



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DOCTORADO EN  
NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

**“Diseño, simulación y fabricación de celda microfluídica para  
la síntesis de micropartículas biopoliméricas”**

T E S I S

Que presenta:

**Aldo Yair Tenorio Barajas**

Para obtener el grado de:

**Doctor en Ciencias  
en  
Nanociencias y Nanotecnología**

Directoras de la Tesis:

Dra. María de la Luz Olvera Amador

Dra. Claudia Oliva Mendoza Barrera

# AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de doctorado.

A mis asesoras Dra. María de la Luz Olvera Amador y la Dra. Claudia Oliva Mendoza Barrera quienes me brindaron todo su apoyo en el desarrollo de este proyecto de investigación, sin su guía y ayuda este no habría sido posible.

A todos los técnicos, personal e instituciones que me brindaron su ayuda para llevar a cabo diversas tareas de caracterización y experimentación, en especial al Dr. Gabriel Romero Paredes, Dr. Víctor M. Altuzar, Dr. Daniel Bahena, Dr. Miguel Alemán Arce, Dr. Salvador Mendoza A., Dr. Jacobo Esteban M., Dr. Ramón Peña S., Dr. Alejandro Ávila, Dr. Víctor Sánchez Reséndiz, Ing. Miguel Galván A., Ing. Miguel Ángel Luna A., Norma Iris G.G. y Benito Nepomuceno J.

Agradezco a mi familia y en especial a Consuelo Ramírez Reyes, quien me brindó su apoyo incondicional y aliento.

A mi esposa e hijos Natalie y Rodrigo, por su comprensión y paciencia, a quienes amo enormemente y quienes me impulsan a dar lo mejor de mí.

# DEDICATORIA

Dedico esta tesis a la memoria de mi hermano Emmanuel González Barajas cuya vida fue brutalmente arrebatada a sus 21 años por la delincuencia que azota nuestro país. Su pérdida afectó gravemente a nuestra familia, te extrañamos hermano.

*Do not go gentle into that good night,  
Old age should burn and rave at close of day;  
Rage, rage against the dying of the light.*

*Though wise men at their end know dark is right,  
Because their words had forked no lightning they  
Do not go gentle into that good night.*

*Good men, the last wave by, crying how bright  
Their frail deeds might have danced in a green bay,  
Rage, rage against the dying of the light.*

*Wild men who caught and sang the sun in flight,  
And learn, too late, they grieved it on its way,  
Do not go gentle into that good night.*

*Grave men, near death, who see with blinding sight  
Blind eyes could blaze like meteors and be gay,  
Rage, rage against the dying of the light.*

*And you, my father, there on the sad height,  
Curse, bless, me now with your fierce tears, I pray.  
Do not go gentle into that good night.  
Rage, rage against the dying of the light*

*Dylan Thomas*

## Lista de Abreviaturas

**ABS.**- Acrilonitrilo butadieno estireno  
**ADN.**- Ácido desoxirribonucleico  
**CAD.**- Diseño asistido por computadora  
**CFD.**- Dinámica de fluidos computacional  
**CINVESTAV.**- Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN  
**CNC.**- Control numérico por computadora  
**DARPA.**- Agencia de proyectos de investigación avanzada para la defensa  
**DI.**- Agua des ionizada  
**EPA.**- Agencia de Protección al Ambiente  
**FTIR.**- Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier  
**HIMS.**- Sistemas microfluídicos altamente integrados  
**HF.**- ácido fluorhídrico  
**IgG.**- Inmunoglobulina G humana  
**IUPAC.**- Unión Internacional de Química Pura y Aplicada  
**MEMS.**- Sistemas micro electro mecánicos  
**MFCs.**- Sistema de control microfluídico  
**NP's.**- Nanopartículas  
**PAMAMO o PAMAM.**- Poliamidoamina órgano silicóna  
**PDMS.**- Polidimetilsiloxano  
**PEG.**- Polietilenglicol  
**pH.**- Potencial de hidrógeno  
**PLGA.**- Ácido poliláctico co-glicólico  
**Proteína E.**- Proteína de envoltura de virus de Dengue  
**PTFE.**- Politetrafluoroetileno  
**PVP.**- Polivinilpirrolidona  
**QN.**- Quitosán o quitosano  
**Raman.**- Espectroscopía infrarroja Raman  
**RIE.**- Grabado por iones reactivos  
**Rpm.**- Revoluciones por minuto  
**Si.**- Silicio  
**TEM.**- Microscopía electrónica de transmisión  
**TPP.**- Tripolifosfato de sodio  
**UV.**- Ultra violeta  
**XPS.**- Espectroscopía de fotoelectrones por rayos X  
**μTAS.**- Micro sistemas de análisis total

# Índice General

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>ii</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>iv</b>
<b>Índice General.....</b>	<b>v</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>x</b>
<b>Índice de Tablas .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>xiv</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>xvi</b>
<b>1 Introducción.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Antecedentes y motivación _____</b>	<b>18</b>
<b>1.2 Planteamiento del problema _____</b>	<b>20</b>
1.2.1 Síntesis tradicional en masa .....	21
1.2.2 Reacciones químicas costosas .....	22
1.2.3 Reacciones químicas no selectivas y de baja productividad.....	23
1.2.4 Reacciones químicas inseguras.....	23
1.2.5 Hipótesis .....	24
<b>1.3 Objetivo general y específicos del proyecto _____</b>	<b>24</b>
1.3.1 Objetivo general .....	24
1.3.2 Objetivos específicos .....	24
1.3.3 Comentarios sobre los objetivos .....	25
<b>1.4 Organización del trabajo _____</b>	<b>26</b>
<b>1.5 Conclusiones del capítulo 1 _____</b>	<b>27</b>
<b>2 Estado del Arte.....</b>	<b>28</b>

<b>2.1 Nanomateriales</b>	<b>28</b>
2.1.1 Hidrogeles acarreadores.....	29
2.1.2 Dendrímeros .....	30
2.1.3 Polímeros electroactivos .....	30
2.1.4 Materiales mesoporosos .....	30
<b>2.2 Técnicas de síntesis</b>	<b>31</b>
2.2.1 Características de las nanopartículas orgánicas .....	33
2.2.2 Métodos de preparación Top-Down .....	34
2.2.2.1 La reducción de partículas mediante fuerzas mecánicas .....	34
2.2.2.2 Métodos litográficos .....	35
2.2.3 Métodos de preparación Bottom-Up .....	36
2.2.3.1 Métodos basados en soluciones .....	36
2.2.3.2 Métodos de emulsiones .....	36
2.2.3.3 Métodos de re-precipitaciones .....	37
2.2.3.4 Técnicas de fluidos supercríticos.....	39
2.2.3.5 Precipitación por formación compleja polielectrolítica .....	39
2.2.3.6 Síntesis de nanopartículas orgánicas en dispositivos microfluídicos .....	40
<b>2.3 Orígenes de la microfluídica</b>	<b>40</b>
2.3.1 Conceptos esenciales de microfluídica .....	43
2.3.1.1 Sistemas abiertos vs cerrados .....	43
2.3.1.2 Ecuación de Navier Stokes .....	46
2.3.1.3 Simulación computacional de sistemas microfluídicos, CFD.....	50
2.3.1.4 El fenómeno de formación de gotas .....	52
2.3.1.5 Consideraciones físicas en un fluido multifase .....	53
2.3.2 Estado del arte de dispositivos microfluídicos .....	55
2.3.2.1 Geometrías y métodos empleados para producir microgotas.....	57
<b>2.4 Conclusiones del capítulo 2</b>	<b>61</b>
<b>3 Desarrollo experimental</b>	<b>62</b>
<b>3.1 Fabricación del sistema de inyección</b>	<b>62</b>
<b>3.2 Simulación computacional</b>	<b>63</b>
<b>3.3 Mascarilla, moldes y chips microfluídicos</b>	<b>64</b>

3.3.1 Creación de moldes con diseños microfluídicos.....	64
3.3.2 Transferencia de patrones mediante PDMS y grabado directo de vidrio .....	65
3.3.3 Sellado de chips .....	66
<b>3.4 Conexiones microfluídicas _____</b>	<b>67</b>
<b>3.5 Síntesis de NP's de QN _____</b>	<b>67</b>
3.5.1 Síntesis masiva.....	67
3.5.2 Síntesis mediante microfluídica.....	68
<b>3.6 Técnicas de caracterización _____</b>	<b>69</b>
3.6.1 Microscopia electrónica de transmisión (TEM) .....	69
3.6.2 Determinación de tamaño de partícula.....	70
3.6.3 Análisis de espectros FTIR y Raman.....	71
3.6.4 Análisis de espectros XPS.....	74
<b>3.7 Creación de sistema de inyección microfluídico _____</b>	<b>75</b>
<b>3.8 Caracterización de líquidos y reactivos empleados en la simulación _____</b>	<b>79</b>
<b>3.9 Simulación microfluídica CFD empleando COMSOL _____</b>	<b>80</b>
3.9.1 Pre-proceso .....	80
3.9.2 Cálculo .....	83
3.9.3 Parámetros de cálculo .....	83
3.9.4 Post-proceso.....	84
<b>3.10 Fabricación de mascarilla con diseños microfluídicos _____</b>	<b>85</b>
<b>3.11 Fabricación de chips microfluídicos _____</b>	<b>86</b>
3.11.1 Transferencia de diseños geométricos.....	86
3.11.1.1 Transferencia de diseños sobre oblea de Si mediante mascarilla.....	87
3.11.1.2 Transferencia de diseños sobre oblea de Si o vidrio mediante láser .....	88
3.11.2 Grabado de canales y sellado de chip .....	89
3.11.3 Fabricación de chips de PDMS-vidrio .....	89
3.11.3.1 Transferencia de canales con PDMS .....	90
3.11.3.2 Sellado de chip PDMS-vidrio mediante plasma O <sub>2</sub> .....	91
3.11.4 Fabricación de chips de vidrio-vidrio.....	91
3.11.4.1 Grabado de canales de vidrio por ataque químico .....	91
3.11.4.2 Grabado de canales mediante RIE .....	93

3.11.4.3 Sellado de chip vidrio-vidrio por fusión térmica .....	94
3.11.5 Conexión de chips microfluídicos .....	96
<b>3.12 Síntesis de Np's de QN en masa _____</b>	<b>97</b>
<b>3.13 Síntesis de Np's de QN mediante microfluídica _____</b>	<b>98</b>
3.13.1 Encapsulado de proteína IgG.....	100
<b>3.14 Técnicas de caracterización _____</b>	<b>101</b>
3.14.1 Preparación de muestras para análisis y caracterización .....	102
<b>3.15 Conclusiones del capítulo 3 _____</b>	<b>102</b>
<b>4 Resultados y Discusión .....</b>	<b>103</b>
<b>4.1 Fabricación de sistema de inyección _____</b>	<b>103</b>
<b>4.2 Caracterización de líquidos empleados en la simulación _____</b>	<b>106</b>
<b>4.3 Simulación _____</b>	<b>108</b>
<b>4.4 Fabricación de la mascarilla _____</b>	<b>110</b>
<b>4.5 Fabricación de moldes para crear chips microfluídicos _____</b>	<b>111</b>
4.5.1 Perfilometría de canales creados sobre vidrio y Si.....	111
4.5.2 Perfilometría chips de Si y vidrio mediante ataque químico y RIE .....	113
<b>4.6 Fabricación de chips de PDMS-vidrio y vidrio-vidrio _____</b>	<b>115</b>
<b>4.7 Síntesis de NP's de QN y NP's de QN + IgG _____</b>	<b>117</b>
4.7.1 Caracterización con microscopio electrónico de transmisión TEM.....	117
4.7.2 Medición de tamaño de partícula y distribución estándar .....	120
<b>4.8 Caracterización composicional de NP's de QN _____</b>	<b>123</b>
4.8.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, FTIR.....	123
4.8.2 Espectroscopía Raman .....	128
4.8.3 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X, XPS .....	130
<b>4.9 Conclusiones Generales _____</b>	<b>133</b>
4.9.1 Consideraciones.....	134
<b>Potencial aplicación, y trabajo futuro .....</b>	<b>136</b>



<b>5.1 Perspectivas</b>	<b>140</b>
<b>Anexo</b>	<b>143</b>
<b>Protocolos experimentales</b>	<b>143</b>
Fabricación de mascarilla	144
Limpieza de sustratos de silicio, proceso RCA	145
Limpieza de vidrio	146
Colocación de Cr sobre vidrio	147
Aplicación de resina y fotolitografía	148
Fotolitografía con mascarilla y alineadora	149
Grabado con RIE, sobre silicio	150
Grabado químico, sobre silicio	151
Grabado de chips de vidrio	152
Preparación y vaciado de PDMS	153
Unión de PDMS a vidrio, sellado del chip microfluídico	154
Unión de vidrio a vidrio, sellado de chip microfluídico	155
Síntesis de Np's de QN en vaso de precipitado	156
Síntesis de Np's de PVP en vaso de precipitado	157
Síntesis de Np's copoliméricas QN/PVP	158
Síntesis de Np's de QN en dispositivo microfluídico	159
Preparación de muestras para observación mediante TEM	160
Preparación de muestras para análisis FTIR	161
Preparación de muestras para observación con XPS	162
Preparación de muestras para caracterización Raman	163
Preparación de muestras para observación con Perfilómetro	164
<b>Bibliografía</b>	<b>165</b>

# Índice de Figuras

Figura 1.- Escalas de distintas partículas y su comparación con elementos biológicos [7].	32
Figura 2.- Incremento del movimiento de una partícula de fluido.	44
Figura 3.- Modelo que simplifica la resolución del problema de fases. Se asignan valores a la advección de interfaz entre agua y aceite: 0.0 en el interior, 0.5 en la interfaz y 1.0 en el exterior.	55
Figura 4.- Distintas geometrías para producir microgotas, unión T, co-flujo y enfoque de flujo [69].	58
Figura 5.- Paralelización de producción de gotas [69].	58
Figura 6.- Capilares coaxiales microfluídicos para producir. <b>1a)</b> Gotas de agua en aceite W/O. <b>1b)</b> gotas dobles W/O/W. <b>1c)</b> Triples W/O/W/O. <b>a,b y c bis.</b> Montaje experimental y resultados [69].	59
Figura 7.- Métodos de producción de micropartículas mediante microfluídica [69].	60
Figura 8.- Formación de partículas de múltiples fases por separación de fases dentro de microgotas. En a) compuestos utilizados, b) mecanismo de separación y formación de fases [69].	61
Figura 9.- Diagrama de flujo de ejecución del trabajo experimental.	76
Figura 10.- Interfaz gráfica creada mediante LabView para controlar el sistema de inyección y sistema de inyección fabricado con impresión 3D y motores NEMA y Arduino.	77
Figura 11.- Diagrama de conexión de motores NEMA 23 a tarjeta Arduino y controladores A4988, renderizado de las bombas armadas.	79
Figura 12.- Propuesta geométrica de los canales y dirección de entrada del flujo de los fluidos.	80
Figura 13.- Regiones o dominios asignados como punto de partida para la simulación, condiciones de frontera entre líquidos y paredes en $t=0$ , así como establecimiento de parámetros y condiciones iniciales.	81
Figura 14.- Mallado del diseño, discretización en elementos finitos.	82
Figura 15.- Editor de mascarillas.	86
Figura 16.- Alineadora de mascarillas.	87
Figura 17.- Obleas de Si con patrones transferidos mediante mascarilla y alineadora.	88
Figura 18.- Transferencia de patrones de forma directa sobre sustrato de vidrio.	88
Figura 19.- Proceso fotolitográfico.	89
Figura 20.- Replicado de canales microfluídicos con PDMS.	90
Figura 21.- Rampa de calentamiento y enfriamiento para unión de vidrio.	95
Figura 22.- Creación de puertos en chip de PDMS y conexión con mangueras de PTFE.	96
Figura 23.- Conexión de chip de vidrio en plataforma de aluminio.	96

Figura 24.- Síntesis tradicional mediante goteo y vaso de precipitado. ....	97
Figura 25.- Procedimiento gráfico de síntesis de NP's de QN. ....	98
Figura 26.- Formación de gotas de QN en chip microfluídico. ....	99
Figura 27.- Mecanismo de nucleación y formación de NP's de QN. ....	100
Figura 28.- Formación de microgotas de QN + IgG. ....	101
Figura 29.- Gráficas de flujo vs pasos de motor de sistema de inyección microfluídico dependiendo del tipo de jeringa empleada. ....	104
Figura 30.- Diseño y fabricación de piezas de soporte y conexión a) y b) sistema de inyección. ....	105
Figura 31.- Gráfica de concentración vs viscosidad de QN de bajo peso molecular. ....	106
Figura 32.- Gráfica de concentración vs viscosidad de polivinilpirrolidona de 40 KDa. ....	107
Figura 33.- Resultado de la simulación, perfil de presiones y comparación con el experimento real. ....	108
Figura 34.- Resultados de simulación computacional variando la velocidad de inyección de QN. Todas las imágenes se obtuvieron en $t=0.05$ s. ....	109
Figura 35.- Velocidades de inyección de fase hidrofílica iguales y superiores a la fase hidrofóbica. ....	110
Figura 36.- Diseño CAD de la mascarilla (izquierda) y mascarilla fabricada (derecha). ....	111
Figura 37.- Regiones de medición de canales con perfilómetro. ....	112
Figura 38.- Perfiles de canales en resina sobre substrato de vidrio, los perfiles a), b) y c) corresponden con las zonas a), b) y c) de la Figura 37. El molde se empleó para replicar los canales. Escala en micras. ....	112
Figura 39.- Perfil de canal. Ataque químico de vidrio B270 con Cr y resina. ....	114
Figura 40.- Perfil de canal. Ataque químico de vidrio B270, solo con resina. ....	114
Figura 41.- Perfil de canal. Ataque químico de vidrio B270 con resina. ....	114
Figura 42.- Perfil canal. Ataque de Si mediante RIE. ....	115
Figura 43.- Perfil canal. Ataque químico sobre silicio poroso. ....	115
Figura 44.- a) Chips grabados con HF, b) unión térmica de chips de vidrio con peso, c) apertura de canales y d) conexión de chip en plataforma de aluminio y conectores. ....	116
Figura 45.- Micrografías electrónicas de transmisión de nanopartículas de QN sintetizadas mediante microfluídica. Imágenes superiores en negativo. ....	117
Figura 46.- Nanopartículas de QN por microfluídica. a) Nanopartícula con proteína IgG encapsulada, b-d) nanopartículas de QN con tinción de azul alamar. Se aprecia una estructura tipo micelar, con cápside y sin contenido, morfología esférica y distribución poco variable. ....	118
Figura 47.- Imágenes de nanopartículas de QN sintetizadas mediante microfluídica. ....	119
Figura 48.- b) Distribución normal del diámetro de la partícula de la imagen a). ....	121
Figura 49.- b) Distribución normal del diámetro de la partícula de la imagen a). ....	121
Figura 50.- b) Distribución normal del diámetro de la partícula de la imagen a). ....	121

Figura 51.- Distribución normal del diámetro de la partícula de la imagen a). .....	121
Figura 52.- Nanopartículas de QN de distintos pesos moleculares sintetizadas mediante método tradicional en masa [45]......	122
Figura 53.- Espectro FTIR de proteína IgG humana, con los picos característicos de las bandas vibracionales. ....	124
Figura 54.- Espectro FTIR de proteína IgG humana, acercamiento a la zona de interés de 350 a 2000 nm. ....	124
Figura 55.- Espectro FTIR de nanopartículas de QN, con las bandas características de los grupos funcionales del biopolímero. ....	126
Figura 56.- a) Espectro FTIR de nanopartículas de QN, polímero QN y TPP, con las bandas características del biopolímero y entrecruzante; b) proceso de gelificación iónica en solución ácida [77]......	127
Figura 57.- Espectro FTIR de nanopartículas de QN, proteína IgG y el conjugado NP's de Qn+IgG. ...	128
Figura 58.- a) FTIR de nanopartículas de QN, proteína IgG y, b) el conjugado NP's de QN+IgG. ....	128
Figura 59.- Espectro Raman de nanopartículas de QN, proteína IgG y el conjugado NP's de QN+IgG. ....	129
Figura 60.- Espectro survey XPS de a) la proteína IgG, b) las NP's de QN y c) el conjugado QN+IgG. .	131
Figura 61.- Espectro XPS de a) orbital S(2p) de azufre de a) NP's de QN, b) proteína IgG y c) conjugado QN+IgG. ....	132

# Índice de Tablas

Tabla 1.- Ejemplos de derivadas respecto al tiempo y su significado. ....	45
Tabla 2.- Suposiciones básicas de flujo y sus declaraciones matemáticas. ....	49
Tabla 3.- Números adimensionales de interés en la microfluídica. ....	52
Tabla 4.- Resultados de búsqueda en distintos portales al emplear la palabra “microfluidics”, 2019..	57
Tabla 5.- Componentes empleados para la fabricación del sistema microfluídico de inyección. ....	78
Tabla 6.- Condiciones de fabricación de mascarilla. ....	85
Tabla 7.- Condiciones de fabricación de patrones sobre obleas de Si. ....	88
Tabla 8.- Condiciones empleadas para la funcionalización de PDMS con O <sub>2</sub> . ....	91
Tabla 9.- Composición química y propiedades de vidrio Schott B270. ....	92
Tabla 10.- Parámetros de ataque químico sobre Si y vidrio Schott B270. ....	92
Tabla 11.- Parámetros empleados para ataque de Si mediante RIE. ....	93
Tabla 12.- Rampa de calentamiento y enfriamiento para fusión térmica de vidrio. ....	95
Tabla 13.- Presiones a las que se logra formación de gotas de QN en aceite. ....	100
Tabla 14.- Rangos de inyección que se logran con el sistema microfluídico variando el diámetro de jeringa. ....	104
Tabla 15.- Viscosidad [g/cm*s] del QN a distintas concentraciones y velocidades de medición. ....	106
Tabla 16.- Viscosidad [g/cm*s] del PVP a distintas concentraciones y velocidades de medición. ....	107
Tabla 17.- Distribución estándar y tamaño de partícula. ....	120
Tabla 18.- Análisis de espectro FTIR, bandas vibracionales características de la proteína IgG humana. Adaptado de [73, 74]. ....	123
Tabla 19.- Bandas vibracionales características del espectro del QN, TPP y NP's de QN. Adaptado de [109]. ....	125
Tabla 20.- Concentración de N(1s) y S(2p) por XPS. ....	131

# Resumen

En este trabajo de tesis se propone el desarrollo de un sistema microfluídico que incluye la fabricación del sistema de inyección mediante motores a pasos, piezas impresas en 3D y la implementación de software mediante Arduino® y LabView®. Se propuso la geometría y se simuló la celda microfluídica mediante el método de elemento finito, empleando COMSOL®. Finalmente, se fabricó la celda microfluídica mediante fotolitografía y su correcta operación se probó mediante la síntesis de nanopartículas (NP's) de Quitosán (QN).

Se fabricaron celdas con dos materiales, vidrio-vidrio y polidimetilsiloxano-vidrio. Logramos optimizar las condiciones para la fabricación de canales microfluídicos hasta  $2\pm 0.2$   $\mu\text{m}$  de ancho de canal mediante fotolitografía y grabado con ácido fluorhídrico (HF), en el caso de las celdas de vidrio. Para las celdas de polidimetilsiloxano (PDMS)-vidrio se empleó Si como substrato y resina como molde, el cual se replicó con PDMS. El vidrio fue empleado para sellar el PDMS. El correcto sellado de celdas de vidrio-vidrio y vidrio-PDMS se realizó mediante unión térmica a  $560^\circ\text{C}$  y funcionalización superficial con plasma de oxígeno, respectivamente. La exitosa conexión a un sistema de inyección microfluídico de fabricación propia y uno comercial (MFCS-EX), se hizo con piezas creadas en este trabajo de tesis. La síntesis de NP's de QN y el encapsulado de proteína IgG se logró mediante el dispositivo microfluídico creado.

Los dispositivos microfluídicos fueron caracterizados mediante perfilometría para asegurar su relación de aspecto diseño-fabricación donde encontramos una relación de 90 % de similitud entre el diseño y el dispositivo creado mediante ataque isotrópico en vidrio Schott B270. Se empleó régimen de formación de gota de agua en aceite dentro de canales de 12 y 20  $\mu\text{m}$ . Para esto se empleó aceite mineral con

Span 80 y QN disuelto en agua con [pH 3] como fase acarreadora y fase dispersa, respectivamente. Como entrecruzante se empleó tripolifosfato de sodio (TPP). Para la formación y nucleación de las NP's se propuso un mecanismo de emulsión de agua en aceite y migración de entrecruzante por difusión dentro de las gotas biopoliméricas que funcionan como micro reactores. Se logró la síntesis de NP's de QN de  $15.41 \pm 4.07$  nm de diámetro promedio y forma esférica. Las NP's fueron analizadas mediante TEM, FTIR, Raman y XPS. La prueba del dispositivo se llevó a cabo mediante la síntesis de las NP's mencionadas, en flujo continuo.

El uso de las NP's de QN como potencial acarreador adyuvante se demuestra mediante el encapsulamiento de proteína IgG. El trabajo se centró en el desarrollo del sistema de inyección, la propuesta geométrica del dispositivo microfluídico, la simulación computacional y su fabricación, la prueba del dispositivo mediante la síntesis de NP's biopoliméricas de QN y el encapsulado de proteína IgG así como pruebas biológicas de toxicidad.

Finalmente presentamos una posible aplicación de los dispositivos microfluídicos que hemos probado en trabajos anteriores. Consideramos que con los resultados obtenidos de la síntesis de las NP's de QN empleando un sistema microfluídico, se tendrá un impacto positivo en su desempeño como acarreadores adyuvantes y encapsulantes de proteína.

# Abstract

In this thesis, we propose the development of a microfluidic system that includes the manufacture of the injection system using stepper motors, 3D printed parts and the implementation of software using Arduino and LabView. The geometry was proposed, and the microfluidic cell was simulated using the finite element method using COMSOL. The microfluidic cell was manufactured by photolithography, and its correct operation was tested by the synthesis of nanoparticles (NP's) from Chitosan (QN).

We managed to optimize the conditions for the manufacture of microfluidic channels up to 2  $\mu\text{m}$  channel width by photolithography and HF-etched, in the case of glass cells. For the polydimethylsiloxane (PDMS) -green cells Si was used as a substrate and resin as a template, which was replicated with PDMS; For the sealing of the PDMS cells, glass was used. The correct sealing of glass-glass and glass-PDMS cells was performed by thermal bonding at 560 ° C and surface functionalization with oxygen plasma, respectively. The successful connection to a microfluidic injection system of our manufacture and a commercial one (MFCS-EX), was made with pieces created by us. The synthesis of NPs of QN and the encapsulation of IgG protein was achieved by the microfluidic device created.

The microfluidic device was characterized by profilometry to ensure its design-manufacturing aspect ratio where we found a 90% similarity relationship with the design and isotropic attack on Schott B270 glass. The water-in-oil drop formation regime was used within 12 and 20  $\mu\text{m}$  channels. For this, mineral oil with Span 80 and QN dissolved in water with (pH 3) was used as the carrying phase and dispersed phase, respectively; Sodium tripolyphosphate (TPP) was used as a crosslinker. For the formation and nucleation of the NP's, a mechanism of a water-in-oil emulsion and cross-linking migration by diffusion is proposed within the biopolymer droplets that



function as microreactors. We achieved the synthesis of NPs of QN of  $15.41 \text{ nm} \pm 4.07 \text{ nm}$  of average diameter and spherical shape. The NPs were analyzed by TEM, FTIR, Raman, and XPS. The test of the device was carried out using the synthesis of the NP's mentioned, in a continuous flow.

The use of QN NPs as a potential adjuvant carrier is demonstrated by encapsulation of IgG protein. The work focused on the development of the injection system, the geometrical proposal of the microfluidic device, the computational simulation and its manufacture, the device test through the synthesis of QN biopolymer NPs and the IgG protein encapsulation.

Finally, we present a possible application that we have tested in previous works. We consider that with the results obtained from the synthesis of the NPs of QN using a microfluidic system, it will have a positive impact on their performance as adjuvant carriers and protein encapsulants.

Currently, as a complementary work, these NPs NPs are being tested *in vitro* models to study their applicability.

# 1

## Introducción

Este capítulo describe los antecedentes y motivaciones que sirvieron para desarrollar este trabajo de tesis. También se presentan los objetivos generales y específicos, el planteamiento del problema y la hipótesis de trabajo que dió origen al presente desarrollo.

### 1.1 Antecedentes y motivación

La síntesis de NP's biopoliméricas biodegradables es de suma importancia en las áreas biológicas [1-3]. Es bien conocido el empleo de NP's inorgánicas con propósitos biológicos para combatir cáncer, el acarreo de fármacos o proteínas [4]. Estas partículas pueden representar un riesgo potencial en modelos biológicos por su acumulación, baja o nula eliminación o toxicidad una vez que cumplieron el cometido para el que se les fabricó. Por otro lado, el uso de NP's biopoliméricas es deseable ya que después de cumplir su función pueden ser desechadas del cuerpo por las distintas rutas biológicas y por tanto no representan un riesgo para la salud [5-8]. Ejemplo de ello son los polisacáridos y sus derivados, como el alginato, celulosa y quitina.

Se sabe que la síntesis por rutas comunes, como la síntesis tradicional en masa, produce NP's de muy diversos tamaños y formas. Tanto la síntesis de NP's inorgánicas como orgánicas dependen enormemente de variables como temperatura, pH, concentración y proporción de los precursores, tipo de solventes, velocidades y tiempo de agitación durante la síntesis, entre otras.

Encontrar las variables adecuadas que permitan fabricar las NP's con la morfología y dispersión deseadas puede llegar a convertirse en un reto. Es aquí donde entra la nanotecnología, mediante el empleo de diversas y nuevas tecnologías como la microfluídica. En este caso es posible crear y controlar de una manera más precisa las variables que intervienen en las reacciones químicas [3]. La microfluídica escala las dimensiones a las cuales se manipulan los reactivos y químicos involucrados en la síntesis, con el consiguiente ahorro de materiales y la potencialización del número de reacciones que se pueden llevar a cabo en un tiempo mucho menor mediante paralelización. No obstante, no todo es positivo, pues esta tecnología puede llegar a ser costosa debido al equipamiento requerido para los procesos relacionados con su fabricación, así como la implementación y automatización de estos. Determinar las condiciones para la creación de la geometría adecuada de los sistemas microfluídicos, el grabado y sellado de los dispositivos puede ser difícil sin la experiencia y la infraestructura adecuada. El control de la inyección de los líquidos también es crucial durante el proceso, así que el control que se gana en el proceso de síntesis mediante chips microfluídicos se paga mediante el costo de equipamiento, la automatización y producción de los chips. Esto se puede superar mediante el empleo de una nueva estrategia en el área. Las nuevas tendencias se enfocan en el empleo de papel para fabricar los chips u otros materiales de menor costo que el silicio como los polímeros sintéticos o vidrio, así como técnicas pasivas de inyección y escalas de canal mucho mayores que no requieran del uso de la fotolitografía y cuartos limpios. Otra vertiente emplea canales microfluídicos mediante capilares o impresión 3D [9-17].

Una ventaja hoy en día es el empleo de la simulación computacional previo a la fabricación de los dispositivos microfluídicos. Mediante esta tecnología se pueden crear los modelos o dispositivos de forma virtual, hacer la prueba de concepto y la corrección de errores antes de su fabricación. El auge de las empresas de microfluídica en Europa y Estados Unidos permite hacer uso de sus instalaciones para la fabricación de dispositivos microfluídicos, sin la necesidad de hacer una inversión mayor en equipos y cuartos limpios. Esto ofrece ventajas para casos donde la tecnología es escasa y la rama de la microfluídica aún está en vías de desarrollo [18].

La principal actividad de este trabajo se centró en lograr la fabricación de un dispositivo microfluídico que permita un mejor control sobre el tamaño de las NP's de QN y la posibilidad de encapsular proteína, lo cual no es posible lograr mediante la síntesis en bulto. La principal motivación fue la incursión en esta nueva rama de investigación que se encuentra en desarrollo en nuestro país así como, la creación de un sistema o plataforma microfluídica, la cual sabemos tiene un enorme potencial en cuanto a aplicaciones y usos se refiere.

## 1.2 Planteamiento del problema

Al momento de iniciar este trabajo en 2014, había pocos grupos de investigación interesados en el estudio y desarrollo de sistemas microfluídicos para la síntesis de NP's en México. En el año 2017 se llevó a cabo el primer simposio nacional de micro y nanofluídica en el Laboratorio Nacional de Micro y Nanofluídica en la ciudad de Querétaro. Fue hasta ese momento cuando tuvimos contacto con los primeros investigadores que estaban incursionando y trabajando en el área de la microfluídica. Como ya mencionamos anteriormente la síntesis de materiales nanoestructurados se ve favorecida por el empleo de la microfluídica. En trabajos previos hemos sintetizado

NP's de QN mediante la síntesis tradicional en masa, sin embargo, el control sobre la morfología o tamaño es difícil.

Actualmente, el encapsulado de proteína es un reto ante la carencia de una plataforma o sistema microfluídico razón por la que se justifica el desarrollo de tecnología propia. La inexistencia de una línea de investigación en CINVESTAV o en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla enfocada a la microfluídica nos obliga a incursionar en un tema novedoso. Esta carencia se ve compensada con el enorme potencial y el conocimiento existente en el área de la fotolitografía dentro de la sección de Electrónica de Estado Sólido y con la cooperación entre los distintos departamentos e investigadores de ambas instituciones en programas multidisciplinarios como el Doctorado en Ciencias en Nanociencias y Nanotecnologías. Esto permite la colaboración interdepartamental e interinstitucional.

### 1.2.1 Síntesis tradicional en masa

El principal problema al momento de hacer cualquier síntesis es el empleo de los reactivos involucrados. En algunos procesos los reactivos pueden no representar un problema en cuanto a costo se refiere, sin embargo, el avance de la tecnología lleva implícito un mayor control en la calidad y pureza de los compuestos empleados en la síntesis. Para la creación de materiales nanoestructurados, es sabido que materiales más puros y procesos de síntesis con mayor control sobre las variables, así como ambientes libres de contaminantes, producen resultados con mejores rendimientos y producción. Un ejemplo muy claro es la industria de semiconductores que mejoró notablemente con la automatización de los procesos, el uso de cuartos limpios, la eliminación del factor humano propenso a errores y el empleo de precursores y reactivos más puros durante el proceso de fabricación [19].

### 1.2.2 Reacciones químicas costosas

Algo similar sucede en la síntesis y producción de NP's orgánicas e inorgánicas. Para mejorar las características de éstas se debe tener un mejor control sobre las variables de la síntesis, desde los reactivos empleados y las condiciones físicas que determinan su formación. Esta necesidad ha sido más notoria sobre todo en las áreas biológicas donde los materiales empleados son costosos y a veces se dispone de cantidades muy pequeñas para llevar a cabo los experimentos, materiales como ADN, proteínas, tintes, células, fármacos, entre otros pueden ser difíciles de purificar u obtener, lo que los vuelve muy valiosos [20].

El ejemplo más claro se da en la industria farmacéutica. Las grandes empresas tienen bases de hasta un millón de moléculas para llevar a cabo experimentos donde se busca mediante cribado, el mejor candidato para el desarrollo de nuevas medicinas o fármacos. La imperiosa necesidad de llevar a cabo enormes cantidades de experimentos con poco material y analizar los resultados obligó primero a reducir los volúmenes de los reactivos involucrados en los experimentos y posteriormente a automatizar los procesos y análisis de los resultados [21].

El empleo de cantidades pequeñas de reactivos tiene ciertas ventajas sobre el empleo de materiales en bulto. La relación de área superficial vs volumen se ve incrementada al contar con una mayor área superficial. Las reacciones químicas se llevan a cabo de una manera más rápida, ya que los compuestos se encuentran en íntimo contacto. También es sumamente valioso el ahorro en materiales y la información que se obtiene en la fase de prueba o investigación. Mediante el empleo de menores cantidades de reactivos se puede escalar posteriormente a la producción industrial. Estas condiciones ofrecen una mejor homogeneidad térmica y aseguran que las cantidades involucradas en las reacciones sean siempre las mismas [22].

Esto no ocurre en un vaso de precipitados o un matraz, por ejemplo. Bajo condiciones tradicionales, habrá un gradiente de temperatura entre la base en contacto con la fuente de calor y la parte más alejada de esta. Al momento de poner dos compuestos en contacto, las reacciones pueden ser más o menos veloces que la difusión entre los compuestos [23].

### 1.2.3 Reacciones químicas no selectivas y de baja productividad

En un sistema tradicional de síntesis, la selectividad es un problema. Al tener constantemente en contacto dos precursores A+B que generan un producto C, este último continúa teniendo contacto o interactuando en el proceso de síntesis A+B hasta que ésta termina. En cambio, en un sistema de flujo continuo o de gotas como el que se puede lograr en los sistemas microfluídicos, el producto C no sigue en contacto con los precursores A y B. La presencia de productos indeseados o intermedios se reduce significativamente. Esto se logra mediante la individualización de las fases en un medio continuo o acarreador. Este fenómeno puede verse como la creación de micro reactores independientes en donde se llevan a cabo cientos o miles de experimentos de forma secuencial [24].

### 1.2.4 Reacciones químicas inseguras

Las reacciones químicas en masa tienen propiedades intrínsecas que hacen algunas reacciones peligrosas por la inestabilidad de los procesos o el carácter exotérmico de las reacciones. El empleo de volúmenes menores lleva implícita una exposición menor a agentes tóxicos, reactivos o explosivos, haciendo los procesos más seguros así también el rápido transporte térmico debido a la relación de área superficial vs volumen genera una pérdida o ganancia de calor más rápida en reacciones exotérmicas o endotérmicas [25].

### 1.2.5 Hipótesis

¿Es posible la creación de una plataforma microfluídica para producir NP's biopoliméricas de QN con un tamaño y monodispersidad controlada, así como el encapsulamiento de proteína en su interior para su uso como acarreador adyuvante?

## 1.3 Objetivo general y específicos del proyecto

### 1.3.1 Objetivo general

El objetivo de esta tesis es diseñar y fabricar un sistema de inyección microfluídico, su automatización a través de software y una interfaz de Arduino para poder inyectar con jeringas. Así como chips microfluídicos para sintetizar nanopartículas de QN con proteína IgG encapsulada.

### 1.3.2 Objetivos específicos

- I. Proponer una geometría y simular la operación y funcionamiento de la celda microfluídica en régimen de formación de gota empleando análisis por elemento finito.
- II. Diseñar y simular un sistema de inyección microfluídico con motores a pasos e inyección con jeringas.
- III. Fabricar la celda o chip microfluídico con PDMS y vidrio.
- IV. Caracterizar el chip microfluídico.
- V. Conectar y probar el sistema de inyección microfluídico.
- VI. Sintetizar NP's biopoliméricas de QN mediante chip microfluídico.
- VII. Encapsular proteína IgG en las NP's de QN.
- VIII. Caracterizar morfológica y composicionalmente las NP's de QN.



### 1.3.3 Comentarios sobre los objetivos

Una de las partes más importantes del sistema es el mecanismo de inyección. El control de los flujos es crucial y determinante para la dosificación de los reactivos. Esto se propuso lograrlo mediante motores a pasos y un sistema de inyección versátil empleando jeringas. Las jeringas se encuentran comercialmente disponibles, son estériles, desechables, de bajo costo, resistentes a una gran variedad de productos químicos, se encuentran disponibles en varios diámetros y capacidades, hay disponibles desde 10  $\mu$ l, hasta 50 ml. La fabricación se propone mediante componentes comercialmente disponibles y piezas impresas en 3D. La implementación se hará mediante una tarjeta Arduino® y LabView® que puede correr en cualquier PC de escritorio para tener control de la inyección.

La geometría adecuada permite la formación de gotas dentro un líquido acarreador, esto se puede lograr mediante el empleo de geometrías 2D tipo “T” o “Y”. La estrategia es buscar en la literatura la información necesaria para proponer una geometría acorde con nuestra necesidad. El siguiente paso es la simulación de esta geometría mediante elemento finito empleando software como ANSYS® y COMSOL®. Para esto se deben caracterizar los líquidos que se van a emplear en la simulación.

El siguiente paso después de la simulación es su fabricación. Para esto se debe proponer una geometría acorde a las capacidades de los equipos e instalaciones disponibles en la institución. Los materiales de la celda deberán ser también materiales disponibles comercialmente, de fácil adquisición al alcance de la institución. Una vez fabricado el dispositivo es necesario validar la dimensionalidad y similitud, comparando el diseño propuesto con el dispositivo fabricado. Esto se logrará mediante la caracterización con perfilómetro y microscopio óptico con micrómetro acoplado, para medir y comparar los resultados.

El conectar el sistema de inyección microfluídico con la celda microfluídica es esencial para poder controlar e inyectar los reactivos. Esto se puede hacer mediante plataformas o piezas comercialmente disponibles, o se puede fabricar un sistema propio para tal propósito. Una vez fabricado el chip se debe probar y sintetizar nanopartículas biopoliméricas con tamaño uniforme, controlando monodispersidad y morfología, empleando el chip microfluídico fabricado y el sistema de inyección microfluídico. El último paso consiste en encapsular proteína dentro de las nanopartículas biopoliméricas para comprobar su uso como potencial acarreador, y finalmente caracterizar las NP's en cuanto a morfología, monodispersidad, composición y tamaño para evaluar la mejoría del uso de la microfluídica respecto a la síntesis en masa.

#### 1.4 Organización del trabajo

En el capítulo 1 se menciona la importancia del desarrollo de este trabajo y la motivación que nos lleva a ejecutarlo; se plantea el problema principal que pretende resolverse mediante la creación e implementación de una nueva tecnología que se encuentra en desarrollo en México y que tiene un crecimiento considerable en el extranjero, con una amplia gama de aplicaciones.

El capítulo 2 presenta los fundamentos teóricos y el estado del arte relacionado a la síntesis de nanopartículas biopoliméricas y desarrollo de sistemas microfluídicos. Así como las bases teóricas involucradas. Se mencionan los métodos de síntesis más comúnmente empleados y los sistemas microfluídicos para la síntesis de nanopartículas.

El capítulo 3 trata las generalidades del desarrollo experimental y las técnicas de caracterización. Se proporciona una breve explicación de los fundamentos teóricos de las técnicas empleadas.

El capítulo 4 presenta el trabajo experimental realizado. Aborda la fabricación del sistema de inyección, la simulación y fabricación del dispositivo microfluídico y la síntesis de las NP's de QN, así como la preparación de muestras para las distintas caracterizaciones, los resultados y la discusión de estos, así como la conclusión general de este trabajo de investigación.

El capítulo 5 explora una posible aplicación de la tecnología y trabajos futuros que son de interés para el desarrollo de la microfluídica en México y hacia donde me gustaría encaminar el trabajo futuro.

## 1.5 Conclusiones del capítulo 1

En esta sección se reportó una introducción al problema planteado. Aunque el uso de la microfluídica tiene ventajas sobre la síntesis en masa, los expertos en la materia consideran que esta tecnología no reemplazará el uso tradicional de síntesis en vaso de precipitados o matraz y que sí substituirá su uso en las aplicaciones que lo requieran [24]. Dependiendo de la conveniencia de la aplicación entre uno y otro método debe considerarse su uso e implementación. Abordamos la hipótesis como resultado del análisis del problema y se describió el objetivo general y específicos que se pretenden cumplir con la realización de este trabajo de investigación. También se proporcionó la estructura general y contenido de la tesis.

# 2

## Estado del Arte

### 2.1 Nanomateriales

El campo de las nanopartículas ha tenido un rápido desarrollo en las últimas décadas. Esto puede observarse por la cantidad de publicaciones que existen sobre el tema, tan solo una búsqueda en el portal Google Académico, en bases de datos especializadas, patentes, revistas y libros, arroja más de 2,030,000 resultados al emplear la palabra “nanopartículas”. La gran variedad que existen de ellas y sus usos son tan amplios como los elementos y compuestos que pueden desarrollarse con la tabla periódica. Existen incontables polímeros y combinaciones de tamaños, morfologías, técnicas de síntesis y aplicaciones. Debido a estas amplias características y categorías, es necesario hacer una delimitación que concierna al área de nuestro interés, sin embargo, haremos una breve mención de manera general sobre el tema de las nanopartículas.

La primera distinción que se debe hacer es referente al tamaño de partícula. Si bien la palabra nanopartícula se refiere a una partícula de tamaño nanométrico, la cual debería estar dentro del rango de 1 a 100 nm de forma estricta, esto ha sido tema de debate. Algunos autores no consideran a las partículas de más de 100 nm dentro de la categoría de nano, sin embargo, la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), por sus siglas en inglés, considera como nanopartículas todas aquellas partículas en el rango de  $1 \times 10^{-9}$  m hasta  $1 \times 10^{-7}$  m. La agencia de protección al ambiente de Estados Unidos (EPA) por sus siglas en inglés, identifica cuatro grandes

grupos, dependiendo de su diámetro: ultrafinas [ $\varnothing \leq 100$  nm], finas [ $100$  nm  $< \varnothing \leq 2500$  nm], gruesas [ $2.5$   $\mu$ m  $< \varnothing \leq 10$   $\mu$ m] y extragruesas [ $\varnothing > 10$   $\mu$ m], respectivamente. La importancia de esta distinción radica en que las propiedades físicas y químicas de los materiales comienzan a cambiar por debajo de los 100 nm. Características como; área superficial, reactividad, capacidad de atravesar membranas, propiedades como, dispersión y propiedades electroquímicas, entre otras, son afectadas. Estas propiedades las hace deseables en áreas de aplicación como la biomedicina, óptica y electrónica [26]. Recientemente en el año 2016, se comienza a hacer una distinción entre las nanopartículas y los materiales liberadores de fármacos. También la IUPAC hace esta distinción y crea tres grandes categorías dentro de los materiales liberadores de fármacos: las nanopartículas, las micelas y los liposomas [27].

El empleo de nanopartículas como acarreadores para aplicaciones biológicas lleva implícito el problema de su eliminación tras cumplir su cometido. Esto hace necesario el empleo de materiales biocompatibles, biodegradables o inocuos para su desarrollo. Otro aspecto para tomar en cuenta es la dosis, ruta de administración, efectos secundarios, vida media del fármaco y farmacocinética. Empleando materiales específicos, podemos controlar las variables presentes en un sistema de liberación del fármaco, haciendo que sean más efectivos y seguros.

### 2.1.1 Hidrogeles acarreadores

Algunos sistemas acarreadores como los hidrogeles, polímeros hidrofílicos entrecruzados, altamente hidratados, pueden reaccionar a estímulos externos como pH, luz, temperatura, concentración iónica, campo magnético o químicos. Los hidrogeles pueden cambiar sus propiedades como permeabilidad, elasticidad o hidrofobicidad. Las ventajas de emplear un hidrogel son: su habilidad de deformación incrementa la retención y adhesión, el entrecruzamiento mejora la estabilidad, y su

tiempo de circulación. Pequeñas moléculas, biomacromoléculas y fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos se pueden transportar. Los geles se pueden ajustar a la carga acarreadora y su liberación puede ser controlada. Se tiene control sobre su tamaño, presentan una síntesis simple, baja toxicidad y habilidad de dirigirse a un objetivo en particular [27].

### 2.1.2 Dendrímeros

Los dendrímeros son estructuras tridimensionales súper ramificadas con un índice de polidispersidad muy estrecho. El control sobre su estructura permite la funcionalización de su superficie. Los espacios entre las ramificaciones proveen un volumen para cargar o transportar fármacos. Existen dos procesos de síntesis de dendrímeros y existe una gran variedad, entre los que se encuentran el cristal líquido, tecto, quiral, PAMAMOS, PAMAM, etc. que pueden fabricarse a base de péptidos y carbohidratos [28, 29].

### 2.1.3 Polímeros electroactivos

Son polímeros que reaccionan cambiando su tamaño o forma cuando un campo eléctrico pasa a través de ellos. También los polímeros con propiedades redox son considerados como electroactivos. Pueden ser empleados para sensar y liberar moléculas, empleando las propiedades redox se puede controlar el transporte a través de la membrana polimérica [30].

### 2.1.4 Materiales mesoporosos

Mediante el empleo de una combinación de materiales que presenten solubilidad-insolubilidad se pueden crear partículas que posteriormente, de ser sintetizadas,

permitan disolver la fase que funciona como plataforma. Esto crea partículas sólidas con propiedades porosas. La combinación y control sobre las cantidades o concentraciones que intervienen en las fases permite controlar el tamaño de poro y tamaño de partícula, así como el área superficial y su funcionalización. Los materiales mesoporosos son un sistema de liberación de fármaco prometedor también pueden ser diseñados para responder a estímulos externos [31, 32].

## 2.2 Técnicas de síntesis

Existen muchas y muy variadas técnicas de síntesis, sin embargo, hay dos grandes grupos en las que se pueden clasificar: “*bottom up*” y “*top down*”. Ejemplo de proceso top-down es la ablación, en el cual las nanopartículas se obtienen de una fracción más grande del material. Por otro lado un proceso bottom-up es la síntesis de compuestos o moléculas que dan origen a partículas de mayor tamaño, Kumar *et al* [33] en su colección temática menciona la tremenda importancia y crecimiento que ha tenido el área de la síntesis de materiales nano estructurados, por su importancia en áreas como la microelectrónica, fotónica, catálisis, biomedicina, farmacéutica, etc.

La mayoría de los métodos de síntesis que se encuentran bien establecidos son para el desarrollo o síntesis de compuestos inorgánicos, siendo el desarrollo de métodos de síntesis para compuestos orgánicos es mucho menor. Una búsqueda en “[www.scopus.com](http://www.scopus.com)” con la palabra “nanoparticle” arroja 192,883 resultados, pero solo 18,087 empleando la palabra “organic nanoparticle”, equivalente a 9.37 %.

Cuando hablamos de nanopartículas orgánicas, el rango de materiales es muy amplio, abarca desde nanómetros hasta micrómetros, además de los materiales empleados, ver **Figura 1**. En la parte superior se encuentran muchas de las partículas orgánicas usadas industrialmente como pigmentos y micropartículas de fármacos,

gotas de emulsiones y células biológicas. En la parte más baja se encuentran las típicas moléculas orgánicas, normalmente en dimensiones subnanométricas en solución homogénea. Entre estos dos grupos se encuentran las estructuras supramoleculares y ensamblados de moléculas y macromoléculas con dimensiones en el rango nano.

Algunas de las microestructuras y nanoestructuras listadas en la **Figura 1** se encuentran formadas esencialmente por partículas líquidas suaves, como las gotas de emulsión o micelas.

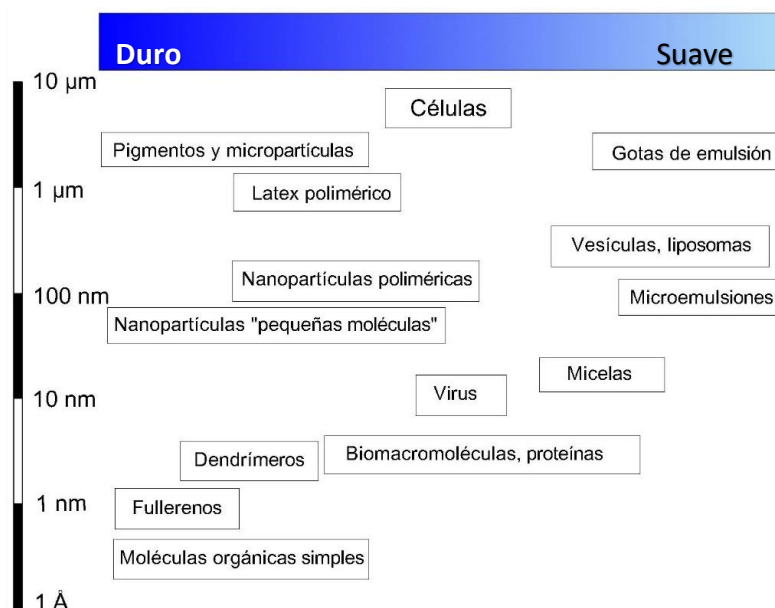


Figura 1.- Escalas de distintas partículas y su comparación con elementos biológicos [7].

Estas partículas “suaves” se caracterizan por estar constantemente en equilibrio dinámico con el líquido circundante y pueden cambiar su composición o se descomponen mediante el ajuste de las condiciones externas como temperatura, concentración o fuerza iónica. Muchas micelas formadas de compuestos anfifílicos o copolímeros bloque pertenecen a esta categoría. Algunos copolímeros forman micelas fijas, que son estructuras cinemáticamente estables [34].



Nosotros nos enfocaremos en partículas orgánicas sólidas, que son ensamblados de moléculas orgánicas que se encuentran en un estado estable, cinemáticamente hablando, después de su formación. En consecuencia, estas partículas en principio pueden ser aisladas como polvos sólidos o transferidas de un medio a otro. Nanopartículas orgánicas, bajo los términos aquí descritos, son las partículas orgánicas en el rango nanométrico en sus tres dimensiones. Objetos con una o dos dimensiones de mayor tamaño como las nano-fibras, nano-tubos o nano-hojas no son consideradas, ya que requieren métodos de síntesis distintos a los aquí enunciados.

Varias revisiones y monografías que proveen un amplio panorama en el área de nanopartículas orgánicas, incluyendo síntesis y propiedades, así como una revisión en polímeros liberadores de fármacos y partículas de fármacos o métodos de síntesis especiales, pueden ser consultados en la siguiente referencia [33]. Nuestro propósito es proveer un panorama de los métodos actuales más importantes para la síntesis de nanopartículas orgánicas, incluyendo los métodos tradicionales mediante síntesis basada en emulsiones, así como los métodos más recientes empleando microfluídica.

### 2.2.1 Características de las nanopartículas orgánicas

En las nanopartículas inorgánicas los bloques básicos de construcción son los átomos, los cuales se encuentran en arreglos de redes cristalinas. En contraste, las moléculas orgánicas pequeñas son los bloques de construcción de las partículas orgánicas de mayor tamaño. El número de moléculas en una nanopartícula orgánica es menor al número de átomos en una nanopartícula inorgánica del mismo tamaño [35]. En las moléculas orgánicas, los efectos cuánticos de confinamiento debido al tamaño reducido no son esperados, como en las nano partículas inorgánicas. Más que depender de efectos de confinamiento cuántico, los efectos dependientes de tamaño,

en nanopartículas orgánicas son mayormente causados por los distintos estados energéticos de las moléculas localizadas en la superficie de las partículas.

Es sabido que las moléculas orgánicas localizadas en las superficies e interfaces poseen diferente estructura electrónica y propiedades, que las moléculas en el volumen de una partícula. En los materiales nano estructurados gran parte de las moléculas se encuentran en la superficie o en la interfase. Esto genera importantes efectos en las propiedades de los materiales, como lo son las propiedades ópticas o la biodisponibilidad [36]. Las nanopartículas orgánicas pueden, en principio, ser preparadas a partir de una enorme cantidad de distintos compuestos orgánicos, desde pequeñas moléculas hasta macromoléculas. Dependiendo del tamaño de partícula y las interacciones moleculares dentro de la partícula, las propiedades de las nanopartículas pueden diferir significativamente de aquellas del mismo material en fase de volumen. Regularmente se asume que las nanopartículas orgánicas representan el paso intermedio entre los materiales sólidos orgánicos en volumen y en solución molecular homogénea. Las nanopartículas orgánicas ofrecen un enorme potencial para la creación y diseño de materiales con propiedades únicas en distintos campos de aplicación como la farmacéutica, alimentos, imagenología, sensado, electrónica orgánica, fotónica entre otros [33, 35].

## 2.2.2 Métodos de preparación Top-Down

### 2.2.2.1 *La reducción de partículas mediante fuerzas mecánicas*

En este método se emplean fuerzas mecánicas para moler partículas macroscópicas o microscópicas hasta escala nanométrica, hasta un punto en que se comience a presentar aglomeración de las partículas. La contaminación de las nanopartículas por abrasión y desgaste de las partes que se emplean para la molienda tampoco puede ser evitada, y se incrementa cuando se emplean materiales orgánicos. Este método

desarrollado por Van Eerdenbrugh *et al.* [37] ha sido muy empleado en la industria para la producción de partículas inorgánicas empleando placas de 96 micro pozos o pequeños viales de vidrio con solo 10 mg de material. Mediante estos métodos, se pueden obtener suspensiones de nanopartículas para posteriores caracterizaciones.

Otro método de molienda en seco, desarrollado por M. Juhnke y R. Weichert [38]. Emplea criogenia y enfriado de las muestras para facilitar su fractura empleando dióxido de carbono sólido como el medio de molienda. Este método evita que se contamine la muestra con el medio de molienda por abrasión, ya que el dióxido de carbono sólido se elimina al calentarse la muestra. Otro método es la homogeneización a alta presión, el cual se basa en el fenómeno de cavitación. En este, una suspensión de nanopartículas orgánicas es obligada a pasar por un orificio de unos 25  $\mu\text{m}$  a altas presiones, de alrededor de 150 MPa. Posteriormente la presión estática disminuye por debajo del valor de presión del vapor del agua, generando la formación de burbujas de vapor que implosionan al dejar el orificio [38]. Las fuerzas de cavitación creadas durante la implosión son las responsables de la desintegración de las micropartículas en nanopartículas. Se pueden requerir varios ciclos de homogeneización para alcanzar el tamaño de partícula deseado. Otra ventaja es que se evita la contaminación de las muestras por degradación de las partes que muelen la muestra [33].

#### 2.2.2.2 Métodos litográficos

Los métodos litográficos han sido ampliamente empleados para su uso en la industria de la microelectrónica y semiconductores para la fabricación de nanoestructuras de dos dimensiones, así como de microestructuras. Generalmente estos equipos carecen de compatibilidad con materiales orgánicos o biológicos debido al daño producido por la radiación, el uso de plasmas, gases corrosivos y solventes. Se han logrado crear coloides poliméricos y micropartículas, empleando fotolitografía combinando

fotolitografía y microfluídica. Otro método conocido como “*nanoimprint technology*” está ganando importancia. Una estrategia seguida por deSimone [39], fue emplear moldes hidrofóbicos hechos de un fluoro polímero que evita que se formen capas del polímero precursor entre los espacios de las cavidades, evitando que queden residuos de las partículas y haciendo más fácil la recolección de las partículas. Este método se conoce como PRINT® Process [33, 40].

## 2.2.3 Métodos de preparación Bottom-Up

### 2.2.3.1 Métodos basados en soluciones

La mayoría de las nanopartículas orgánicas empleadas en investigación son creadas empleando el método “*bottom-up*”. Esta aproximación es mejor para la pequeña escala y su fabricación en masa “*batch*” permite una rápida y fácil variación de las condiciones de preparación. No requieren de equipos costosos o especiales y son más fáciles de implementar en los laboratorios. Estos métodos permiten un mejor control de las propiedades como tamaño de partícula, distribución y composición.

### 2.2.3.2 Métodos de emulsiones

Un importante grupo de métodos se basa en la aplicación de diferentes tipos de emulsión para la formación de nanopartículas [41]. Es decir, en un sistema coloidal de dos líquidos inmiscibles entre sí, se emplea como vasija o estado intermedio para la formación de partículas. La polimerización por emulsión es un método clásico y bien conocido para la síntesis de microesferas poliméricas y nano esferas, en técnicas de síntesis tipo “*oil in oil*” . La síntesis “*oil in water*” permite la síntesis de materiales como monómeros y catalizadores, que son sensibles, a la presencia de agua. Este método ha ganado gran relevancia con el empleo de la microfluídica.

La polimerización en mini emulsión es un método muy versátil para la síntesis de polímeros y nanopartículas híbridas [41]. Se basa en las reacciones que ocurren en pequeñas gotas de emulsión que son estabilizadas con un surfactante junto con un co-estabilizador que actúa como agente de presión osmótica. Las micro emulsiones son sistemas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente con la mezcla y agitación de los componentes, como es el caso de las investigaciones recientes de emulsificación- evaporación y la emulsificación-difusión [42]. Otros métodos tratan de mejorar la biocompatibilidad de las nanopartículas y el proceso de síntesis evitando los solventes orgánicos, por ejemplo, el método de “emulsión por fundición”. En este se emplea una temperatura por encima del punto de fusión del material orgánico, para después emplearlo como la parte aceitosa de la emulsión. Otra posibilidad es el uso de sustancias biocompatibles, como emulsificantes y estabilizadores de partículas [33].

Un método muy útil de síntesis de NP's en micro emulsión, es el de secado en frío. El proceso se basa en la combinación de emulsión y secado en frío. Una emulsión de aceite-en-agua es formada empleando un solvente orgánico volátil que contiene el compuesto orgánico disuelto como la fase oleosa y un surfactante disuelto en agua como la fase acuosa. Después de congelar la emulsión con nitrógeno líquido, ambos tanto el solvente orgánico como el agua, se evaporan por secado-en-frío. Esto genera una mezcla sólida porosa consistente en nanopartículas del compuesto orgánico previamente disuelto y los surfactantes disueltos en agua, eliminando así el paso de la liofilización [43].

#### *2.2.3.3 Métodos de re-precipitaciones*

La gran mayoría de los procedimientos son de dos o más pasos, que incluyen primero, la formación de una emulsión y la posterior formación de las nanopartículas. En este caso, por medio de difusión o evaporación, el proceso de re-precipitación se lleva a

cabo en un solo paso para la creación y síntesis de nanopartículas orgánicas. El principio se basa en la mezcla de una solución con el compuesto orgánico con un solvente pobre o sin él. La condición que se debe satisfacer es que el solvente empleado para disolver la parte orgánica debe ser perfectamente miscible con el solvente pobre (comúnmente agua), con la finalidad de alcanzar altos niveles de súper saturación de forma casi instantánea después del mezclado. Esta súper saturación es necesaria para promover una rápida nucleación y limitar el crecimiento de las nanopartículas [44]. Usualmente se emplea una solución de un compuesto orgánico disuelto en un solvente miscible con el agua, como acetona o alcohol, y se agrega a un solvente pobre como el agua. También el proceso contrario es posible, es decir, agregar el solvente pobre a la solución. Este método se empleó por primera vez para la síntesis de nanopartículas orgánicas y una lista completa de aplicaciones del método puede ser consultada en [36]. Una de las aplicaciones más importantes del método es que se ha podido emplear para producir nanopartículas de fármacos que son poco solubles e hidrofóbicos.

Todos los ejemplos de síntesis de nanopartículas orgánicas por el método de re-precipitación recaen en el cambio de la solubilidad del compuesto orgánico del que están hechas, cambiando de un ambiente de un buen solvente a un mal o pobre solvente. Este “cambio de solvente” no es el único mecanismo por el cual la solubilidad de un compuesto orgánico puede ser modificada. La calidad de un solvente puede verse fuertemente afectada por el pH ya que muchas moléculas orgánicas, como los polímeros, contienen grupos cargados que se pueden disociar. Cambiar el pH de una solución puede crear un estado de supersaturación de un compuesto orgánico y puede ser usado para la síntesis de nanopartículas orgánicas. Un trabajo al respecto, fue tema de investigación de nuestro grupo en el pasado [45]. Empleamos un cambio de fase soluble a una menos soluble aunada a un cambio de pH [45]. Se empleó una técnica desarrollada primero por Calvo *et al.* [18], conocida como gelación iónica. Por sus características, podría considerarse dentro de este

apartado. Este proceso también se empleó para la síntesis de nanopartículas con proteína E de dengue y se analizó su respuesta inmune en un modelo *in vivo* de ratón con buenos resultados [45, 46] .

#### *2.2.3.4 Técnicas de fluidos supercríticos*

En estas técnicas, los líquidos se llevan a un punto crítico de temperatura y presión en el cual presentan propiedades híbridas de líquido y gas. Bajo estas condiciones, pueden difundirse como un gas y disolver compuestos orgánicos como si se tratara de un líquido. Pueden presentar cambios de densidades muy amplios, con cambios muy pequeños de presión y temperatura por encima del punto crítico. Por lo anterior, se puede caracterizar a la técnica como una forma especial de método de re-precipitación. Una de las formas de emplear esta técnica es mediante la disolución de un compuesto orgánico en el fluido supercrítico y posteriormente, a través de una aguja, se vierte el contenido en una cámara con baja presión. Esto genera una rápida expansión, nucleación y la agregación resulta en la precipitación de pequeñas partículas [33, 36].

#### *2.2.3.5 Precipitación por formación compleja polielectrolítica*

En este método se emplean polielectrolitos cargados de forma opuesta. La mezcla de polímeros cargados de forma opuesta genera una asociación de polímeros por interacción electrostática dando una neutralización parcial y una formación compleja. Esto puede lograrse por la acción de polielectrolitos sintéticos o biomacromoléculas cargadas por las concentraciones de los polímeros empleados. Se ha demostrado que pesos moleculares pequeños generan complejos más estables. Para la asociación de polielectrolitos con distintos pesos moleculares se estableció una relación entre el tamaño de partícula y la relación con su longitud de cadena mientras que para polímeros con grupos iónicos fuertes y pesos similares se propone una relación 1:1. La relación se establece como un concepto de (anfitrión/huésped), siendo el anfitrión

el polielectrolito con mayor peso molecular. Adicionalmente, de las dos especies responsables del complejo, muchas partículas pueden contener compuestos como fármacos. Muchas nanopartículas biocompatibles y biodegradables derivadas de polisacáridos han sido empleadas como acarreadores de fármacos o proteína [45-47].

#### *2.2.3.6 Síntesis de nanopartículas orgánicas en dispositivos microfluídicos*

Actualmente tanto la microfluídica como la tecnología de “*lab on a chip*” se encuentran en rápida expansión y uso en áreas como la química, biología, farmacéutica y en general ciencias de la vida. Estos sistemas ofrecen amplias ventajas donde se requiere trabajar con cantidades muy pequeñas de fluidos, además del gran control que permiten sobre las cantidades que intervienen en reacciones químicas y síntesis. Permiten automatizar o semi automatizar casi cualquier proceso. Estos dispositivos microfluídicos se han explotado para la producción de partículas y micro partículas poliméricas, permitiendo el control de su morfología y tamaño e incluso su producción con múltiples núcleos [48-51].

### 2.3 Orígenes de la microfluídica

En años previos, la microfluídica ha demostrado ser una gran promesa para la síntesis de nanopartículas orgánicas. La mayor parte de las técnicas de síntesis descritas podría llevarse a cabo dentro de dispositivos microfluídicos. Además del mezclado de componentes en dispositivos microfluídicos, se pueden llevar a cabo una serie de operaciones como división, filtración, separación, agitación, calentamiento o enfriamiento, almacenaje, entre otros. De los distintos componentes empleados en las fases líquidas o gaseosas que intervienen en la síntesis. Un compendio extenso sobre aplicaciones y operaciones en dispositivos microfluídicos para la síntesis de nanopartículas poliméricas puede ser consultado en [52]. Se ha demostrado que empleando una geometría de canal en forma de “Y”, los tiempos de micro mezclado



pueden estar en el rango de 1 ms, lo que se encuentra por debajo de los tiempos de nucleación típicos. Además, se crea una nucleación más homogénea con un tamaño de partícula menor y una distribución de tamaños más estrecha que en los reactores macroscópicos en masa. Se puede controlar el tamaño de partícula de 80 a 450 nm cambiando la geometría del canal y las tasas de flujo de los fluidos, lo cual también ha sido confirmado mediante simulación computacional [33].

La creación de la microfluídica implica la manipulación de fluidos en canales de unos cuantos micrómetros. Dicha tecnología tiene una amplia área de acción en ciencias, como la química, análisis biológico, óptica e incluso informática. De acuerdo con Whitesides, “la microfluídica es la ciencia y tecnología de sistemas que procesan o manipulan pequeñas cantidades de líquidos ( $10^{-9}$  a  $10^{-18}$  litros), empleando canales de decenas o cientos de micrómetros” [16]. Las primeras aplicaciones de la microfluídica han sido para el análisis, debido a que ofrece la posibilidad de emplear pequeñas cantidades de reactivos y muestras. De igual manera se pueden llevar a cabo separaciones y detección con gran resolución y sensibilidad, bajos costos y pequeños tiempos de análisis. Explora las características de “pequeño volumen y flujo laminar en canales”. Esto ofrece un mayor control de la concentración de las moléculas en el espacio y tiempo. Las ciencias que dieron origen a la microfluídica son el análisis molecular, la biodefensa, la biología molecular y la microelectrónica [16].

El origen de la microfluídica inicia con el desarrollo de los métodos micro analíticos como la cromatografía en fase gaseosa, cromatografía líquida a alta presión y la electroforesis capilar. Estos métodos, combinados con análisis IR hicieron posible la detección con una alta sensibilidad y resolución, empleando pequeñas cantidades de muestra. Una segunda motivación proviene de la bio defensa y la necesidad de detectar amenazas químicas y biológicas [16].

La “*Defense Advanced Research Projects Agency*” (DARPA), departamento de defensa estadounidense, financía una serie de programas en 1990 para el desarrollo de sistemas microfluídicos desplegables en campo para detectar amenazas químicas y biológicas, lo que fue el catalizador del desarrollo de la microfluídica. La tercera motivación proviene de la biología molecular, la explosión de la genómica en 1980 fue seguida por otras áreas de análisis como la secuenciación de ADN de alto rendimiento, que requería mayor rendimiento, sensibilidad y resolución. La cuarta y última contribución fue debida a la microelectrónica, la idea original fue que la tecnología que era utilizada en la fotolitografía que ha sido tan exitosa, pudiera ser aplicable directamente a la microfluídica. Los trabajos iniciales de microfluídica emplean silicio y vidrio, pero han sido paulatinamente desplazados por plástico o polímeros [16].

El silicio en particular es caro y opaco para la luz ultravioleta o visible y no se pueden emplear métodos convencionales de detección. Es más fácil emplear componentes como válvulas y bombas en materiales elastoméricos que en materiales rígidos. Ni el vidrio ni el silicio poseen las características de permeabilidad necesarias para trabajar con células vivas. El uso de poli dimetil siloxano (PDMS) ofrece características deseables como transparencia óptica, suavidad elastomérica, facilidad de prototipado y su capacidad de soportar componentes como válvulas neumáticas [53]. Sin embargo han surgido nuevos métodos de fabricación de los componentes que sirven como canales, válvulas, mezcladores y bombas, necesarios para formar fábricas en un chip [49, 52].

### 2.3.1 Conceptos esenciales de microfluídica

En los canales microfluídicos se explota el fenómeno de flujo laminar. En estas dimensiones micrométricas las fuerzas de inercia son menores que las fuerzas debido a la viscosidad de los fluidos. Esto provoca que dos líquidos dentro de un canal tan estrecho se mezclen solo debido a la difusión en la interfaz entre los líquidos en contacto dentro del canal [54]. El desarrollo de geometrías específicas para promover el mezclado de los líquidos a bajos números de Reynolds, se hace necesario. El número de Reynolds es un número adimensional proveniente de la relación entre las fuerzas de inercia ( $\rho \cdot v \cdot L$ ) y la viscosidad del líquido ( $\mu$ ).

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot L}{\mu} \qquad \text{Ecuación 1}$$

En la **Ecuación 1**,  $\rho$  es la densidad,  $v$  la velocidad,  $L$  el radio hidráulico y  $\mu$  representa la viscosidad del fluido. Experimentalmente las transiciones de flujo laminar a turbulento suelen estar entre 1,800 y 2,100. El flujo laminar suele darse por debajo del valor crítico de 2,040 del número de Reynolds.

#### 2.3.1.1 Sistemas abiertos vs cerrados

La información de un problema dado en términos de sus características, viscosidad, fluido newtoniano/no newtoniano, compresible/incompresible y las suposiciones apropiadas permiten la selección de una técnica de solución adecuada y esta decisión depende de la descripción del fluido en términos del punto de vista *Lagrangiano* (cerrado, control de superficie) o *Euleriano* (abierto, control de volumen).

Desde el punto de vista *Lagrangiano*, se considera la suposición de que un volumen de masa o líquido se mueve a través de una línea de desplazamiento con

respecto a un sistema coordenado de referencia. En la **Figura 2**, la posición inicial de A en  $t=t_0$  la partícula se encuentra en  $\mathbf{r}_0 = \mathbf{r}_0(\mathbf{x}_0, t_0)$  y un momento después en  $t= t_0+\Delta t$  se encuentra en  $\mathbf{r}_A = \mathbf{r}_A(\mathbf{r}_0, t_0+\Delta t)$ , donde  $\mathbf{r}_A = \mathbf{r}_0 + \Delta \mathbf{r}$ . Considerando todos los distintos puntos y siguiendo su movimiento para  $t > t_0$ , el movimiento de una partícula sólida o de fluido puede ser descrito con el vector de posición, **Ecuación 2**.

$$\mathbf{r} = \mathbf{r}(\mathbf{r}_0, t) \quad \text{Ecuación 2}$$

En el límite obtenemos la velocidad del fluido y su aceleración **Ecuación 3** y **Ecuación 4**.

$$\frac{d\mathbf{r}}{dt} = \mathbf{v} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2} = \frac{d\mathbf{v}}{dt} = \mathbf{a} \quad \text{Ecuación 4}$$

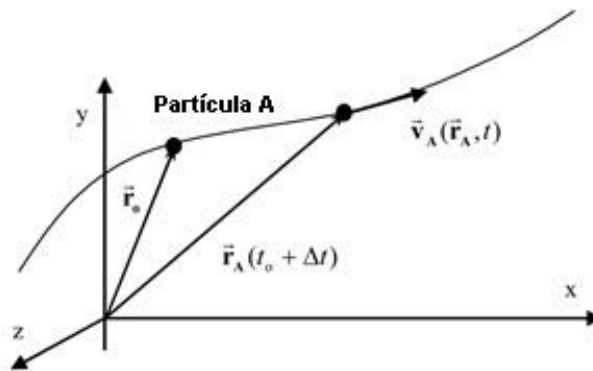


Figura 2.- Incremento del movimiento de una partícula de fluido.

El concepto de un punto de materia se extiende al de un volumen de material (sólido o líquido) con una masa constante identificable que forma un sistema cerrado. Este sistema se mueve y deforma con el flujo. No hay transferencia de masa, porque se considera la superficie del volumen del material como cerrada [55].

El sistema se analiza a través del tiempo y el espacio donde el interés es conocer los cambios en el sistema (masa, momento, energía). La derivada material, derivada de Stokes se define como el operador  $D/Dt \equiv \partial/\partial t + \mathbf{v} \cdot \nabla$  describe la tasa de cambio de alguna cantidad física (como calor o momento) de un elemento material sujeto a un campo de velocidades dependientes del espacio y el tiempo de esa cantidad física. Para aclarar lo anterior se muestran ejemplos de derivadas con respecto al tiempo  $\partial/\partial t$  (local),  $d/dt$  (total de una partícula),  $D/Dt$  (total de un elemento de fluido), su significado, así como sus diferencias, empleando como ejemplo la aceleración, ver **Tabla 1**.

Viéndolo desde el punto de vista Euleriano o abierto, se considera que la masa, momento y energía, pueden cruzar las fronteras. Desde este punto de vista un observador fijo en un marco de referencia inercial registra los cambios en el campo de flujo en “todos los puntos”. En el caso de un “volumen de control”, se considera que pueden ocurrir cambios de flujo “locales” dentro del volumen de control. Este volumen de control puede ser un elemento infinitesimal creado por mallado o puede ser un punto en el campo de fluido [55].

*Tabla 1.- Ejemplos de derivadas respecto al tiempo y su significado.*

Expresión	Descripción
$\mathbf{a}_{x,local} = \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = \partial_t \vec{v}$	$v$ es la velocidad del elemento de fluido en la dirección $x$
$\mathbf{a}_{particula} = \frac{d\vec{v}}{dt} = d_t \vec{v}$	Para partículas sólidas
$\mathbf{a}_{elemento\ de\ fluido} = \frac{D\vec{v}}{Dt} = \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v}$ $\mathbf{a}_{local} + \mathbf{a}_{convectiva}$	Es la aceleración total del elemento de fluido

El observador Euleriano registra los cambios en todos los puntos del campo del fluido y en el caso de un volumen de control, el tránsito de masa, momento y/o energía dentro, así como los flujos a través de las superficies del volumen de control. Por el contrario, un observador Lagrangiano se mantiene con cada elemento de

volumen y registra sus cambios mientras se mueve a través del espacio. El teorema de transporte de Reynolds emplea ambos puntos de vista para describir masa, momento y transferencia de energía en forma integral. Este teorema une las leyes de conservación del Lagrangiano al marco Euleriano. Como consecuencia una transformación integral de superficie a volumen da como resultado las leyes de conservación en forma diferencial en el marco Euleriano también conocido como “acercamiento de volumen de control” [55].

### 2.3.1.2 Ecuación de Navier Stokes

La **Ecuación 7** es la ecuación de Navier-Stokes, la cual describe la aceleración de un elemento de fluido debido a diferentes fuerzas por unidad de masa.

La descripción Lagrangiana de una variable  $\mathbf{F}(\mathbf{r}(t), t)$  que depende del tiempo y posición, cuya posición también es dependiente del tiempo, se puede escribir en notación diferencial de acuerdo con la **Ecuación 5**.

$$d_t \mathbf{F} \equiv \frac{d\mathbf{F}}{dt} = \partial_t \mathbf{F} + (\partial_t \mathbf{r}) \partial_i \mathbf{F} = \partial_t \mathbf{F} + (\mathbf{v}_i) \partial_i \mathbf{F} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde  $\partial_t \mathbf{F}$  es la derivada de la función respecto al tiempo,  $\mathbf{r}$  el vector posición y  $\mathbf{v}_i$  la velocidad  $i$ -ésima. Empleando el operador nabra  $\nabla$ , la **Ecuación 5** puede reescribirse como la **Ecuación 6**.

$$d_t \mathbf{F}(\mathbf{r}(t), t) = \partial_t \mathbf{F} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{F} \quad \text{Ecuación 6}$$

En el operador diferencial nabla  $\nabla$  el orden de los factores importa. En la **Ecuación 6**, el producto  $(\mathbf{v} \cdot \nabla)$ , es un operador diferencial y no debe confundirse con la divergencia de un campo vectorial en el que el orden de los factores se encuentra invertido  $(\nabla \cdot \mathbf{v})$ .

Substituyendo la función  $F$ , en la **Ecuación 6**, por el vector velocidad  $\mathbf{v}$  y agregando los términos debidos a fuerzas externas como presión e internas (como el tensor de estrés viscoso debido a la fricción interna del líquido), tenemos la **Ecuación 7**, conocida como la ecuación Navier-Stokes para fluidos incompresibles Newtonianos en su forma diferencial en términos del campo vectorial velocidad [56].

$$\mathbf{a}_{total} \equiv \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} = -\frac{1}{\rho} \nabla p + \nu \nabla^2 \mathbf{v} + \mathbf{g} \quad \text{Ecuación 7}$$

En la **Ecuación 7** los primeros dos términos del lado izquierdo representan la derivada material donde  $\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t}$  es el término transitorio,  $(\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v}$  el término de inercia que contempla tanto el punto de vista Euleriano  $\mathbf{F}(\mathbf{r}, t)$  como el punto de vista Lagrangiano  $\mathbf{F}(\mathbf{r}(t), t)$ . Del lado derecho de la ecuación,  $-\frac{1}{\rho} \nabla p$  la fuerza debida a la presión,  $\nu \nabla^2 \mathbf{v}$  es el tensor de estrés viscoso (fricción interna debido a la viscosidad o estrés cortante) y  $\mathbf{g}$  la fuerza ejercidas por la gravedad en el elemento de volumen diferencial considerado.

Se asume continuidad mecánica, es decir las leyes de conservación de masa, momento y energía en todo el sistema considerado. Se considera al líquido con características homogéneas o promedio en condiciones locales con respecto a las propiedades generales del volumen, sólido o líquido, comparadas de manera microscópica y macroscópica como viscosidad y densidad. El método de la continuidad mecánica es un método efectivo para explicar de manera física y describir

matemáticamente fenómenos de transporte, sin tener que lidiar con el conocimiento exacto de las estructuras micro y nanoscópicas del material y los fluidos. En este caso, se tratan como un medio continuo caracterizado por cantidades de “campo” asociadas con la estructura interna del material como densidad, temperatura, velocidad y viscosidad.

En general la mecánica de medio continuo trata tres aspectos fundamentales

- *Cinética.* - *Movimiento del elemento de fluido sin importar su causa.*
- *Dinámica.* - *Origen e impacto de las fuerzas y flujos que generan el movimiento del fluido, así como pérdidas por calor, como; tensor de esfuerzo, vector de flujo de calor y entropía.*
- *Principios de Balance.* - *Leyes de conservación de masa, momento y energía.*

De igual manera, se considera que las propiedades de flujo se encuentran en equilibrio termodinámico local. Las características del líquido a nivel macroscópico se pueden ajustar para ser usadas en condiciones de frontera adyacentes, pero cuando los canales se aproximan a nivel microscópico, la relación de área superficial vs volumen ( $A/V \sim D_h^{-1}$ ) se vuelve grande. Los efectos de superficie como la rugosidad, discontinuidades en el fluido, velocidad y temperatura en las paredes o fronteras (sólido-líquido), se vuelven importantes. Para el caso en que los fluidos se desplazan en canales de unos cuantos nanómetros, las suposiciones de continuidad deben re examinarse ya que valores como la viscosidad de la que depende el resto de la **Ecuación 7** cambian [57].

Las ventajas de hacer una aproximación molecular del tema en estudio es que, los modelos moleculares consideran la posición, velocidad y estado de cada molécula en un fluido o en múltiples fluidos en todo momento. Se crea la posibilidad de tener un modelo que puede ser aplicado de forma general y no se requieren submodelos



como; tensor de estrés, flujo de calor, turbulencia, condiciones de frontera en paredes, además de evitar inestabilidades numéricas. Sin embargo, el considerar cientos de miles de moléculas, átomos o partículas requeriría un gasto computacional enorme. Se asume solamente el estudio de un número finito de moléculas que interactúan en el canal. Por ejemplo, en 1 mm cubico de agua existen 34 billones de moléculas, lo que hace prohibitiva la simulación dinámica hasta este momento [58].

Dado que el objetivo general es analizar la interacción entre las fuerzas del fluido y su movimiento, podemos derivar del vector de velocidad todas las ecuaciones de transporte. Esto nos proporciona la información que necesitamos: transferencia de masa y calor por convección, magnitudes o gradientes de flujos, concentraciones y temperaturas. En general podemos decir que la diferencia de fuerzas presentes en la superficie o el cuerpo, así como los gradientes, generan el movimiento de los líquidos haciendo que se traslade, rote o se deforme, mientras que los gradientes de temperatura y concentración generan transferencia de calor o masa [58]. Las suposiciones básicas de flujo se describen en la **Tabla 2**.

*Tabla 2.- Suposiciones básicas de flujo y sus declaraciones matemáticas.*

Suposición de flujo		Consecuencia
Dependiente del tiempo	$\frac{\partial}{\partial x} = 0$	Estado estable
	$\mathbf{v} = \mathbf{v}(t)$	Flujo transitorio
Dimensionalidad	$\mathbf{x} = (x, y, z)$	Número de coordenadas espaciales
Direccionalidad	$\mathbf{v} = (u, v, w)$	Número de componentes de velocidad
Flujo unidireccional	$\mathbf{v} = (u, 0, 0)$	Todas las componentes de la velocidad son cero, excepto una
Fase de desarrollo	$\frac{\partial v}{\partial s} = 0$	Flujo completamente desarrollado donde s es la coordenada axial
Simetría	$\frac{\partial}{\partial n} = 0$	Plano medio (n es la coordenada normal)
	$\frac{\partial}{\partial \theta} = 0$	Simétrico respecto a un eje

### 2.3.1.3 Simulación computacional de sistemas microfluídicos, CFD

Con el empleo de nuevas tecnologías como el análisis numérico y la simulación computacional se pueden resolver de manera satisfactoria ciertos problemas como los que se presentan en la microfluídica. Es suficiente con establecer las condiciones iniciales y de frontera para obtener resultados o predicciones cercanas a lo que se observa en la práctica. Estos problemas se reducen a fenómenos de transporte en los que la mecánica de fluidos, la transferencia de masa y calor, así como la estadística, dinámica y teoría de tensión-deformación no ofrecen solución exacta. Entonces se proponen modelos matemáticos que ofrecen representaciones aproximadas a las que se presenta en los sistemas reales. Esto ofrece como ventaja el predecir y analizar sistemas antes de fabricarlos, lo cual genera un mayor entendimiento de nuestro sistema y permite modificarlo. Así mismo evita gastos innecesarios en sistemas que tal vez no funcionen o no cumplan con la tarea para la que pretendemos usarlos [59].

Los fenómenos que se presentan en la microfluídica se pueden reducir a *mecánica clásica*, concretamente al estudio de la transferencia de momento, masa y calor. Solo en algunos casos de la microfluídica y la nanofluídica se presentan fenómenos que todavía se están estudiando y para los cuales, la física clásica solo ofrece respuestas aproximadas. Esto abre una nueva área de investigación. En estos casos las soluciones a los modelos y problemas no es analítica y se opta por soluciones numéricas y el empleo de ecuaciones existentes con ciertas modificaciones, para aproximarse a la solución mediante análisis numérico. Así mismo se utilizan las ventajas de la computación mediante elemento finito, con software como ANSYS® y COMSOL® [59, 60].

En este trabajo de tesis, para la simulación de los sistemas microfluídicos se empleó COMSOL®. A esta técnica se le conoce como “*Computational Fluid Dynamics*” (CFD), por sus siglas en inglés. El sistema emplea las ecuaciones Navier-Stokes para

fluidos incompresibles Newtonianos, lo cual considera a los volúmenes discretos de los fluidos con densidad constante e incompresibles. Básicamente el problema general consiste en proponer una geometría o una simplificación del problema de 3D a 2D, con la finalidad de economizar recursos computacionales y emplear los datos de los fluidos que se van a emplear en la simulación, como lo son: densidad, viscosidad, coeficiente de difusión, rugosidad superficial de las paredes, entre otros.

El proceso de simulación es importante y debe preceder a la fabricación, al igual que se hace en otras áreas de ingeniería. La visualización o la prueba de los modelos de forma computacional, permite modificar y probar el modelo de forma numérica antes de ser fabricado. Esto economiza recursos y permite solucionar problemas de diseño u operación antes de su fabricación.

Las condiciones típicas para la formación de gotas dentro de los canales dependen del empleo de dos líquidos inmiscibles entre sí. Esta es la primera condición necesaria para que se presente el fenómeno de formación de gotas. La tensión interfacial entre los líquidos, la cual puede ser variada empleando surfactantes, permite el rompimiento y discretización del medio continuo de la gota dentro del líquido acarreador. Así mismo la viscosidad, densidad y velocidad de los líquidos dentro de los canales también son variables de las que depende el fenómeno. Debido a la constricción que producen los micro canales (debajo de  $100\ \mu\text{m}$ ) en los líquidos empleados, se produce un fenómeno de flujo laminar. Bajo estas condiciones, las fuerzas de viscosidad tienen un rol más importante que las fuerzas inerciales, debido a que los volúmenes o cantidades de líquido empleados en estos micro canales son pequeños, del orden de  $10^{-9}$  L. La fricción con las paredes y la viscosidad juegan un papel más relevante que las fuerzas inerciales. Para analizar este fenómeno se emplea un conjunto de valores numéricos adimensionales que indican en cierto grado la relación existente entre las distintas variables físicas: el número de Reynolds ( $Re$ ), el

número de Weber (We), El Número de Bond (Bo) y el Número de Capilaridad (Ca),

**Tabla 3.**

*Tabla 3.- Números adimensionales de interés en la microfluídica.*

Fórmula	Parámetros que relaciona
Número de Reynolds $Re = \rho v \lambda / \mu$	Relaciona la densidad $\rho$ , velocidad $v$ y unidad de longitud del canal $\lambda$ (radio hidráulico), con la viscosidad del fluido $\mu$ . En microfluídica estudiamos sistemas donde $Re < 2100$ cuando el flujo es laminar.
Número de weber $We = \rho v^2 \lambda / \gamma$	Relaciona la densidad $\rho$ , velocidad $v$ y unidad de longitud del canal $\lambda$ (inercia), con la tensión interfacial entre los líquidos $\gamma$ .
Número de Bond $Bo = \Delta \rho g \lambda^2 / \gamma$	Relaciona las fuerzas gravitacionales ( $\Delta \rho$ ), producidas por la diferencia de densidad en los líquidos y la tensión interfacial $\gamma$ . Para nuestro caso se desprecia, debido a que empleamos volúmenes muy pequeños de fluidos $Bo \ll 1$
Número Capilar $Ca = \mu v / \gamma$	Este número compra principalmente fuerza viscosa $\mu$ o inercial ( $\mu v$ ), con la fuerza interfacial $\gamma$ .

#### 2.3.1.4 El fenómeno de formación de gotas

La formación de gotas en los fluidos es un tema complejo que no será tratado a profundidad aquí, sin embargo, para mayor detalle en la física y el fenómeno de formación de gotas el lector interesado se puede referir a [61-65]. Brevemente, la formación de la gota sucede en la interfaz entre los líquidos, debido a la presión ejercida en el líquido, esto conduce a la deformación de la interfaz entre el líquido acarreado y el acarreador, para nuestro caso QN y aceite. Cuando la presión comienza a ser mayor que la fuerza interfacial, se introduce un volumen de la región de menor fuerza interfacial hacia la región de mayor fuerza interfacial que trata de minimizar la superficie del fluido introducido. Este fenómeno, ayudado por la velocidad y presión de los líquidos acarreados, arrastra esta fracción de volumen acarreado y lo minimiza en forma de esfera, tal que se minimiza la superficie en contacto, generando gotas de la fase dispersa de QN, dentro la fase acarreadora (aceite). Cuando la interfaz se deforma y se curva, se introduce una *Presión de Laplace ( $\Delta P$ )*, que es distinta en el interior y el exterior de la gota **Ecuación 8 y Figura 3.**

$$\Delta P = \gamma(1/R_1 + 1/R_2)$$

Ecuación 8

Donde  $R_1$  y  $R_2$  son los radios de curvatura de la interfase.

Los números adimensionales antes mencionados brindan los parámetros bajo los cuales se presentan diversos fenómenos físicos, como el flujo laminar o turbulento. Para números de Reynolds  $Re > 4000$  se presenta flujo turbulento mientras que para  $4000 < Re < 2100$  se presenta una región de transición donde se aprecian inestabilidades y ondulaciones que pueden aparecer y desaparecer. Con  $Re < 2100$  las fuerzas de viscosidad comienzan a dominar y generan un flujo laminar. Es en este régimen, en el que el número de Weber también es pequeño. En estas condiciones el número de Bond puede ser desestimado debido a su poca o nula contribución, cuando dos o más fluidos intervienen en el fenómeno. En el número Capilar, la contribución que se considera es la del líquido con la mayor viscosidad. En nuestro caso es el QN el que presenta mayor viscosidad que el aceite mineral. Valores bajos de número capilar  $Ca$  indican que la fuerza interfacial es mayor que las fuerzas de viscosidad. Esto favorece la formación de gotas ya que se minimiza la superficie de la gota para reducir la energía en la interfaz. Cuando las fuerzas viscosas dominan, se observan gotas más grandes y formas asimétricas [61].

#### 2.3.1.5 Consideraciones físicas en un fluido multifase

En la simulación de mecánica de fluidos, la ecuación de Navier-Stokes (**Ecuación 9**) se resuelve empleando sistemas continuos y métodos numéricos para su solución.

$$\rho \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial x} + \rho(\mathbf{v} \cdot \nabla)\mathbf{v} = \nabla \cdot [-p\mathbf{l} + \mu(\nabla\mathbf{v} + (\nabla\mathbf{v})^T)] + \rho\mathbf{g} + \mathbf{F}_{st} + \mathbf{F} \quad \text{Ecuación 9}$$

$$\nabla \cdot \mathbf{v} = 0 \quad \text{Ecuación 10}$$

$$\frac{\partial \varphi}{\partial x} + \mathbf{v} \cdot \nabla \varphi = \gamma \nabla \cdot \left( \varepsilon_{|s} \nabla \varphi - \varphi(1 - \varphi) \frac{\nabla \varphi}{|\nabla \varphi|} \right) \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde  $\rho$  representa densidad,  $\mathbf{v}$  el vector velocidad,  $\mu$  viscosidad,  $\mathbf{g}$  gravedad,  $p$  presión,  $\mathbf{F}$  las fuerzas adicionales cuando se consideran otras variables físicas como transporte de calor, difusión o campos eléctricos,  $\gamma$  representa la fuerza interfacial y  $\varphi$  la advección interfacial. La **Ecuación 10** representa la conservación de momento y masa, mientras que la **Ecuación 11** introduce el conjunto de nivel conservador para un flujo de dos fases.

Los cambios en la interfaz se encuentran dados por la **Ecuación 11**, esta ecuación se introduce para simular la multifase, donde  $\varphi$  representa la variable de advección en la interfaz agua-aceite, a la constante  $\varphi$  se le asigna el valor de 1 dentro de la gota, 0 afuera y 0.5 en la interfaz, ver **Figura 3**. Esto simplifica el problema, de otra forma se necesitaría crear un mallado dinámico para la simulación.  $\varepsilon_{|s}$  Es un parámetro que controla el espesor de la interfaz y  $\gamma$  es un parámetro de reinicialización.

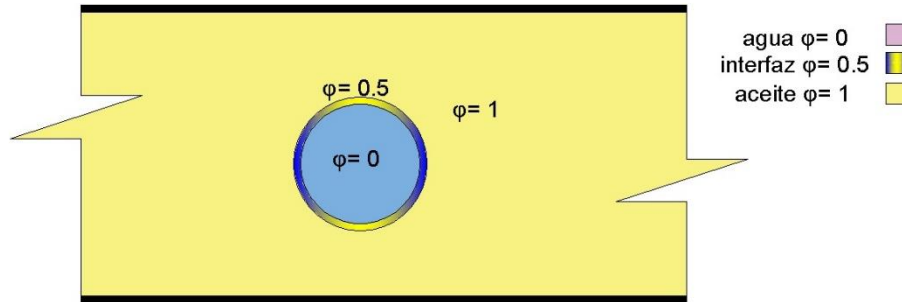


Figura 3.- Modelo que simplifica la resolución del problema de fases. Se asignan valores a la advección de interfaz entre agua y aceite: 0.0 en el interior, 0.5 en la interfaz y 1.0 en el exterior.

Para la solución de este problema se empleó el “método de conjunto de nivel conservador para un flujo de dos fases” [66, 67], que presenta ciertas ventajas con respecto a otros métodos como el seguimiento frontal, el volumen de fluido y campo de fase [68].

### 2.3.2 Estado del arte de dispositivos microfluídicos

Una de las mayores aplicaciones de los sistemas microfluídicos probablemente es la exploración de condiciones como el pH, fuerza iónica, concentración y composición para cristalización de proteínas. Permite explorar una amplia gama de condiciones y elegir las ideales para el crecimiento de cristales [69]. Otras áreas que se benefician de esta tecnología son la espectroscopia de masas, rastreo de alto rendimiento en desarrollo de fármacos, bioanálisis, examinación y manipulación de una sola célula o molécula y la síntesis de compuestos orgánicos marcados para tomografías de emisión de positrones. La manipulación de diversos fluidos es otra ventaja de la técnica dado que se pueden generar y manipular burbujas y gotas mono-dispersas dentro de una fase continua de flujo. Esto sugiere nuevas rutas para la producción de partículas poliméricas, emulsiones y espumas. Las aplicaciones van desde la óptica y la biología celular hasta la síntesis química [69].

Algunas de las desventajas para la adopción de estos sistemas pueden deberse a que varios solventes orgánicos disuelven el PDMS. Esto puede ser resuelto empleando otros materiales como vidrio, silicio o metal, que soporten mayor presión y temperatura. Sin embargo, el implementar bombas o válvulas en materiales rígidos puede ser más complicado y requeriría una tecnología distinta a la empleada para producir sistemas microfluídicos con PDMS [16].

El futuro de la microfluídica se centra en las amplias aplicaciones que incluyen diversos servicios de salud y monitoreo en países en desarrollo, cuidado de la salud en casa, uso en consultorios médicos, seguridad nacional y contra terrorismo, empleado por los servicios en dar respuesta primero: policías, paramédicos y departamentos de bomberos. Tiene aplicaciones en medicina veterinaria, monitoreo de alimentos y medio ambiente. Esto requiere un bajo costo de producción y la capacidad de crear dispositivos en masa. Recientemente se explora la posibilidad de producir chips de bajo costo con papel o celulosa para hacerlos económicos y desechables los cuales son comúnmente llamados "*paper-based Lab-on-a-chip*" [16, 70-72]. Los dispositivos pueden ser encontrados bajo diversos nombres; "*Lab on a chip*", sistemas "*bio micro-electromecánicos*" (bioMEMS) o "*micro total analysis systems*" ( $\mu$ TAS). Mas recientemente el desarrollo de tales sistemas ha hecho posible el surgimiento de sistemas más complejos, llamados "*organ on a chip*" o, "*highly integrated microfluidic systems*" (HIMS), los cuales integran muchos componentes micro electromecánicos, automatización y electrónica.

La cantidad de investigación que se hace hoy en día en el área de microfluídica es enorme, una búsqueda con la palabra "*microfluidics*" en distintos portales arroja los resultados de patentes, artículos y libros mostrados en la **Tabla 4**. Un breve análisis de los 10 artículos más relevantes de Google Académico permite ver que dentro del campo aún hay retos que superar. Uno de los artículos más citados de G. Whitesides



[16] habla sobre el origen y futuro de la microfluídica. Una de las formas más activas y de mayor uso para la formación de nanopartículas es la formación de gotas mediante el uso de dos fases inmiscibles en flujo laminar. Estas gotas funcionan como micro reactores y permiten llevar a cabo tareas como separación, unión, mezclado, almacenamiento, polimerización, encapsulado y síntesis. Un fluido acarreador más viscoso facilita el rompimiento de la fase discreta y la formación de gotas dentro del canal.

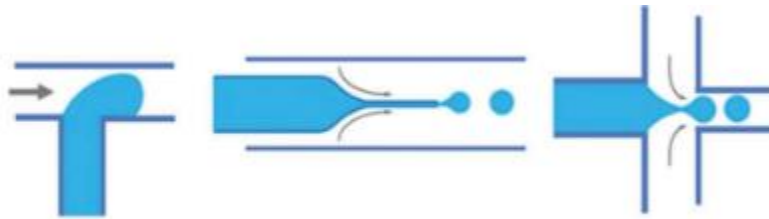
*Tabla 4.- Resultados de búsqueda en distintos portales al emplear la palabra “microfluidics”, 2019.*

Portal	Resultados de búsqueda
World Wide Science	3,317
Google Académico	239,000
BASE	55,460
Science Research	*12,082,120
Academia.edu	16,098
Springer Link	64,719
Wiley Online Library	10,257
Elsevier	**316
Nature	2,355
RSC	7,059
Web of science	21,733
Taylor & Francis	**1,440
online and eBook	
*4,585 resultados clave de 293 fuentes, **libros y artículos	

### *2.3.2.1 Geometrías y métodos empleados para producir microgotas*

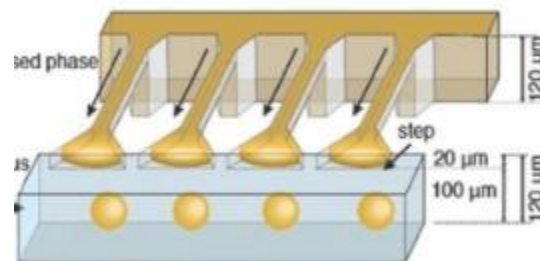
Muchos métodos convencionales generan mezclas mediante esfuerzos cortantes por impacto, agitación o sonicación. Debido a que este esfuerzo no se aplica de forma uniforme, las emulsiones presentan una alta polidispersidad en tamaño. En la microfluídica esta fabricación de gotas dispersas se hace de una en una. En un dispositivo microfluídico se pueden controlar parámetros como inercia, viscosidad, tensión interfacial o la aplicación de fuerzas magnéticas, eléctricas, centrífugas e incluso acústicas. Estas fuerzas a su vez determinan la formación de las gotas, tamaño y composición [73].

En una emulsión el número  $C_a$  de la fase continua y el número  $W_e$  de la fase dispersa son pequeños. En un sistema microfluídico el tamaño de las partículas se puede controlar con el tamaño de la salida y las velocidades de flujo de las fases. Los modos principales de formación de gota son flujo cruzado, co-flujo y enfoque de flujo como se aprecia en la **Figura 4**, tomada de [69].



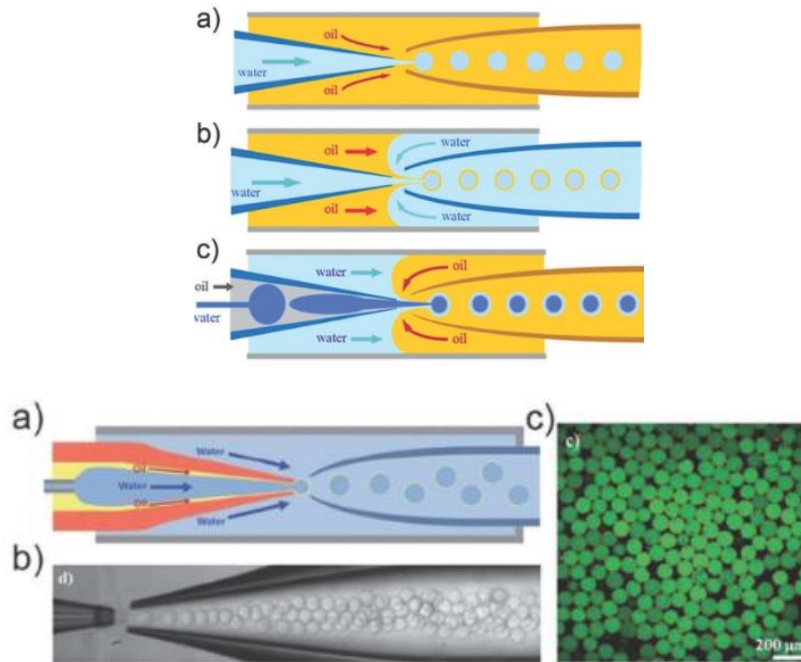
*Figura 4.- Distintas geometrías para producir microgotas, unión T, co-flujo y enfoque de flujo [69].*

Una forma de producir microgotas en paralelo de forma pasiva sin uso de bombas es mediante el cambio de presión capilar. Se emplean reducciones y aumentos de las dimensiones de los canales **Figura 5**. La ventaja es la paralelización y la formación de gotas independientemente de las velocidades de la fase continua y dispersa, siempre y cuando la velocidad de la fase dispersa sea menor que la continua. Se puede emplear centrifugación o fuerzas magnéticas para incrementar la tasa de producción.



*Figura 5.- Paralelización de producción de gotas [69].*

El empleo de capilares de vidrio ofrece una ventaja en la producción de microgotas en co-flujo son fáciles de ensamblar y no requieren de litografía para producirse. Varias configuraciones pueden producirse mediante esta técnica como se aprecia en la **Figura 6** [69].



*Figura 6.- Capilares coaxiales microfluídicos para producir. 1a) Gotas de agua en aceite W/O. 1b) gotas dobles W/O/W. 1c) Triples W/O/W/O. a,b y c bis. Montaje experimental y resultados [69].*

Dentro de los materiales empleados para la fabricación de dispositivos microfluídicos además del vidrio y PDMS también se encuentra el politetrafluoroetileno (PTFE) que ofrece una excelente resistencia a agentes químicos, pero no soporta altas presiones ni temperaturas elevadas. Otras tecnologías como la impresión 3D usan polímeros foto curables como PEG, di-acrilato, gelatina de metacrilato, ácido hialurónico y alginatos funcionalizados. El empleo de estos polímeros depende de los productos químicos empleados en la síntesis y de las cualidades de las superficies hidrofílicas e hidrofóbicas que se pretenden emplear en la producción. Así por ejemplo, es más fácil producir gotas de W/O en un dispositivo

de PDMS que es hidrofóbico, que hacerlo en un dispositivo de vidrio, que es hidrofílico [74, 75].

Un método que permite una fabricación en serie es el estampado en caliente. Típicamente un polímero es pasado a través de rodillos calientes que imprimen el patrón deseado en el polímero para crear los canales. Estructuras de alta relación de aspecto son difíciles de lograr con este método.

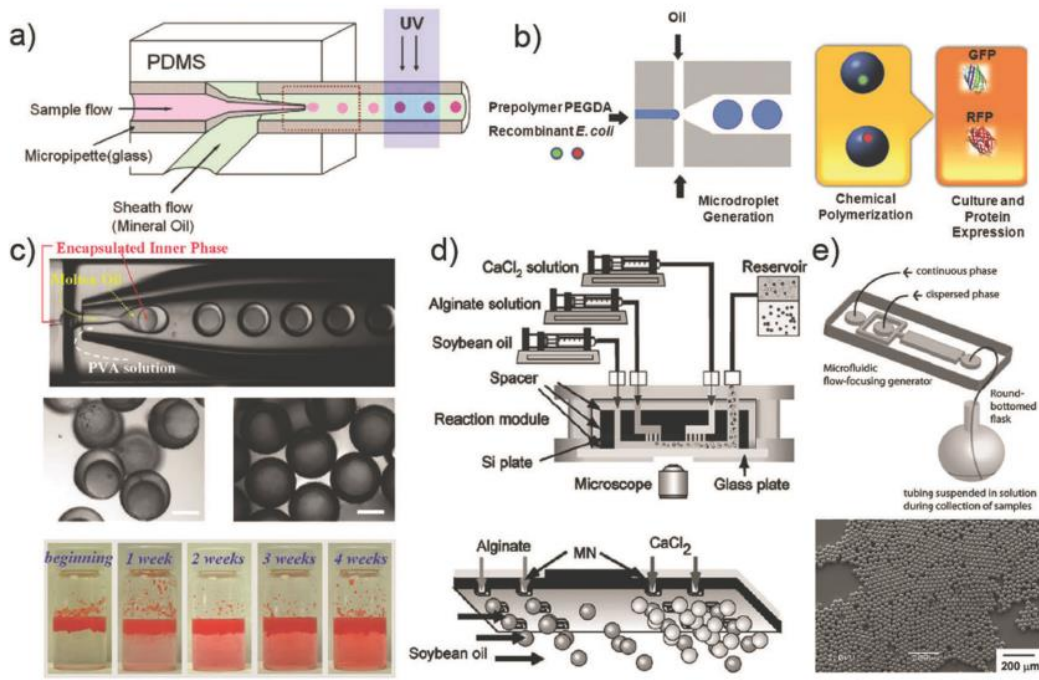
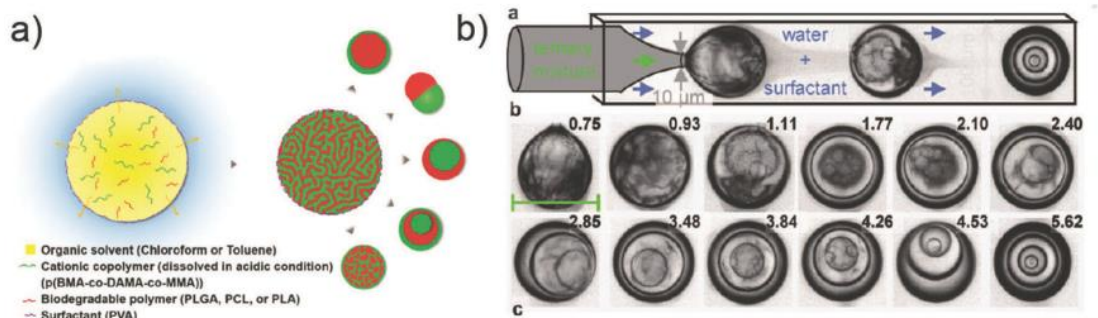


Figura 7.- Métodos de producción de micropartículas mediante microfluídica [69].

En la **Figura 7** se muestran distintas operaciones que pueden llevarse a cabo mediante la generación de gotas. En **7a)** se muestra un proceso de fotopolimerización. En **7b)** encapsulado de bacterias mediante polimerización química iniciada por redox. **7c)** se producen partículas con colorante en su interior mediante congelamiento de estas. Conforme pasa el tiempo el colorante se libera gradualmente. **7d)** muestra la formación de micropartículas de alginato mediante la coalescencia de dos gotas separadas y posterior entrecruzamiento. **7e)** muestra la síntesis de micropartículas de PLGA por evaporación de solvente. Mediante la separación de fases dentro de micro

emulsiones, también se pueden producir estructuras tipo cebolla, como la mostrada en la **Figura 8 a y b**. Otras estructuras como las de las partículas *Janus* y de múltiples núcleos pueden ser creadas con estas metodologías. Una revisión más extensa del tema puede ser consultada en [13, 26, 47, 51, 69, 71, 76].



*Figura 8.- Formación de partículas de múltiples fases por separación de fases dentro de microgotas. En a) compuestos utilizados, b) mecanismo de separación y formación de fases [69].*

## 2.4 Conclusiones del capítulo 2

En este capítulo se mostró el beneficio que aporta la tecnología de la microfluídica para el desarrollo de nanomateriales y nanopartículas. Se expusieron los métodos de síntesis más comunes para la fabricación de nanopartículas. Se trataron las bases teóricas de la microfluídica y se brindó un panorama general del estado del arte de los dispositivos microfluídicos para la generación de micro y nanopartículas para aplicaciones biomédicas. Los grandes beneficios del uso de la microfluídica se encuentran en una etapa de implementación, uso y escalamiento a nivel industrial. Las tasas de producción de los dispositivos microfluídicos rondan los 0.1 a 10 mL h<sup>-1</sup>, pero a escala comercial se requieren volúmenes de producción del orden de L h<sup>-1</sup>.

# 3

## Desarrollo experimental

En esta sección se describen generalidades sobre la sección experimental, la fabricación del sistema de inyección, la simulación computacional y fabricación de chips microfluídicos, así como la síntesis de NP's de QN y encapsulado de proteína. Se menciona la síntesis en masa previa y se describen las técnicas de caracterización empleadas. Se describe el procedimiento empleado para la fabricación del sistema de inyección microfluídico, el procedimiento general de la simulación computacional de la celda microfluídica, la fabricación y construcción de la celda microfluídica mediante proceso fotolitográfico y sellado mediante unión térmica y de plasma. Se trata el proceso de síntesis de nanopartículas por el método tradicional y mediante microfluídica. Así mismo, se describe la preparación de muestras para análisis estructural, morfológico y composicional empleando técnicas de TEM, FTIR, Raman, XPS y perfilometría.

### 3.1 Fabricación del sistema de inyección

Para la fabricación del sistema de inyección se buscó la simplificación de la tarea. El empleo de otro tipo de inyección puede ser mejor, pero también es más difícil de implementar. La inyección mediante motores a pasos es más fácil de implementar que otras tecnologías como bombas peristálticas, de presión, membrana, electrostática, piezoeléctrica, electromagnética, magneto-hidrodinámica, electro-

hidrodinámica, electro-osmótica, electroquímica, acústica, entre otras. El sistema de inyección se fabricó con piezas impresas en 3D y tarjeta Arduino® lo que permitió una rápida automatización e implementación. Se utilizó LabView® para programar de forma rápida sin recurrir a la escritura de código. Se buscó también que el volumen de inyección pudiera modificarse, por lo que el sistema diseñado permite cambiar la jeringa y con ello el volumen desplazado por el paso del motor. El siguiente paso consistió en la discretización del paso del motor mediante controladores. El paso final fue crear las conexiones para conducir el líquido de la jeringa al chip microfluídico [77].

### 3.2 Simulación computacional

Para la simulación computacional se eligió una geometría tipo “T” ideal, simplificando el problema de 3D a 2D tal que se redujeron recursos computacionales. El diseño final fabricado cambió atendiendo las capacidades de fabricación con las que contamos en la institución. La caracterización reológica de los líquidos se realizó para determinar los parámetros requeridos en la simulación, mientras que otros parámetros fueron tomados de la base de datos del software. Se seleccionaron varias velocidades de inyección y se mantuvo fija la velocidad del líquido acarreador. Se empleó un mallado medio para economizar recursos computacionales, mallados más finos permiten obtener resultados más precisos. Dentro de la simulación se empleó el “método de ajuste de nivel”, considera fases y variables de advección para simplificar el problema y la interfaz, de lo contrario sería necesario un mallado dinámico lo cual complica más la simulación. El paso final es realizar el análisis para encontrar las variables bajo las cuales se forman gotas del líquido disperso dentro del líquido acarreador. El análisis de los datos puede resumirse mediante imágenes y videos que son dependientes del tiempo en donde se aprecia la formación de gotas mediante colores que representan las fases de líquidos.

Actualmente el software COMSOL® solo permite la simulación de dos fases simultáneas, pero si es posible emplear los resultados de “salida” de una simulación como “entrada” de una simulación posterior. Con la finalidad de asegurar la convergencia se probaron distintos valores de re-inicialización y pasos de tiempo, el parámetro de espesor de interfaz agua-aceite se dejó con los valores predeterminados por el software mientras que los materiales de las paredes se eligieron de la base de datos como PDMS, aunque en la práctica una pared del sistema es de vidrio, por tanto, se idealiza. En el diseño experimental se empleó surfactante en la fase oleosa acarreadora, pero en la simulación no se considera este, debido a que no disponíamos de los datos experimentales para determinar la tensión superficial entre las fases. Las simulaciones fueron corridas en una PC de escritorio con cuatro procesadores (quad-core) Intel i7 y 32Gb de memoria RAM con Windows Server.

### 3.3 Mascarilla, moldes y chips microfluídicos

La fabricación de las mascarillas se hizo con el propósito de replicar los modelos o patrones de los canales con mayor rapidez. Se empleó una mascarilla comercialmente disponible recubierta con Cr. Los diseños se fabricaron mediante AutoCAD y posteriormente fueron exportados a distintos formatos para emplear los diseños en formato \*.GIS, \*.GSD, \*.DXF, \*.STL para ser leídos mediante LayoutEditor y replicados mediante editor de mascarillas por grabado directo.

#### 3.3.1 Creación de moldes con diseños microfluídicos

La creación de los micro canales puede hacerse por distintos métodos y medios. Se probaron la creación de moldes en silicio y silicio poroso (ver Anexo), empleando la resina misma como molde y el silicio o vidrio como substrato. También se empleó



vidrio como sustrato y el grabado de este para obtener los canales protuberantes en vidrio y canales grabados en vidrio. Se optó por esta última alternativa dado que se puede emplear el vidrio para replicar los canales mediante PDMS empleando los canales protuberantes o grabarlo directamente para crear los canales microfluídicos en el vidrio. También este procedimiento nos permitió tener un buen control del grabado en vidrio y una baja rugosidad. La relación de aspecto es mejor que la que se obtiene con resina y equiparable a la obtenida en silicio  $\sim 90\%$ . El ataque en vidrio es isótropo, es decir es igual de forma lateral y vertical, debe considerarse en el diseño para la obtención final de ancho y profundidad de canal. Se empleó el protocolo propuesto en [78] y se fueron variando las proporciones de los reactivos empleados hasta lograr el correcto grabado del vidrio, atendiendo a las características de éste. Se empleó vidrio Schott B270<sup>®</sup>, aunque también se utilizó vidrio de borosilicato y soda lime como parte de los experimentos.

### 3.3.2 Transferencia de patrones mediante PDMS y grabado directo de vidrio

La transferencia de los patrones se hace mediante PDMS. Se vierte el polímero directamente en el molde para replicar los patrones, quienes quedan replicados una vez que se endurece el polímero por la acción de un catalizador y calor, típicamente se emplea en proporción 1:10. En los diseños de moldes de vidrio se dejó el Cr de la mascarilla ya que observamos que esta película sirve como protección para desmoldar el diseño y evitar adherencia. La creación de los puertos, previo a la unión de la tapa es esencial y facilita el proceso de conexión del chip microfluídico. Una conexión lateral paralela al canal es mejor que la inyección perpendicular, pero esta última es más fácil de crear en un diseño 2D como el propuesto. Crear una conexión fuera del plano es más sencillo porque se evita el cruce de canales de inyección y conducción.

También se intentó el grabado directo del Si y vidrio mediante RIE. Sin embargo, el sistema con el que contamos no tiene la potencia necesaria para el grabado, aunque si contamos con los reactivos necesarios. Varios intentos se realizaron variando las proporciones de flujo de gases SF<sub>6</sub> y Ar<sub>2</sub> sin embargo, la tasa de ataque es muy baja, del orden de [nm \* h<sup>-1</sup>], esto no nos permitió utilizar esta técnica. La potencia máxima de nuestro sistema es de 100 W mientras que la literatura reporta el uso de una potencia de 390 W para procesos similares [79, 80].

### 3.3.3 Sellado de chips

El sellado de los chips de PDMS se realizó empleando la metodología y parámetros basados en el trabajo de Bhattacharya [81]. Una funcionalización de plasma de O<sub>2</sub> de 20 s, asegura una excelente unión dentro de los 60 s posteriores a la funcionalización. Esto asegura una buena unión y evita dañar la superficie. Otros métodos de unión pueden consultarse en [82-86].

El sellado de vidrio-vidrio es un poco más complejo, a pesar de que existen protocolos bien definidos [87], no se cuenta con un horno con control de temperatura. Existen diferencias entre los distintos tipos de vidrio y se experimentó con distintas temperaturas y rampas de calentamiento y tiempos de calentamiento e incubación. Las superficies en contacto y la fuerza de unión se determinaron de manera experimental hasta lograr la correcta fusión térmica del vidrio. También se emplearon otras técnicas como lo fue el empleo de adhesivos como “Vitalit” o “Xinova” que curan bajo luz UV y la utilización de capas metálicas entre los vidrios que funcionaran como adhesivo durante el ablandamiento en la unión térmica. Estos protocolos no son reportados aquí ya que no dieron buenos resultados, sin embargo, vale la pena mencionarlos. No se emplearon otro tipo de protocolos químicos dada la posible reacción que pudiera tener esta capa con los líquidos que se acarrean en los

canales, lo cual podría generar una contaminación dentro de la celda. De esta forma se optó por emplear solo la unión térmica para que el chip fuera completamente de vidrio y no hubiera nada adicional en contacto con los fluidos.

### 3.4 Conexiones microfluídicas

Se crearon las conexiones microfluídicas para ser robustas, así como plataformas mediante impresión 3D para permitir una mejor conexión y soportar las mangueras durante la inyección. Estos soportes además de alinear las mangueras permiten que el estrés mecánico de las mismas se transfiera al soporte y no al chip microfluídico, evitando que se doblen y se desconecten las mangueras del chip por flexión o movimientos externos. Una alta presión de inyección no es deseable ya que la presión provoca que se desconecten las mangueras del chip. Para evitar lo anterior propusimos el diseño de conexiones y plataformas que hicieran más robusto este sistema **Figura 22**, **Figura 23** y **Figura 30**. Estas se diseñaron mediante AutoCAD y se fabricaron por impresión 3D o micro maquinado CNC, con buenos resultados. Algunas piezas no se fabricaron, pero el diseño se propuso y pueden ser fabricadas posteriormente. También se propuso una plataforma de chip microfluídico resellable que no requiere unión térmica de vidrio-vidrio y solo emplea presión mecánica mediante para mantener los vidrios unidos “*in situ*”. Esta posibilidad no se exploró y quedó como propuesta para un trabajo posterior **Figura 23**.

### 3.5 Síntesis de NP's de QN

#### 3.5.1 Síntesis masiva

La síntesis en masa de estructuras tres pesos moleculares de QN y dos de PVP con distintas velocidades de agregación de surfactante TPP y agitación magnética se realizó de acuerdo a [45]. En este trabajo se emplearon las condiciones que nos

proporcionaron los mejores resultados en el trabajo previo para compararlo con los resultados mediante microfluídica. Se sintetizaron nanopartículas de QN de bajo peso molecular con una velocidad de agregación de surfactante de 15 ml/h mediante bomba de infusión KDS y jeringa terumo de 5 ml con aguja 22G. Los detalles del protocolo de síntesis se describen en el Anexo.

### 3.5.2 Síntesis mediante microfluídica

La síntesis microfluídica se puede ver como una combinación de varias técnicas debido a que el mecanismo de formación de NP's también es mediante gelación iónica. Difiere de la síntesis en masa porque: 1) La compartimentalización que se hace del polímero mediante la creación de microgotas de QN dentro de aceite. Esto podría verse como una síntesis en micro emulsión, pero se logra una alta uniformidad debido al empleo de los micro canales **Figura 26**. La formación de las NP's por gelación iónica ocurre por difusión del surfactante dentro de los micro reactores y la separación de fases agua-aceite que ocurre en el vaso de precipitados **Figura 27**. A diferencia de como ocurre en la síntesis en masa, donde los reactivos entran en contacto directo y el resultado de la reacción se produce por la velocidad de la reacción entre los agentes y las variables físicas como la agitación magnética y difusión, el resultado de la reacción C de los productos A+B, sigue teniendo contacto con los precursores. Mientras que en el sistema de nucleación el producto C se encuentra autocontenido en las microgotas y el aceite funciona como una barrera evitando que el producto C entre en contacto con B, solo A y C se encuentran en el micro reactor, la difusión paulatina del entrecruzante va creando las NP's de QN dentro de las gotas. Se pueden probar con distintas variables en el sistema como lo son, concentración de los reactivos y velocidad de inyección, velocidad de agitación o tamaño de gota. En este trabajo se sintetizan las NP's de QN como método de comprobación de funcionamiento del sistema microfluídico y el análisis del efecto de las variables de la fabricación de NP's de QN se dejará para un trabajo posterior.

Así mismo se encapsuló proteína IgG en Np's de QN, las cuales fueron analizadas morfológica y composicionalmente mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía Raman (Raman) y espectroscopía electrónica de rayos X (XPS).

### 3.6 Técnicas de caracterización

Las técnicas de caracterización utilizadas para determinar las propiedades morfológicas, estructurales y composicionales de las NP's de QN sintetizadas con el sistema microfluídico fabricado fueron microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman y espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS). El análisis de las imágenes de TEM para determinar el tamaño de partícula empleando distribución estándar, se hizo mediante hoja de cálculo en excel y AutoCAD. Para la caracterización de los chips microfluídicos se empleó perfilometría, para determinar la relación de aspecto entre diseño geométrico y fabricación del dispositivo.

#### 3.6.1 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Es una de las técnicas principales para el análisis morfológico de materiales [88], permite la visualización directa de una gran cantidad de materiales orgánicos e inorgánicos que por su naturaleza pueden requerir de preparación. Particularmente los materiales biológicos deben prepararse para su observación debido a las condiciones de vacío y alta energía a las que se ven sometidos [89]. Otros requieren la creación de secciones para su observación o tinción. En general, muchos materiales inorgánicos pueden analizarse mediante ésta técnica gracias a sus propiedades tales como densidad y composición [88] lo que permite la deducción o extracción de información valiosa mediante el análisis de las imágenes obtenidas [90].

A grandes rasgos, el equipo emplea un haz enfocado de electrones altamente energéticos provenientes de un filamento de tungsteno empleado como fuente y conectado a un alto voltaje. Los electrones emitidos viajan hacia la cámara de vacío que se crea en el cuerpo del microscopio y donde se encuentra la muestra, enfocados por una serie de lentes electromagnéticos que enfocan y dirigen el haz de electrones hacia la muestra de interés que el haz de electrones atraviesa o se dispersa en la muestra, dependiendo de las características físicas de ésta, generando una imagen de campo oscuro y alta resolución que revela la estructura interna del material, tamaño, forma, distribución de partículas y defectos.

Las imágenes obtenidas mediante la caracterización de las muestras de este trabajo de investigación se realizaron mediante un microscopio electrónico JEM-ARM200F. Las muestras se prepararon con y sin tinción de la muestra con azul alamar tomando directamente el producto de la síntesis y empleando distintas concentraciones o alícuotas de la muestra a 1:10, 1:100 y 1:1000, con agua desionizada. Ver protocolo de preparación de muestras en Anexo. Se emplearon rejillas de cobre con soporte de *Formvar/Carbón* de 300 mesh marca TedPella.

### 3.6.2 Determinación de tamaño de partícula

El análisis del tamaño de partícula se realizó empleando las imágenes obtenidas mediante TEM. Las imágenes de las micrografías se escalaron e importaron a AutoCAD, dibujando círculos sobre las partículas empleando capas. Estos datos fueron exportados a una tabla de Excel donde se trataron los datos para determinar entre otras cosas, promedios de tamaños de radio y diámetro de partícula, así como la distribución estándar  $\sigma$ . Esta medida se emplea para determinar la desviación o dispersión de un conjunto de datos numéricos.

El análisis de las imágenes de forma manual representa ciertas ventajas sobre el tratamiento de las imágenes mediante software automatizado ya que evita errores de reconocimiento de partículas que quedan a la interpretación del algoritmo empleado por el software.

### 3.6.3 Análisis de espectros FTIR y Raman

Estas técnicas de caracterización mediante espectroscopía en el infrarrojo basan su funcionamiento en la implementación de un interferómetro Michelson. Básicamente un haz de la “fuente” es dividido en dos. Un haz sirve como comparación o referencia. El otro haz se hace incidir sobre una muestra, dependiendo de las propiedades de la muestra, ésta absorbe la luz incidente, la cual se compara con el haz de referencia para determinar el cambio sufrido por el haz que incidió sobre la muestra. Esta diferencia corresponde a la absorción que tiene una muestra respecto a una longitud de onda determinada. Variando la longitud de onda de la fuente, se hace un barrido de longitudes de onda. Dependiendo de la composición molecular de una muestra, esta absorbe la energía del haz incidente o no. Lo que crea un patrón único o huella digital. Se dice que la molécula vibra, absorbe o se excita a cierta longitud de onda, cuando los átomos de la muestra o compuesto vibran a esa longitud de onda incidente resultando en el estiramiento de los enlaces de unión. Esto crea patrones específicos dependiendo de su composición. El equipo analiza la reducción en la frecuencia de la radiación electromagnética del haz incidente absorbido por la muestra y lo compara con el haz original. Existen tablas de compuestos y bases de datos con espectros que sirven para comparar los resultados de mediciones con patrones bien definidos. El análisis de estos patrones es sutil y permite obtener mucha información de la muestra analizada, como la presencia de compuestos y tipos de enlaces intermoleculares. Del análisis e interpretación de los resultados se puede determinar el tipo de movimiento que presentan los enlaces en una muestra; deformaciones (simétrico o asimétrico), doblamiento, tijeo o balanceo dentro o fuera del plano, entre otros [91]. Para el

análisis FTIR de las muestras se empleó un espectrómetro de infrarrojos Nexus 470 Termo Nicolet, en modo absorción, con resolución menor a  $1\text{ cm}^{-1}$ , en el rango 400 a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , con la muestra embebida en una pastilla de KBr.

La espectroscopía Raman es una técnica en la que también se inducen vibraciones de los enlaces químicos tal que la frecuencia de excitación para cada tipo de enlace químico en una molécula ocurre a la misma longitud de onda incidente. Tanto FTIR como Raman pueden ser empleadas para medir excitaciones vibracionales para la mayoría de la materia en estado sólido, líquido o gaseoso.

Las diferencias fundamentales con FTIR radican en que la espectroscopía Raman da como resultado una transición entre estados electrónicos en IR. Solo se produce un cambio en los estados vibracionales. En la espectroscopía Raman la fuente de excitación es una onda de longitud única (monocromática) visible o cerca del IR. La fuente en un espectrómetro IR es capaz de crear todas las frecuencias de radiación en infrarrojo. Es común que, para obtener un barrido de más longitudes de onda, se haga un cambio de fuente.

Así mismo, la radiación electromagnética no es absorbida como en FTIR sino dispersada. El cambio en la intensidad de la radiación antes y después de que la muestra es medida es proporcional a la frecuencia del enlace vibracional. Dado que los enlaces de muestras no polares son más polarizables, que los de las muestras polares, en la espectroscopía Raman se presentan activas y los enlaces polares disminuyen su actividad en Raman conforme la diferencia de electronegatividad en los enlaces de los átomos se incrementa [92-94].



Para el análisis de las muestras mediante Raman, empleamos un Espectrómetro Raman Jobin-Y von T64000.

Entonces en Raman la radiación incidente es dispersada por la muestra, cambiando su frecuencia. La diferencia entre las frecuencias de la radiación incidente y dispersada corresponde a la excitación del modo vibracional de la muestra. En FTIR una energía específica de radiación electromagnética es absorbida por la muestra resultando directamente en un pico en el espectro.

En general:

En moléculas simétricas si se presentan vibraciones activas en IR entonces son inactivas en Raman y viceversa.

En moléculas no simétricas las vibraciones pueden ser activas en ambas técnicas, en una o en ninguna.

Las Bandas fuertes en IR (enlaces polares) reflejan bandas débiles en Raman.

Las Bandas fuertes en Raman (enlaces no polares) implican bandas débiles en IR.

Las diferencias instrumentales básicas entre ambas técnicas incluyen: El FTIR tiene una fuente de múltiples longitudes de onda y Raman tiene una fuente de una sola longitud de onda. En FTIR no existe monocromador mientras que en Raman es indispensable.

### 3.6.4 Análisis de espectros XPS

La espectroscopía por fotoelectrones de rayos X (XPS) es una técnica de análisis superficial cuantitativa, mide la composición elemental de los orbitales atómicos presentes en la muestra, así como el estado químico y electrónico de los elementos en las últimas capas de un material. Por ejemplo, se puede determinar el estado en el que se encuentra por ejemplo un óxido metálico +1 o +2 y determinar la proporción de uno y otro.

El espectro XPS se obtiene irradiando el material con un haz de rayos x, mientras se mide la energía cinética y el número de electrones que escapan de los primeros 10 nm de la muestra. El resultado usualmente se grafica en función de la energía de enlace, empleando la ecuación de Einstein. Requiere de un alto vacío para trabajar del orden de entre  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  mbar. Se pueden detectar prácticamente todos los elementos, excepto hidrógeno y helio.

Cada elemento produce un conjunto característico de picos, a valores de energía de unión que identifican directamente a cada elemento que existe sobre la superficie del material analizado. Estos picos corresponden a la configuración electrónica dentro de los átomos 1s, 2s, 2p, 3s etc. El número de los electrones detectados en cada pico característico está estrechamente relacionado con la cantidad del elemento en la muestra analizada. Para generar los volúmenes de porcentajes atómicos cada señal del XPS debe ser corregida dividiendo la intensidad de su señal por un “factor de sensibilidad relativo” y normalizado para todos los elementos detectados [95-97].

El límite de detección es del orden de 0.1% o incluso partes por millón, bajo condiciones especiales como concentraciones altas en la superficie y tiempos prolongados de recolección de datos.

Para el análisis de las muestras de NP's de QN se empleó un XPS Thermo Scientific K-Alpha.

### 3.7 Creación de sistema de inyección microfluídico

El proceso general que seguimos puede ser descrito por el diagrama de flujo de la **Figura 9**. El diagrama se divide en tres áreas. Por sus colores, la zona amarilla corresponde al trabajo que se llevará a cabo de forma teórica y corresponde al proyecto y la propuesta geométrica, incluye revisión bibliográfica, propuesta geométrica y simulación, termina con la creación de las máscaras para la transferencia de diseños y fabricación del dispositivo. La zona verde corresponde al trabajo de ejecución, fabricación de sistema de inyección, fabricación de chip y síntesis de nanopartículas biopoliméricas, así como su caracterización. Finalmente, la zona rosa corresponde al análisis de resultados y escalado del dispositivo a vidrio. Adicionalmente se contempla la posible modificación del diseño es caso de que este no funcione, deberá modificarse la geometría para poder llevar a cabo síntesis en microgotas y encapsulado de proteína.

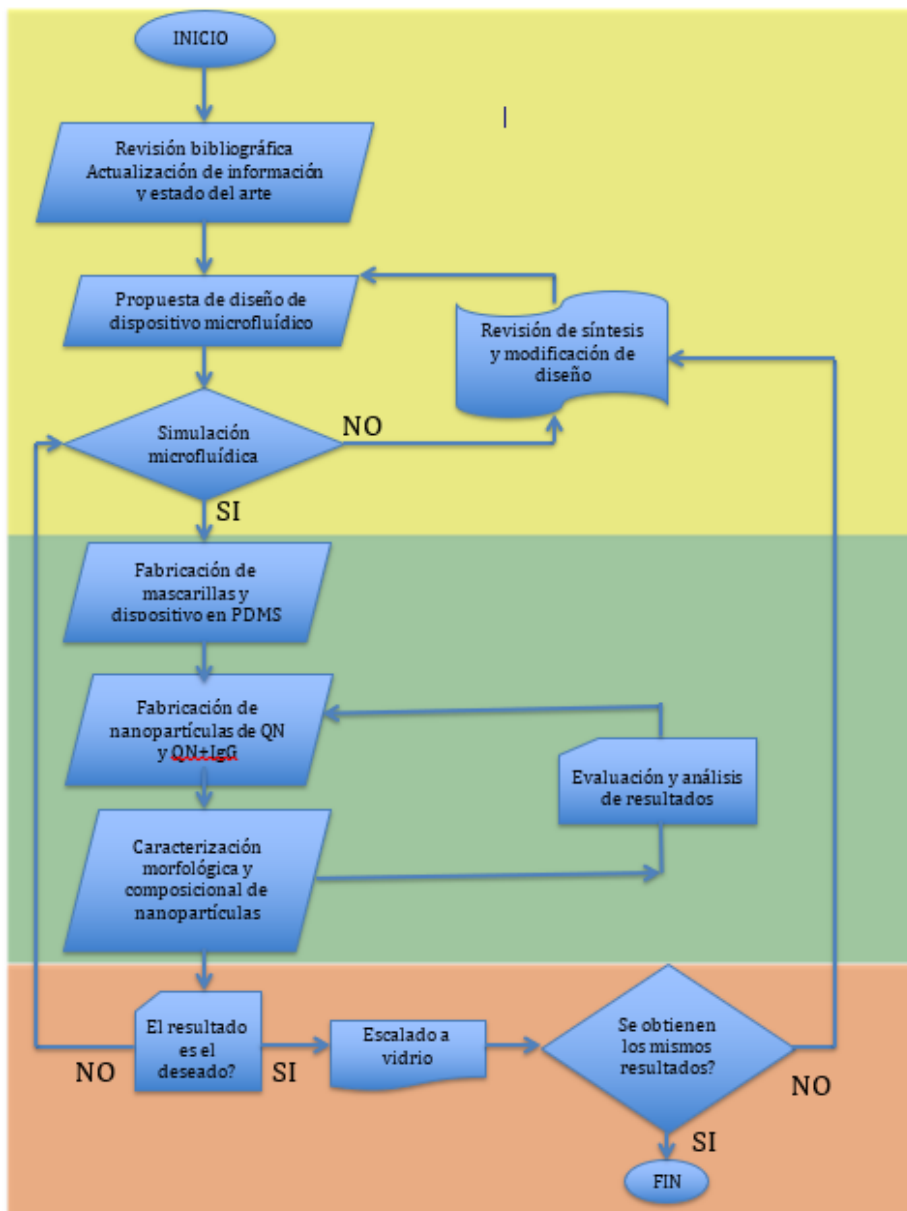
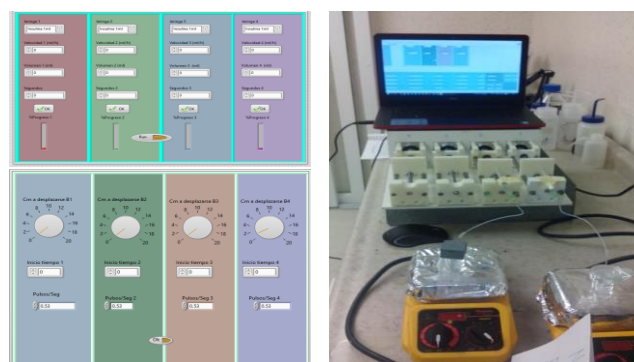


Figura 9.- Diagrama de flujo de ejecución del trabajo experimental.

Una parte muy importante del sistema microfluídico, es el sistema de inyección. Las cantidades de flujo o gasto que se manejan deben estar en el rango de micro o nano litros por hora, nosotros desarrollamos un sistema hecho en casa. Comercialmente existen muchos equipos con estas características, sin embargo, muchos de ellos son caros y el tiempo de importación suele exceder los 30-60 días. En nuestro grupo desarrollamos este sistema para inyectar volúmenes desde 7  $\mu$ l. por hora, este sistema puede ser consultado con más detalle en esta referencia [98].

El sistema se construyó con piezas comercialmente disponibles y se redujeron costos mediante la impresión 3D de algunas partes hechas de acrilonitrilo butadieno estireno (ABS). Para el sistema de inyección se emplea un tornillo sin fin y un embolo que permite el control preciso del volumen inyectado mediante la automatización y control empleando una tarjeta Arduino. Se empleó el sistema de inyección mediante jeringas. El uso de jeringas se debe a que existe una amplia gama de jeringas disponibles comercialmente. Los volúmenes van desde los 0.3 hasta los 25 ml y hay jeringas de la marca Hamilton de hasta 0.5  $\mu$ l. Esto ofrece una amplia gama de volúmenes que pueden ser dispensados, las jeringas poseen propiedades a favor como; esterilidad, bajo costo y baja reacción a la mayoría de los compuestos orgánicos, son desechables y libres de fugas o filtraciones, fáciles de cargar y conectar. Debido a que el flujo es dependiente del volumen, el sistema puede ser fácilmente escalable, haciendo el sistema muy versátil **Figura 10** [98].



*Figura 10.- Interfaz gráfica creada mediante LabView para controlar el sistema de inyección y sistema de inyección fabricado con impresión 3D y motores NEMA y Arduino.*

Para la construcción del sistema se emplearon partes obtenidas de distribuidores locales y se emplearon las versiones libres de software de LabView™ y Arduino®. En la **Tabla 5** se muestra una lista de componentes empleados. En la **Figura 10** se muestra el sistema armado y funcionando y en la **Figura 11** se muestra un renderizado de una de las bombas de inyección, así como el diagrama electrónico de conexión. Se integraron los componentes para poder controlarlos mediante cuatro motores NEMA 23 y sus respectivos controladores A4988 empleando una tarjeta Arduino Mega 2560 R3.

*Tabla 5.- Componentes empleados para la fabricación del sistema microfluido de inyección.*

Componente	Cantidad
Tornillos de bajo perfil M5 25 mm	4
Embolo para montaje de jeringa impreso 3D	4
Base de montaje parte final impresa 3D 50 mm	4
Pistones impresos 3D	4
Espaciadores impresos 3D 40 mm	16
Acoplador flexible 6.5 mm x 8 mm	4
Tuerca bloqueadora anti resbale de 8 mm para tornillo ACME	4
Bolas de rodamiento 8x16x5 mm	8
Calce de 8 mm	8
Collar de cerramiento 8 mm	8
Motor a pasos NEMA 23	4
Tornillos M5*55	2
Tornillos métricos ACME principales 8 mm	4
Tarjeta Arduino Mega 2560 R3	1
ATX fuente de poder	1
Controlador a pasos para motor NEMA A4988 1/16 de paso	4
Tuerca pistón 8 mm	4

La configuración para la conexión nos permite expandir el micro paso del motor discretizando cada paso en 16 pasos más pequeños, con esto se logran inyecciones de volumen que van de los 70  $\mu$ l/h hasta los 54 ml/h, variando el volumen de jeringa empleado y los pasos del motor. La **Tabla 14** muestra el escalamiento que puede lograrse. La **Figura 11** muestra el diagrama del circuito empleado.

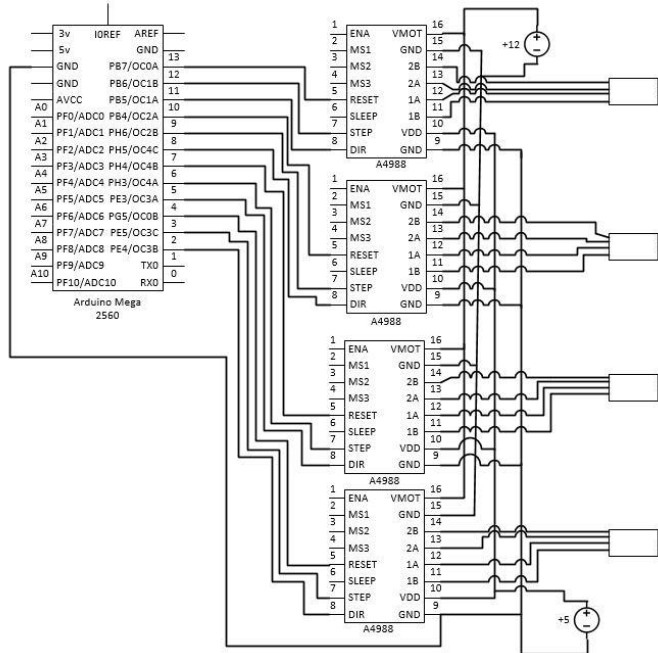


Figura 11.- Diagrama de conexión de motores NEMA 23 a tarjeta Arduino y controladores A4988, renderizado de las bombas armadas.

### 3.8 Caracterización de líquidos y reactivos empleados en la simulación

Para la simulación son requeridas las viscosidades de los líquidos involucrados en la simulación, para este efecto se realizó la caracterización de los polímeros empleados, estos son QN y PVP, se empleó un viscosímetro Brookfield mod. DV-I prime. Los resultados se muestran en la **Tabla 15** y **Tabla 16** y en las **gráficas** de la **Figura 31** y **Figura 32**.

Se aprecia el valor de estos resultados de concentración vs viscosidad en Centipoise [ $\text{g}/\text{cm}^*\text{s}$ ]. Para el aceite (CAS M4810) se empleó el dato proporcionado por la hoja del fabricante en la hoja técnica de especificaciones, que es de 30 cps y Gravedad específica 0.82-0.88.

### 3.9 Simulación microfluídica CFD empleando COMSOL

#### 3.9.1 Pre-proceso

El proceso general de la simulación computacional se describe a continuación, primero se procede a hacer la propuesta geométrica del sistema a simular, en las medidas o dimensiones deseadas, en nuestro caso propusimos un diseño en “T” con canales de 1 micra y una longitud de 7  $\mu\text{m}$  total, el diseño de estos canales bidimensionales que son una simplificación del problema puede hacerse con cualquier software de diseño CAD o directamente en el software de simulación COMSOL, la recomendación es hacerlo directo en COMSOL a menos que el diseño sea muy complejo, si es este último el caso, recomendamos hacerlo mediante AutoCAD, SolidWorks, 3DStudio u otro software similar.

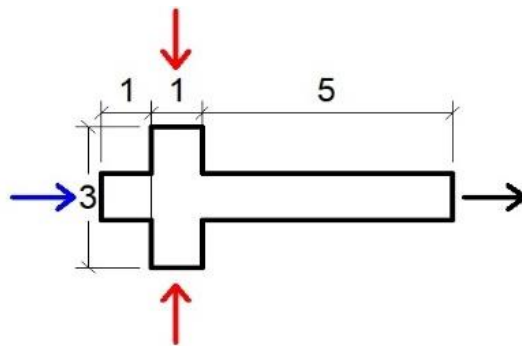
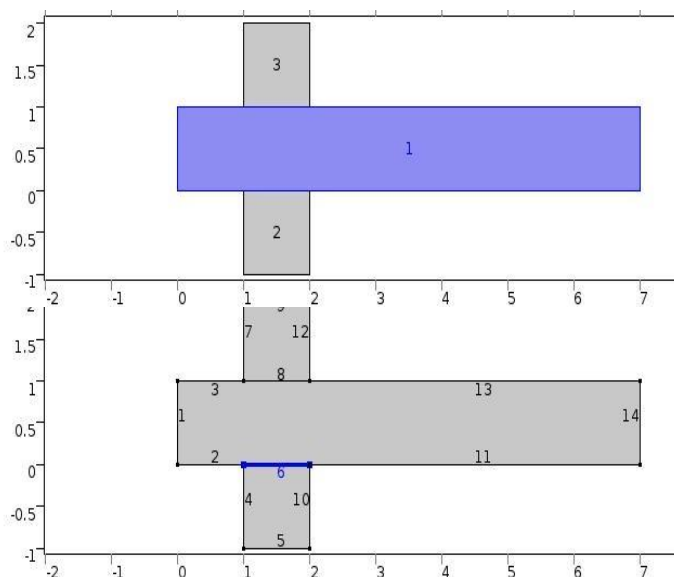


Figura 12.- Propuesta geométrica de los canales y dirección de entrada del flujo de los fluidos.



Una vez propuesta la geometría el siguiente paso es establecer las direcciones del desplazamiento del fluido y variables o condiciones iniciales como lo son los materiales empleados, características de los fluidos, tipo de paredes (no móviles), y establecer dominios iniciales, donde se considera que el fluido se encuentra cuando  $t=0$ , así como las interfases o sitios de contacto de los dos líquidos en  $t=0$ . Se establecen también las velocidades iniciales de los fluidos en  $t=0$ , así como la dirección de entrada **Figura 12**. En la **Figura 13** arriba, la región 1 es para QN, mientras que las regiones 2 y 3 son para aceite. Las interfases se denotan por las líneas 6 y 8 abajo, que en realidad son áreas o regiones bidimensionales donde los fluidos están en contacto.

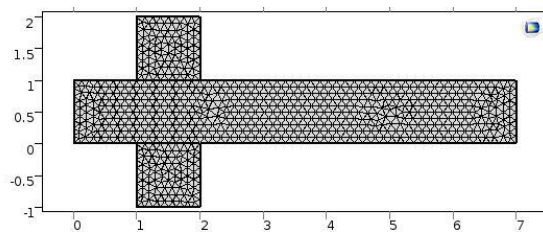


*Figura 13.- Regiones o dominios asignados como punto de partida para la simulación, condiciones de frontera entre líquidos y paredes en  $t=0$ , así como establecimiento de parámetros y condiciones iniciales.*

Debido a que no hay una solución analítica para las ecuaciones Navier-Stokes excepto para problemas muy concretos, la solución numérica computacional, es la única alternativa de cálculo. Este método permite construir un problema de cálculo diferencial en un espacio vectorial de dimensión no-finita, en uno de algebra lineal de dimensión finita que puede resolverse de manera aproximada, con un número de ecuaciones finitas.

La discretización permite obtener las soluciones exactas en un número determinado de puntos (nodos del mallado), el resto de los puntos, que no son nodos, se calculan interpolando los valores de las soluciones obtenidas para los nodos.

Para crear el mallado, se eligieron triángulos. Para ello se soluciona el problema, mediante el método de elemento finito como solución de las ecuaciones diferenciales parciales de Navier Stokes, discretiza el dominio en dominios menores, elementos finitos o subdominios, creando nodos y una malla de puntos **Figura 14**. Dichos puntos se consideran adyacentes si pertenecen al mismo elemento. De acuerdo con las relaciones de vecindad o adyacencia, se relaciona el valor de un conjunto de variables incógnitas definidas para cada nodo (grados de libertad). Estas relaciones se escriben en forma de ecuaciones lineales, para crear una matriz de rigidez del sistema. El número de ecuaciones del problema es proporcional al número de nodos, al cual se introducen condiciones iniciales. Al ser proporcional el número de ecuaciones y los nodos de la malla, un mallado más fino requiere mayor tiempo de cómputo y recursos computacionales. En fluidos, es posible determinar los perfiles de velocidades y presiones, desplazamientos, deformaciones y tensiones mediante el empleo de relaciones cinemáticas y constitutivas.



*Figura 14.- Mallado del diseño, discretización en elementos finitos.*

### 3.9.2 Cálculo

El cálculo es interno, pero básicamente se emplea un algoritmo para la solución de sistemas de  $N$  ecuaciones con  $N$ -incógnitas para problemas no dependientes del tiempo. Si el problema es no-lineal o dependiente del tiempo, el cálculo es una sucesión finita de sistemas de  $N$  ecuaciones con  $N$ -incógnitas que se resuelven de forma sucesiva. En este sistema, la solución del sistema  $N-1$  se emplea como entrada del sistema  $N$ . La entrada del sistema  $N$  depende del resultado del paso anterior, y consume más tiempo de cómputo para problemas dependientes del tiempo, que para problemas de tipo estacionario.

### 3.9.3 Parámetros de cálculo

En la simulación, se emplearon los datos de la caracterización de los líquidos empleados en el experimento real. Para el aceite mineral se emplearon los valores proporcionados por el proveedor: densidad 0.84 g/ml, índice de refracción  $n_{20/D}$  1.467, viscosidad Brookfield 30.0 cps, gravedad específica 0.82-0.88. Para la fase hidrofílica se emplearon los datos obtenidos en la caracterización del QN al 1 % w/v, que es 20 cps, de acuerdo con la **Figura 31**. La densidad se estima en 1.01 g/ml que resulta de sumar la densidad del agua más los 10 mg de QN disuelto en la solución. En la simulación se mantuvieron fijos los parámetros de entrada del líquido acarreador, en nuestro caso el aceite, a una velocidad normal de entrada de 0.01 m/s y se fue variando la velocidad normal de entrada de la fase hidrofílica. La velocidad de entrada del QN se varió de 0.001 m/s a 0.01 m/s, en incrementos de 0.001 m/s. Hasta igualar la velocidad de entrada del líquido acarreador, con un total de 10 simulaciones.

Las simulaciones se corrieron en una computadora de escritorio marca Hewlett Packard (HP), con cuatro procesadores Intel i7 quad-core y 32 Gb de memoria RAM, con Windows Server y la versión 5.4 de COMSOL *Multiphysics*. Cada simulación tomó entre 14 a 24 h para terminar. Algunos datos para la simulación como, la tensión superficial entre el agua y el aceite fueron tomados de la base de datos de COMSOL. Para el mallado se eligió una discretización gruesa de aproximadamente 1,398 dominios, que representan 9,360 grados de libertad dependientes del tiempo. Para la resolución del problema bidimensional-idealizado, las variables para las que se resolvió fueron velocidad, presión y advección de la interfaz. Debido a que el problema es dependiente del tiempo se propuso un periodo de 0.0 a 0.1 s de estudio, con pasos de 0.001 s. Las variables y los grados de libertad se resolvieron para cada paso del intervalo de tiempo, es decir para los 9,360 grados de libertad por cada paso de 0.001 s, desde 0.0 s hasta 0.1 s. Ello dio un total de 100 pasos y 936,000 grados de libertad en total. Esto se realizó a su vez para 10 velocidades de entrada de la fase hidrofílica (QN), desde 0.001 m/s hasta 0.01 m/s, con pasos de 0.001 m/s.

#### 3.9.4 Post-proceso

Esta etapa permite tratar y trabajar con los resultados del proceso, cuando se establecen los parámetros iniciales. También se indica al programa las variables de interés. En el postproceso se emplean representaciones gráficas de las variables, de magnitudes principales o magnitudes derivadas, que permiten obtener un juicio sobre los resultados de la simulación que de otra forma sería difícil o complicado de comprender. Generalmente se emplean códigos de colores o tonalidades para las distintas variables de interés velocidad, presión, viscosidad, densidad, difusión, miscibilidad etc.

### 3.10 Fabricación de mascarilla con diseños microfluídicos

La fabricación de las mascarillas se hizo con el propósito de transferir y replicar los patrones de los canales microfluídicos de forma rápida. Se probaron varios tamaños de ancho de canal para determinar la mejor relación de aspecto y geometría durante la fabricación. Para su fabricación se empleó una mascarilla comercial que ya cuenta con una película de resina y de Cr. La **Tabla 6** resume las condiciones de fabricación de la mascarilla.

*Tabla 6.- Condiciones de fabricación de mascarilla.*

Acción	Condiciones ideales
Grabado de Patrones [mW]	40 al 100%
Tiempo de exposición [min]	30 por patrón
Ataque de cromo [s]	60
Relación de aspecto [ $\mu\text{m}$ ]	90% $\pm$ 0.2 a 0.3

El diseño de los patrones se hizo mediante AutoCAD y posteriormente fueron transferidos a LayoutEditor. Estos diseños se cargaron a la PC para grabarlos a la mascarilla. Se introdujo la mascarilla en blanco al editor de mascarillas Heidelberg  $\mu\text{PG101}$  y se grabaron directamente los patrones mediante un láser de luz UV con una potencia de 40 mW al 100 %. Después del grabado de patrones se lavó la mascarilla con acetona, propanol y agua desionizada, se secó con  $\text{N}_2$ . Se reveló con atacante de Cr por 60 s.

### 3.11 Fabricación de chips microfluídicos

Como hemos visto, existen varias estrategias, procedimientos y materiales mediante los cuales se pueden crear dispositivos microfluídicos. El procedimiento elegido en este trabajo se basa en las capacidades y alcances con los que contamos en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados y en la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

#### 3.11.1 Transferencia de diseños geométricos

En la transferencia de los diseños reside la calidad de los diseños geométricos y la reproducibilidad de los patrones que pretenden copiarse. El equipo empleado cuenta con un haz láser de luz ultravioleta de 400 nm. La resolución que tiene el equipo es de 1  $\mu\text{m}$ , pero en la práctica logramos transferir diseños de hasta 2  $\mu\text{m}$ . Todos los diseños fabricados se realizaron con el editor de mascarillas **Figura 15**. La transferencia posterior de patrones empleando la mascarilla reduce la capacidad del aspecto y definición geométrica de 2  $\mu\text{m}$  que permite el diseño directo. Cuando replicamos patrones empleando la mascarilla y alineadora solo logramos que se definieran motivos de 5  $\mu\text{m}$ . Motivos de menor dimensión no lograron definirse. Así, por ejemplo, los canales de 2 y 3  $\mu\text{m}$  se cierran, no quedan bien definidos o presentan irregularidades de geometría sobre todo en los costados.



*Figura 15.- Editor de mascarillas.*

### 3.11.1.1 Transferencia de diseños sobre oblea de Si mediante mascarilla

Para la transferencia de los diseños empleando la mascarilla, se procedió a recubrir una oblea de Si, con 1  $\mu\text{m}$  de resina siguiendo el “**protocolo de aplicación de resina**” (ver anexo). Teniendo la oblea con resina precocida, se coloca la oblea y la mascarilla en la alineadora **Figura 16**, se orientan a través de los controles micrométricos y microscopio óptico para asegurar la correcta posición de la mascarilla con respecto a la superficie de la oblea. Posteriormente se hace incidir luz UV por 5 s para transferir los patrones de la mascarilla a la oblea **Figura 17**. Esto también puede hacerse sobre vidrio con Cr **Figura 18**. Las condiciones de fabricación se muestran en la

**Tabla 7.**



*Figura 16.- Alineadora de mascarillas.*



Figura 17.- Obleas de Si con patrones transferidos mediante mascarilla y alineadora.

Tabla 7.- Condiciones de fabricación de patrones sobre obleas de Si.

Acción	Condiciones ideales
Aplicación de resina [rpm * s]	4,000 * 20
Grabado de patrones [mW]	40 al 100%
Tiempo de exposición [min]	30
Proporción de revelador [v/v]	13: 1
Tiempo de revelado [s]	12 ~ 13 s
Relación de aspecto [ $\mu\text{m}$ ]	90% $\pm$ 0.2 a 0.3
Espesor de resina [ $\mu\text{m}$ ]	1.96

### 3.11.1.2 Transferencia de diseños sobre oblea de Si o vidrio mediante láser

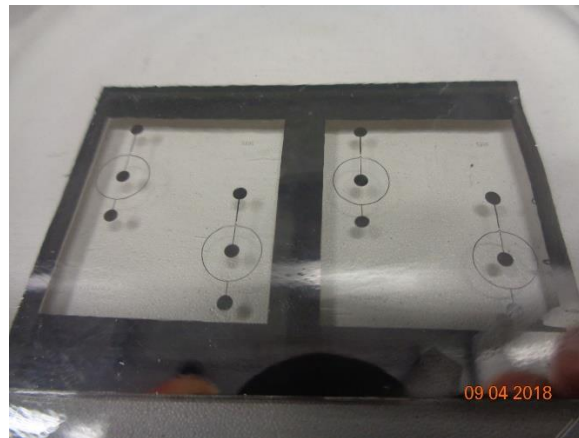


Figura 18.- Transferencia de patrones de forma directa sobre substrato de vidrio.



### 3.11.2 Grabado de canales y sellado de chip

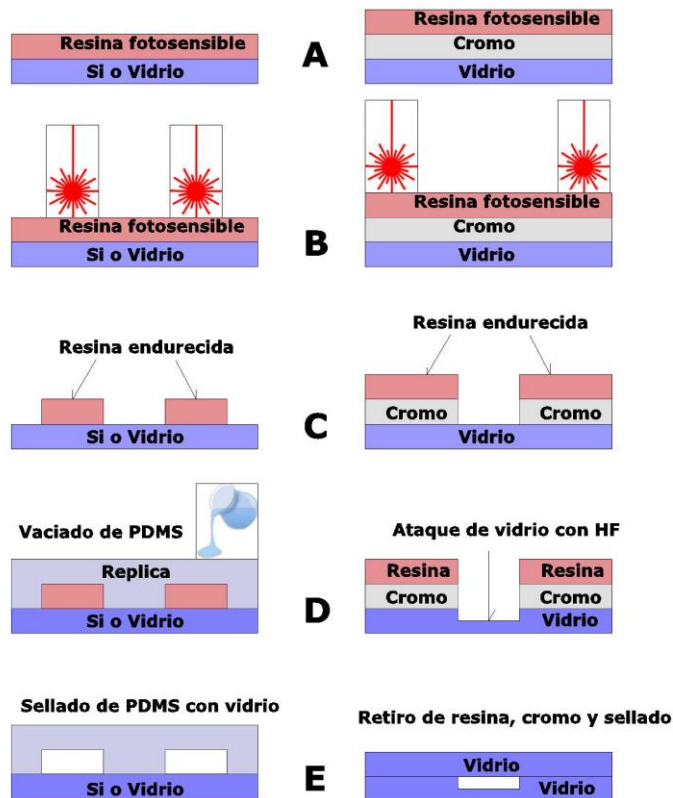


Figura 19.- Proceso fotolitográfico.

El proceso general para el grabado de canales y sellado de chips se resume en la **Figura 19**. Dependiendo del material final en el que se va a fabricar el dispositivo, PDMS o vidrio el proceso varía. Si el diseño final es de PDMS, el Si o vidrio solo se emplean como sustrato o soporte y es la resina la que crea los canales que serán copiados con PDMS **Figura 19 izquierda A-D**. Por el contrario, si el dispositivo final es de vidrio, la resina solo funciona como cubierta para proteger el vidrio durante el grabado de los canales **Figura 19 derecha A-D**.

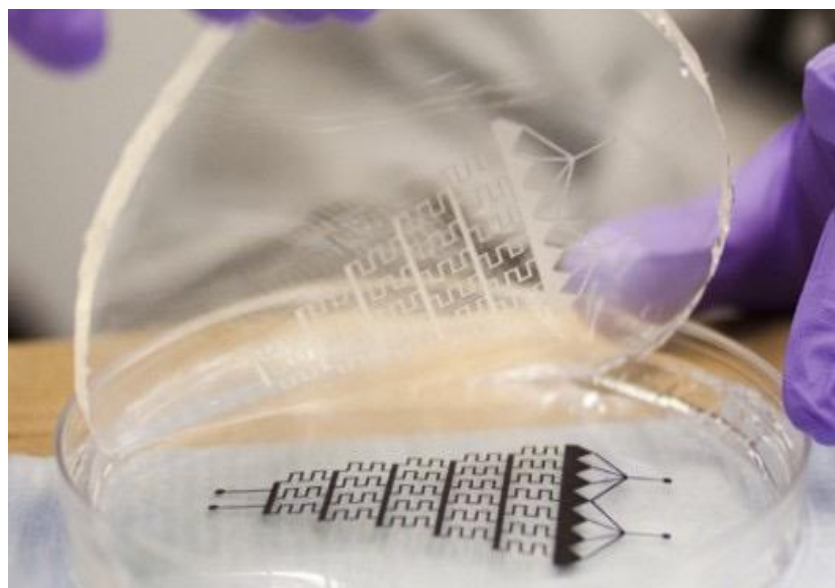
### 3.11.3 Fabricación de chips de PDMS-vidrio

Mediante este procedimiento se crean chips con propiedades hidrofóbicas. Se puede realizar el sellado mediante vidrio u otra capa de PDMS. Las características dependen

del tipo de arreglo que se necesite para la formación de gotas de agua en aceite o de aceite en agua. Un diseño en PDMS favorece la fabricación de gotas de agua en aceite por sus propiedades hidrofóbicas. Por el contrario, un diseño en vidrio favorece la formación de gotas de aceite en agua.

### 3.11.3.1 Transferencia de canales con PDMS

Para la transferencia y replicación de canales mediante PDMS se utilizó un kit elastomérico de PDMS que se compone de base PDMS y un catalizador (marca Sylgard), en proporción 1:10. El mezclado manual genera burbujas de aire que son posteriormente eliminadas mediante una bomba de vacío. La desgasificación se lleva a cabo por 1 h. Posteriormente el polímero se vierte sobre el diseño previamente grabado en Si con resina o en vidrio con resina **Figura 20**. Se emplea un molde para contenerlo y para acelerar el proceso de endurecimiento se coloca en un horno a 60° por 1 h. Posteriormente se desmolda, quedando replicados los patrones.



*Figura 20.- Replicado de canales microfluídicos con PDMS.*

### 3.11.3.2 Sellado de chip PDMS-vidrio mediante plasma $O_2$

Para el sellado se emplea el PDMS con los canales grabados como se aprecia en la **Figura 20**. La tapa se puede hacer empleando un vidrio limpio o PDMS. Se colocan ambas superficies expuestas en plasma de oxígeno para funcionalizarlas. Posteriormente las superficies se ponen en contacto, lo cual genera una unión covalente entre las superficies sellando de forma permanente el dispositivo. Se dispone de unos 60 s para poner las superficies en contacto, tal que la funcionalización no desaparezca y se logre el sellado del dispositivo. Las condiciones empleadas se resumen en la **Tabla 8**.

*Tabla 8.- Condiciones empleadas para la funcionalización de PDMS con  $O_2$ .*

Variable	Condiciones
Vacío [mTor]	0.1
Tiempo [s]	20 s
Potencia incidente [W]	30
Potencia reflejada [W]	0
$O_2$	Apertura 11

### 3.11.4 Fabricación de chips de vidrio-vidrio

La fabricación de chips de vidrio-vidrio permite el uso de agentes químicos. Las plataformas y sistemas de conexión en este tipo de chips deben ser robustas, tal que eviten filtraciones o fugas y deben ser resistentes a agentes químicos. Se pueden hacer uniones químicas mediante la funcionalización de las superficies, pero la unión térmica es la que genera un dispositivo monolítico con mejores propiedades.

#### 3.11.4.1 Grabado de canales de vidrio por ataque químico

Para grabar los canales en vidrio se empleó una solución a base de HF, las proporciones de los ácidos que graban el vidrio dependen de la composición de éste. Mientras que el HF ataca al  $SiO_2$ , los otros ácidos como HCl y fluoruro de amonio  $NH_4F$  atacan los compuestos adicionales en el vidrio, principalmente óxidos metálicos. El

ataque también depende del tiempo, temperatura y área superficial expuesta, así como agitación de las soluciones. Se partió de un protocolo base [99] que fue modificando para adaptarlo a nuestras necesidades.

Tabla 9.- Composición química y propiedades de vidrio Schott B270.

Compuesto	Contenido %
SiO	69
Na <sub>2</sub> O	8
K <sub>2</sub> O	8
CaO	7
BaO	2
ZnO	4
TiO <sub>2</sub>	1
Sb <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1
Propiedad Física	Valor
Coefficiente de expansión térmica [20~300°C]	(9.4±0.1) x10 <sup>-6</sup> /°C
Punto de tensión [°C]	511
Punto de recocido [°C]	541
Punto de ablandamiento [°C]	724
Punto de trabajo [°C]	1006
Densidad [g/cm <sup>3</sup> ]	2.55
Módulo de Young [Mpa]	7,150
Coefficiente de Poisson	0.22
Índice de refracción, long. onda [nm]	1.5251 (588)

Tabla 10.- Parámetros de ataque químico sobre Si y vidrio Schott B270.

Variable	Ataque en Si	Variable	Ataque en B270
Creación de Si poroso [s]	45	Buffer HF: NH <sub>4</sub> F	1:10
KOH	45% + propanol		
Capa de Si poroso, espesor [µm]	10	Grabante H <sub>2</sub> O: Buffer: HCl	17:1:2
<b>Ataque catalítico de Si poroso</b>			
HF: Etanol: H <sub>2</sub> O	1 :2: 1	Tiempo de ataque [min]	5, 20, 25 o 35
Tiempo de ataque [min]	2		
Profundidad de ataque [µm]	3.5	Tasa de ataque [µm/min]	0.7

Se utilizó vidrio Schott B270 cuya composición es la mostrada en la **Tabla 9** patente US 6,441,809 [100]. La solución para el ataque de Si poroso y vidrio se muestran en la **Tabla 10**. Puede consultarse el protocolo correspondiente en el Anexo. En el caso del ataque de Si poroso siempre obtuvimos superficies con alta rugosidad por lo que se descartó para la producción de canales. Por su parte, el ataque de vidrio

presentó buena relación de aspecto, ataque isotrópico y baja rugosidad, por lo que fue seleccionado para la fabricación de moldes.

Durante las pruebas de replicado con PDMS observamos que la capa de cromo facilita el desmolde por lo que fue dejada como capa protectora.

#### 3.11.4.2 Grabado de canales mediante RIE

El RIE es una técnica de ataque fisicoquímica que permite atacar selectivamente áreas o zonas expuestas de un material. Para tal motivo, se crearon patrones de canales sobre Si, cubriendo con resina la zona de los canales y dejando expuestas las demás áreas. Mediante esta técnica obtuvimos buenos resultados de ataque en Si, con buena relación de aspecto. Los parámetros empleados en el ataque se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11.- Parámetros empleados para ataque de Si mediante RIE.

Variable	Parámetro
Tiempo [min]	30
Potencia [W]	100
Flujo de SF <sub>6</sub> [cm <sup>3</sup> ]	10
Flujo de Ar [cm <sup>3</sup> ]	40
Ataque [μm]	10 a 11

#### 3.11.4.3 Sellado de chip vidrio-vidrio por fusión térmica

Se hizo un sellado térmico con peso y una rampa de temperatura. Con la finalidad de evitar hacer alineación, la cubierta del dispositivo se hizo mediante un vidrio plano del mismo tipo. La planicidad evita la creación de burbujas o zonas donde no existe adherencia entre ambos vidrios.

Para unirlos primero se lavaron ambos vidrios con el “protocolo de limpieza de vidrio” (ver anexo) y posteriormente se incubaron en Amonio  $\text{NH}_4\text{OH}$  [28-30%] que resulta de la mezcla de  $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$  a  $60^\circ\text{C}$  por 30 min. Se secaron con  $\text{N}_2$  y se dejaron con peso uniformemente distribuido por 14 h. Otras funcionalizaciones que también sirvieron para la adherencia fue la incubación en  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % por 10 min, y la limpieza con plasma de  $\text{O}_2$  por 10 min previa a la unión.

Se introdujeron en mufla Lindberg con un controlador Honeywell DC1010 con rampas de  $50^\circ\text{C}$  de calentamiento **Tabla 12** hasta alcanzar  $580^\circ\text{C}$ . Con peso uniformemente distribuido sobre los vidrios  $0.2215 \text{ Kg/cm}^2$ . Se dejaron a  $580^\circ\text{C}$  por 15 h y se enfriaron con decrementos de  $50^\circ\text{C}$  **Tabla 12**. Un pulido posterior de las superficies puede ser necesario para mejorar la transparencia.

Una vez que el vidrio llega a la fase de transición vítrea a los  $540^\circ\text{C}$ . Es importante notar que se requiere que las superficies en contacto con los vidrios sean lo más lisas posibles ya que cualquier imperfección es transferida y replicada al vidrio durante la fase de unión térmica. Esto lo evitamos empleando laminillas de acero pulido “steel shim cold rolled, low carbon Steel 1010 UPC16245 gauge (0.003) = 0.076 mm”.

Tabla 12.- Rampa de calentamiento y enfriamiento para fusión térmica de vidrio.

Rampa de calentamiento			Rampa de enfriamiento		
Tiempo [min]	+ $\Delta T$ [°C]	Condición	Tiempo [min]	- $\Delta T$ [°C]	Condición
50	0-50	Calentamiento	14	580-540	Enfriamiento
150	50-100	Calentamiento	13	540-500	Enfriamiento
32	100	Estabilización	19	500-450	Enfriamiento
6	100-150	Calentamiento	23	450-400	Enfriamiento
32	150	Estabilización	27	400-350	Enfriamiento
6	150-190	Calentamiento	32	350-300	Enfriamiento
18	190	Estabilización	40	300-250	Enfriamiento
5	190-200	Calentamiento	49	250-200	Enfriamiento
5	200-250	Calentamiento	68	200-150	Enfriamiento
6	250	Estabilización	102	150-100	Enfriamiento
5	250-300	Calentamiento	172	100-50	Enfriamiento
5	300	Estabilización	50	50-27	Enfriamiento
5	300-350	Calentamiento			
3	350	Estabilización			
5	350-400	Calentamiento			
2	400	Estabilización			
4	400-450	Calentamiento			
1	450	Estabilización			
4	450-500	Calentamiento			
1	500	Estabilización			
10	500-550	Calentamiento			
4	550	Estabilización			
1	550-580	Calentamiento			
900	580	Incubación			

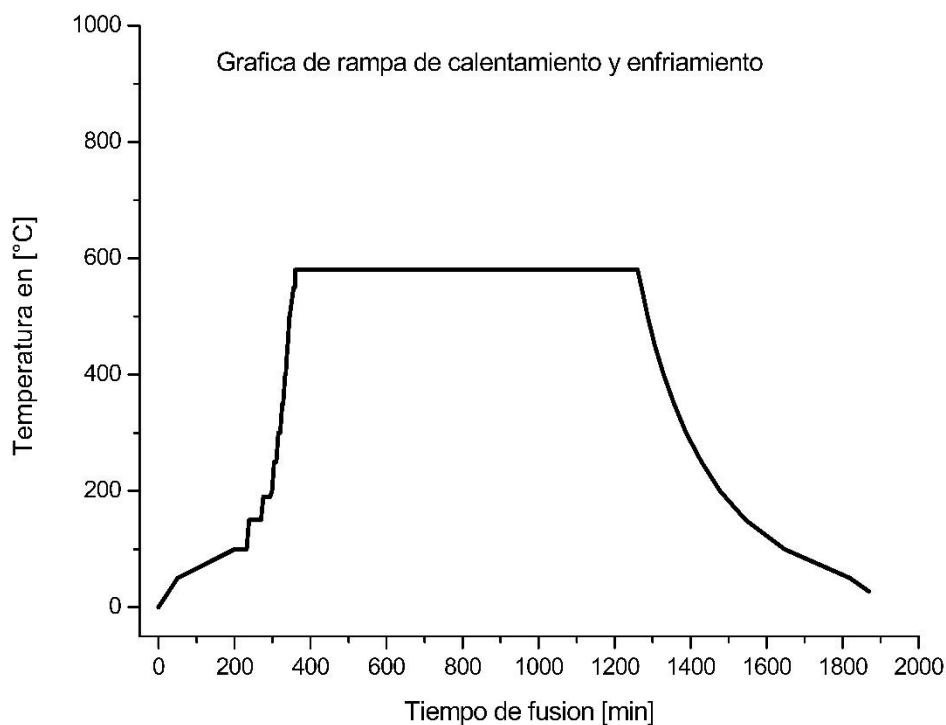
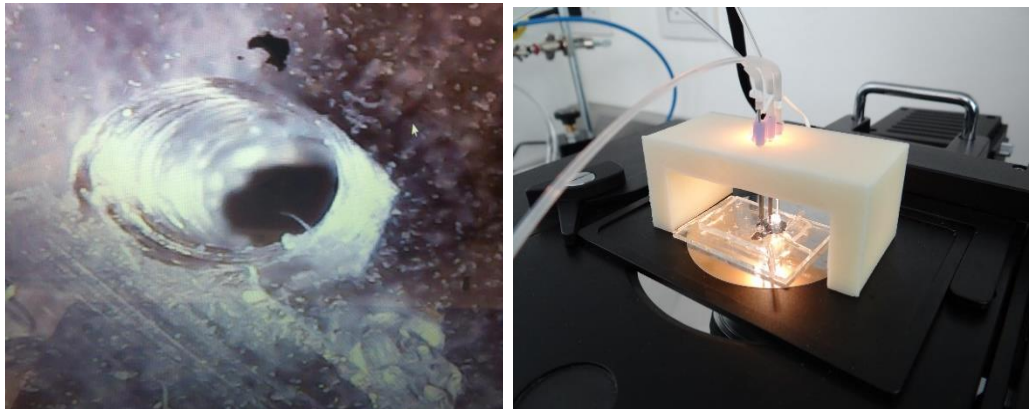


Figura 21.- Rampa de calentamiento y enfriamiento para unión de vidrio.

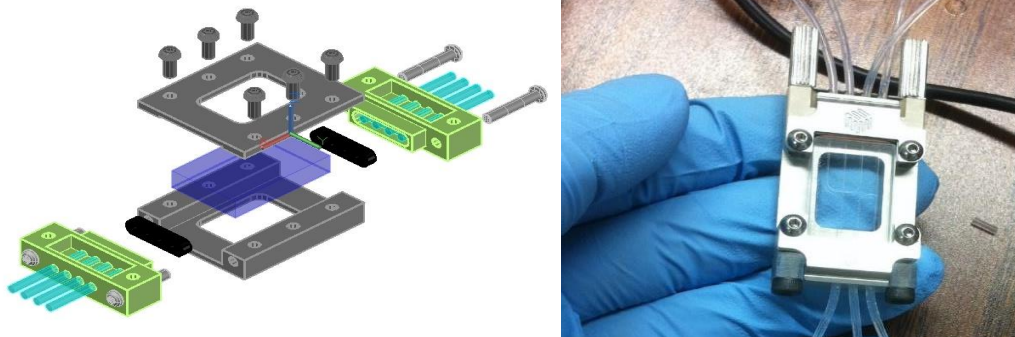
### 3.11.5 Conexión de chips microfluídicos

La conexión de los chips microfluídicos se realizó mediante inserción directa de las mangueras de PTFE en el chip microfluídico **Figura 22**. Se realizaron punciones directamente sobre los puertos del dispositivo mediante una aguja de jeringa que previamente se cortó y afiló para tal propósito. El diámetro de la aguja dependió de la manguera utilizada. También se crearon soportes mediante impresión 3D para reducir el movimiento lateral de las mangueras en el dispositivo.

En el caso de los chips de vidrio, se conectaron con conexiones más robustas creadas para tal propósito **Figura 23**. Las piezas se diseñaron mediante AutoCAD y se fabricaron con CNC en aluminio, acrílico y PTFE. Se emplearon tornillos de acero inoxidable en algunos casos.



*Figura 22.- Creación de puertos en chip de PDMS y conexión con mangueras de PTFE.*



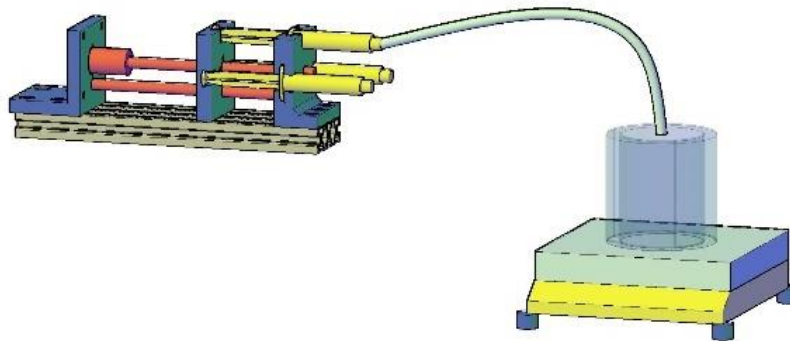
*Figura 23.- Conexión de chip de vidrio en plataforma de aluminio.*



### 3.12 Síntesis de Np's de QN en masa

Para la síntesis de nanopartículas de quitosán (QN) se siguió el procedimiento de gelación iónica previamente reportado por el grupo de Calvo y colaboradores [101-103] con algunas variaciones [45]. Se disolvió QN de bajo peso molecular al 1% en agua con ácido acético a pH 3, filtrado a través de filtro de 40  $\mu\text{m}$ . En otra solución se adicionó TPP al 0.5 % disuelto en agua desionizada y se agitó por 5 min. Esta solución de TPP se agregó al QN bajo régimen de goteo mediante bomba de infusión a 35 ml/h en una relación 1:5 v/v **Figura 24**.

La solución resultante se centrifugó a 5000 rpm por 1 h a  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se retiró el sobre nadante. Posteriormente el botón de muestra resultante se congeló a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 12h y se liofilizó por 24 h a una presión de  $-0.035\text{ mbar}$  a  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El procedimiento general se resume en la **Figura 25**. Estas partículas de QN se ocuparon para compararlas con las sintetizadas mediante microfluídica.



*Figura 24.- Síntesis tradicional mediante goteo y vaso de precipitado.*

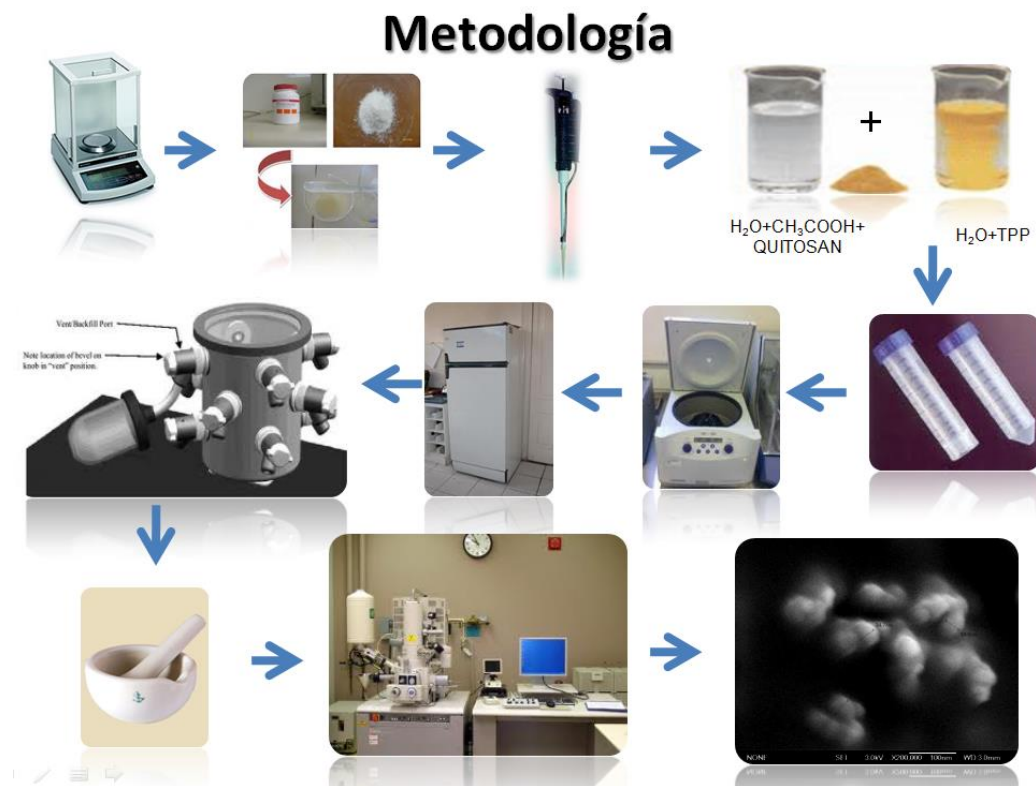
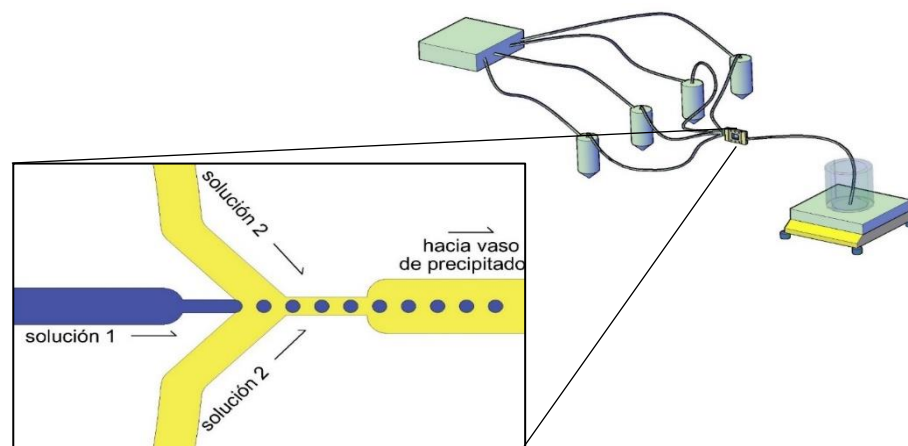


Figura 25.- Procedimiento gráfico de síntesis de NP's de QN.

### 3.13 Síntesis de Np's de QN mediante microfluídica

La preparación de las soluciones se realizó, de manera similar a como se realizó para la síntesis de NP's de QN en bulto. Se disolvió QN de bajo peso molecular a distintas concentraciones (0.5, 1 y 2 %) p/v, en agua desionizada (DI) a pH 3 con Ácido Acético y se filtró a través de filtro de 40  $\mu m$  (**solución 1**). Se preparó aceite mineral con Span 80 al 2% v/v y se agitó con vortex 5 min (**solución 2**). Se preparó TPP al 10 % en DI p/v y se agitó en vortex 5 min (**solución 3**).

De estas tres soluciones la **solución 2** es la fase acarreadora hidrofóbica, la **solución 1** es la fase dispersa hidrofílica y la **solución 3** es la solución entrecruzante receptora hidrofílica. Las soluciones 1 y 2 se colocaron en viales de 50 ml, presurizados en el sistema de inyección microfluídico MFCS-EX marca Fluigent. Se condujeron al chip microfluídico mediante mangueras de PTFE a distintas presiones, que permitieron la formación de gotas dentro de los canales microfluídicos del chip. La observación del rompimiento de la fase dispersa se observó mediante un microscopio óptico invertido Oxion marca Euromex. La configuración del montaje del experimento puede observarse en la **Figura 26**.



*Figura 26.- Formación de gotas de QN en chip microfluídico.*

El mecanismo de formación de NP's de QN por nucleación es el propuesto en la **Figura 27**. Después de la formación de gotas de QN en el chip **Figura 26**, las microgotas de QN son conducidas a través de una manguera en aceite como líquido acarreador (**Figura 26, solución 2**), posteriormente estas microgotas son colectadas en un vaso de precipitados con la **solución 3**, (**Figura 27, fase 2**) en agitación magnética suave. El aceite comienza a separarse de la microgota de QN haciendo la capa más delgada y permitiendo la migración del entrecruzante por diferencia de gradientes de concentración y difusión (**Figura 27, fase 3**), comenzando así la nucleación y formación de NP's de QN dentro de las microgotas (**Figura 27, fase 4**).

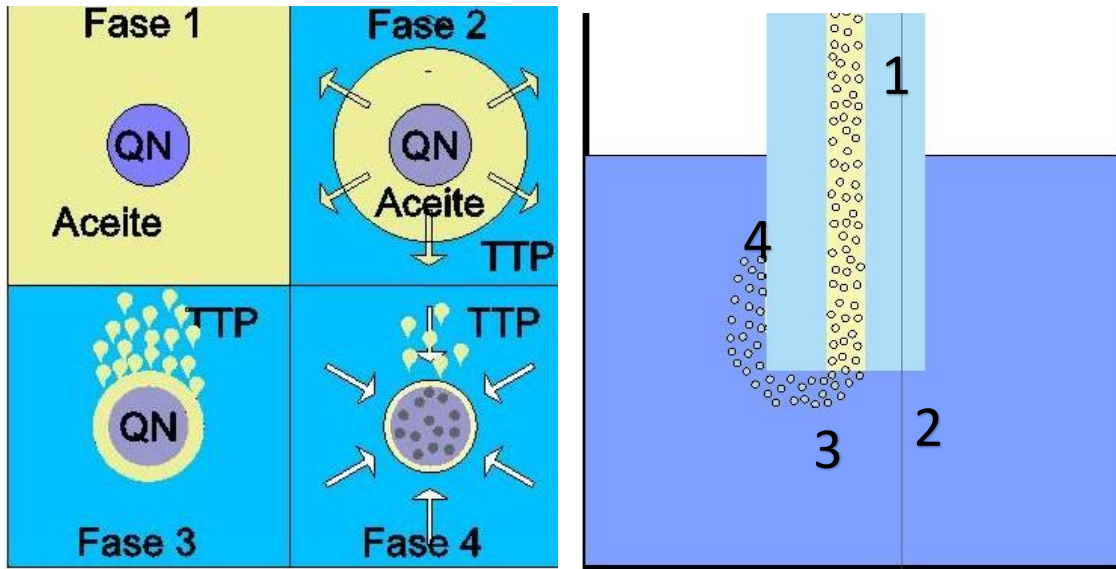


Figura 27.- Mecanismo de nucleación y formación de NP's de QN.

Las presiones que permitieron generar microgotas dentro de los canales se presentan en la **Tabla 13**.

Tabla 13.- Presiones a las que se logra formación de gotas de QN en aceite.

Solución 1 QN [mbar]	Solución 2 Aceite [mbar]	Solución 1 QN [mbar]	Solución 2 Aceite [mbar]
66.00	77.00	335.58	344.73
65.00	80.00	365.00	372.00
73.22	82.37	418.00	428.00
79.32	85.42	457.61	456.56
80.95	85.95	486.00	495.00
123.00	117.00	620.00	632.00
122.03	131.18	1,313.00	1,320.00
200.00	223.00	1,330.00	1,338.00
312.00	317.00	1,383.00	1,388.00

### 3.13.1 Encapsulado de proteína IgG

Para el encapsulado de proteína IgG, el montaje del experimento fue similar al mostrado en la **Figura 26** y **Figura 27**, con la diferencia de que se empleó un chip con 4 entradas. De las dos líneas centrales, una conducía QN y la otra proteína IgG disuelta a una concentración de 1 mg/ml **Figura 28**.

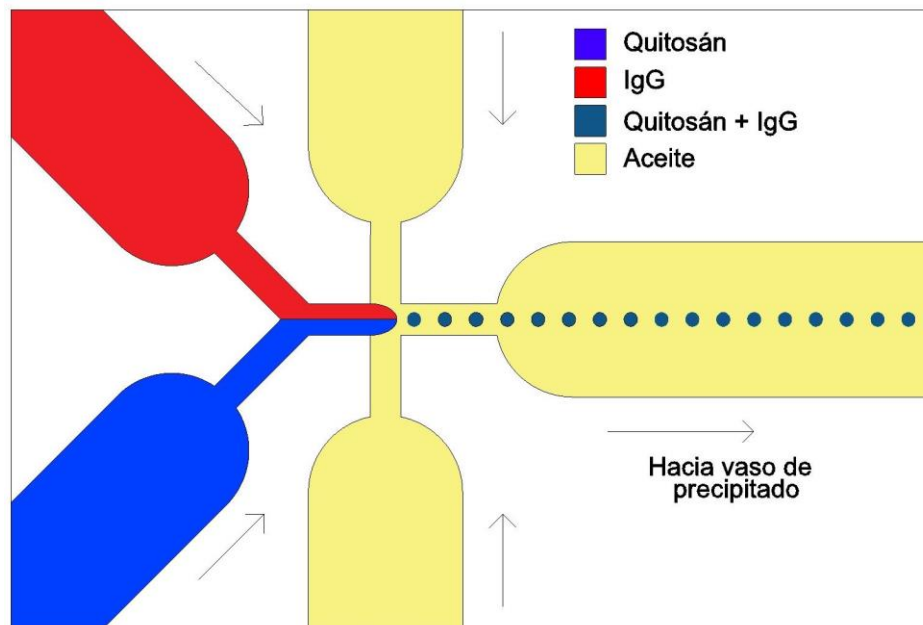


Figura 28.- Formación de microgotas de QN + IgG.

### 3.14 Técnicas de caracterización

Las técnicas de caracterización nos permiten corroborar la composición estructural y la morfología de las NP's. Para ello se realizaron pruebas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) y se analizaron las imágenes para determinar tamaños de partícula. En nuestro caso es de mayor interés la composición de las nanopartículas, por ello se realizaron caracterizaciones mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopías de fotoelectrones de rayos X (XPS) y Raman.

### 3.14.1 Preparación de muestras para análisis y caracterización

Para TEM, se empleó ácido fosfotungstico para teñir las muestras mientras que para los análisis composicionales se fabricaron pastillas con las muestras hechas a base de KBr. En el análisis XPS se colocaron las muestras directamente sobre un substrato de vidrio y se dejaron secar. Para mayores detalles consultar el Anexo.

### 3.15 Conclusiones del capítulo 3

En este capítulo se mostraron los aspectos experimentales que permitieron la fabricación del sistema de inyección. Se mostró el proceso general de simulación microfluídica. Para hacer la simulación computacional se realizó la caracterización de la viscosidad de los líquidos involucrados. También se mostraron los procedimientos necesarios para la fabricación de los moldes empleando diversos protocolos, técnicas y materiales. Se mostraron las técnicas de fabricación de los chips microfluídicos empleando distintos procedimientos y como se transfieren los patrones de los canales. Finalmente, se mostró el montaje experimental de síntesis de nanopartículas de QN y encapsulado de proteína IgG.

# 4

## Resultados y Discusión

En este capítulo se presentan los resultados y su análisis, tanto de la fabricación del sistema de inyección, la simulación, moldes y chips microfluídicos, así como la síntesis de las nanopartículas de quitosano empleando el dispositivo fabricado. Así mismo se presentan las caracterizaciones composicionales y estructurales de NP's de QN y QN/IgG mediante TEM, FTIR, Raman y XPS.

### 4.1 Fabricación de sistema de inyección

En la **Tabla 14** se muestra la escalabilidad que se logra en el sistema de inyección. Mediante la combinación de la discretización de los pasos del motor y el volumen de jeringa empleado, se observa que ésta inyección depende del volumen y el número de pasos por revolución, desde 235 a 51,200 pasos/cm.

También se diseñaron y crearon las piezas de soporte y conexión necesarias para la inyección de los chips microfluídicos con el sistema de inyección. Algunos detalles pueden apreciarse en la **Figura 30**. El diseño se realizó mediante AutoCAD y se fabricaron las piezas en aluminio y PMMA, empleando micro maquinado 3D. También se aprecian algunos de los pasos de diseño y de construcción de las piezas de conexión, así como del sistema de inyección microfluídico.

Tabla 14.- Rangos de inyección que se logran con el sistema microfluídico variando el diámetro de jeringa.

Pasos por cm	jeringa 10 $\mu\text{L}$	jeringa 0.3 ml	jeringa 0.5 ml	jeringa 1 ml	jeringa 5 ml	jeringa 10 ml	jeringa 20 ml	jeringa 25 ml	jeringa 60 ml
235	0.0306	1.135	1.532	2.688	16.472	25.532	43.769	54.711	131.285
470	0.0153	0.567	0.766	1.344	8.236	12.766	21.884	27.356	65.643
940	0.0077	0.284	0.383	0.672	4.118	6.383	10.942	13.678	32.821
1880	0.0038	0.142	0.191	0.336	2.059	3.191	5.471	6.839	16.411
3760	0.0019	0.071	0.096	0.168	1.030	1.596	2.736	3.419	8.205
51200	0.0001	0.005	0.007	0.012	0.076	0.117	0.201	0.251	0.603

Pasos por cm	$\mu\text{L} / \text{h}$	$\mu\text{L} / \text{h}$	$\mu\text{L} / \text{h}$	$\mu\text{L} / \text{h}$	$\mu\text{L} / \text{h}$	$\mu\text{L} / \text{h}$	$\mu\text{L} / \text{h}$	$\mu\text{L} / \text{h}$	$\mu\text{L} / \text{h}$
235	30.64	1,134.75	1,531.91	2,687	16,472	25,531	43,769	54,711	131,285
470	15.32	567.38	765.96	1,343	8,236	12,765	21,884	27,355	65,642
940	7.66	283.69	382.98	671	4,118	6,382	10,942	13,677	32,821
1880	3.83	141.84	191.49	335	2,059	3,191	5,471	6,838	16,410
3760	1.91	70.92	95.74	167.97	1,029	1,595	2,735	3,419	8,205
51200	0.14	5.21	7.03	12.34	75	117	200	251	602

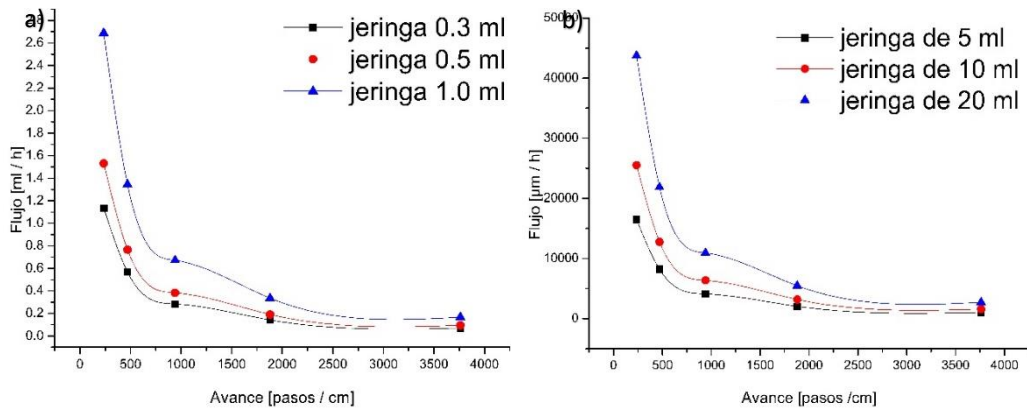


Figura 29.- Gráficas de flujo vs pasos de motor de sistema de inyección microfluídico dependiendo del tipo de jeringa empleada.



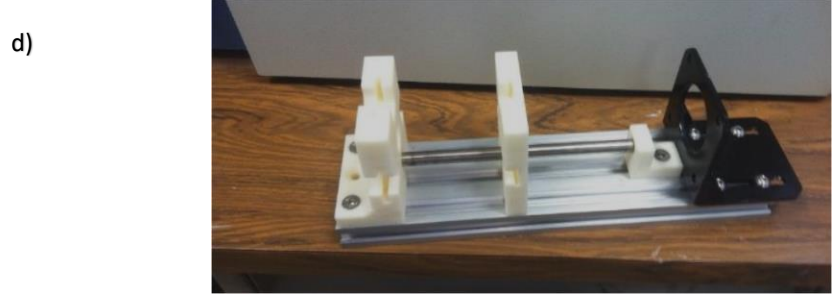
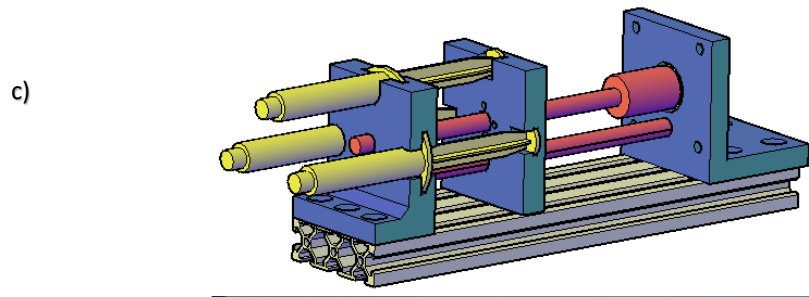
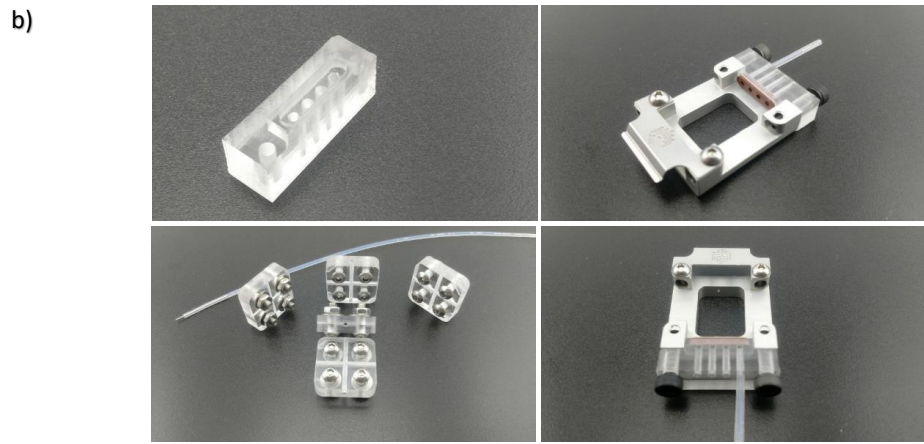
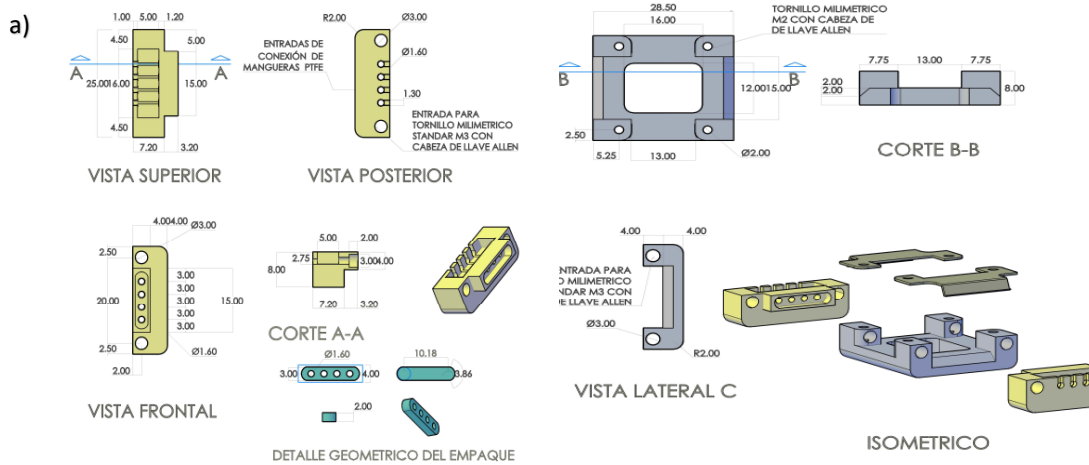


Figura 30.- Diseño y fabricación de piezas de soporte y conexión a) y b) sistema de inyección.

## 4.2 Caracterización de líquidos empleados en la simulación

Muestras de Qn de bajo peso molecular en concentraciones de 10 a 80 mg/ml fueron caracterizadas reológicamente en viscosidad. La **Tabla 15** presenta los resultados de revoluciones por minuto de 0.3 a 60.0.

Tabla 15.- Viscosidad [g/cm\*s] del QN a distintas concentraciones y velocidades de medición.

rpm \ mg/ml	0.3	0.6	1.5	3.0	6.0	12.0	30.0	60.0
10	0.0	0.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
20	0.0	50.0	60.0	70.0	70.0	75.0	77.0	79.0
40	399.9	599.9	659.9	699.9	704.8	709.8	714.0	-
60	5 799.0	5 849.0	5 399.0	5 399.0	-	-	-	-
80	49 889.0	-	-	-	-	-	-	-

Por su parte, la **Figura 31** grafica los resultados de la **Tabla 15**, encontrándose linealidad cuando la viscosidad se mide a 60 rpm

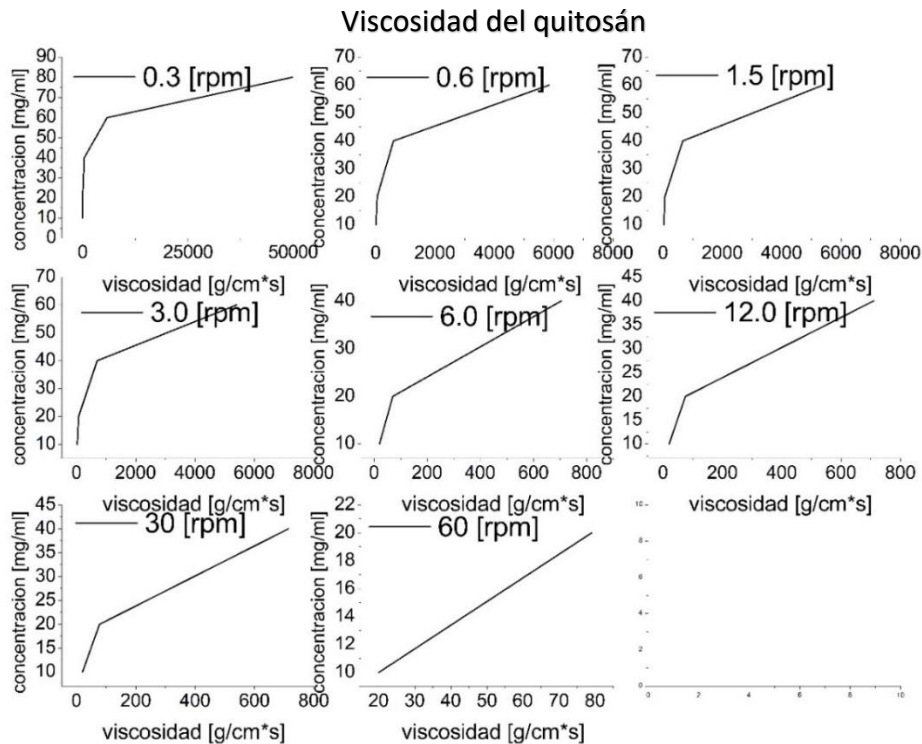


Figura 31.- Gráfica de concentración vs viscosidad de QN de bajo peso molecular.

Así mismo, la **Tabla 16** condensa los resultados de la viscosidad de concentraciones de PVP 40 KDa, de 10 a 1500 mg/ml para 0.3 a 60.0 rpm.

Tabla 16.- Viscosidad [g/cm\*s] del PVP a distintas concentraciones y velocidades de medición.

rpm \ mg/ml	0.3	0.6	1.5	3.0	6.0	12.0	30.0	60.0
10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5
20	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	1.0	1.0
40	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.5
60	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	3.0	3.0
80	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	4.0	4.0
100	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	5.0	4.0
125	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	7.5	7.0	6.0
500	100.0	100.0	120.0	90.0	95.0	102.5	105.0	105.5
1 000	899.0	899.9	889.0	919.0	929.0	939.8	943.9	-
1 500	3 099.0	3 799.0	4 199.0	4 259.0	4 449.0	-	-	-

La **Figura 32** muestra las gráficas respectivas de los datos de la **Tabla 16**

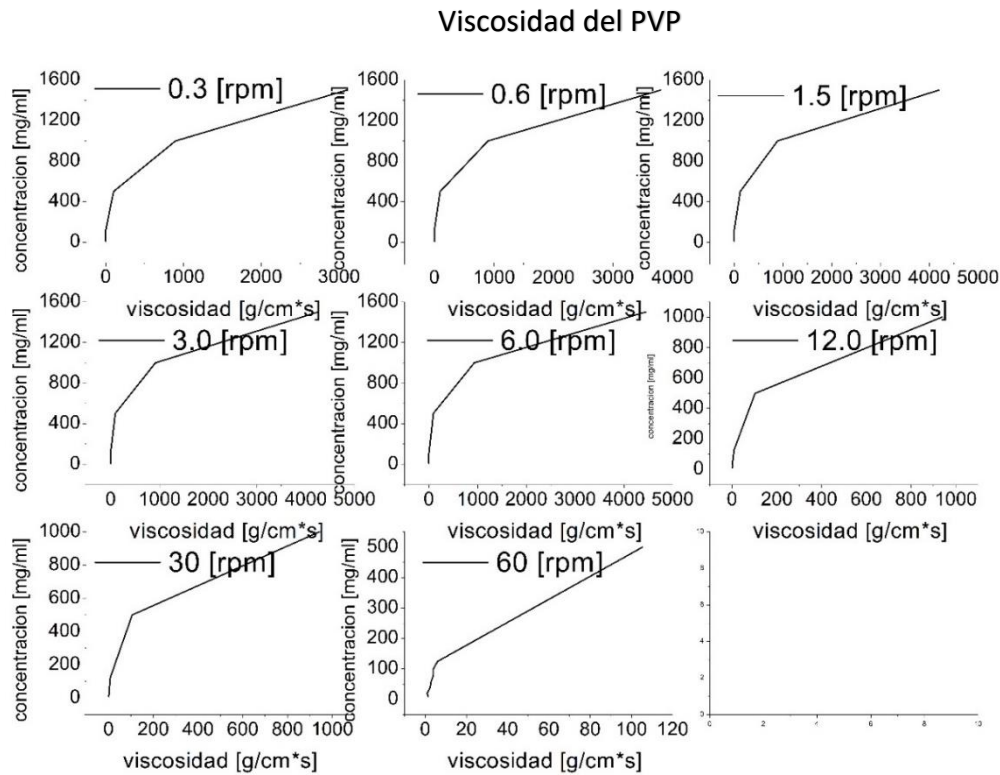
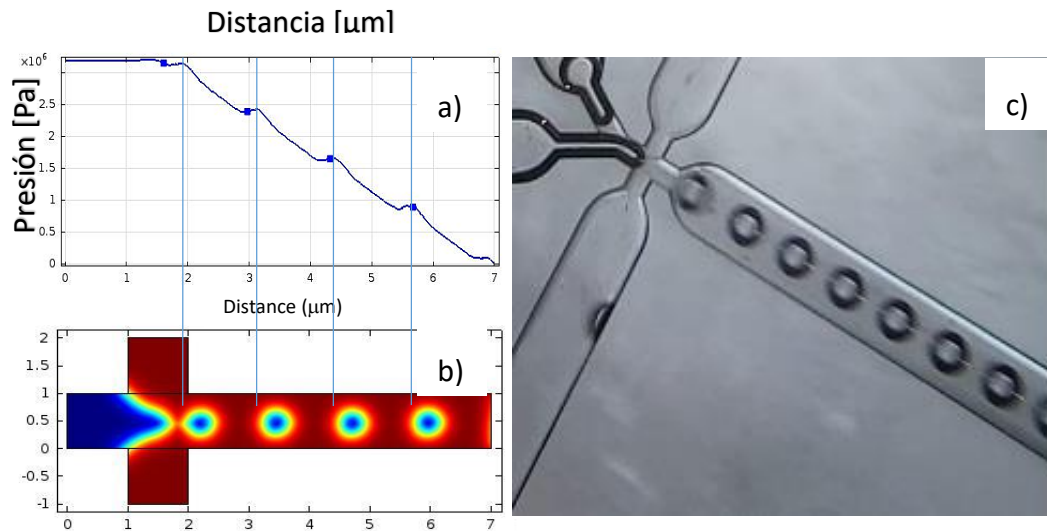


Figura 32.- Gráfica de concentración vs viscosidad de polivinilpirrolidona de 40 KDa.

### 4.3 Simulación

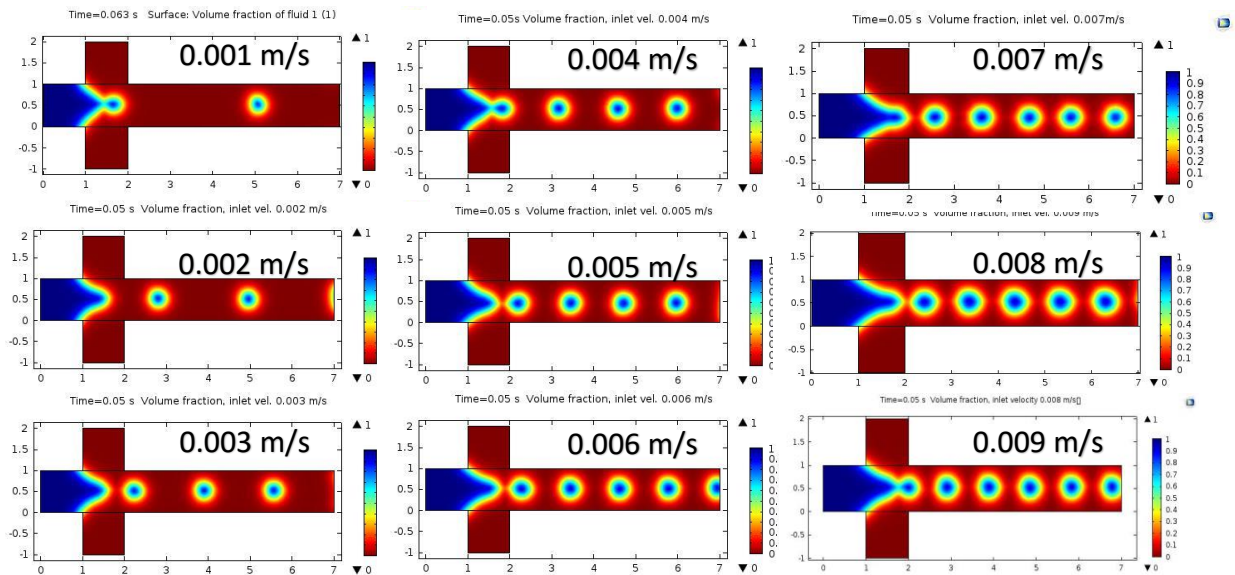
La **Figura 33**, corresponde a la simulación de la celda tipo T propuesta para QN a una velocidad de inyección de 0.005 m/s y  $t=0.05$  s. En la **Figura 33a** podemos observar los cambios de presión entre las fases hidrofílica e hidrofóbica, así como la deformación del dominio del QN dentro del dominio de la fase continua y su rompimiento en gotas. Se aprecia el cambio de presión justo donde empieza la interfaz de las gotas. Estos datos concuerdan y fueron empleados para llevar a cabo el experimento. Aunque las dimensiones no fueron las mismas, se conservó la relación de velocidades agua-aceite.



*Figura 33.- Resultado de la simulación, perfil de presiones y comparación con el experimento real.*

Los colores **Figura 33b** representan las fases de los fluidos. El azul es la fase hidrofílica QN y la fase roja es la hidrofóbica. Se aprecia la deformación de la fase hidrofílica y como entra a la región hidrofóbica hasta que las condiciones físicas de tensión superficial y presión logran el desprendimiento de una fracción del líquido y la formación de la gota. Esta forma es la geometría que minimiza la energía superficial entre las fases. La región amarilla es la interfaz entre las fases. En el perfil de presión **Figura 33 a**, se aprecia el salto donde cambian las interfases. La mayor presión se

presenta en el interior de la gota y ésta va disminuyendo conforme el líquido va saliendo de los canales y se iguala con la presión atmosférica, externa. En la **Figura 33c** se aprecia el montaje del diseño experimental con dos fases de agua-aceite dentro de un chip.



*Figura 34.- Resultados de simulación computacional variando la velocidad de inyección de QN. Todas las imágenes se obtuvieron en  $t=0.05$  s.*

Las imágenes de la **Figura 34** representan las velocidades desde 0.001 m/s hasta 0.009 m/s. Se observa en azul que, a velocidades bajas de inyección de la fase hidrofílica, de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo, comienza a darse el fenómeno de goteo dentro de los canales microfluídicos. Por su parte la velocidad de inyección del aceite (en rojo) se mantiene constante a 0.01 m/s. De esta manera conforme se incrementa la velocidad de inyección, la frecuencia del goteo también se incrementa.

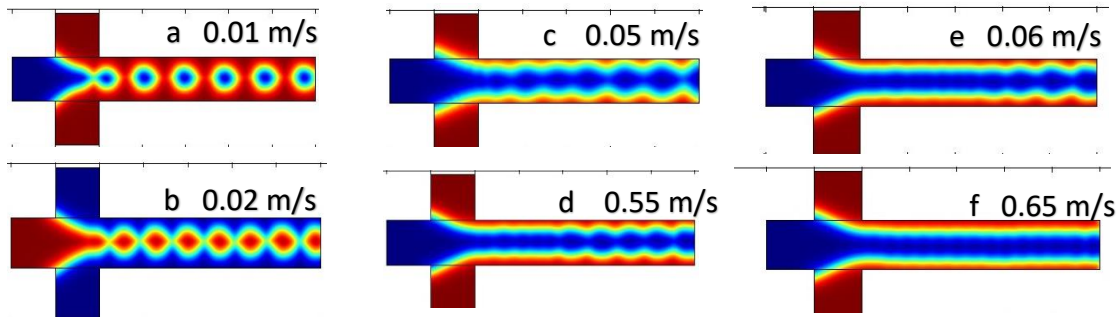


Figura 35.- Velocidades de inyección de fase hidrofílica iguales y superiores a la fase hidrofóbica.

En la **Figura 35a**, se observa que a velocidades iguales de la fase hidrofílica e hidrofóbica (0.01 m/s) se siguen formando gotas. A una velocidad de (0.02 m/s) **Figura 35b**, la suma de las velocidades del aceite comienza a igualar a la del QN y aparecen fluctuaciones en la fase dispersa (inestabilidad Raleigh-Plateau). A velocidades mayores para el QN 0.05 y 0.55 m/s, **Figura 35c** y **Figura 35d** respectivamente, comienzan a desaparecer las inestabilidades para formar un flujo laminar continuo. Esto puede apreciarse en las imágenes mostradas en la **Figura 35e** y **Figura 35f**, velocidades de 0.06 y 0.65 m/s, respectivamente cuando casi han desaparecido las inestabilidades. Así mismo, la simulación muestra que la frecuencia de formación y tamaño de las gotas de la fase hidrofílica dependen de la velocidad de inyección.

#### 4.4 Fabricación de la mascarilla

Mediante esta tecnología logramos reproducir los diseños con una exactitud de 90 %, con canales de 2, 3 y 5  $\mu\text{m}$  se generan motivos de 1.81, 2.7 y 4.7  $\mu\text{m}$ , respectivamente. La máxima resolución que proporciona el editor es de 1  $\mu\text{m}$ , ver **Figura 36**. Estos diseños permiten o impiden el paso de luz y sirven para transferir todos los patrones a una oblea de Si con resina de una sola vez.

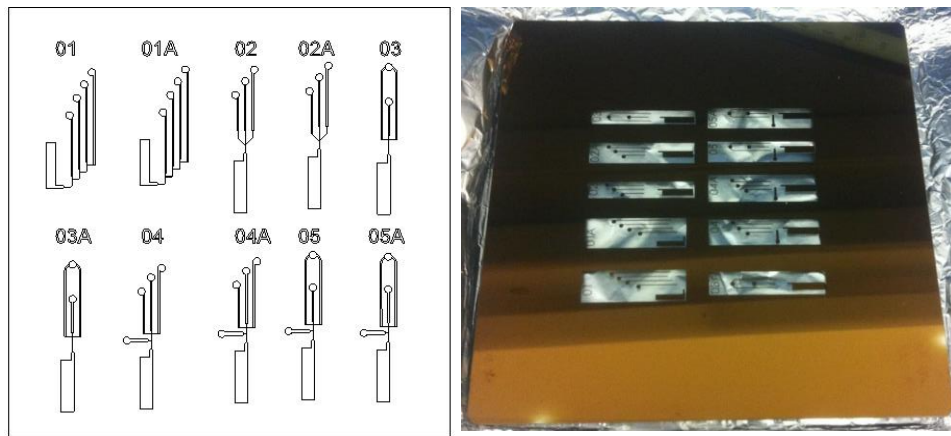


Figura 36.- Diseño CAD de la mascarilla (izquierda) y mascarilla fabricada (derecha).

## 4.5 Fabricación de moldes para crear chips microfluídicos

### 4.5.1 Perfilometría de canales creados sobre vidrio y Si

Con perfilometría sobre los canales fabricados se determinó la morfología y tamaño de los canales que servirán para su replicación con PDMS, estos canales quedan protuberantes sobre el silicio, para que impriman los canales sobre PDMS. En la **Figura 37** se aprecian las regiones donde se llevaron a cabo las mediciones mostradas en la **Figura 38**, sobre el molde para replicar el dispositivo microfluídico. Se asume que la geometría final del dispositivo en PDMS es igual a la medida del molde.



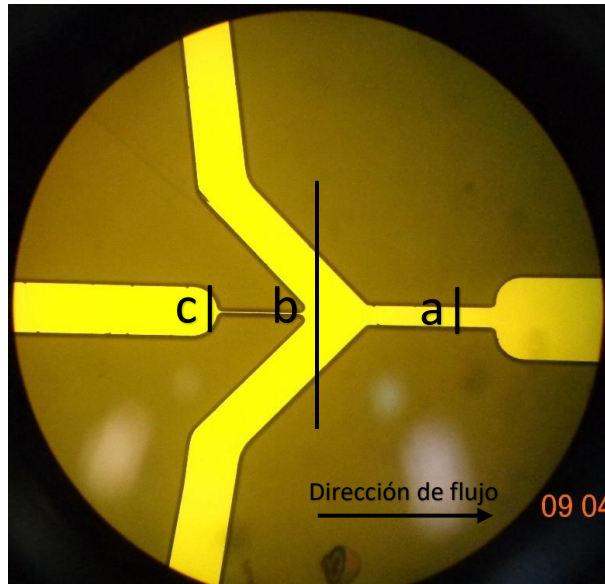


Figura 37.- Regiones de medición de canales con perfilómetro.

En la **Figura 38** se presentan los resultados de la perfilometría en: a) las dimensiones del canal de recolección 35  $\mu\text{m}$  de ancho y 5  $\mu\text{m}$  de altura , b) muestra la intersección “Y” del dispositivo, los canales laterales para inyección de aceite y el canal central para inyección de agua. En c) se aprecia un acercamiento del canal central donde se forman las microgotas. Para las mediciones se empleó un perfilómetro Dektak 150 (veeco).

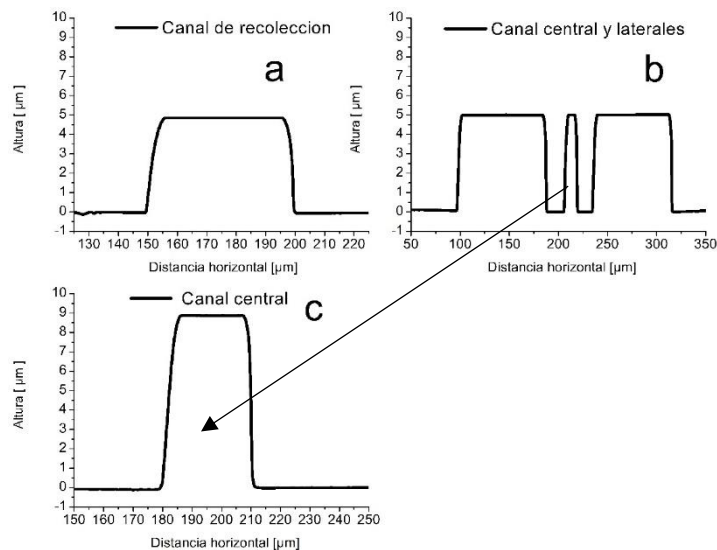


Figura 38.- Perfiles de canales en resina sobre sustrato de vidrio, los perfiles a), b) y c) corresponden con las zonas a), b) y c) de la Figura 37. El molde se empleó para replicar los canales. Escala en micras.



#### 4.5.2 Perfilometría chips de Si y vidrio mediante ataque químico y RIE

Mediante perfilometría corroboramos el aspecto geométrico y la rugosidad del ataque químico realizado sobre vidrio B270 y sobre Si, así como el ataque mediante RIE sobre Si. No fue factible el ataque mediante RIE sobre vidrio dada la potencia de 300 W necesaria. El ataque sobre vidrio con resina produce un sobre ataque en los bordes. Para evitar esto se colocó una capa protectora de Cr antes de la resina, con lo que se evita el sobre ataque en los bordes. En las **Figuras 39 a 43** se presentan los perfiles: ataque químico de vidrio B270 con resina, ataque químico de vidrio con Cr y resina, ataque químico de Si poroso con resina y ataque físico químico de Si con RIE.

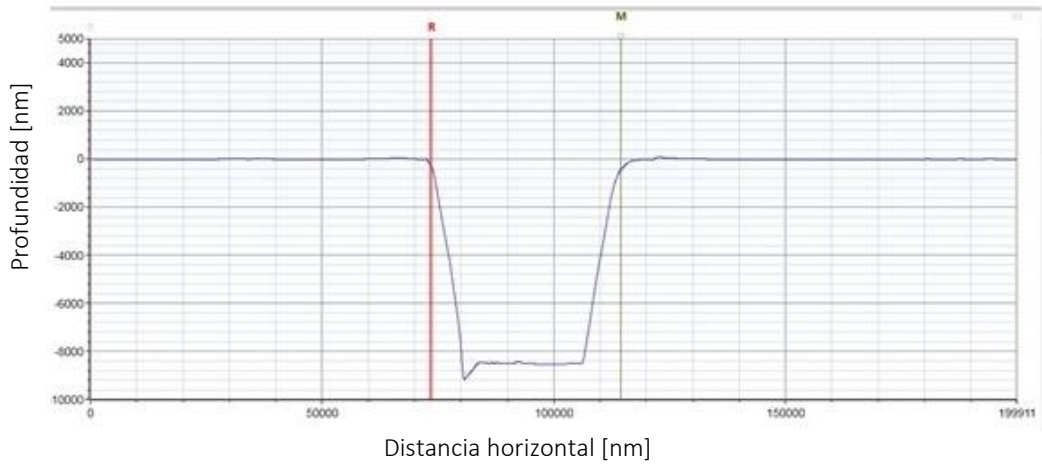


Figura 39.- Perfil de canal. Ataque químico de vidrio B270 con Cr y resina.

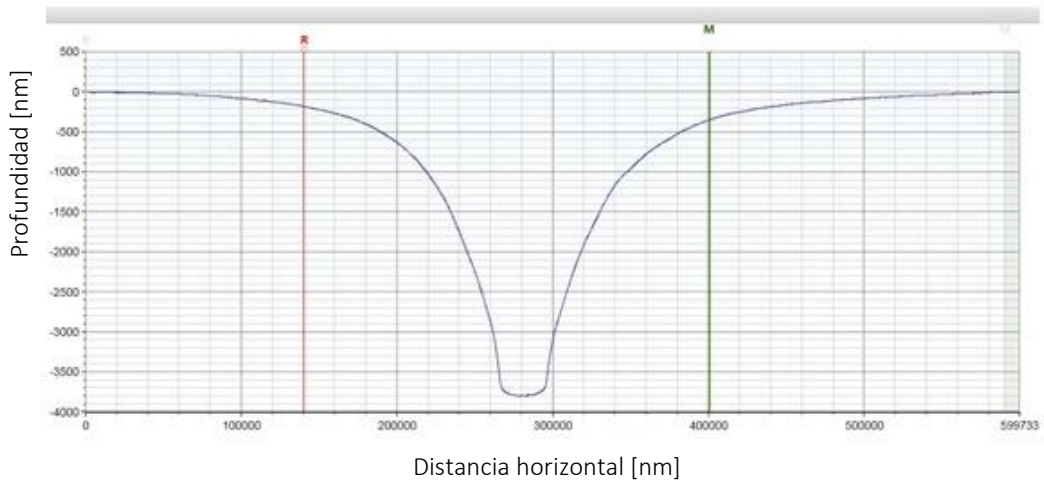


Figura 40.- Perfil de canal. Ataque químico de vidrio B270, solo con resina.

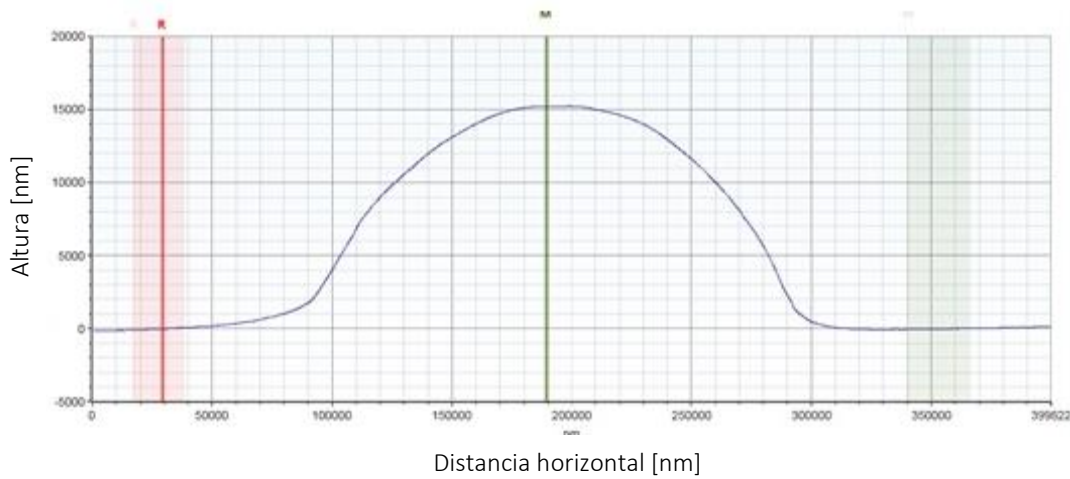


Figura 41.- Perfil de canal. Ataque químico de vidrio B270 con resina.

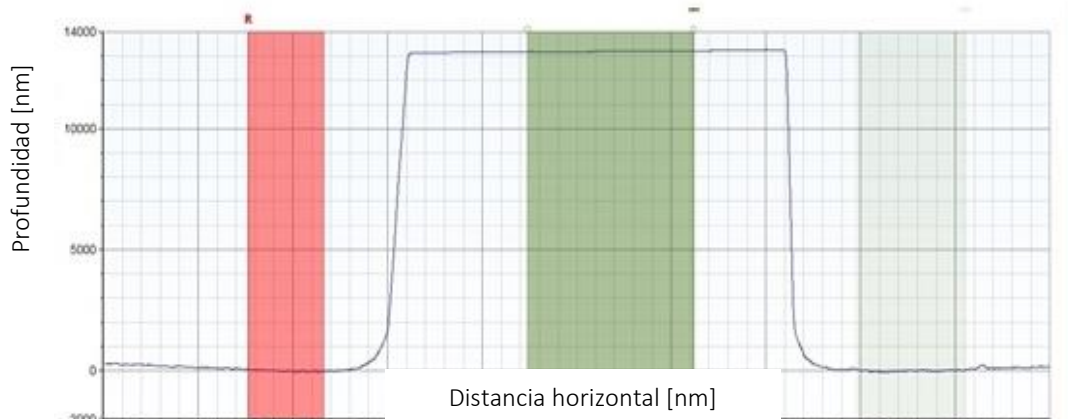


Figura 42.- Perfil canal. Ataque de Si mediante RIE.

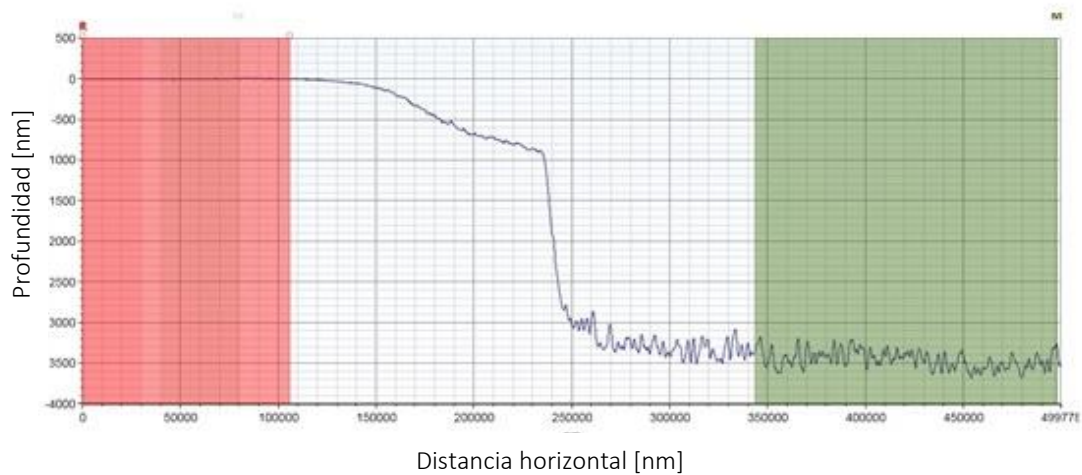


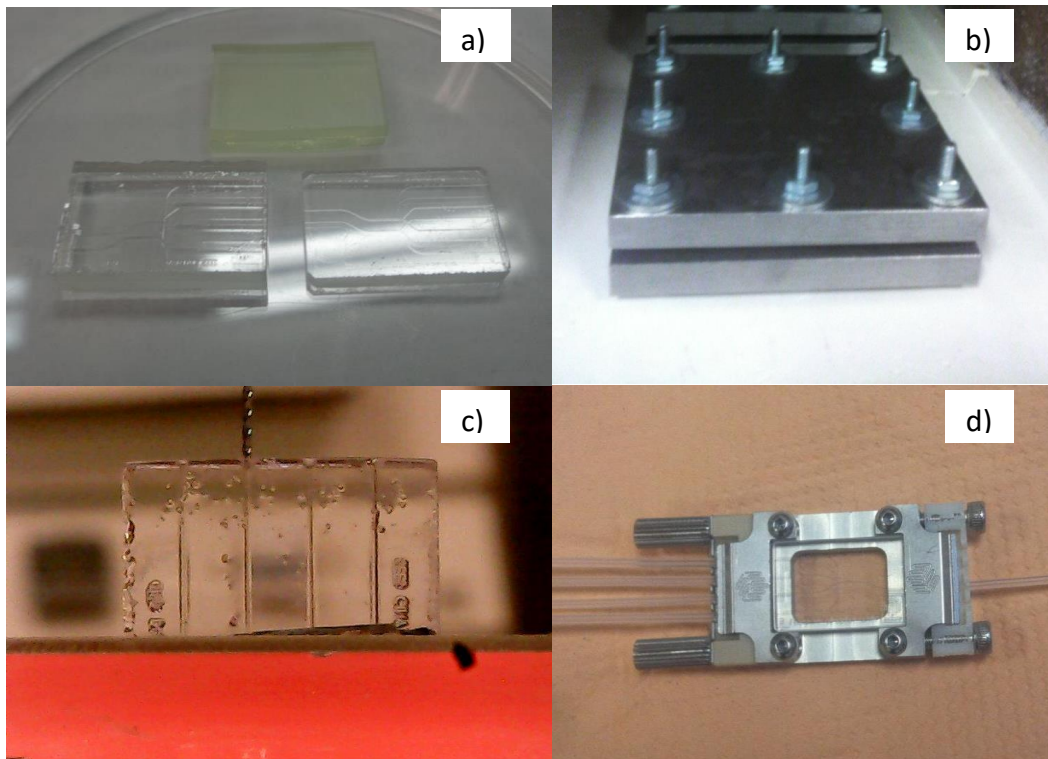
Figura 43.- Perfil canal. Ataque químico sobre silicio poroso.

#### 4.6 Fabricación de chips de PDMS-vidrio y vidrio-vidrio

El sellado de los chips de PDSM-vidrio se realizó mediante plasma de  $O_2$  de acuerdo a reportes previos [82, 87]. El tiempo para el sellado entre las superficies debe ser cercano a 30 s, para evitar que se pierda funcionalización en tiempos iguales o superiores a 60 s.

La **Figura 44** muestra los chips de vidrio grabados en Figura 44a, la compresión empleada para fusionar los dos vidrios Figura 44b, la apertura de canales Figura 44c y el chip montado sobre el soporte “H” Figura 44d.

Se empleó una rampa de calentamiento de 50° C con periodos de estabilización de 10 min, para el sellado de los chips. El empleo de peso ayudó a la fusión sin deformar el chip ver (protocolo de unión térmica en el Anexo). Otras estrategias como el empleo de una capa de Cr ayudan también a la adherencia de los vidrios.

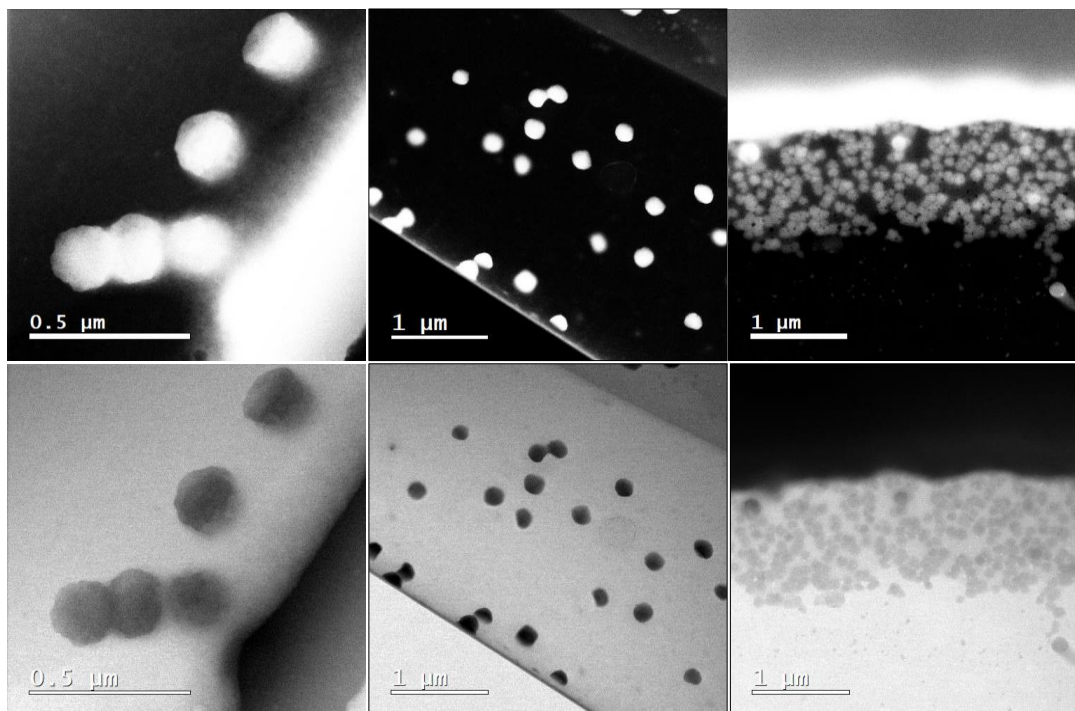


*Figura 44.- a) Chips grabados con HF, b) unión térmica de chips de vidrio con peso, c) apertura de canales y d) conexión de chip en plataforma de aluminio y conectores.*

## 4.7 Síntesis de NP's de QN y NP's de QN + IgG

### 4.7.1 Caracterización con microscopio electrónico de transmisión TEM

El propósito principal de la utilización de la caracterización mediante TEM, es la observación de la morfología de los materiales. Regularmente las técnicas de TEM no emplean métodos especiales de preparación de la muestra, ya que emplean el contraste generado por la masa o espesor del material observado. Sin embargo, en la observación de materiales biopoliméricos o biológicos es necesaria la preparación o tinción de algunos de los materiales observados, ya sea para que estos no se degraden con la energía del haz incidente. En algunos casos se usó tinción para generar contraste, debido a la baja densidad que pueden presentar los materiales biológicos. Generalmente las partículas más densas o sólidas presentan un color más oscuro, mientras que las menos densas presentan un color más claro o transparente [104]. La **Figura 45** muestra el resultado de la síntesis de NP's de QN mediante microfluídica, empleando TPP como Entrecruzante (ver Anexo).

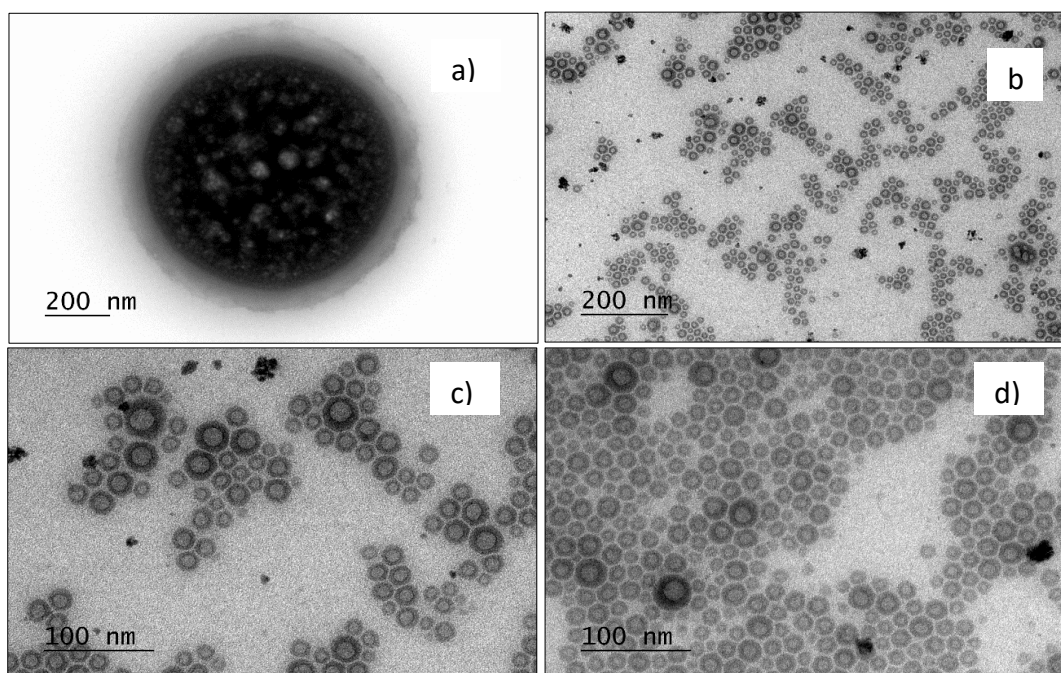


*Figura 45.- Micrografías electrónicas de transmisión de nanopartículas de QN sintetizadas mediante microfluídica. Imágenes superiores en negativo.*



Las nanopartículas de la **Figura 46** corresponden a NP's de QN por microfluídica con TPP c/s IgG y azul alamar. El azul alamar es un marcador fluorescente que permite rastrear las NP's o proteínas. La **Figura 46a** corresponde a una sola nanopartícula que contiene proteína IgG humana. Esto demuestra la capacidad de encapsulamiento uniforme mediante la técnica. Se observa una estructura bien definida, con un núcleo y una corona o cápside. La región interior más oscura sugiere una mayor densidad. Se presume que las regiones claras al interior es proteína IgG pero se requieren más estudios para confirmarlo.

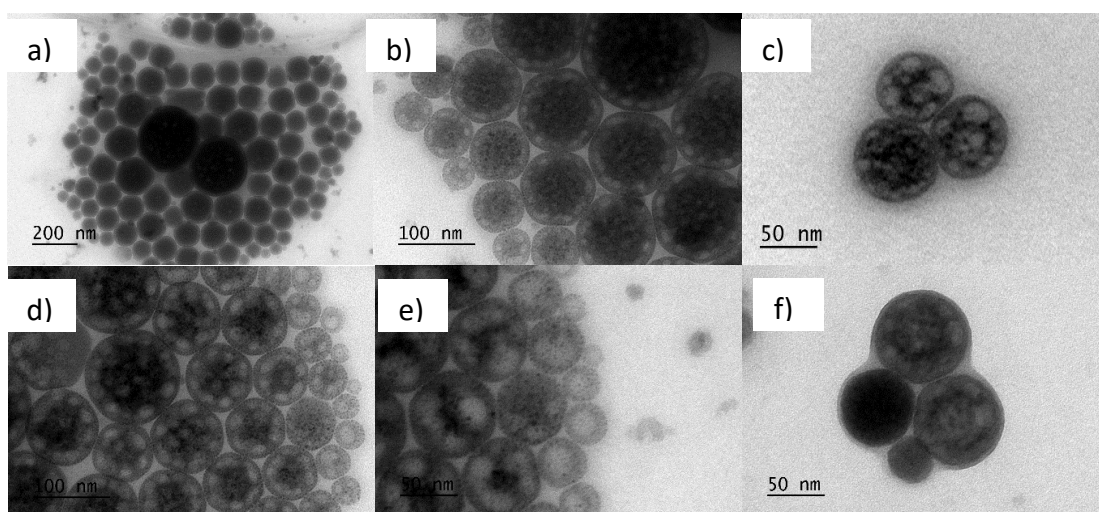
Por su parte, las imágenes de la **Figura 46 b-d**, que corresponden a NP's de QN teñidas con azul alamar, presentaron una estructura tipo micelar.



*Figura 46.- Nanopartículas de QN por microfluídica. a) Nanopartícula con proteína IgG encapsulada, b-d) nanopartículas de QN con tinción de azul alamar. Se aprecia una estructura tipo micelar, con cápside y sin contenido, morfología esférica y distribución poco variable.*

Pareciera que el empleo azul alamar como elemento de tinción durante el proceso de síntesis, también estabiliza la formación de las nanopartículas, evitando que coalezcan. El mecanismo aún se desconoce por lo que será necesario un estudio más extenso para corroborarlo. **Figura 46b-d** nanopartículas de QN sintetizadas por microfluídica, pero sin azul alamar como método de tinción, pueden observarse en las imágenes de la **Figura 47**, las cuales corresponden a tiempos 5, 10, 15 minutos después de la observación inicial.

La **Figura 47a** presenta en su centro, un aglomerado de partículas de mayor tamaño, las cuales se incrementan con el tiempo de observación **Figura 47b y d**. Las partículas más externas son más pequeñas, las cuales no se han fusionado para formar las más internas, se observa una especie de núcleo en las partículas perimetrales (más claro), **Figura 47 e**, que conforme va pasando el tiempo coalescen hasta formar partículas de mayor tamaño. Adicionalmente presentan más núcleos. Esto sugiere que la incorporación del azul alamar estabiliza las nanopartículas superficialmente y evita la coalescencia de estas.



*Figura 47.- Imágenes de nanopartículas de QN sintetizadas mediante microfluídica.*

#### 4.7.2 Medición de tamaño de partícula y distribución estándar

Para medir el tamaño de partícula, tomamos las imágenes más representativas de las nanopartículas de QN teñido con azul alamar. Se procedió a importar las imágenes y a escalarlas en AutoCAD con ayuda de la barra presente en cada imagen, una vez escalada la imagen se dibujaron círculos de diámetro igual a cada partícula. La media aritmética, desviación estándar y distribución normal de las partículas fueron determinadas. Los resultados se presentan en las **Figuras 48 a 51**, para un  $R^2$  entre 0.92 y 0.95.

Los valores de tamaño de partícula y su error se resumen en la **Tabla 17**.

*Tabla 17.- Distribución estándar y tamaño de partícula.*

Figura	Media aritmética del diámetro [nm]	Desviación estándar [nm]
48	17.15	4.97
49	16.31	3.57
50	13.75	3.73
51	14.42	4.02



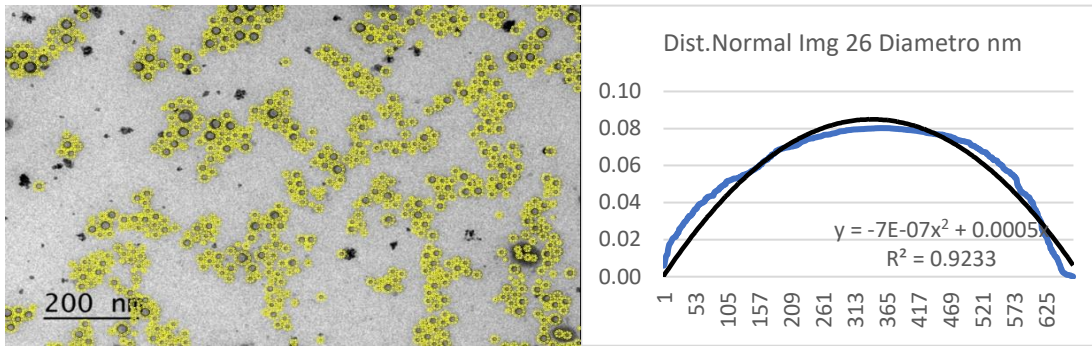


Figura 48.- b) Distribución normal del diámetro de la partícula de la imagen a).

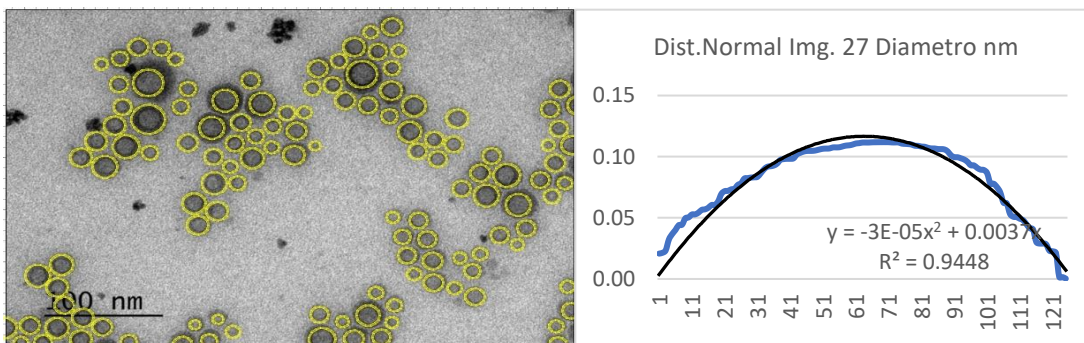


Figura 49.- b) Distribución normal del diámetro de la partícula de la imagen a).

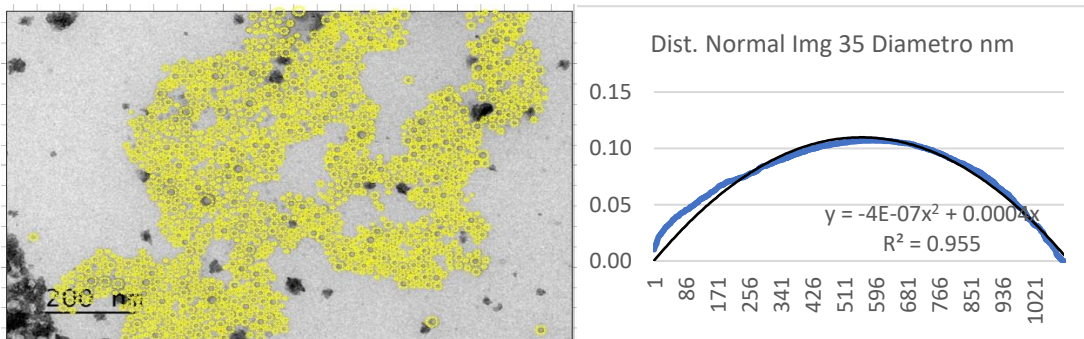


Figura 50.- b) Distribución normal del diámetro de la partícula de la imagen a).

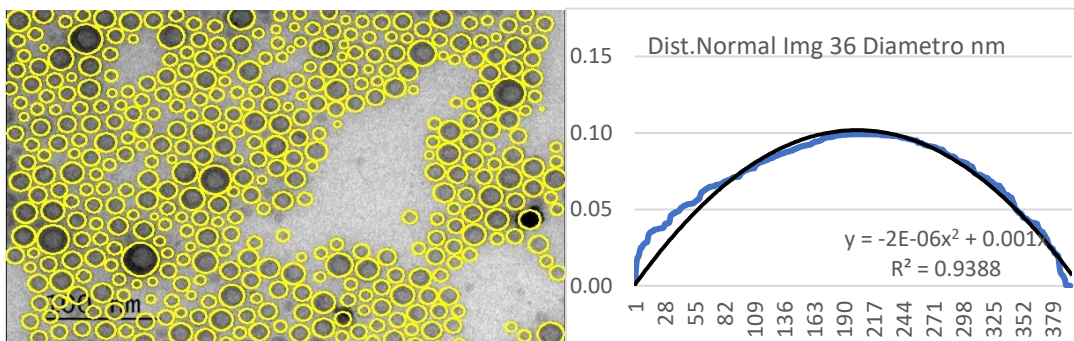
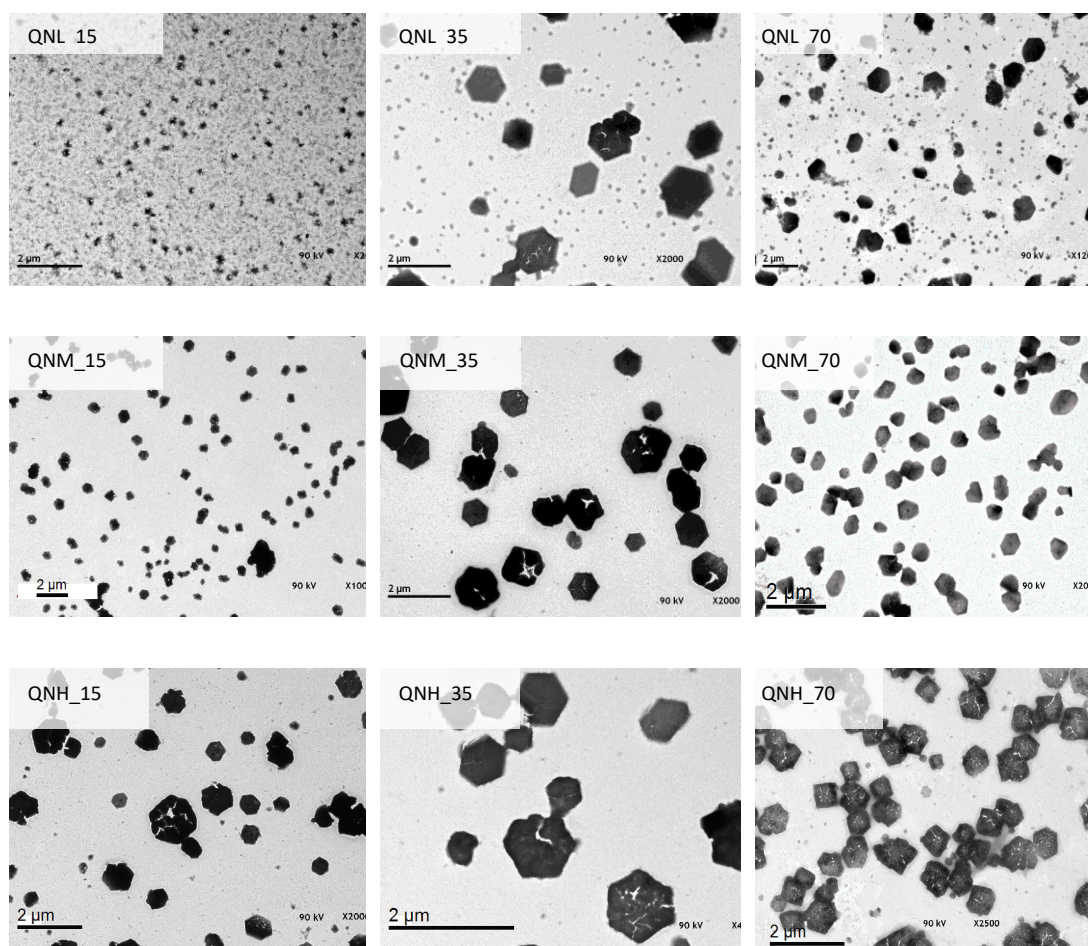


Figura 51.- Distribución normal del diámetro de la partícula de la imagen a).

El tamaño de partícula osciló entre  $13.75 \pm 3.73$  y  $17.15 \pm 4.97$ , esto es una mejora substancial en la morfología y la desviación estándar se reduce considerablemente con respecto a la síntesis en masa. La **Figura 46** muestra síntesis de NP's de QN por microfluídica mientras que la **Figura 52**, presenta los resultados obtenidos previamente mediante síntesis en masa [45].



*Figura 52.- Nanopartículas de QN de distintos pesos moleculares sintetizadas mediante método tradicional en masa [45].*

## 4.8 Caracterización composicional de NP's de QN

### 4.8.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, FTIR

La caracterización mediante FTIR ha demostrado ser una técnica analítica sensible y altamente reproducible desde el punto de vista físico-químico. Mediante la técnica podemos caracterizar biomoléculas, especies moleculares o grupos funcionales gracias a su absorción en el infrarrojo. Dado que una biomolécula o grupo funcional exhibe siempre la misma estructura, es de suponerse que también su espectro IR es único. Esto representa su huella digital debido a que la técnica es sumamente sensible. Pequeñas variaciones en el ambiente pueden afectar la medición de la muestra, como humedad ambiental, temperatura, contaminación de la muestra, etc.

Para hacer las caracterizaciones se emplearon pastillas de KBr para embeber las muestras secas de interés, nanopartículas de QN, proteína IgG y el conjugado QN + IgG.

La **Figura 53** presenta el espectro IR de la proteína IgG obtenido, donde se incluyen los terminales reactivos de la huella digital **Figura 54**. La proteína IgG presenta sus bandas vibracionales características en los rangos mostrados en la **Tabla 18** y que corresponden a las mediciones obtenidas mediante FTIR [105, 106].

*Tabla 18.- Análisis de espectro FTIR, bandas vibracionales características de la proteína IgG humana. Adaptado de [73, 74].*

Número de onda [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Correspondencia con grupos funcionales presentes
1720-1600	$\nu(\text{C=O})$ : (amida I) hoja $\beta$ , proteínas, barriles, hélices
1630-1560	$\delta(\text{NH}_2)$ : aminoácidos
1600-1480	$\delta(\text{N-H})$ : (amida II) $\alpha$ -hélice: proteínas
1430-1360	$\nu(\text{COO}^-)$ : aminoácidos
1300-900	$\nu(\text{C-O})$ : sacáridos, glucosa, lactato, glicerol

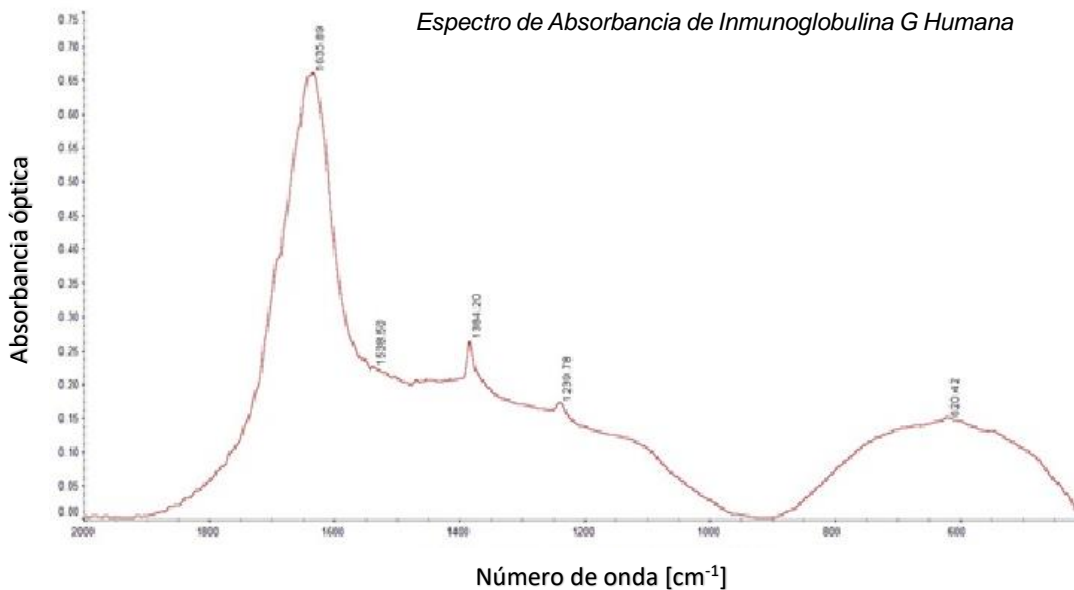
*v: stretching,  $\delta$ : vending (scissoring), s: symmetric stretching, as: asymmetric stretching.*

*Espectro de Absorbancia de Inmunoglobulina G Humana*



*Figura 53.- Espectro FTIR de proteína IgG humana, con los picos característicos de las bandas vibracionales.*

*Espectro de Absorbancia de Inmunoglobulina G Humana*



*Figura 54.- Espectro FTIR de proteína IgG humana, acercamiento a la zona de interés de 350 a 2000 nm.*



En la **Figura 55** puede observarse, el correspondiente espectro de NP's de QN [107, 108]. La amplia banda vibracional corresponde a los hidroxilos, se muestra alrededor de  $3500\text{ cm}^{-1}$ . En  $1645$  y  $1584\text{ cm}^{-1}$ , los grupos correspondientes a amida se presentan mientras que las aminas producen vibraciones en las bandas de  $1638$ - $1557\text{ cm}^{-1}$ .

*Tabla 19.- Bandas vibracionales características del espectro del QN, TPP y NP's de QN. Adaptado de [109].*

<i>Material</i>	<i>Bandas [<math>\text{cm}^{-1}</math>]</i>	<i>Correspondencia con grupos funcionales presentes y modo de vibración</i>
<i>QN</i>	<i>3360</i>	<i><math>\nu(\text{N-H})</math>: se encima con la vibración OH</i>
	<i>2870</i>	<i><math>\nu(\text{C-H})</math>:</i>
	<i>1650</i>	<i><math>(\text{C=O})</math>: (amida)-CONH no hay casi, por el alto grado de desacetilación.</i>
	<i>1580</i>	<i><math>\delta(\text{N-H})</math></i>
	<i>1430</i>	<i><math>\delta(\text{O-H})</math> deformación</i>
	<i>1370</i>	<i><math>\delta(\text{C-H})</math></i>
	<i>1080 y 1030</i>	<i><math>\nu(\text{C-O})</math></i>
<i>TPP</i>	<i>1210</i>	<i><math>\nu(\text{P=O})</math></i>
	<i>1130</i>	<i>s &amp; as (<math>\text{O-P=O}</math>)</i>
	<i>1090</i>	<i>s &amp; as <math>\text{PO}_3</math></i>
	<i>888</i>	<i><math>\nu</math> de puente P-O-P</i>
<i>QN+TPP NPs</i>	<i>3360</i>	<i><math>\nu(\text{N-H})</math> superpuesto con el <math>\nu(-\text{OH})</math></i>
	<i>1530</i>	<i><math>\nu(\text{N-O-P})</math> lo oculta un poco el enlace N-H en 1580</i>
	<i>1630</i>	<i><math>\delta(\text{N-H})</math></i>

*$\nu$ : stretching,  $\delta$ : bending (scissoring), s: symmetric stretching, as: asymmetric stretching.*

*Espectro de Transmitancia de Nanopartículas de QN*

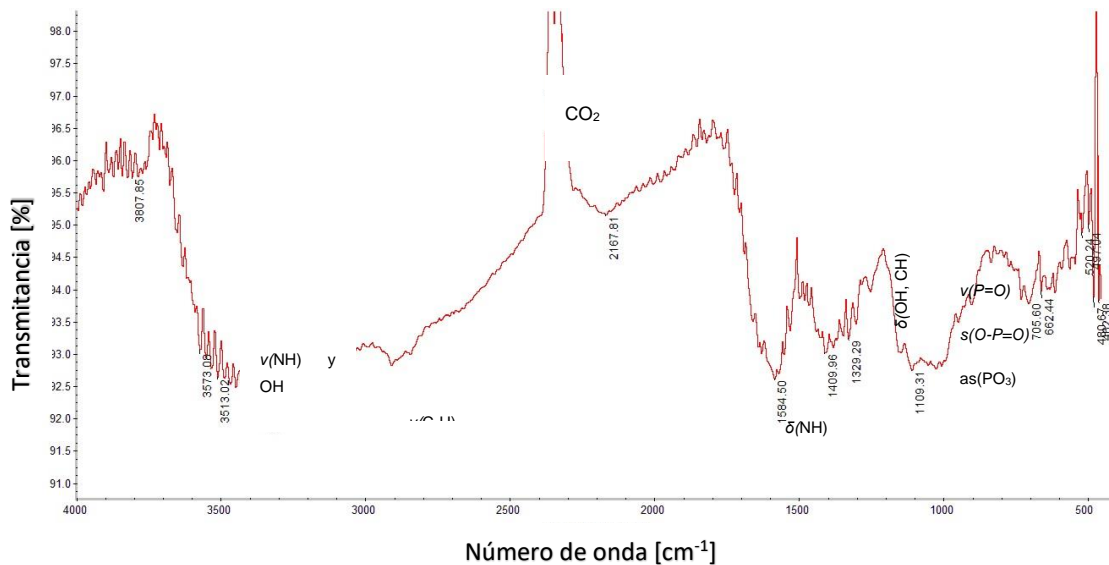


Figura 55.- Espectro FTIR de nanopartículas de QN, con las bandas características de los grupos funcionales del biopolímero.

El QN es un polisacárido que se obtiene de la desacetilación de la quitina. Ésta proviene del caparazón de crustáceos y es el biopolímero más abundante después de la celulosa. La desacetilación se realiza con HCl y NaOH a 110 °C, para eliminar hasta un 85 % los grupos cetónico. El mecanismo de gelación iónica con TPP se ilustra en la **Figura 56**. La **Tabla 19** corresponde a las bandas vibracionales del QN, TPP y NP's de QN+TPP [109]. Debido a que las bandas características de QN e IgG **Tabla 18** aparecen en la misma zona, con FTIR no se logra distinguir la presencia de IgG en las NP's.

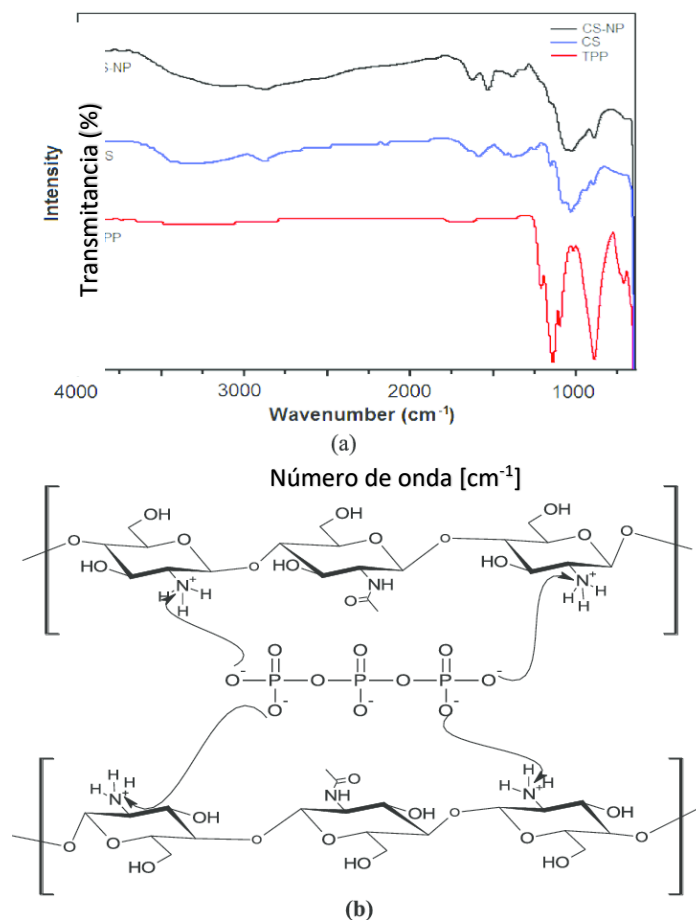


Figura 56.- a) Espectro FTIR de nanopartículas de QN, polímero QN y TPP, con las bandas características del biopolímero y entrecruzante; b) proceso de gelificación iónica en solución ácida [77].

El análisis del espectro de las nanopartículas de QN y la proteína IgG se presenta en la **Figura 57**. Se incluyen los espectros de QN e IgG por comparación

El conjugado QN+IgG, debido a que ha pasado por el proceso de gelación iónica, presenta entrecruzamiento de los terminales reactivos de QN con los correspondientes de TPP **Figura 56b**, por lo que aparecen los picos característicos de esta molécula en las bandas vibracionales 1210, 1130, 1090 y 888, ver **Tabla 19**. Algunos de los grupos NH de la proteína se traslapan con los del QN, al igual que los grupos OH.

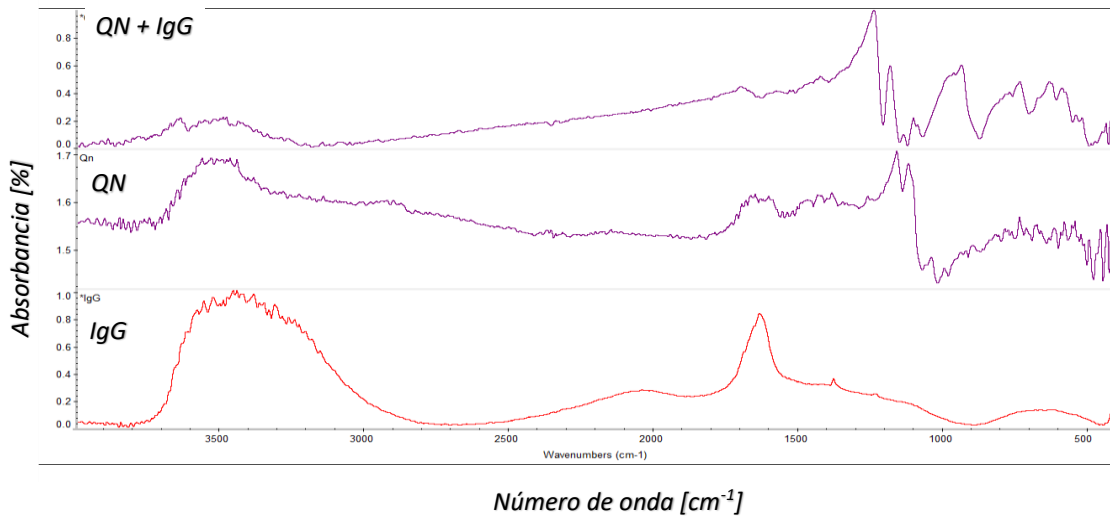


Figura 57.- Espectro FTIR de nanopartículas de QN, proteína IgG y el conjugado NP's de Qn+IgG.

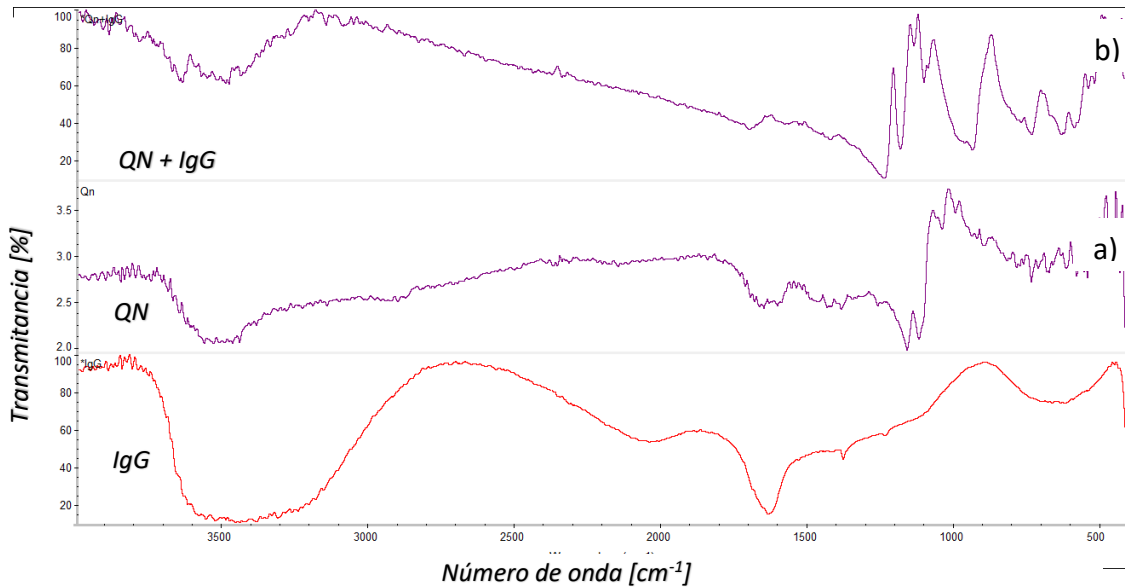


Figura 58.- a) FTIR de nanopartículas de QN, proteína IgG y, b) el conjugado NP's de QN+IgG.

#### 4.8.2 Espectroscopía Raman

La técnica de Espectroscopía Raman es una técnica complementaria al FTIR, la base teórica del comportamiento y análisis es muy similar, la ventaja de la técnica Raman es que es más sensible y emplea varias fuentes para distintos rangos de longitud de onda.



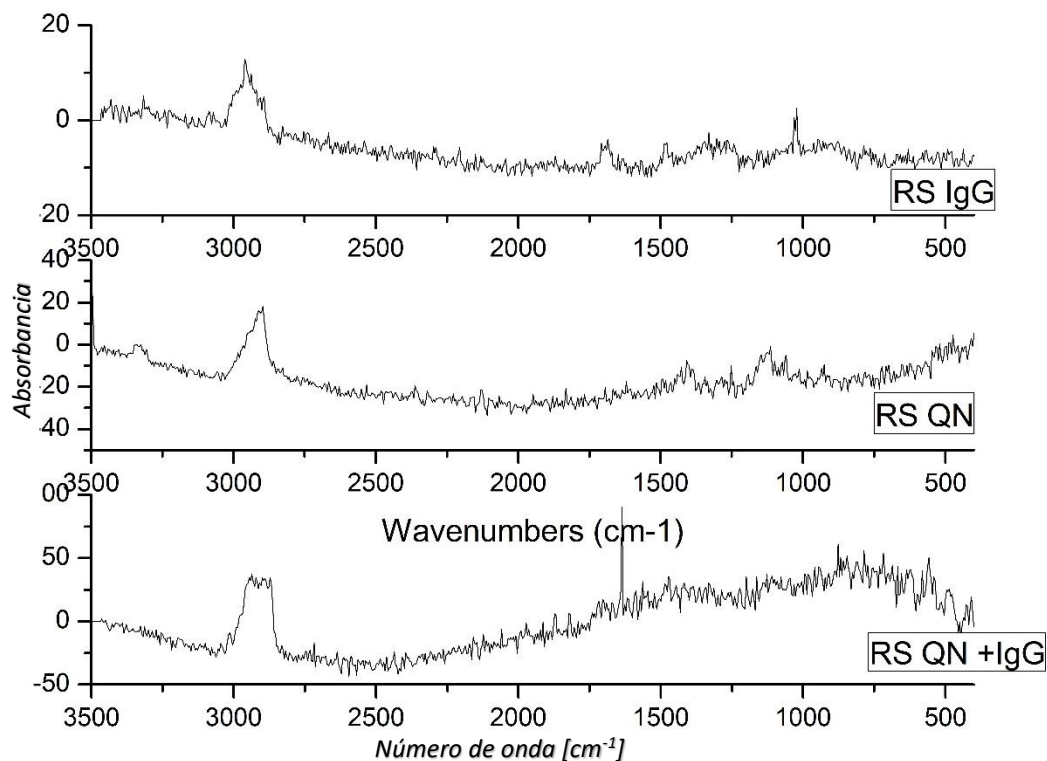


Figura 59.- Espectro Raman de nanopartículas de QN, proteína IgG y el conjugado NP's de QN+IgG.

Las bandas características de la proteína IgG en su forma liofilizada aparecen en los números de onda 621, 643, 759, 830, 856, 878, 934, 957, 1004, 1032, 1070, 1126, 1155, 1174, 1209, 1238, 1319, 1337, 1359, 1398, 1450, 1558, 1582, 1615, 1672  $\text{cm}^{-1}$  [110]. Y por su lado las bandas vibracionales principales del QN se presentan en 2885, 1654, 1591, 936 y 896  $\text{cm}^{-1}$  [111]. Los espectros de las muestras fabricadas se encuentran desfasados hacia la derecha, debido al proceso de desnaturalización y cambio conformacional de la proteína durante el proceso de fabricación de las NP's . Del espectro Raman del conjugado QN+IgG se observa que se encuentra presente la proteína IgG cerca de 1600  $\text{cm}^{-1}$  con un pico bien definido que corresponde con el espectro Raman de IgG y que no se encuentra presente en el espectro de QN. Los demás picos principales parecen traslaparse como ocurre con el espectro FTIR entre 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$ , y los picos principales de la proteína comprendidos entre 500 y 1500  $\text{cm}^{-1}$  quedan ocultos por el espectro de QN.

#### 4.8.3 Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X, XPS

Las muestras analizadas fueron el conjugado QN+IgG de nanopartículas liofilizadas sintetizadas mediante microfluídica, proteína pura IgG liofilizada y QN puro liofilizado. La caracterización mediante XPS permite determinar la presencia de elementos específicos en la superficie de la muestra. Las muestras con proteínas pueden ser caracterizadas en sus elementos específicos N(1s) y S(2p). Entre mayor concentración de proteína exista, se espera mayor presencia de estos elementos. Su cuantificación porcentual permite diferenciar muestras con N proveniente de terminales NH<sub>2</sub> en QN y provenientes de IgG y de las NP's de QN.

La **Figura 60** muestra los espectros survey de las muestras analizadas. En 285 eV se presenta el orbital C(1s) en todas las muestras, asociado tanto a los componentes de las muestras como al carbono residual. Así mismo, se presenta el orbital característico N(1s) propio de las proteínas, en este caso IgG, pero también de QN en 532.0 eV, mientras que en 164.0 eV se presenta S(2p), característico en IgG. La **Figura 61a**, muestra los espectros a detalle de las muestras analizadas, entre 156 y 176 eV.

La muestra de proteína IgG, presentó el pico característico correspondiente al pico disulfuro en S(2p) a 169.0 eV, mientras que este no está presente en las muestras de NP's de QN o el conjugado QN + IgG.

Por su parte, la **Figura 61b**, presenta los espectros a detalle de N (1s) para las mismas muestras, se observa que la concentración de las NP's de QN es menor a la correspondiente a la de IgG sola, y que en la muestra QN + IgG no aparece. Esto confirma que la proteína se encuentra encapsulada por el polímero y que los terminales NH<sub>2</sub> de QN efectivamente no quedan expuestos al exterior de las NP's.

La **Tabla 20** corresponde a la concentración elemental de N(1s) y S(2p) de las muestras y de la proteína presente.

Tabla 20.- Concentración de N(1s) y S(2p) por XPS.

Muestra	N(1s)	S(2p)
NP's QN	79,919.79	10, 159.36
QN/IgG	16,059.49	3,960.45
IgG	52,245.41	61,653.31

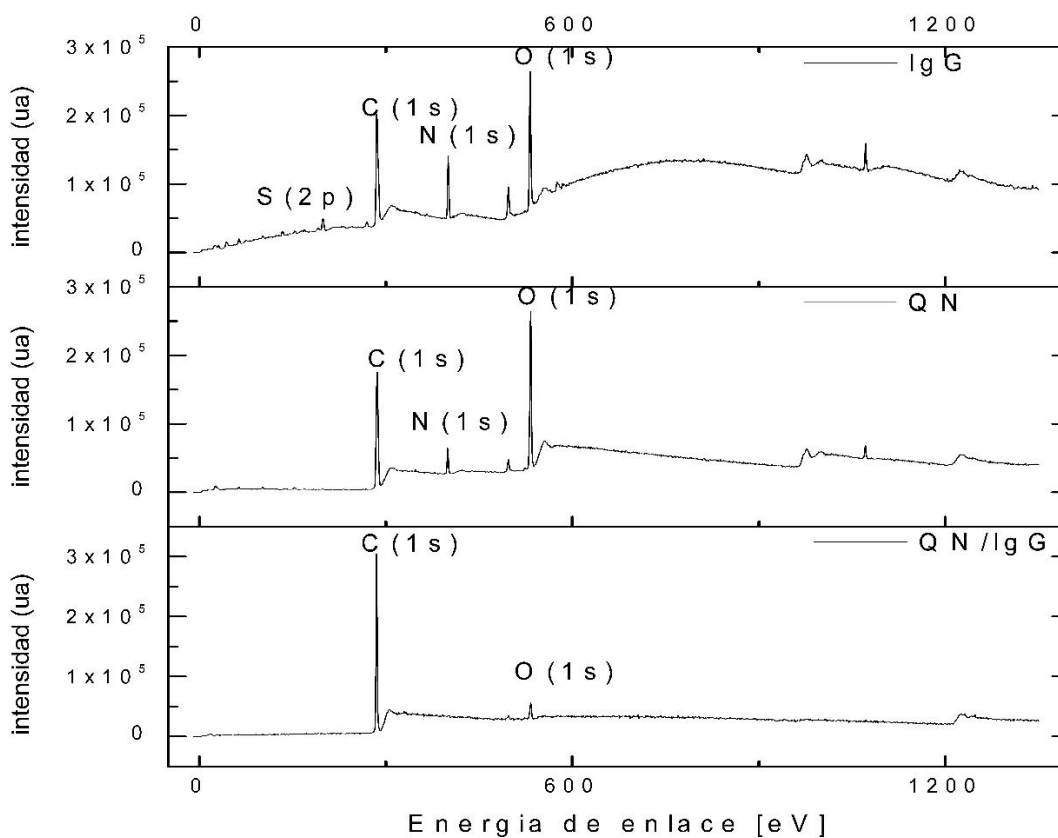


Figura 60.- Espectro survey XPS de a) la proteína IgG, b) las NP's de QN y c) el conjugado QN+IgG.

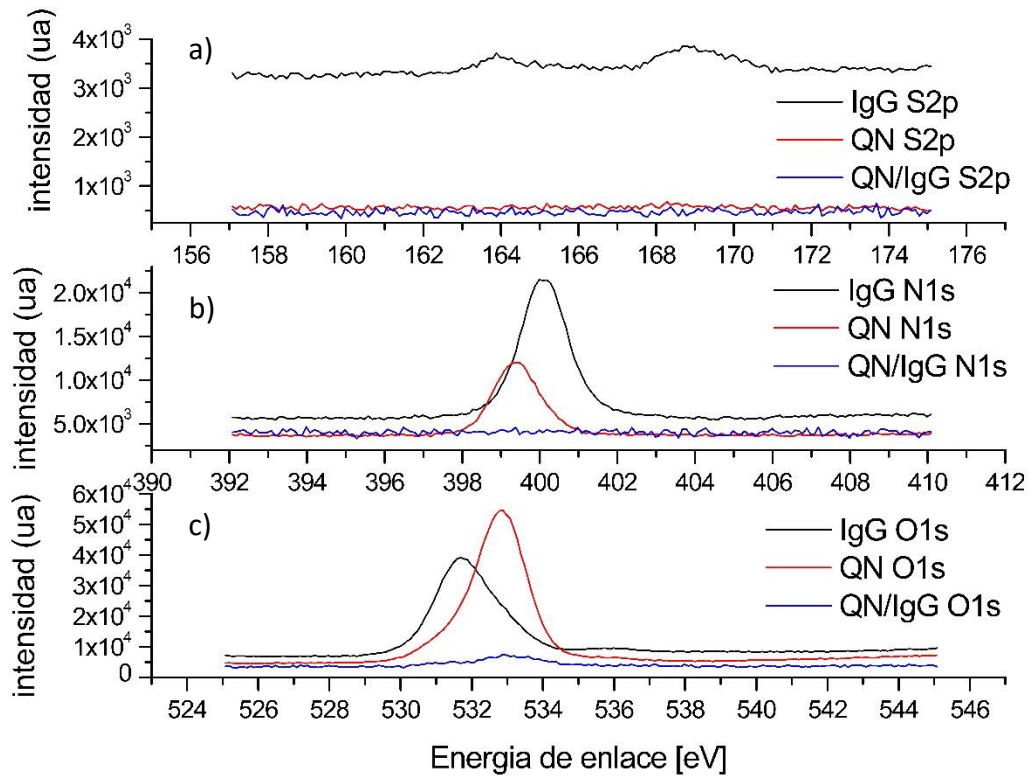


Figura 61.- Espectro XPS de a) orbital S(2p) de azufre de a) NP's de QN, b) proteína IgG y c) conjugado QN+IgG.

## 4.9 Conclusiones Generales

Se diseñó y fabricó un sistema de inyección microfluídico.

Se diseñaron, simularon y fabricaron chips microfluídicos de PDMS, vidrio y PDMS-vidrio.

Se sintetizaron nanopartículas biopoliméricas de QN, empleando una celda microfluídica de PDMS-vidrio.

Se encapsuló exitosamente proteína IgG, en NP's de QN empleando microfluídica

Se mejoró la síntesis de nanopartículas de QN, empleando microfluídica, tanto en uniformidad de tamaño como en distribución, comparadas con respecto a la síntesis en masa.

Se logró la estabilización del crecimiento de NP's de QN, así como el conjugado QN/IgG de tipo micelar, con terminales reactivos  $\text{NH}_2$  al interior

Se determinó que la proteína IgG queda completamente contenida al interior de la NP de QN, en el conjugado QN/IgG.

Se caracterización las NP's de QN mediante técnicas morfológicas y composicionales para corroborar la distribución y tamaño de las partículas.

#### 4.9.1 Consideraciones

Es importante mencionar que esta investigación continua en curso y seguimos trabajando para lograr la identificación de la proteína IgG y emplear las NP's de QN sintetizadas mediante microfluídica como acarreadores adyuvantes. En trabajos previos [46], las nanopartículas de QN sintetizadas mediante el método tradicional en masa, conjugadas con proteína E mostraron un buen resultado de Inmunización en ratones, así como una respuesta humoral inmune similar a la obtenida empleando alúmina, esto por sí solo es un resultado notable. Esperamos que los resultados de las pruebas de NP's de QN con proteína E de dengue encapsulado mediante microfluídica, presenten un comportamiento aún mejor que las sintetizadas en masa, sin embargo, es necesaria la experimentación y análisis de los resultados para poder aseverarlo, aquí me limito a mencionarlo como un posible resultado.

El desarrollo del sistema microfluídico y los chips microfluídicos me dejan satisfecho, es en esta parte en donde se invirtió más tiempo. Esta investigación sienta las bases para posteriores desarrollos y usos de la tecnología, no sólo en el área biológica sino también en la síntesis de materiales inorgánicos nanoestructurados y la integración de componentes que permitan la automatización, esta tecnología presenta una gran versatilidad. Creo firmemente que este proyecto es un buen ejemplo de la multidisciplinariedad del programa del Doctorado en Ciencias en Nanociencias y Nanotecnologías, que involucró varias ramas de las ciencias como lo fueron las Matemáticas, Física, Química, Electrónica y Biología.

Desde la propuesta geométrica y la simulación, pasando por la fabricación del sistema, su implementación, la puesta en marcha y la síntesis de las nanopartículas, hasta la caracterización de éstas. Teniendo en consideración que es un área donde estamos incursionando en México y las muchas carencias de infraestructura y expertos en el área, considero que hemos contribuido de manera significativa al

desarrollo de la línea de investigación en microfluídica y dejamos los cimientos para desarrollos y aplicaciones futuras de la tecnología en la que continuaremos trabajando.

En México hace falta infraestructura, capital financiero y humano para que se desarrolle más esta tecnología que aporta innumerables beneficios para diversas áreas de las ciencias, desde la síntesis de materiales, la farmacología, bioquímica e incluso el área energética. Es crucial que se continúe trabajando en este tópico y que no nos quedemos rezagados en la materia, estamos en un buen momento para desarrollar tecnología como la aquí mostrada, espero poder emprender en breve, más proyectos relacionados con esta línea de investigación e ir mejorando paulatinamente nuestras capacidades, infraestructura y resultados. Actualmente existen pocas instituciones que cuentan con la tecnología y el conocimiento para desarrollar microfluídica y espero que en el corto plazo más instituciones se sumen al empleo y desarrollo de esta.

Solo me queda agradecer a todas las personas que hicieron posible este trabajo y en especial a CONACYT por la beca brindada y los fondos para el desarrollo de este proyecto. Así como a mis asesoras la Dra. María de la Luz Olvera Amador y la Dra. Claudia O. Mendoza Barrera cuyo apoyo fue esencial.

# 5

## Potencial aplicación, y trabajo futuro

Nuestro grupo de investigación ya hemos empleado las nanopartículas acarreadoras de quitosán con cierto éxito, menciono aquí un posible uso que pretendemos darle a las nanopartículas sintetizadas durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Históricamente el Dengue ha sido una enfermedad elusiva para su erradicación mediante la vacunación. Entre los factores que han impedido el desarrollo de una vacuna, se encuentran; la presencia de cuatro distintos serotipos del virus, así como la similitud con los síntomas que presentan otros virus como; el Sika, Chikunguña, fiebre amarilla y en general los *flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Su poca o nula identificación y fenómenos biológicos como el mejoramiento de infección mediada por anticuerpos y el pecado antigénico original. A pesar de los grandes esfuerzos que se han hecho para erradicar la enfermedad, la fumigación para el control de los mosquitos y la descacharrización, así como las políticas públicas, sigue siendo hoy en día, un problema en los países que se encuentran en la región ecuatorial. Esto se debe, a que esta zona geográfica presenta las condiciones para el desarrollo y dispersión del vector *Aedes Aegypti*, sobre todo en áreas costeras. El carácter gregario y nómada del ser humano es el que ha contribuido a la diseminación de la enfermedad, no se sabe a ciencia cierta donde o cuando surgió la enfermedad, pero se tienen registros de una enfermedad similar en China en el año 265 D.C.



Yakarta, Indonesia y Egipto en 1779 y el primer registro preciso de la enfermedad en 1780 en Filipinas.

De lo que, si se tiene certeza, es que el virus migró del *Rhesus Monkey* al ser humano mediante los vectores *A. Aegypti* y *A. Albopictus*, desafortunadamente en el humano el virus genera síntomas que no se presentan en el *Rhesus Monkey*. Así tenemos la presencia de formas no graves, Síndrome de Choque por Dengue, Fiebre por Dengue y la forma severa de la enfermedad Dengue Hemorrágico (DH). Se sabe que una infección secundaria de dengue con un serotipo cruzado es más susceptible de desencadenar DH, pero hay evidencia que demuestra que esto no es siempre la regla y existen excepciones. Aun hoy se sigue estudiando que produce que se presente o no, esta condición. Algunos estudios apuntan a que existen factores genéticos en cada individuo que desencadenan esta condición.

La carga mundial de dengue de acuerdo con un estudio de (Bhatt) apunta a que el gasto por paciente infectado es de \$828 dls. La cantidad de pacientes infectados hacia finales de 2010 a nivel mundial es de 532,000 casos y el costo total anual mundial se estima en \$243,000 millones de dólares.

El tratamiento de la enfermedad puede resumirse de acuerdo a la OMS, en la “Guía de bolsillo: Diagnóstico y manejo de casos de dengue” .El tratamiento que proponen para las formas tanto leves como graves incluyen la ingesta abundante de líquidos, suero y paracetamol de 500 a 750 mg/kg cada 4 o 6 h en adultos, con una dosis máxima de 4 g al día y de 10 a 15 mg/kg en niños cada 6 h, así como baños con esponja, en importante mencionar que no se debe suministrar ácido acetilsalicílico, dipirona, diclofenaco, naproxeno, etc. O la combinación de esteroides y antibióticos, así como la administración de medicamentos vía intramuscular. Estas medidas que

solo son sintomáticas, de hidratación y seguimiento que parecen ser muy sencillas, puede hacer que la tasa de mortalidad quede por debajo del 1 %.

Actualmente el mecanismo de infección del virus se encuentra bien estudiado gracias a Yorgo Modis. El virus se conforma por una superficie suave de 90 homodímeros de proteína E organizada en balsas de 3 dímeros paralelos, el virus es fagocitado mediante receptores en la membrana celular asociados al dominio III de la proteína E, una vez dentro de la célula la diferencia de pH en el endosoma genera el cambio conformacional de los dímeros disociando la proteína E y exponiendo sus péptidos fusogénicos, gracias al movimiento tipo bisagra que se encuentra entre el dominio I y II de la proteína E donde cuenta con los mecanismos de detección de pH que desencadenan los cambios conformacionales para la posterior fusión del virus a la membrana celular y la posterior liberación del ARN dentro de la célula.

Una vacuna contra dengue ha sido difícil de desarrollar debido a la existencia de los 4 distintos serotipos circulantes, cada uno con proteínas virales ligeramente distintas, Muchos investigadores concuerdan con que el DH es causado cuando una persona es infectada con un serotipo, y posteriormente infectada con otro serotipo. Los anticuerpos y la inmunidad ganada con la primera infección parecen ayudan con la infección del segundo serotipo, en vez de proveer una inmunidad general contra los cuatro subtipos. Esto significa que una vacuna contra dengue debe estimular anticuerpos protectores contra los cuatro subtipos de una sola vez, algo que aún no se ha logrado [112].

En niños por arriba de un año, los estudios sugieren que el desarrollo de dengue hemorrágico es de 15 a 80 veces más frecuente durante una segunda infección que durante la infección primaria. Sin embargo, durante una infección primaria, la presencia de dengue hemorrágico ocurre en un pequeño porcentaje de

pacientes dentro de este grupo de edad [113]. Los recién nacidos con madres que tienen inmunidad contra el virus, son un grupo con alto riesgo de desarrollar dengue hemorrágico con una primera infección.

Los principales objetivos de la respuesta de anticuerpos inmunes en humanos son contra la membrana precursora pre-M y la envoltura E, ambas proteínas estructurales y la proteína no estructural NS1, demostrado por “*western blot*” y la caracterización de paneles de anticuerpos monoclonales, también se han detectado respuestas de anticuerpos contra otras proteínas no estructurales como la NS3 y NS5, sin embargo, dichas respuestas son débiles en especial durante infecciones primarias, las caracterizaciones más extensas de epítomos de células B se han realizado para la proteína E del virus [113, 114].

Es por ello por lo que la mayoría de las vacunas que se encuentran en desarrollo, emplean la proteína E de la envoltura para desencadenar una respuesta inmune, recientemente Sanofi Pasteur a liberado la primera vacuna contra dengue *Dengvaxia* ®, que emplea un esqueleto de virus de fiebre amarilla con la envoltura del virus de Dengue, sin embargo, se encuentra contraindicada para niños menores de 9 años y adultos mayores, los principales grupos de riesgo. Además, tiene desventajas como la administración que son tres dosis en un esquema de vacunación de cada seis meses.

Sin embargo, es la mejor solución que se tiene hasta el momento y ha demostrado una reducción de la presencia de dengue en tres estudios regionales de Asia-Pacífico y regiones tropicales y subtropicales de Latinoamérica, donde el dengue es endémico, reduciendo su presencia y asegurando la supervivencia de los pacientes vacunados durante la fase de convalecencia, de igual forma reduce el riesgo de

hospitalización por hasta 2 años después de su vacunación en grupos de niños entre 9 a 16 años [115].

Debido a que la enfermedad es endémica en países de bajo y medio desarrollo, lo ideal es el desarrollo de una vacuna que se aplique en el menor número de dosis, (idealmente una) y que genere una protección vitalicia contra los cuatro distintos serotipos, que sea de bajo costo y que además se pueda suministrar en niños pequeños y adultos, los candidatos a vacunas de virus vivos atenuados buscan este grupo objetivo de 1 y 2 años debido a la interferencia con los anticuerpos maternos, se están evaluando vacunas de una sola dosis [116].

Un artículo interesante que explora las distintas vacunas en desarrollo es el de Vannice, K.S. [116]. Se exponen las distintas vacunas en desarrollo, la metodología y la fase de desarrollo en la que se encuentran.

## 5.1 Perspectivas

Como se ha podido ver en este capítulo, el dengue es una enfermedad que probablemente está presente desde antes de 1945, la cual apenas comienza a ser entendida y cuya vacuna recientemente acaba de ser aprobada. Aunque no presenta varias de las características que son deseables en las vacunas, debido a que desencadena una reacción inmune con preferencia a un serotipo y no presenta resultados deseables en la población infantil, es la única vacuna aprobada hasta el momento de la escritura de esta tesis. La OMS recomienda su aplicación con pleno conocimiento de las circunstancias y un análisis económico, de prevalencia y presencia de la enfermedad en poblaciones con riesgo de contraer la enfermedad, en una región geográfica donde exista una alta carga de dengue. Los estudios económicos del costo-efectividad para la aplicación de la vacuna en una persona

deben rondar de 15 a 40 dólares. Visto desde el punto de vista social, debe ser menor de 100 o 150 dólares, recordemos que el estudio de Bhatt y la OMS nos indicaban que el costo por padecimiento de la enfermedad en una persona ronda los 800 dólares. Si bien existen otras vacunas en desarrollo parece ser que la estrategia es similar, solo dos vacunas en desarrollo parecen emplear adyuvantes vacunales. El conocimiento del mecanismo que desencadena el choque por dengue y el dengue hemorrágico parece escapar de nuestro entendimiento ya que los efectos de la enfermedad parecen variar de un paciente a otro.

La evidencia muestra que se puede o no presentar una hemorragia con una primera infección o puede presentarse una infección secundaria sin presencia de hemorragia, como vimos, son necesarios más estudios al igual que estudios en recién nacidos con madres que fueron infectadas con dengue, incluso puede ser necesaria una correlación de información genética del paciente infectado versus infecciones primarias y posteriores en el paciente. La presencia de la enfermedad se da en países en desarrollo que carecen de la infraestructura de laboratorios y equipo necesario en donde incluso la oportuna detección y diferenciación de la enfermedad, con respecto a otras enfermedades similares, parece ser difícil. Esta correlación de características genéticas vs identificación-serotipificación del virus parece ser una utopía.

Hay un gran campo de trabajo que va desde el desarrollo de dispositivos para la oportuna detección y diferenciación del virus, hasta el desarrollo de una vacuna que cumpla con las características deseadas como lo son; amplia cobertura, larga duración, respuesta inmune contra los 4 serotipos, mono dosificable, de bajo costo y que sea aplicable tanto para población infantil como adulta.

Por nuestra parte, el trabajo de nuestra investigación se centrará en el desarrollo de un acarreador que además funcione como adyuvante vacunal empleando proteína E de los distintos serotipos del virus de dengue, en nuestro trabajo previo, logramos la creación de micropartículas que presentan una reacción inmune similar a la Alúmina [46]. Ha sido empleada como adyuvante para potenciar la reacción vacunal, los resultados ya han sido publicados, sin embargo, por el método de síntesis empleado, no se pudo lograr la fabricación de micropartículas mono dispersas ni tampoco se logró la caracterización de las mismas ni el control de la morfología y encapsulado [45]. A pesar de lo anteriormente mencionado, se obtuvieron resultados prometedores que motivaron el desarrollo del presente trabajo de investigación en el que empleamos la microfluídica para controlar el tamaño, morfología y encapsulado de proteína, pretendemos evaluar la respuesta inmune de estos acarreadores adyuvantes en un modelo *in vivo*.

Para mí es de especial interés la microfluídica por la gran cantidad de aplicaciones y potencial que presenta, así que me enfocaré en esta área para desarrollar dispositivos con más componentes, que permitan la automatización y control de procesos, espero poder desarrollar “lab-on-a-chip”, “organ-on-a-chip”, “highly integrated microfluidic systems” y biosensores. Aún falta camino por recorrer y es arduo, pero confío en que lograremos desarrollar esta nueva área de investigación en México.

## Protocolos experimentales

Se reportan a continuación la lista de protocolos desarrollados y empleados para la limpieza de substratos, depósito de películas, grabado de Si y vidrio, fabricación y sellado de dispositivos, síntesis de nanopartículas, así como de preparación de muestras. Los protocolos se encuentran bien establecidos, como los relativos a limpieza, depósito de películas de Cr, vertido de PDMS, sellado de PDMS-vidrio y preparación de muestras para su caracterización. Sin embargo, otros protocolos como los relativos a la fotolitografía, grabado de Si y vidrio, así como el sellado térmico de vidrio-vidrio y síntesis microfluídica requirieron una extensa experimentación para establecer las condiciones ideales que proporcionaran los mejores resultados de relación de aspecto diseño-fabricación para grabado de canales en Si y vidrio, correcto sellado y correcta formación de microgotas dentro del dispositivo microfluídico. Se probaron variables como espesor de resina, que depende a su vez del tiempo y velocidad, tiempo de recocido de resina, distancia y tiempo de exposición de la resina a luz UV, concentración de revelador y tiempo de revelado de la resina y tiempo de revelado de Cr. Para el grabado de Si y vidrio se probaron distintas proporciones de los reactivos grabantes y tiempo de grabado que generaran la mejor relación de aspecto, geometría de canal y menor rugosidad superficial. Para la síntesis de microgotas se probaron distintas velocidades de inyección de líquidos, viscosidades de la fase dispersa y concentración de surfactante de la fase oleosa acarreadora.

Solo se presentan los protocolos que dieron resultados positivos en la experimentación para la correcta realización de este trabajo de tesis.

## *Fabricación de mascarilla*

### Material y equipo

Mascarilla con recubrimiento de Cr (comercial)  
Atacante de Cr cas# 651826  
Acetona CAS# 67-64-1 JT. Baker  
2-propanol CAS# 67-63-0 Sigma Aldrich  
Agua des ionizada (DI) con sistema Millipore con filtros de resina de 4 etapas  
Gas N<sub>2</sub> marca Infra  
Editor de mascarillas *Heidelberg μPG-101 laser writer*  
Pinzas para oblea y cuarto limpio

### Procedimiento

1. Colocar mascarilla en el editor y alinear. Introducir diseños a transferir en el software y grabar directamente 80 mW
2. Revelar con atacante de Cr por 60 s
3. Lavar con acetona por 30 s
4. Lavar con propanol por 30 s
5. Lavar con DI por 30 s
6. Secar con N<sub>2</sub>
7. Relación de aspecto 0.90-0.94



## *Limpieza de substratos de silicio, proceso RCA*

### Material y Equipo

- Obleas de Si de 4 in  $\emptyset$ , tipo N orientación (100) marca. Unisil 1-5  $\Omega$ /cm esp. 500-550  $\mu$ m
- Obleas de 1.5 in  $\emptyset$ , tipo P orientación (111) marca. Sitronix 15-17.1  $\Omega$ /cm
- Soporte de teflón para obleas de Si
- Pinzas de sujeción para obleas de Si
- Vasos de precipitados
- Baño Ultrasónico Cole Parmer mod. 8845-30 (BU)
- Cajas Petri (CP)
- Parrilla de agitación magnética (PAM)
- Cascada de agua
- N<sub>2</sub> marca Infra
- Xileno al 100 % JT. Baker CAS # 1330-20-7
- Acetona 100 % JT. Baker CAS# 67-64-1
- Agua des ionizada (DI)
- Solución piraña 3:1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAS# 7664-93-9 y CAS# 7722-84-1
- Fluoruro de Hidrógeno HF al 48 %, CAS# 1.00334.0500 marca Merk
- Solución X1 proporción 5:1:1 H<sub>2</sub>O: NH<sub>4</sub>OH: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> CAS# 1336-21-6 y CAS#7722-84-1
- Solución X2 proporción 5:1:1 H<sub>2</sub>O: HCl: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAS# 7647-01-0 y CAS#7722-84-1

### Procedimiento

1. Lavar en xileno en BU 5 min
2. Lavar en acetona en BU 5 min
3. Lavar en BU con DI 5 min
4. Inmersión en solución piraña 10 min a 85 °C
5. Lavar con DI 5 min en BU
6. Inmersión 30 s en HF al 10 %
7. Lavar con DI 5 min en BU
8. Inmersión en solución X1 10 min a 85 °C
9. Lavar con DI 5 min en BU
10. Inmersión 30 s en HF al 10 %
11. Lavar con DI 5 min en BU
12. Inmersión en X2 10 min a 85 °C
13. Lavar con DI 5 min en BU
14. Inmersión 30 s en HF al 10 %
15. Lavar con DI 5 min en BU
16. Colocar en cascada de agua y secar con N<sub>2</sub>
17. Colocar en CP

## *Limpieza de vidrio*

### Material y equipo

Cubre objetos y porta objetos de vidrio Corning 0.8-1.1 mm de espesor  
Soporte de teflón para cubrir objetos y portaobjetos de vidrio  
Pinzas de sujeción de teflón  
Vasos de precipitados  
Baño Ultrasónico marca Cole Parmer mod. 8845-30 (BU)  
Cajas Petri de vidrio (CP)  
Parrilla de agitación magnética (PAM)  
Cascada de agua  
N<sub>2</sub> marca Infra  
Xileno al 100 % JT. Baker CAS # 1330-20-7  
Acetona 100 % JT. Baker CAS# 67-64-1  
Agua desionizada obtenida con sistema Millipore de 4 etapas (DI)  
Solución piraña 3:1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAS# 7664-93-9 y CAS# 7722-84-1  
Solución X1 proporción 5:1:1 H<sub>2</sub>O: NH<sub>4</sub>OH: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAS# 1336-21-6 y CAS#7722-

84-1

Solución X2 proporción 5:1:1 H<sub>2</sub>O: HCl: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, CAS# 7647-01-0 y CAS#7722-84-

1

### Procedimiento

1. Lavar en xileno en BU 5 min
2. Lavar en acetona en BU 5 min
3. Lavar con DI 5 min en BU
4. Inmersión en solución piraña 10 min a 85 °C en PAM
5. Lavar con DI 5 min en BU
6. Inmersión en solución X1 10 min a 85 °C en PAM
7. Lavar con DI 5 min en BU
8. Inmersión en solución X2 10 min a 85 °C en PAM
9. Lavar con DI 5 min en BU
10. Colocar en cascada de agua y secar con N<sub>2</sub>
11. Colocar en CP

### *Colocación de Cr sobre vidrio*

#### Material y equipo

Vidrios limpios. Ver protocolo de limpieza de vidrio

Sputtering marca INTERCOVAMEX

Pinzas

Blanco de Cr

Gas Ar

#### Procedimiento

1. Colocar vidrio limpio dentro del sputtering para depositar el Cr con corriente directa DC
2. Condiciones de depósito: Presión  $1.5 \times 10^{-2}$  mbar, potencia 50 W, Gas Ar, t=4 min.
3. Se genera una capa uniforme de Cr de 100 nm

## ***Aplicación de resina y fotolitografía***

### Material y equipo

Obleas de Si de 1.5 in  $\emptyset$ , tipo P orientación (111) marca Sitronix 15.0-17.1  $\Omega$ /cm  
Obleas de Si de 4.0 in.  $\emptyset$ , tipo N orientación (100) marca Unisil 1-5  $\Omega$ /cm esp. 500-550  $\mu$ m.  
Resina *positive microposit* SC1827 marca ROHM HASS  
Solución reveladora de resina proporción 13:1 H<sub>2</sub>O-Revelador  
Porta filtro para jeringa marca terumo  
Jeringa terumo  
Filtros de papel 40  $\mu$ m para jeringa  
*Spinner photoresist* modelo EC101D-F485 con bomba de vacío XX55 110 v/4 A/60 Hz  
Campana con luz amarilla  
Pinzas de sujeción de obleas de silicio  
Recipiente obscuro para transporte de obleas de silicio  
Horno *Blue M Electric Co.* modelo OV-8A  
Cuarto limpio con luz amarilla de al menos 10,000 partículas

### Procedimiento

1. Colocar oblea o vidrio limpio, en spiner
2. Verter resina sobre toda la superficie
3. Centrifugar a 4,000 rpm 20 s
4. Pre-hornear resina a 90 °C, 20 min
5. Transferir oblea al editor de mascarillas Heidelberg,  $\mu$ PG-101
6. Imprimir patrones a 80 mW con autoenfoco
7. Revelar con revelador de resina 12s proporción 13:1
8. Enjuagar 2 veces por 1 min. en DI
9. Secar con aire de N<sub>2</sub>
10. Recocer oblea a 120 °C por 20 min
11. Analizar la calidad de grabado con un microscopio óptico y perfilómetro

## ***Fotolitografía con mascarilla y alineadora***

### Material y equipo

Mascarilla con los motivos grabados ver: “protocolo de fabricación de mascarilla”  
Oblea de Si con resina fotosensible ver: “protocolo de aplicación de resina” pasos 1 al 4  
Alineadora de mascarillas  
Solución reveladora proporción 12:1 (H<sub>2</sub>O: revelador)  
Campana con luz amarilla  
Pinzas de sujeción de obleas de silicio  
Recipiente obscuro para transporte de obleas de silicio  
Horno *Blue M Electric Co.* modelo OV-8A  
Cuarto limpio con luz amarilla de al menos 10,000 partículas  
Aire de N<sub>2</sub>

### Procedimiento

1. Colocar oblea con resina en la alineadora “chuck”
2. Colocar mascarilla en la parte superior
3. Alinear y calibrar con microscopio para evitar sombras
4. Incidir luz ultravioleta, exponer los motivos por 5 s
5. Revelar en solución reveladora 13:1 por 17 s
6. Sumergir oblea en DI y secar con aire de N<sub>2</sub>
7. Hornear 20 min a 120 °C

## ***Grabado con RIE, sobre silicio***

### Material y equipo

Obleas de Si con resina y patrones previamente grabados

RIE (*Reactive Ion Etching*)

Gas SF<sub>6</sub> marca Infra

Gas Ar marca Infra

### Procedimiento

1. Colocar oblea en RIE con programa SAUL 1
2. Emplear flujo de Gas SF<sub>6</sub> 10 cm<sup>3</sup>/min: Gas Ar 40 cm<sup>3</sup>/min, potencia de 100 W y t= 30 min
3. Con estas condiciones se logra un ataque de aproximadamente 0.5 μm/min

## *Grabado químico, sobre silicio*

### Material y equipo

Obleas de Si con resina y patrones previamente grabados.  
Recipientes de plástico resistentes a HF  
Hidróxido de potasio KOH al 45 %  
Fluoruro de Hidrógeno HF al 48 % CAS# 1.00334.0500 marca Merk  
Propanol Sigma Aldrich  
Etanol Sigma Aldrich  
H<sub>2</sub>O desionizada  
Atacante de Si poroso HF: Etanol: Agua proporción 1:2:1

### Procedimiento

1. Crear Si poroso mediante KOH saturado de propanol,
2. Sumergir 45 s para crear una capa de 10  $\mu\text{m}$  de Si poroso.
3. Sumergir en atacante 2min
4. Se logra un grabado de unas 8  $\mu\text{m}$ .

## ***Grabado de chips de vidrio***

### Material y equipo

Vidrio Schott B270®  
Resina positiva microposit SC1827 marca ROHM HASS  
Revelador de resina proporción 13:1 KOH45 % + H<sub>2</sub>O CAS# 7732-18-5 JT. Baker  
Revelador de Cr, Sigma CAS# 651826  
Agua des ionizada (DI)  
Porta filtro para jeringa terumo  
Jeringa terumo  
Filtros de papel para jeringa  
*Spiner photoresist* mod. EC101D-F485 acoplado a bomba de vacío 110 v/4 A/60 Hz  
Campana con luz amarilla  
Pinzas de sujeción de obleas de silicio  
Recipiente obscuro para transporte de obleas de silicio  
Horno *Blue M Electric Co.* modelo OV-8A  
Cuarto limpio con luz amarilla de al menos 10,000 partículas  
Perfilómetro Dektak 150 (Veeco)  
Microscopio óptico Olympus mod. 709193 100x  
Editor de mascarillas Heidelberg  $\mu$ PG-101  
Ácido fluorhídrico HF 49 %  
Ácido clorhídrico HCl 37 %  
Fluoruro de Amonio NH<sub>4</sub>F 40 %  
Buffer de HF (20 ml NH<sub>4</sub>F al 45 % + 2 ml HF al 49 %) proporción 10:1  
Solución gravante de Vidrio (34 ml H<sub>2</sub>O + 2 ml Buffer + 4 ml HCl al 37 %) proporción 17:1:2

### Procedimiento

1. Colocar Cr sobre vidrio, ver “**protocolo de aplicación de Cr sobre vidrio**”.
2. Coloca resina sobre Cr, ver “**protocolo de aplicación de resina**”
3. Sumergir 12 s en revelador de resina con agitación suave
4. Sumergir en DI y secar con N<sub>2</sub>
5. Recoser 20 min a 120 °C
6. Sumergir 45 s en revelador de Cr con agitación suave
7. Sumergir en DI y secar con N<sub>2</sub>.
8. Proteger parte posterior y los costados del vidrio con resina.
9. Recubrir con un pincel y hornear 20 min a 90 °C
10. Coloca vidrio con los patrones dentro de solución grabante, 5, 20, 25 o 35 min
11. Lavar con DI y secar con N<sub>2</sub>
12. Este procedimiento graba a una tasa de 0.7  $\mu$ m/min



## ***Preparación y vaciado de PDMS***

### Material y equipo

PDMS *sylgard*<sup>®</sup> 184 *silicone elastomer kit*  
Catalizador *sylgard*<sup>®</sup> 184 *silicone elastomer kit*  
Bomba de Vacío  
Desecador  
Horno *Blue M Electric Co.* modelo OV-8A  
Vaso de precipitados  
Substrato de Si con los patrones que se desean copiar  
Recipiente para contención de PDMS y substrato  
Cuarto limpio  
Campana

### Procedimiento

1. Mezclar PDMS con catalizador, proporción 10:1
2. Desgasificar PDMS con bomba de vacío
3. Colocar oblea de Si con los motivos a replicar en un recipiente
4. Verter PDMS desgasificado sobre el diseño
5. Hornear 1 h a 60 °C
6. Desmoldar PDMS con los patrones replicados

## *Unión de PDMS a vidrio, sellado del chip microfluídico*

### Material y equipo

O<sub>2</sub> marca Infra

RIE "*reactive ion etching*"

Substrato de PDMS con canales grabados

Vidrio limpio para sellado de sistema microfluídico (portaobjetos)

Etanol CAS# 64-17-5 JT. Baker

Cuarto limpio

Pinzas de sujeción

### Procedimiento

1. Limpiar vidrio con protocolo RCA
2. Colocar molde de PDMS y el vidrio en RIE
3. Crear plasma de oxígeno a 20 W por 30 s
4. Retirar de RIE y colocar en contacto las superficies expuestas dentro de los 60 s posteriores a la funcionalización
5. Se emplea etanol en caso de ser necesario para permitir el acomodo de las superficies en contacto

## *Unión de vidrio a vidrio, sellado de chip microfluídico*

### Material y equipo

Vidrio Schott B270 grabado con los canales o patrones a sellar

Vidrio liso para sellar con o sin patrones

Placas de hierro de 3/8" con perforaciones perimetrales para alinear ambas placas, pulidas.

Mufla u horno con control de rampa de temperatura marca Lindberg con controlador Honeywell DC1010

### Procedimiento

1. Colocar vidrio limpio con canales y tapa con un peso uniformemente distribuido dentro del horno mediante placas de hierro
2. Unir a una temperatura de 541 °C por 15 h
3. Emplear rampa de calentamiento de 50 °C y periodos de estabilización de 10 min.
4. Dejar enfriar
5. Cortar, detallar y perforar los chips

## *Síntesis de Np's de QN en vaso de precipitado*

### Material y equipo

QN, bajo, medio y alto peso molecular (DD 85 %, Sigma CAS# 9012-76-4)  
Agua inyectable (AI) o agua desionizada (DI)  
Tripolifosfato (TPP, Sigma CAS# 7758-29-4)  
Ácido acético (AA, grado molecular)  
Parafilm  
Vasos de precipitados despirogenizados  
Tubos cónicos  
Jeringas  
Agitador magnético  
Bomba de infusión  
Vortex  
Revco  
Liofilizadora  
Campana Clase II A2  
Centrífuga de temperatura controlada

### Procedimiento

1. Preparar solución de AI o DI con AA al 1.75 % v/v (pH 3)
2. Incorporar QN para obtener una solución al 0.5 % p/v en PAM 12h. y filtrar
3. Preparar solución de TPP en H<sub>2</sub>O al 0.25 % w/v agitar 5 min.
4. Adicionar solución de TPP a la solución de QN con goteo a (15, 35 y 70 ml/h) relación 1:5 v/v
5. Centrifugar la solución de QN/TPP a (5,000 rpm ,1 h, T = -10 °C).
6. Retirar sobrenadante al volumen centrifugado, dejar 15 ml del fondo
7. Pasar a viales despirogenizados
8. Congelar (T = -70 °C, t = 12 h)
9. Liofilizar (T = -50 °C, p = 0.035 mbar, t = 24 h)

### *Síntesis de Np's de PVP en vaso de precipitado*

#### Material y equipo

PVP10 o PVP40, Sigma CAS# 9003-39-8  
Agua inyectable o agua des ionizada (AI o DI)  
Tritonx100, Sigma CAS# 9002-93-1  
Parafilm  
Vasos de precipitado despirogenizados  
Tubos cónicos  
Jeringas  
Parrilla de agitación magnética (PAM)  
Bomba de infusión (BI)  
Vortex  
Revco  
Liofilizadora  
Campana Clase II A2  
Centrífuga de temperatura controlada

#### Procedimiento

1. Incorporar PVP en DI al 0.5 % p/v
2. Preparar Tritónx100 en DI al 0.25 % w/v agitar 5 min
3. Adicionar 2 en 1 velocidad de goteo (15, 35 y 70 ml/h) con BI en relación 1:5 v/v
4. Centrifugar solución 3 a 5,000 rpm 1 h, T = -10 °C
5. Retirar sobrenadante, dejando 15 ml del fondo
6. Congelar (T = -70 °C, t = 12 h) y liofilizar (T = -50 °C, p = 0.035 mbar, t = 24 h)

## *Síntesis de Np's copoliméricas QN/PVP*

### Material y equipo

QN (QN; 50-190kDa, 190-310kDa y 310-375kDa, DD85 %, Sigma CAS# 9012-76-4)  
PVP 10 y 40 kDa (PVP10 y PVP40, Sigma CAS# 9003-39-8)  
Agua inyectable AI  
Tripolifosfato (TPP, Sigma CAS# 7758-29-4)  
Ácido acético (AA, grado molecular)  
Filtros de separación celular 40  $\mu$ m  
Parafilm  
Vasos de precipitados despirogenizados  
Tubos cónicos  
Jeringas  
Parrilla de agitación magnética (PAM)  
Bomba de infusión (BI)  
Vortex  
Revco  
Liofilizadora  
Campana Clase II A2  
Centrífuga de temperatura controlada

### Procedimiento

1. Preparar AI o DI al 1.75 % v/v con AA (pH = 3)
2. Incorporar QN de bajo, medio o alto peso molecular en solución 1 al 0.5 % p/v
3. Incorporar TPP en AI o DI al 0.25 % w/v y agitar 5 min
4. Agregar PVP a solución 2 equivalente al peso molecular de QN disuelto
5. Agregar solución 3 a solución 4 (15, 35 y 70 ml/h) con BI relación 1:5 v/v
6. La solución de QN/TPP se centrifuga a 5,000 rpm por 1 hora (T = -10 °C)
7. Al volumen centrifugado se le retira el sobrenadante, dejando un volumen mínimo de 15 ml del fondo, el cual se trasvasa a viales despirogenizados para congelarlo (T = -70 °C, t = 12 h) y liofilizado (T = -50 °C, p = 0.035 mbar, t = 24 h)

## *Síntesis de NP's de QN en dispositivo microfluídico*

### Material y equipo

QN (QN; 50-190kDa; DD85 %; Sigma CAS 9012-76-4)  
Agua desionizada (DI)  
Tripolifosfato como surfactante (TPP, Sigma CAS 7758-29-4)  
Ácido acético (AA, grado molecular)  
Filtros de separación celular 40  $\mu\text{m}$   
Parafilm  
Vasos de precipitados despirogenizados  
Tubos cónicos  
Jeringas  
Agitador magnético (AM)  
Bomba de inyección microfluídica MFCS-EX (Fluigent)  
Vortex  
Revco  
Liofilizadora  
Campana Clase II A2  
Centrífuga de temperatura controlada  
Microscopio  
Chip microfluídico (ver fabricación de chip)  
Mangueras y conexiones de Teflón PTFE de distintos diámetros  
Aceite mineral sigma CAS M8410 (AM)  
Span 80, Sigma CAS 1338-43-8

### Procedimiento

1. Preparar DI al 1.75 % v/v (pH 3), empleando AA
2. Incorporar QNL en solución 1 a (0.5, 1 y 2 %) p/v, y filtrar con filtro millipore 40  $\mu\text{m}$
3. Preparar TPP en DI al 10.00 % w/v y agitar 5 min
4. Preparar AM con 2 % de Span 80 v/v y agitar 5 min
5. Conectar chip microfluídico **figura 19** de tal forma que el líquido central sea QN y el líquido acarreador sea el aceite en una configuración de tipo "Y" (**ver apartado de simulación microfluídica**)
6. Verter la solución dentro de TPP al 10 % en AM, en agitación suave
7. La formación de NP's de QN se da por el mecanismo propuesto en la **Figura 19**
8. Recolectar sobrenadante, centrifugar y separar sobrenadante a 5,000 rpm, 5 min a 4 °C
9. Congelar muestras a -70 °C por 5 h y liofilizar por 24 h a -50 °C

## *Preparación de muestras para observación mediante TEM*

### Material y equipo

Muestra a analizar  
Ácido fosfotúngstico al 2 %  
Centrifugadora  
Rejillas de Cu para TEM  
Cronómetro  
Papel filtro  
Pinzas  
Gradilla y pinzas

### Procedimiento

1. Centrifugar la solución madre a 5,000 rpm por 5 min, se observa una separación de fases
2. Tomar 10  $\mu$ l (de las distintas fases presentes) se colocan sobre la rejilla para TEM, se dejan reposar por 10 min en todos los casos
3. Preparar muestras teñidas y sin teñir. Pasados 10 min se seca el excedente de líquido con papel filtro. Si la muestra es sin teñir, se deja secar para su observación. Si la muestra se tiñe con ácido fosfotungstico al 2 %, se hace por 30 o 45 s, se retira el excedente con papel filtro y se deja secar
4. Preparar diluciones 1:10 y 1:100 de las muestras para observación. Se indican las condiciones en el apartado de resultados (Capítulo 4)



## *Preparación de muestras para análisis FTIR*

### Material y equipo

Muestra a analizar previamente liofilizada  
KBr  
Molde para pastillas  
Prensa hidráulica  
Equipo FTIR marca Nexus 470

### Procedimiento

1. Tomar la muestra liofilizada de las nanopartículas, proteína o conjugado y se procede a hacer una pastilla con KBr de aproximadamente 1 cm de diámetro y 2 mm de espesor dentro del molde con la muestra a analizar.
2. Aplicar presión de 8 Ton Por espacio de 1 h para compactar la muestra y crear una pastilla o por 40 min y 7 Ton de presión para pastillas más delgadas
3. Colocar la pastilla en el soporte para hacer la medición por transmitancia

## *Preparación de muestras para observación con XPS*

### Material y equipo

Muestra a analizar  
Substrato de vidrio con Cr  
Pipeta  
Pinzas  
Caja Petri  
Equipo XPS marca *Thermo Scientific* modelo K-Alpha equipado con fuente monocromada Al K $\alpha$

### Procedimiento

1. Tomar la muestra y colocar una gota de 10  $\mu$ l sobre el substrato de vidrio con Cr
2. Dejar secar la muestra dentro de una caja Petri para evitar contaminación
3. La muestra seca, se introduce en XPS por unas 12 h antes de la medición para de gasificar la muestra a  $1 \times 10^{-8}$  Torr en la pre-cámara
4. Se procede a analizar la muestra con un *spot* de 400  $\mu$ m a  $1 \times 10^{-9}$  Torr en modo *survey* y detalle

## *Preparación de muestras para caracterización Raman*

### Material y equipo

- Muestra a analizar
- Substrato de vidrio
- Pinzas
- Caja Petri
- Equipo Raman Jobin-Y Von T64000

### Procedimiento

1. Colocar el sustrato de vidrio en el soporte de Raman y se mide. Esta será la línea base que se restará de la medición que se haga de la muestra de interés
2. Colocar la muestra liofilizada directamente en el sustrato y se mide

## *Preparación de muestras para observación con Perfilómetro*

### Material y equipo

- Muestra a analizar
- Perfilómetro
- Pinzas
- Caja Petri

### Procedimiento

1. Colocar el sustrato de interés sobre la base del perfilómetro y medir. La punta recorrerá la muestra sobre la línea de interés donde se encuentren presentes los valles y crestas
2. Verificar que el sustrato se encuentre bien fijo a la base para que este no sea arrastrado por la punta al momento de ser medido

## Bibliografía

1. Joye, I.J. and D.J. McClements, *Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2014. **19**(5): p. 417-427.
2. Giezen, F.E., et al., *Biopolymer nanoparticles*. 2004, Google Patents.
3. Andersson, P., M. Ganäs, and G. Thorsén, *Characterization of reaction variables*. 2004, Google Patents.
4. Brigger, I., C. Dubernet, and P. Couvreur, *Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis*. Advanced drug delivery reviews, 2012. **64**: p. 24-36.
5. Panyam, J. and V. Labhassetwar, *Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue*. Advanced drug delivery reviews, 2003. **55**(3): p. 329-347.
6. Soppimath, K.S., et al., *Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices*. Journal of controlled release, 2001. **70**(1): p. 1-20.
7. Kumari, A., S.K. Yadav, and S.C. Yadav, *Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. **75**(1): p. 1-18.
8. Nagavarma, B., et al., *Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles—a review*. Asian J. Pharm. Clin. Res, 2012. **5**(3): p. 16-23.
9. Dangla, R., S.C. Kayi, and C.N. Baroud, *Droplet microfluidics driven by gradients of confinement*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(3): p. 853-8.
10. Abdelgawad, M. and A.R. Wheeler, *Low-cost, rapid-prototyping of digital microfluidics devices*. Microfluidics and Nanofluidics, 2008. **4**(4): p. 349-355.
11. Dungchai, W., O. Chailapakul, and C.S. Henry, *A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing*. Analyst, 2011. **136**(1): p. 77-82.
12. Au, A.K., W. Lee, and A. Folch, *Mail-order microfluidics: evaluation of stereolithography for the production of microfluidic devices*. Lab on a Chip, 2014. **14**(7): p. 1294-1301.
13. Kumacheva, E. and P. Garstecki, *Microfluidic reactors for polymer particles*. 2011, Hoboken, N.J.: Wiley. 223.
14. Chakraborty, S., *Microfluidics and microfabrication*. 2010, New York: Springer. 357.
15. Tian, W.-C. and E. Finehout, *Microfluidics for biological applications*. Vol. 16. 2009: Springer Science & Business Media.
16. Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 368-73.

17. Li, X., D.R. Ballerini, and W. Shen, *A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends*. *Biomicrofluidics*, 2012. **6**(1): p. 11301-11313.
18. Calvo, P., et al., *Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines*. *Pharmaceutical research*, 1997. **14**(10): p. 1431-1436.
19. Tanaka, K. and K. Fukase, *Renaissance of traditional organic reactions under microfluidic conditions: a new paradigm for natural products synthesis*. *Organic Process Research & Development*, 2009. **13**(5): p. 983-990.
20. Porta, R., M. Benaglia, and A. Puglisi, *Flow chemistry: recent developments in the synthesis of pharmaceutical products*. *Organic Process Research & Development*, 2015. **20**(1): p. 2-25.
21. Song, Y., J. Hormes, and C.S. Kumar, *Microfluidic synthesis of nanomaterials*. *small*, 2008. **4**(6): p. 698-711.
22. Ley, S.V., et al., *Machine-assisted organic synthesis*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015. **54**(35): p. 10122-10136.
23. Liu, Y. and X. Jiang, *Why microfluidics? Merits and trends in chemical synthesis*. *Lab on a Chip*, 2017. **17**(23): p. 3960-3978.
24. Elvira, K.S., et al., *The past, present and potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis*. *Nature Chemistry*, 2013. **5**: p. 905.
25. Fortt, R., R.C. Wootton, and A.J. de Mello, *Continuous-flow generation of anhydrous diazonium species: Monolithic microfluidic reactors for the chemistry of unstable intermediates*. *Organic process research & development*, 2003. **7**(5): p. 762-768.
26. Taylor, R., et al., *Small particles, big impacts: A review of the diverse applications of nanofluids*. *Journal of Applied Physics*, 2013. **113**(1): p. 011301.
27. IUPAC. *Drug Delivery Materials*. [Web Page] 2016 [cited 2016 nov 2016]; Definitions]. Available from: <https://iupac.org/materialschemistryedu/biomedical/drug-delivery/>.
28. Nanjwade, B.K., et al., *Dendrimers: emerging polymers for drug-delivery systems*. *Eur J Pharm Sci*, 2009. **38**(3): p. 185-96.
29. Madaan, K., et al., *Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues*. *J Pharm Bioallied Sci*, 2014. **6**(3): p. 139-50.
30. Pernaut, J.M. and J.R. Reynolds, *Use of conducting electroactive polymers for drug delivery and sensing of bioactive molecules. A redox chemistry approach*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2000. **104**(17): p. 4080-4090.
31. Vallet-Regi, M., F. Balas, and D. Arcos, *Mesoporous materials for drug delivery*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007. **46**(40): p. 7548-58.
32. Wang, S.B., *Ordered mesoporous materials for drug delivery*. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2009. **117**(1-2): p. 1-9.
33. Kumar, C.S.S.R., *Polymeric nanomaterials*. *Nanomaterials for the life sciences*. 2011, Weinheim: Wiley-VCH. xxiii, 520 p.

34. Kataoka, K., A. Harada, and Y. Nagasaki, *Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance*. *Advanced drug delivery reviews*, 2012. **64**: p. 37-48.
35. Schwoerer, M. and H.C. Wolf, *Organic Molecular Solids*. 2007: John Wiley & Sons.
36. Kumar, C.S.S.R., *Shynthetic Approaches to Organic Nanoparticles*. *Nanomaterials for the life sciences*. 2011, Weinheim: Wiley-VCH. xxiii, 520 p.
37. Van Eerdenbrugh, B., et al., *Downscaling Drug Nanosuspension Production: Processing Aspects and Physicochemical Characterization*. *AAPS PharmSciTech*, 2009. **10**(1): p. 44-53.
38. Juhnke, M. and R. Weichert. *Nanoparticles of soft materials by high-energy milling at low temperatures*. in *7th World Congress of Chemical Engineering*. 2005. Germany.
39. Petros, R.A. and J.M. DeSimone, *Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010. **9**: p. 615.
40. Rolland, J.P., et al., *Direct fabrication and harvesting of monodisperse, shape-specific nanobiomaterials*. *Journal of the American Chemical Society*, 2005. **127**(28): p. 10096-10100.
41. Eastoe, J. and B. Warne, *Nanoparticle and polymer synthesis in microemulsions*. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1996. **1**(6): p. 800-805.
42. Trotta, M., F. Debernardi, and O. Caputo, *Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification–diffusion technique*. *International journal of pharmaceutics*, 2003. **257**(1-2): p. 153-160.
43. Cavalli, R., et al., *Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles*. *International journal of pharmaceutics*, 1997. **148**(1): p. 47-54.
44. Kasai, H., et al., *A novel preparation method of organic microcrystals*. *Japanese Journal of Applied Physics*, 1992. **31**(8A): p. L1132.
45. Tenorio-Barajas, A.Y., *Fabricación de nanopartículas biopoliméricas para su uso como potencial acarreador de antígenos de dengue*, in *Bionotecnología*. 2012, Universidad Veracruzana: Boca del Río, Ver. Mex. p. 76.
46. Izaguirre-Hernández, I.Y., et al., *Non-Conjugated Chitosan-Based Nanoparticles to Proteic Antigens Elicit Similar Humoral Immune Responses to Those Obtained with Alum*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2017. **17**(1): p. 846-852.
47. Liu, Z., et al., *Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems*. *Advanced drug delivery reviews*, 2008. **60**(15): p. 1650-1662.
48. Chu, L.Y., et al., *Controllable monodisperse multiple emulsions*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007. **46**(47): p. 8970-8974.
49. Jahn, A., et al., *Preparation of nanoparticles by continuous-flow microfluidics*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2008. **10**(6): p. 925-934.
50. Xu, S., et al., *Generation of monodisperse particles by using microfluidics: control over size, shape, and composition*. *Angewandte Chemie*, 2005. **117**(5): p. 734-738.

51. Nie, Z., et al., *Polymer particles with various shapes and morphologies produced in continuous microfluidic reactors*. Journal of the American chemical society, 2005. **127**(22): p. 8058-8063.
52. Kumacheva, E. and P. Garstecki, *Microfluidic reactors for polymer particles*. 2011, Hoboken, N.J.: Wiley. xi, 223 p.
53. Pop, P., W.H. Minhass, and J. Madsen, *Microfluidic Very Large Scale Integration (VLSI)*. 2016: Springer.
54. Kamholz, A.E. and P. Yager, *Theoretical analysis of molecular diffusion in pressure-driven laminar flow in microfluidic channels*. Biophysical journal, 2001. **80**(1): p. 155-160.
55. Bruus, H., *Theoretical microfluidics*. Vol. 18. 2008: Oxford university press Oxford.
56. Temam, R., *Navier-Stokes equations: theory and numerical analysis*. Vol. 343. 2001: American Mathematical Soc.
57. Kuropatenko, V., *New models of continuum mechanics*. Journal of Engineering Physics and Thermophysics, 2011. **84**(1): p. 77-99.
58. Kleinstreuer, C., *Modern Fluid Dynamics: Basic Theory and Selected Applications in Macro- and Micro-Fluidics*. Modern Fluid Dynamics: Basic Theory and Selected Applications in Macro- and Micro-Fluidics, 2010. **87**: p. 1-620.
59. Glatzel, T., et al., *Computational fluid dynamics (CFD) software tools for microfluidic applications—A case study*. Computers & Fluids, 2008. **37**(3): p. 218-235.
60. Chen, N., et al., *CFD simulation of droplet formation in a wide-type microfluidic T-junction*. Journal of Dispersion Science and Technology, 2012. **33**(11): p. 1635-1641.
61. Berthier, J. and K.A. Brakke, *The physics of microdroplets*. 2012, Salem, Massachusetts: John Wiley & Sons. 369.
62. Kirby, B.J., *Micro and nanoscale fluid mechanics*. Transport in microfluidic devices. 2010, New York: Cambridge University Press. 512.
63. Baroud, C.N., F. Gallaire, and R. Danga, *Dynamics of microfluidic droplets*. Lab Chip, 2010. **10**(16): p. 2032-45.
64. Bruus, H., *Theoretical microfluidics*. Oxford master series in physics. 2008, Oxford ; New York: Oxford University Press. 346.
65. Utada, A.S., et al., *Dripping to jetting transitions in coflowing liquid streams*. Phys Rev Lett, 2007. **99**(9): p. 094502.
66. Olsson, E. and G. Kreiss, *A conservative level set method for two phase flow*. Journal of Computational Physics, 2005. **210**(1): p. 225-246.
67. Olsson, E., G. Kreiss, and S. Zahedi, *A conservative level set method for two phase flow II*. Journal of Computational Physics, 2007. **225**(1): p. 785-807.
68. Zimmerman, W.B.J., *Multiphysics Modeling with Finite Element Methods*. Vol. 18. 2006: World Scientific. 422.
69. Li, W., et al., *Microfluidic fabrication of microparticles for biomedical applications*. Chem Soc Rev, 2018. **47**(15): p. 5646-5683.



70. Martinez, A.W., et al., *Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices*. *Anal Chem*, 2010. **82**(1): p. 3-10.
71. Li, X., D.R. Ballerini, and W. Shen, *A perspective on paper-based microfluidics: current status and future trends*. *Biomicrofluidics*, 2012. **6**(1): p. 011301.
72. Land, K.J., *Paper based Diagnostics: Current Status and Future Applications*. 2019: Springer. 225.
73. Berthier, J. and K.A. Brakke, *The physics of microdroplets*. 2012: John Wiley & Sons.
74. Bhargava, K.C., B. Thompson, and N. Malmstadt, *Discrete elements for 3D microfluidics*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. **111**(42): p. 15013-15018.
75. Duarte, L.C., et al., *3D printing of microfluidic devices with embedded sensing electrodes for generating and measuring the size of microdroplets based on contactless conductivity detection*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017. **251**: p. 427-432.
76. Chu, L.Y., et al., *Controllable monodisperse multiple emulsions*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007. **46**(47): p. 8970-4.
77. Fütterer, C., et al., *Injection and flow control system for microchannels*. *Lab on a Chip*, 2004. **4**(4): p. 351-356.
78. Iliescu, C. and F.E. Tay. *Wet etching of glass*. in *CAS 2005 Proceedings. 2005 International Semiconductor Conference, 2005*. 2005. IEEE.
79. Li, X., T. Abe, and M. Esashi, *Deep reactive ion etching of Pyrex glass using SF<sub>6</sub> plasma*. *Sensors and actuators A: Physical*, 2001. **87**(3): p. 139-145.
80. Li, L., T. Abe, and M. Esashi, *Smooth surface glass etching by deep reactive ion etching with SF<sub>6</sub> and Xe gases*. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena*, 2003. **21**(6): p. 2545-2549.
81. Bhattacharya, S., et al., *Studies on surface wettability of poly(dimethyl) siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength*. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 2005. **14**(3): p. 590-597.
82. Eddings, M.A., M.A. Johnson, and B.K. Gale, *Determining the optimal PDMS–PDMS bonding technique for microfluidic devices*. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 2008. **18**(6): p. 067001.
83. Aran, K., et al., *Irreversible, direct bonding of nanoporous polymer membranes to PDMS or glass microdevices*. *Lab on a Chip*, 2010. **10**(5): p. 548-552.
84. Haubert, K., T. Drier, and D. Beebe, *PDMS bonding by means of a portable, low-cost corona system*. *Lab on a Chip*, 2006. **6**(12): p. 1548-1549.
85. Beh, C.W., W. Zhou, and T.-H. Wang, *PDMS–glass bonding using grafted polymeric adhesive–alternative process flow for compatibility with patterned biological molecules*. *Lab on a Chip*, 2012. **12**(20): p. 4120-4127.

86. Satyanarayana, S., R.N. Karnik, and A. Majumdar, *Stamp-and-stick room-temperature bonding technique for microdevices*. Journal of Microelectromechanical Systems, 2005. **14**(2): p. 392-399.
87. Mao, P. and J. Han, *Fabrication and characterization of 20 nm planar nanofluidic channels by glass–glass and glass–silicon bonding*. Lab on a Chip, 2005. **5**(8): p. 837-844.
88. Fultz, B. and J.M. Howe, *Transmission electron microscopy and diffractometry of materials*. 2012: Springer Science & Business Media.
89. Bravman, J.C. and R. Sinclair, *The preparation of cross-section specimens for transmission electron microscopy*. Journal of Electron Microscopy Technique, 1984. **1**(1): p. 53-61.
90. Pennycook, S.J. and P.D. Nellist, *Scanning transmission electron microscopy: imaging and analysis*. 2011: Springer Science & Business Media.
91. Smith, B.C., *Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy*. 2011: CRC press.
92. Schrader, B., *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications*. 2008: John Wiley & Sons.
93. Colthup, N., *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. 2012: Elsevier.
94. Larkin, P., *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. 2017: Elsevier.
95. Hofmann, S., *Auger-and X-ray photoelectron spectroscopy in materials science: a user-oriented guide*. Vol. 49. 2012: Springer Science & Business Media.
96. Briggs, D., *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy CD Wanger, WM Riggs, LE Davis, JF Moulder and GE Muilenberg Perkin-Elmer Corp., Physical Electronics Division, Eden Prairie, Minnesota, USA, 1979. 190 pp. \$195*. Surface and Interface Analysis, 1981. **3**(4): p. v-v.
97. Van Grieken, R. and A. Markowicz, *Handbook of X-ray Spectrometry*. 2001: CRC press.
98. Tenorio-Barajas, A.Y., et al. *Automatization and control of home-made micro injection pumps for a microfluidic system*. in *2016 13th International Conference on Electrical Engineering, Computing Science and Automatic Control (CCE)*. 2016.
99. Berthold, A., P. Sarro, and M. Vellekoop. *Two-step glass wet-etching for micro-fluidic devices*. in *Proceedings of the SeSens workshop*. 2000.
100. Yamabe, T., et al., *Composition Change of Glass Materials in Microlenses Formed by CO2 Laser*. Strain, 2007. **50**: p. 10-7.
101. Calvo, P., *Novel Hydrophilic Chitosan-Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers*. J. Applied Polymer Sci., 1997. **63**: p. 8.
102. Calvo, P., et al., *Chitosan and chitosan/ethylene oxide-propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines*. Pharm Res, 1997. **14**(10): p. 1431-6.

103. Calvo, P., et al., *Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions*. Colloid and Polymer Science, 1997. **275**(1): p. 46-53.
104. Goerg H. Michler, R.G., R Adhikari, G.M. Kim, S. Henning, V. Seydewitz, W. Lebek, *Electron Microscopy of Polymers*. 2008, Germany: Springer. 472.
105. Spalding, K., et al., *Enabling quantification of protein concentration in human serum biopsies using attenuated total reflectance – Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy*. Vibrational Spectroscopy, 2018. **99**: p. 50-58.
106. Deleris, G. and C. Petibois, *Applications of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring*. Vibrational Spectroscopy, 2003. **32**(1): p. 129-136.
107. Duarte, M.L., et al., *An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy*. International Journal of Biological Macromolecules, 2002. **31**(1): p. 1-8.
108. Lawrie, G., et al., *Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS*. Biomacromolecules, 2007. **8**(8): p. 2533-2541.
109. Loutfy, S.A., et al., *Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model*. Advances in Natural Sciences-Nanoscience and Nanotechnology, 2016. **7**(3).
110. Pezolet, M., M. Pigeon-Gosselin, and L. Coulombe, *Laser Raman investigation of the conformation of human immunoglobulin G*. Biochim Biophys Acta, 1976. **453**(2): p. 502-12.
111. Zajac, A., et al., *Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy*. Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2015. **134**: p. 114-120.
112. Bank, P.D. *The Hunt for a Dengue Vaccine*. [Web page] 2016 [cited 2016 25 oct 2016]; Available from: <http://pdb101.rcsb.org/motm/103>.
113. Rothman, A.L., *Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(8): p. 532-43.
114. Dejnirattisai, W., et al., *A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus*. Nat Immunol, 2015. **16**(2): p. 170-7.
115. Gailhardou, S., et al., *Safety Overview of a Recombinant Live-Attenuated Tetravalent Dengue Vaccine: Pooled Analysis of Data from 18 Clinical Trials*. PLoS Negl Trop Dis, 2016. **10**(7): p. e0004821.
116. Vannice, K.S., A. Durbin, and J. Hombach, *Status of vaccine research and development of vaccines for dengue*. Vaccine, 2016. **34**(26): p. 2934-8.