto grado de biocompatibilidad o la encapsulación de fármacos u otros compuestos bioactivos [44].

Anexo

Material y dispositivos empleados



(a) Imagen del sistema de microfluídica montado en su configuración en T.



(b) Sigma Immersion Oil 56822.



(c) Bomba Harvard PHD 2000 Programmable.

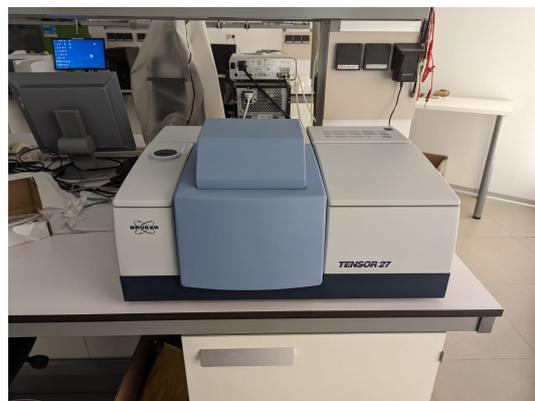


(d) Bomba Masterflex Ismatec ISM596D.

Figura 29: Fotos de los dispositivos empleados durante los experimentos de microfluídica.



(a) Balanza XS105 Mettler Toledo.



(b) FT-IR Tensor 27 Bunker.



(c) DSC Mettler Toledo 822e.

Figura 30: Fotos de los dispositivos empleados durante la caracterización del ELR. experimentos.

Protocolo de la electroforesis

	ONE GEL	RESOLVING GEL				STACKIN GEL
		7.5%	10%	12%	15%	
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

Figura 31: Componentes de la disolución empleados para la creación del gel de poli-acrilamida de la electroforesis. En este caso los correspondientes a un 12 %.

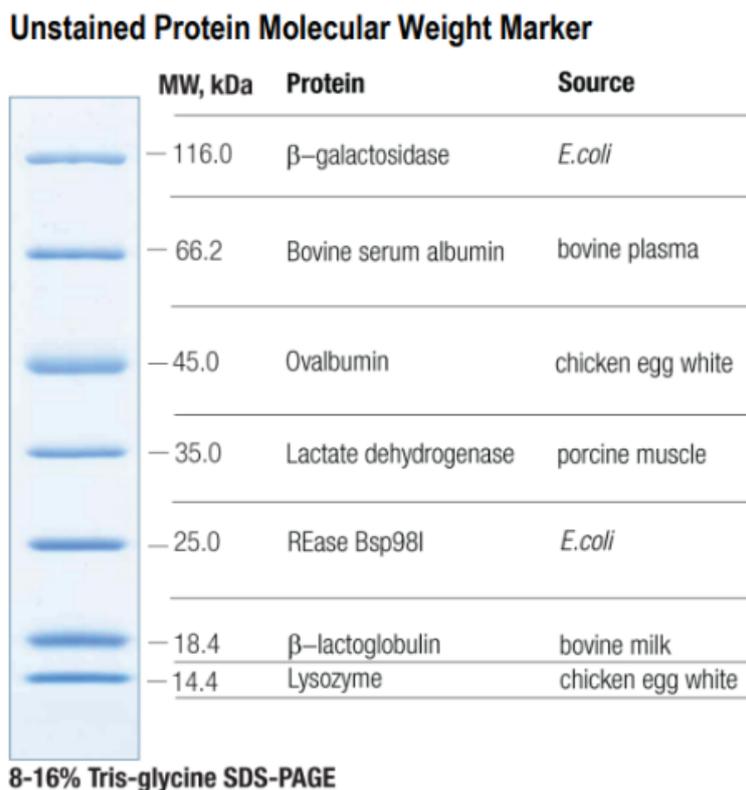


Figura 32: Pesos moleculares del maker 26610 de Thermo Fisher [64].

Sobre microfluídica

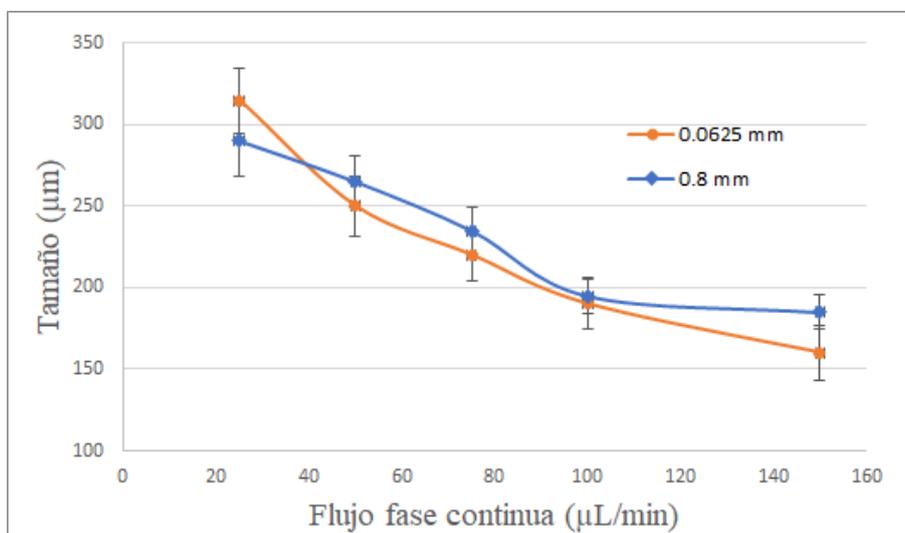


Figura 33: Tamaño de las gotas en función del flujo de la fase continua en el dispositivo hidrofílico fijando el flujo de la fase continua en función del diámetro del tubo de salida.

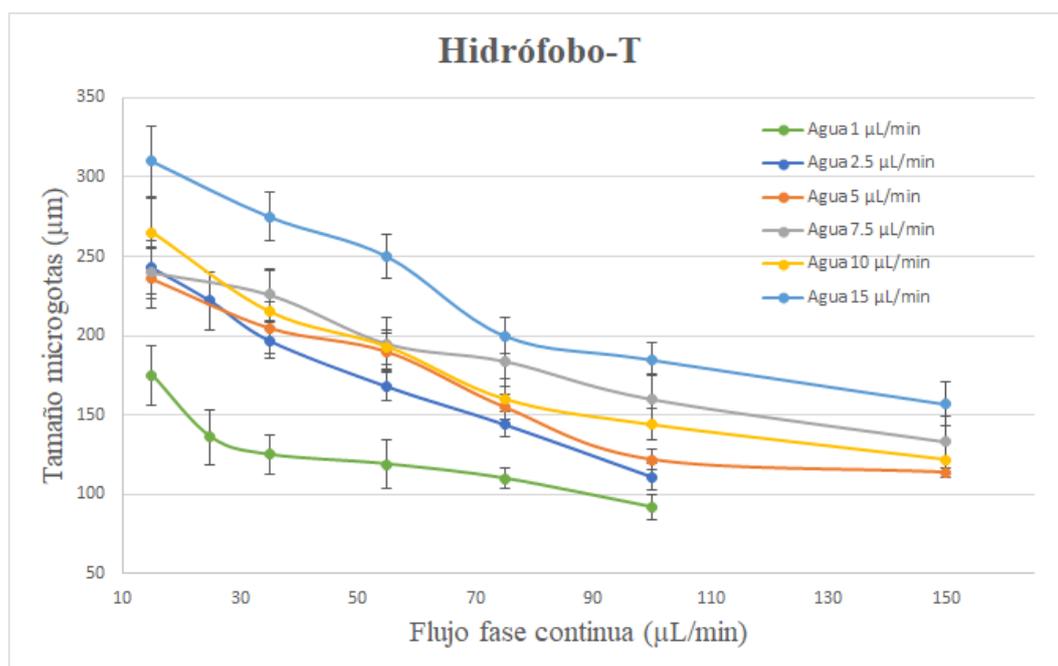


Figura 34: Variación del tamaño de las gotas en función del flujo de la fase continua para una emulsión de agua en aceite en configuración Cross-Flow (T).

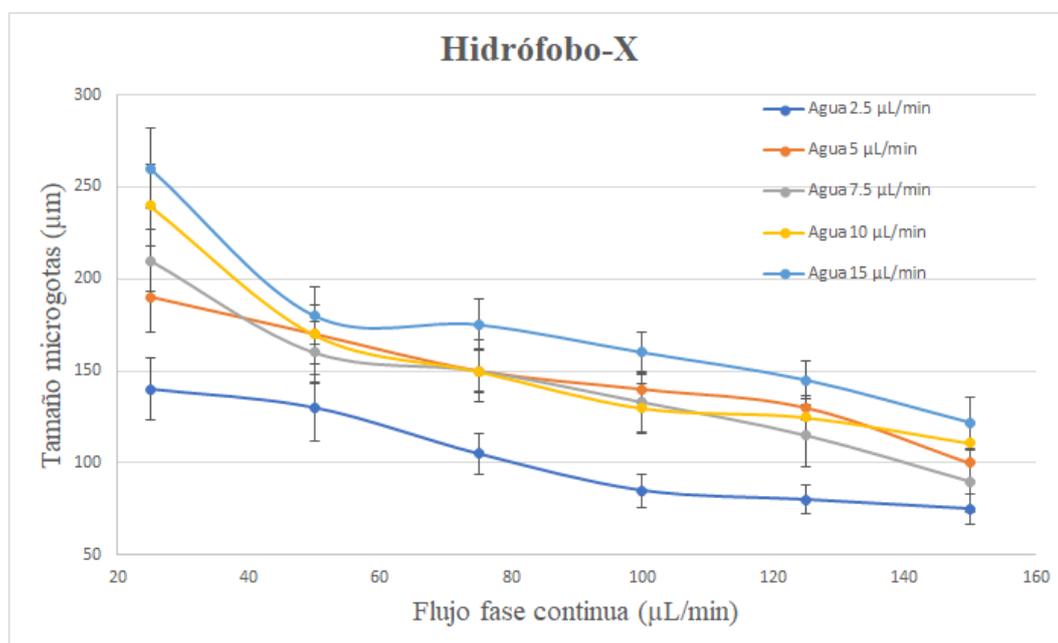


Figura 35: Variación del tamaño de las gotas en función del flujo de la fase continua para una emulsión de agua en aceite en configuración Flow-Focusing (X).

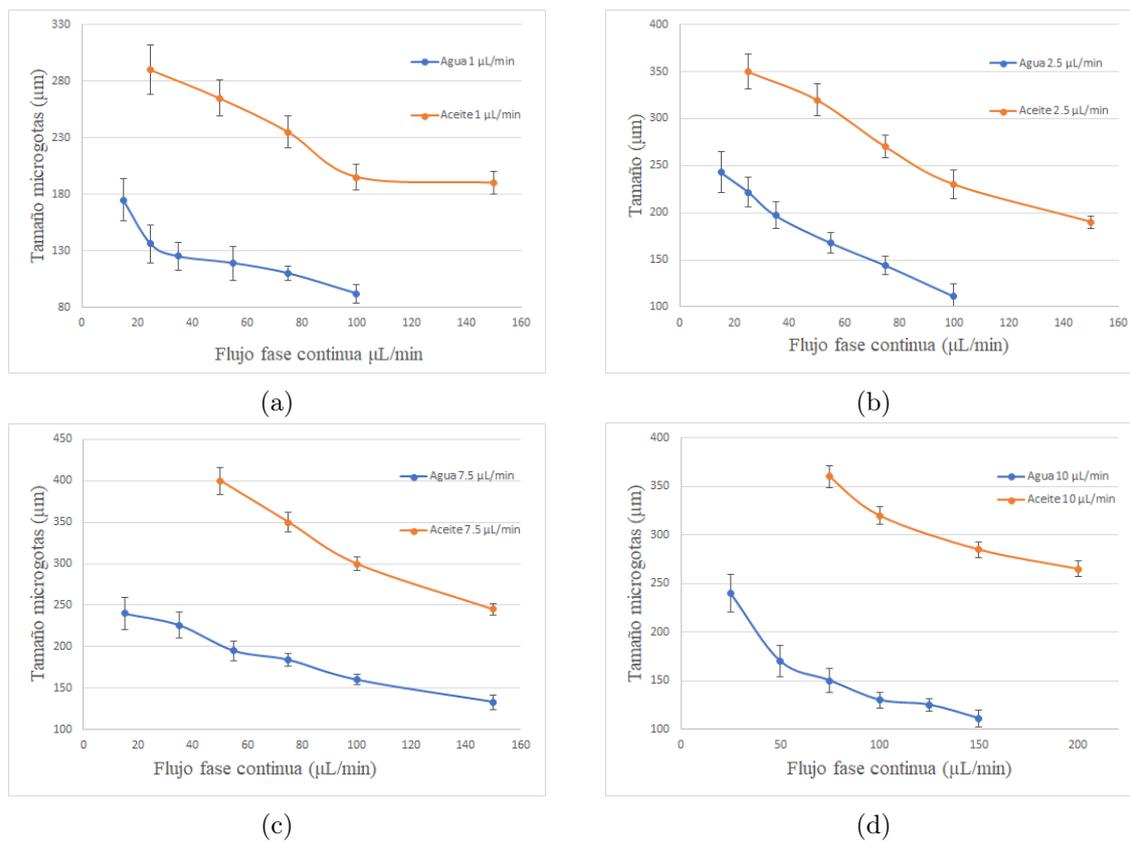


Figura 36: Tamaño de las gotas en función del flujo la fase continua fijando el de la dispersa. Diferencias entre mismos flujos para viscosidades distintas en la fase dispersa.

Referencias

- [1] James P Brody, Paul Yager, Raymond E Goldstein, and Robert H Austin. Biotechnology at low reynolds numbers. *Biophysical journal*, 71(6):3430–3441, 1996.
- [2] Edward M Purcell. Life at low reynolds number. *American journal of physics*, 45(1):3–11, 1977.
- [3] Nikolaus Rott. Note on the history of the reynolds number. *Annual review of fluid mechanics*, 22(1):1–12, 1990.
- [4] David J. Beebe, Glennys A. Mensing, and Glenn M. Walker. Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 4:261–286, 2002.
- [5] Viscous Fluid Flow. Frank m. white, 1991.
- [6] Stephan KW Dertinger, Daniel T Chiu, Noo Li Jeon, and George M Whitesides. Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks. *Analytical Chemistry*, 73(6):1240–1246, 2001.
- [7] Noo Li Jeon, Stephan KW Dertinger, Daniel T Chiu, Insung S Choi, Abraham D Stroock, and George M Whitesides. Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems. *Langmuir*, 16(22):8311–8316, 2000.
- [8] Alex McMillan Juan Sandubete López. Microfluidics Reviews, Flow resistance. <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/flow-resistance/>. [Online] Última revisión: 25/06/2023.
- [9] AJ Vidaurre Garayo. Tensión superficial. <http://hdl.handle.net/10251/142080>, 2020. [Online] Última revisión: 22/06/2023.
- [10] Luis Abraham Ortiz, Ramiro Escudero, and Feng Rao. El ángulo de contacto y su relación con las propiedades superficiales en un sistema orgánico-líquido-gas. *Afinidad*, 79(595):224–230, 2022.
- [11] Alejandro Martínez Ricardo Ortega. Tensión superficial. <https://web.archive.org/web/20091229075257/http://zeth.ciencias.uchile.cl/amartinez/2006/seminario/2.pdf>. [Online] Última revisión: 06/07/2023.
- [12] Booyabazooka. Wasser in tropfen und an der phasengrenze. <https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Wassermolek%C3%BCleInTr%C3%B6pfchen.svg>, 2008. [Online] Última revisión: 22/06/2023.
- [13] Abraham Tamir and Francisco Ruiz Beviá. Arte y ciencia, Tensión superficial.
- [14] Andreas Manz, Carlo S Effenhauser, Norbert Burggraf, D Jed Harrison, Kurt Seiler, and Karl Fluri. Electroosmotic pumping and electrophoretic separations for miniaturized chemical analysis systems. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 4(4):257, 1994.
- [15] Laurie E Locascio, Catherine E Perso, and Cheng S Lee. Measurement of electroosmotic flow in plastic imprinted microfluid devices and the effect of protein adsorption on flow rate. *Journal of chromatography A*, 857(1-2):275–284, 1999.
- [16] Water in oil, what’s the big deal? <https://testoil.com/program-management/water-in-oil/>, February 2013. [Online] Última revisión: 22/06/2023.

- [17] Anthony M Schwartz, James W Perry, and FE Bartell. Surface active agents. *The Journal of Physical Chemistry*, 53(9):1467–1467, 1949.
- [18] Dolomite. *Droplet Junction Chip User Manual*.
- [19] Leonor Pérez-Trejo, Arturo F Méndez Sánchez, and AM Paniagua Mercado. Determinación de la viscosidad de fluidos newtonianos y no newtonianos (una revisión del viscosímetro de couette). *Latin-American Journal of Physics Education*, 4(1):36, 2010.
- [20] Joshua D Tice, Adam D Lyon, and Rustem F Ismagilov. Effects of viscosity on droplet formation and mixing in microfluidic channels. *Analytica chimica acta*, 507(1):73–77, 2004.
- [21] Robert Chang, Kamal Emami, Honglu Wu, and Wei Sun. Biofabrication of a three-dimensional liver micro-organ as an in vitro drug metabolism model. *Biofabrication*, 2(4):045004, 2010.
- [22] Sharma T Sanjay, Wan Zhou, Maowei Dou, Hamed Tavakoli, Lei Ma, Feng Xu, and XiuJun Li. Recent advances of controlled drug delivery using microfluidic platforms. *Advanced drug delivery reviews*, 128:3–28, 2018.
- [23] Devon M Headen, Guillaume Aubry, Hang Lu, and Andrés J García. Microfluidic-based generation of size-controlled, biofunctionalized synthetic polymer microgels for cell encapsulation. *Advanced materials*, 26(19):3003–3008, 2014.
- [24] Hartmut F Hildebrand. Biomaterials—a history of 7000 years. *BioNanoMaterials*, 14(3-4):119–133, 2013.
- [25] Juan Valerio Cauich Rodríguez and José Manuel Cervantes Uc. La historia de los biomateriales. *Editores: Dr. Luis del Castillo Mora Dr. Manuel L. Robert Díaz Dr. Alfonso Larqué Saavedra Dr. Inocencio Higuera Ciapara*.
- [26] Michel Vert, Yoshiharu Doi, Karl-Heinz Hellwich, Michael Hess, Philip Hodge, Przemyslaw Kubisa, Marguerite Rinaudo, and François Schué. Terminology for biorelated polymers and applications (iupac recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2):377–410, 2012.
- [27] Rory E Sallach, Wanxing Cui, Fanor Balderrama, Adam W Martinez, Jing Wen, Carolyn A Haller, Jeannette V Taylor, Elizabeth R Wright, Robert C Long Jr, and Elliot L Chai-kof. Long-term biostability of self-assembling protein polymers in the absence of covalent crosslinking. *Biomaterials*, 31(4):779–791, 2010.
- [28] JC Rodríguez Cabello, IG De Torre, F Cipriani, and L Poocha. Elastin-like materials for tissue regeneration and repair. In *Peptides and proteins as biomaterials for tissue regeneration and repair*, pages 309–327. Elsevier, 2018.
- [29] J Carlos Rodríguez-Cabello, Laura Martín, Alessandra Girotti, Carmen García-Arévalo, F Javier Arias, and Matilde Alonso. Emerging applications of multifunctional elastin-like recombinamers. *Nanomedicine*, 6(1):111–122, 2011.
- [30] Fred W Keeley, Catherine M Bellingham, and Kimberley A Woodhouse. 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. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1418):185–189, 2002.

- [31] Suzanne M Mithieux and Anthony S Weiss. Elastin. *Advances in protein chemistry*, 70:437–461, 2005.
- [32] Ursula R Rodgers and Anthony S Weiss. Cellular interactions with elastin. *Pathologie Biologie*, 53(7):390–398, 2005.
- [33] Ming Miao, Catherine M Bellingham, Richard J Stahl, Eva E Sitarz, Christopher J Lane, and Fred W Keeley. Sequence and structure determinants for the self-aggregation of recombinant polypeptides modeled after human elastin. *Journal of Biological Chemistry*, 278(49):48553–48562, 2003.
- [34] Alessandra Girotti, Alicia Fernández-Colino, Isabel M López, José C Rodríguez-Cabello, and Francisco J Arias. Elastin-like recombinamers: Biosynthetic strategies and biotechnological applications. *Biotechnology journal*, 6(10):1174–1186, 2011.
- [35] J Carlos Rodríguez-Cabello, Laura Martín, Matilde Alonso, F Javier Arias, and Ana M Testera. “recombinamers” as advanced materials for the post-oil age. *Polymer*, 50(22):5159–5169, 2009.
- [36] J Carlos Rodríguez-Cabello, Javier Reguera, Alessandra Girotti, F Javier Arias, and Matilde Alonso. Genetic engineering of protein-based polymers: The example of elastinlike polymers. *Ordered Polymeric Nanostructures at Surfaces*, pages 119–167, 2006.
- [37] Dan W Urry. Physical chemistry of biological free energy transduction as demonstrated by elastic protein-based polymers, 1997.
- [38] Javier Reguera Gómez et al. Estudio de la transición inversa con la temperatura en polímeros tipo elastina con creciente funcionalidad. 2008. Tesis doctoral, Uva.
- [39] Javier Reguera, Dan W Urry, Timothy M Parker, David T McPherson, and J Carlos Rodríguez-Cabello. Effect of nacl on the exothermic and endothermic components of the inverse temperature transition of a model elastin-like polymer. *Biomacromolecules*, 8(2):354–358, 2007.
- [40] A Fernández-Colino, A Girotti, MI López, FJ Arias, and JC Rodríguez-Cabello. Los polímeros tipo elastina y su utilización como tags para la purificación de proteínas. *Bio-mecánica*, 19(1):8–16, 2011.
- [41] Artur Ribeiro, F Javier Arias, Javier Reguera, Matilde Alonso, and J Carlos Rodríguez-Cabello. Influence of the amino-acid sequence on the inverse temperature transition of elastin-like polymers. *Biophysical journal*, 97(1):312–320, 2009.
- [42] Javier Reguera, Amir Fahmi, Philip Moriarty, Alessandra Girotti, and José Carlos Rodríguez-Cabello. Nanopore formation by self-assembly of the model genetically engineered elastin-like polymer [(vpgvg)₂(vpgeg)(vpgvg)₂]₁₅. *Journal of the American Chemical Society*, 126(41):13212–13213, 2004.
- [43] Dan W Urry. Molecular machines: how motion and other functions of living organisms can result from reversible chemical changes. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32(6):819–841, 1993.
- [44] George M Whitesides. The origins and the future of microfluidics. *nature*, 442(7101):368–373, 2006.

- [45] Zhengkun Chen, Sina Kheiri, Edmond WK Young, and Eugenia Kumacheva. Trends in droplet microfluidics: From droplet generation to biomedical applications. *Langmuir*, 38(20):6233–6248, 2022.
- [46] Remigijus Vasiliauskas. Droplet detection and measurement in microfluidic channels. <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/droplet-digital-microfluidics/droplet-detection-measurement-microfluidic-channels/>. [Online] Última revisión: 04/07/2023.
- [47] Carmen Herrero Cabello. Estudio del proceso de co-autoensamblado de polipéptidos sensibles a estímulos. *Trabajo de fin de grado, UVa*, 2021.
- [48] Stefan Roberts, Vincent Miao, Simone Costa, Joseph Simon, Garrett Kelly, Tejank Shah, Stefan Zauscher, and Ashutosh Chilkoti. Complex microparticle architectures from stimuli-responsive intrinsically disordered proteins. *Nature communications*, 11(1):1342, 2020.
- [49] Carlos Antonio Montalvo Navarro and Marco Antonio Lugo Flores. Electroforésis: fundamentos, avances y aplicaciones. *Epistemus*, 13(26):48–54, 2019.
- [50] Joanne M Manns. Sds-polyacrylamide gel electrophoresis (sds-page) of proteins. *Current protocols in microbiology*, 22(1):A–3M, 2011.
- [51] Introduction to SDS-PAGE - Separation of Proteins Based on Size. <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/technical-documents/protocol/protein-biology/gel-electrophoresis/sds-page>. [Online] Última revisión: 04/07/2023.
- [52] Javier Ricardo Velandia Cabra. Identificación de polímeros por espectroscopía infrarroja. *Revista Ontare*, 5:3, 2017.
- [53] Guillermo Barraza-Garza, Laura A de la Rosa, Alejandro Martínez-Martínez, Hiram Castillo-Michel, Marine Cotte, and Emilio Alvarez-Parrilla. La microespectroscopía de infrarrojo con transformada de fourier (ftirm) en el estudio de sistemas biológicos. *Revista latinoamericana de química*, 41(3):125–148, 2013.
- [54] Jeffrey S Gaffney, Nancy A Marley, and Darin E Jones. Fourier transform infrared (ftir) spectroscopy. *Characterization of materials*, pages 1–33, 2002.
- [55] Technical Note: Introduction to FTIR Spectroscopy. <https://www.newport.com/n/introduction-to-ftir-spectroscopy>. [Online] Última revisión: 03/07/2023.
- [56] Martin Badertscher, Philippe Bühlmann, and Ernö Pretsch. *Structure determination of organic compounds: Tables of Spectral Data*. Springer, 2009.
- [57] Bal Ram Singh. Basic aspects of the technique and applications of infrared spectroscopy of peptides and proteins. ACS Publications, 2000.
- [58] Santiago Surinach Cornet Surinach, S Baró, S Bordas, N Clavaguera, and MT Clavaguera-Mora. La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la ciencia de materiales. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 1992, vol. 31, num. 1, p. 11-17, 1992.
- [59] Diccionario médico, Kilodalton ¿Qué es el kilodalton? <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/kilodalton>. [Online] Última revisión: 08/07/2023.

- [60] Maria-Cristina Popescu, Cornelia Vasile, and Oana Craciunescu. Structural analysis of some soluble elastins by means of ft-ir and 2d ir correlation spectroscopy. *Biopolymers*, 93(12):1072–1084, 2010.
- [61] Infrared Spectroscopy Absorption Table . https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Reference_Tables/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table. [Online] Última revisión: 06/07/2023.
- [62] Michele Di Foggia, Paola Taddei, Armida Torreggiani, Monica Dettin, and Anna Tinti. Self-assembling peptides for biomedical applications: Ir and raman spectroscopies for the study of secondary structure. *Proteomics Research Journal*, 2(3):231, 2011.
- [63] Double Emulsions Controlled generation of water-oil-water (w/o/w) or oil-water-oil (o/w/o) droplets, emulsions or particles . <https://www.dolomite-microfluidics.com/applications/double-emulsions/>. [Online] Última revisión: 06/07/2023.
- [64] Infrared Spectroscopy Absorption Table. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011769_Unstain_Protein_Molec_Wght_Mark_UG.pdf. [Online] Última revisión: 08/07/2023.