

Javier Miguel Aquerreta Escribano

**Desarrollo de un generador de gotas microscópicas para
el encapsulado de principios activos en multi-regímenes**

**Trabajo de Fin de Grado
dirigido por el Dr. Salvatore Cito
dirigido por la Dra. Sylvana Varela**

Grado en Ingeniería Biomédica



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2021

Índice

1	Introducción.....	1
2	Marco Teórico:	4
2.1	Métodos microfluídicos para crear gotas:.....	4
2.1.1	Método de las corrientes paralelas:	4
2.1.2	Método de las corrientes transversales:	4
2.1.3	Método de las tensiones de alargamiento:	5
2.2	Tipos de regímenes:	5
2.2.1	“Dripping”:	5
2.2.2	Jetting	6
2.3	Parámetros importantes para el experimento:.....	2
2.4	Antecedentes:.....	7
3	Materiales y métodos	9
3.1	Montaje de la plataforma y eliminación de <i>Licking</i> :.....	9
3.2	Análisis de los videos:	12
3.2.1	Explicación del aplicativo:	12
3.2.2	Problemas encontrados en el procesado de los videos:	15
4	Resultados	16
4.1	Resultados brutos:	16
4.2	Tamaños de las gotas:.....	17
4.3	Resultados obtenidos del programa de tratamiento de imagen:.....	18
4.4	Variaciones de las gotas generadas con el <i>capillary number</i> :.....	24
5	Discusión:	28
6	Conclusión:	30
7	Referencias:	31

Abstract:

Las técnicas de generar gotas por microfluidos son un método muy utilizado para el posterior uso de estas gotas en aplicaciones biomédicas como el *drug delivery* o los *biosensores*. En este trabajo se intentará replicar la plataforma ya desarrollada por Benson et al [20] para la generación de gotas microscópicas. Se eligió esta plataforma debido a su bajo coste.

Además de replicar la estructura, se han hecho diferentes experimentos cambiando los parámetros del mismo para obtener diferentes tamaños de gotas y diferentes velocidades de formación. Por último se ha hecho un análisis de estos resultados para tener conclusiones sobre la relación entre la variación de los parámetros del experimento y los resultados obtenidos del mismo.

1 Introducción

La generación de gotas por medio de microfluidos es una técnica muy extendida para diversas aplicaciones en muchos ámbitos, como por ejemplo, la química, donde se usa para generar un espacio con ciertas condiciones para que se dé una reacción específica; las reacciones de síntesis, es decir dos o más reactivos se unen para formar un producto, son las que más se aprovechan de esta técnica [1].

Cabe destacar que el uso de esta técnica, normalmente requiere de equipos que solo están al alcance de grandes empresas o laboratorios, ya que las plataformas de generación de gotas más extendidas pueden llegar a costar hasta 10000 dólares cada unidad [2], excluyendo totalmente de su uso a los laboratorios con menos recursos.

Esta técnica básicamente consiste en la dispersión de un fluido suspendido en otro inmisible, dando así lugar a la formación de gotas en cascada, con un tamaño y una frecuencia controladas.

Hoy en día la aplicación más extendida de esta técnica es la generación de un gran número de compartimentos, o bien para pantallas de muy alto rendimiento o para la síntesis de materiales funcionales compuestos de partículas [3].

1.1. Aplicaciones biomédicas

Este tipo de técnica se utiliza también en diversos campos de la biomedicina, ya que la generación de estas gotas puede llegar a ser muy útil para desarrollar biosensores, simular el medio extracelular o para *drug delivery* [3]. Las principales aplicaciones de esta técnica en biomedicina son las siguientes:

- *Drug delivery*: esta técnica consiste en el transporte de un compuesto farmacéutico a un área específica del cuerpo. Por ello la técnica que se trata en este trabajo es clave para el desarrollo de esta tecnología, ya que con las gotas que se generan se pueden encapsular medicamentos, controlando la biocompatibilidad y la eficiencia portando el mismo. Esta técnica ha demostrado que tiene una eficiencia de carga del medicamento del >96% [4] y que, controlando el tamaño se pueden programar muchas rutas de administración de los fármacos.
- *Simular la matriz extracelular*: Las células *in vivo* están rodeadas de la Matriz Extracelular (ECM), que consiste en un microambiente compuesto de proteínas y polisacáridos. Las propiedades de la ECM afectan de una manera crucial en el comportamiento y fenotipo celular, por lo tanto, para hacer estudios celulares *in vitro* es importante tener un ambiente similar al que se podría encontrar en la ECM.
Para conseguir esto, se ha demostrado que la técnica de generación de partículas por medio de microfluidos es muy útil, ya que se pueden generar partículas de 60 a 200 μm de hidrogel que imitan muchas de las propiedades de la matriz extracelular. Además, esta técnica se ha impuesto como la más adecuada por encima de la bioimpresión o la litografía suave [5].
- *Biosensores*: los biosensores tienen que permitir un correcto análisis de señales y elementos del cuerpo, y para ello tienen que detectar analitos como glucosa, enzimas o ADN convenientemente. Por otra parte, hay muchísima demanda de estos dispositivos para diversas aplicaciones biomédicas.

Las micropartículas que contienen componentes sensitivos creadas a partir de gotas microscópicas han sido usadas para este tipo de sensores, siendo las

partículas basadas en glicol polietileno (PEG) para detectar concentraciones de glucosa [6].

- *Células artificiales:* Para imitar o sustituir algunas propiedades de las células vivientes, es útil generar este tipo de sistemas micrométricos. Estas células artificiales nos permiten indagar más en las funciones celulares como en el origen de la vida, además de servir en terapias de genes, sustitución celular o el “drug delivery” antes comentado.

Las gotas microscópicas pueden servir para producir micropartículas multicompartimentadas que sirven como células artificiales con funciones bien diseñadas. Las estructuras más típicas que se pueden lograr con este tipo de técnica son liposomas, polimerosomas y microcápsulas de polímero [7].

1.2 Parámetros del experimento:

Para poder llevar a cabo las múltiples aplicaciones de las gotas creadas a través de canales de microfluidos, es necesario tener en cuenta los diversos parámetros y variables que tiene el experimento, ya que variar algunos de estos parámetros cambiará el tamaño o la cantidad de gotas resultantes, factores que son claves a la hora de decidir la aplicación en la que se usarán las gotas formadas.

Es por ello por lo que vamos a revisar estos parámetros clave para el control del experimento.

Para empezar, en este experimento se usarán dos fluidos inmiscibles entre ellos para la generación de emulsiones; el fluido que ejercerá como medio lo denominaremos fase continua, ya que es el fluido que no se fragmentará para formar las gotas. El otro fluido, del cual estarán formadas las emulsiones, lo denominaremos fase dispersa.

La viscosidad cinemática (μ) es una propiedad importante de los líquidos que describe la resistencia del líquido al flujo y está relacionada con la fricción interna en el líquido. Este parámetro se mide en $\text{kg}/(\text{m}\cdot\text{s})$ [8]. La viscosidad es uno de los parámetros clave, ya que se ha visto que el contraste entre la viscosidad de la fase continua y la de la fase dispersa es clave para determinar la frecuencia de las gotas formadas. Esta frecuencia depende mucho de este parámetro sobre todo cuando el ratio entre ambas viscosidades es pequeño ($\mu_d/\mu_c < 1$) [9].

La tensión interfacial (γ) entre ambos fluidos es una propiedad en la interfase entre ambos fluidos; se define por la energía de Gibbs por unidad de área de interfaz a temperatura y presión fijas [10]. También se ha demostrado que influye de manera similar a la viscosidad en las características de las gotas que se forman [11].

Por último, otro factor clave en esta técnica es el caudal de los fluidos utilizados, que se ha observado que puede estar altamente relacionado tanto con los tamaños de las gotas como con la frecuencia de su creación [12].

Englobando todos estos factores existe un parámetro que se denomina número capilar y viene definido por esta fórmula:

$$C = \frac{\mu U}{\gamma}$$

Donde como hemos visto μ es la viscosidad y γ es la tensión interfacial; por otra parte, el parámetro U se trata del caudal del fluido. Como es lógico tendremos un número capilar para las dos fases utilizadas, ya que estas fases tendrán viscosidades y caudales diferentes.

Este valor es el parámetro adimensional más importante a la hora de determinar el tipo de gota que se va a formar y ayudará a predecir el régimen de las mismas.

1.3 Objetivos

Tras introducir el fundamento de esta técnica de generación de gotas y repasar las tan diversas aplicaciones de ésta en el campo biomédico podemos describir los diferentes objetivos de este trabajo:

- Desarrollo de una plataforma de generación de gotas funcional evitando por completo fugas de fluidos ("licking") y así poder controlar el flujo de los fluidos que generarán las gotas.
- Abaratar los costes de esta plataforma, de los materiales y del equipo usados para así poder acercar esta tecnología a investigadores con menos recursos.
- Desarrollo de un aplicativo informático capaz de analizar los datos extraídos de los experimentos de generación de gotas, con el fin de poder encontrar una relación entre el caudal de los fluidos ("Capillary Number"), la frecuencia de generación de gotas y el tamaño de las mismas.
- Demostrar la posibilidad de, además de poder formar gotas con nuestra plataforma, poder controlar su ritmo de formación y su tamaño, aspectos importantes para las aplicaciones mencionadas anteriormente.

2 Marco Teórico:

Como hemos comentado antes la técnica de generación de gotas con microfluidos está muy extendida en muchas industrias para diferentes aplicaciones, y esta se basa en el uso de dos flujos independientes y controlados. Normalmente estos fluidos son una fase acuosa que se dispersa en otra fase continua de algún tipo de aceite; aunque también se puede efectuar a la inversa, siendo la fase continua el agua y la dispersa el aceite, y esta es la disposición que seguiremos en este trabajo.

Existen varios tipos de métodos por medio de microfluidos de formación de gotas, y a continuación veremos las principales.

2.1 Métodos microfluídicos para crear gotas:

Los diferentes métodos para crear gotas microscópicas en microfluidos vienen diferenciados por el tipo de geometría y disposición utilizada para la unión de los microcanales, lo que determinará la manera de deformar el líquido de la fase dispersa emergente y por lo tanto la rotura de este para dar como resultado las gotas que se están buscando.

A continuación, veremos las tres principales geometrías para llevar a cabo esta técnica:

2.1.1 Método de las corrientes paralelas:

Este sistema es el más simple para conseguir la formación de gotas. El método consiste en que la fase dispersa es conducida por el canal interior y emerge por el final de este, saliendo a una corriente paralela del líquido que actúa de fase continua.

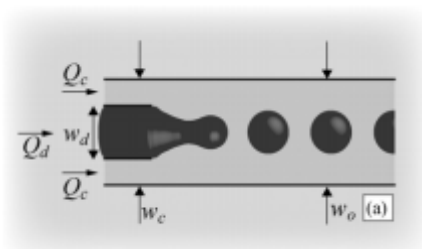


Fig 1 – Esquema del funcionamiento del método de corrientes paralelas [8]

2.1.2 Método de las corrientes transversales:

Uno de los métodos más comúnmente utilizados para implementar esta técnica es el uso de corrientes transversales de las fases continua y dispersa. Esto normalmente se aplica usando juntas de canales de microfluidos en forma de T, es decir la fase dispersa y continua son conducidas por dos canales perpendiculares entre sí, que se cruzan en un punto intermedio, desembocando en un tercer canal en el que se recogerán las gotas formadas.

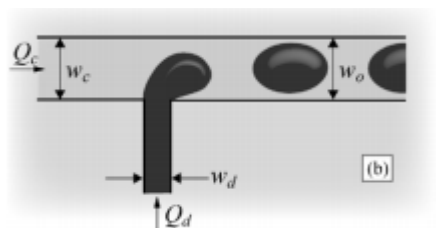


Fig 2 - Esquema del funcionamiento del método de corrientes transversales [8]

2.1.3 Método de las tensiones de alargamiento:

Se trata de una alternativa a los otros dos métodos descritos, en los que las gotas se forman predominantemente por medio de dos corrientes que se encuentran. Este método puede crear eficientemente "chorros" o "jets", un tipo de régimen de gotas que posteriormente veremos, y pequeñas gotas.

Una de las técnicas que aprovecha este método es la retirada selectiva [14], en el que una interfaz líquida plana es deformada en una cúspide y después retirada por un capilar mediante la aplicación de una corriente de succión.

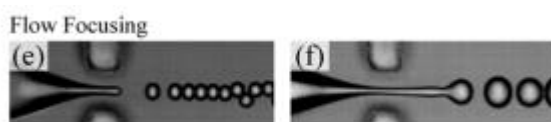


Fig 3 – Imagen del método de tensiones de alargamiento[8].

En la Figura 4 podemos ver la geometría que se usará en este trabajo. Esta geometría se basa básicamente en la fase continua circulando por un tubo de sección cuadrada y la fase dispersa circulando por un capilar circular que está dentro del tubo de sección cuadrada. La zona de unión entre ambos fluidos se sitúa en la salida del primer tubo de sección circular (ver Sección 3).

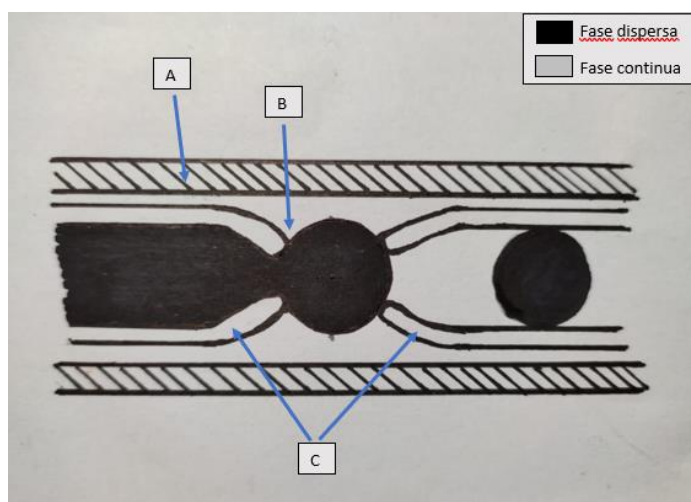


Fig 4 – Esquema de la geometría usada en este experimento. A) Tubo de sección cuadrada. B) Zona de unión entre ambas fases. C) Tubos de sección circular.

2.2 Tipos de regímenes:

A la hora de aplicar esta técnica de creación de gotas por microfluidos se puede llegar a observar dos tipos de régimen de gotas principales, el "dripping" y el "jetting". Que se llegue a observar un régimen o el otro depende de la velocidad de los fluidos, las características del fluido, las propiedades de los materiales utilizados y demás parámetros propios del experimento que se está llevando a cabo o ambientales. También se puede usar el Ca para identificar el régimen correspondiente.

2.2.1 "Dripping":

Este primer régimen da como resultado gotas uniformes a un ritmo constante que no ocupan todo el canal en el que son formadas. Esto es gracias a que la diferencia de presión entre los dos fluidos no es muy elevada y el efecto de la viscosidad domina las fuerzas interfaciales.

Hay una variante de este régimen que se da cuando la gota formada obstruye por completo el canal donde ambos fluidos se juntan dando un incremento de la presión de la fase continua hasta que la gota es formada. Este subtipo de régimen se llama "squeezing" y se da cuando las velocidades de los fluidos no son muy elevadas.

Por lo tanto, el "dripping" lo conseguimos cuando las velocidades de los fluidos son lo suficientemente grandes como para evitar que la fase dispersa obstruya el canal y se dé "squeezing". Es por ello, que el "dripping" da como resultado siempre gotas de un tamaño menor que el del canal de unión, además de una presión menor para que la fase continua pueda circular con más facilidad, lo que permite un mejor control del tamaño de las gotas [15].

2.2.2 Jetting

Este otro régimen se alcanza normalmente con un incremento de las velocidades de ambas fases, continua y dispersa. Además, da como resultado gotas mucho más pequeñas que el canal de unión, y por supuesto, también gotas mucho más pequeñas que las que se pueden observar con el otro régimen ya explicado.

Lo que se obtiene con este tipo de régimen es un largo hilo de la fase dispersa penetrando en el canal principal y dando gotas de unas pocas micras de tamaño en una zona bastante más alejada de la unión de ambas fases que en los otros regímenes. Por ello el resultado serán muchas gotas de tamaños muy pequeños [16].

Para conseguir la transición de "dripping" a "jetting" existen dos formas[17]:

- La primera forma se trata del incremento de la velocidad de la fase continua, ya que a la vez que este parámetro aumenta, las gotas se iban volviendo más pequeñas hasta conseguir un "jet".
- La segunda forma es efectiva a caudales más altos, y se trata de controlar la inercia relativa del fluido en fase dispersa a la presión del capilar.

Este cambio de régimen se puede producir en cualquiera de las geometrías ya explicadas, aunque las condiciones para que este cambio se dé variarán según el tipo de geometría (Figura5).

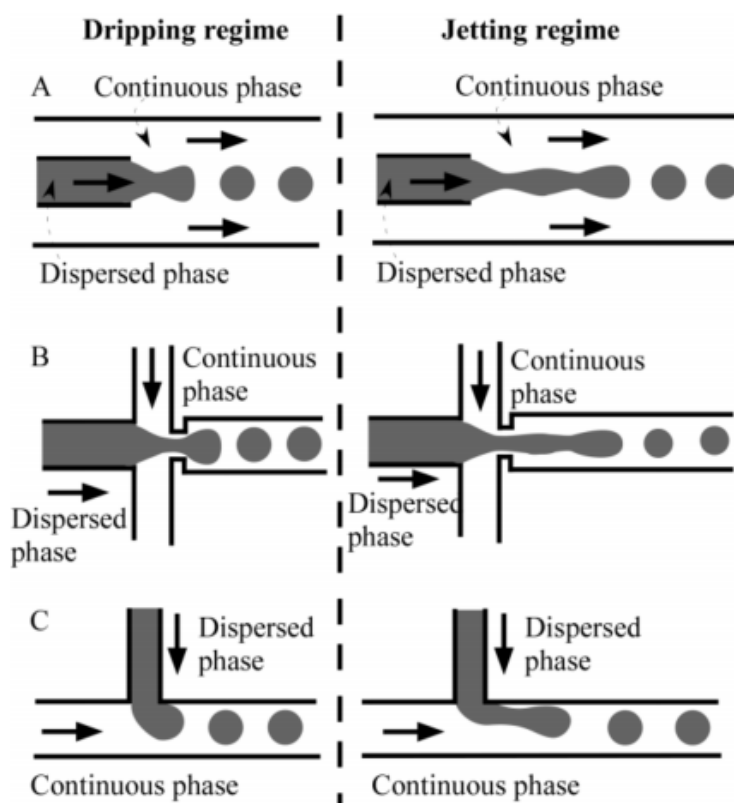


Fig 5 – Esquemas de cómo se verían los regímenes de “dripping” y “jetting” en diferentes geometría.

2.3 Antecedentes:

Como hemos visto en la introducción, las aplicaciones de esta técnica al campo biomédico son diversas y muy relevantes, ya que permiten la realización de técnicas de vanguardia que nos sugieren un futuro prometedor en este campo de la salud.

Por ello, ahora repasaremos algunos ejemplos de la utilización de esta técnica para desarrollar algunas de las aplicaciones ya mencionadas anteriormente.

Por ejemplo, se ha observado que este método de generar partículas por medio de microfluidos, es capaz de crear micropartículas (de alrededor de 114 μm) que pueden usarse de una manera bastante eficiente para el mencionado “drug delivery”. Esto se ha conseguido encapsulando estas micropartículas en vesículas lipídicas, consiguiendo así un grado de carga de medicamento del 19%. Por lo tanto, gracias a su biocompatibilidad y las ventajas ya dichas, este método se postula como uno de los mejores para el desarrollo de métodos de “drug delivery” [18].

Esta técnica también ha demostrado ser muy fiable a la hora de aislar células para un posterior análisis (Figura 6). Se ha demostrado que permite un análisis rápido y de alto rendimiento en aspectos de la célula, como la genética o las proteínas. Esto permite la detección de células tumorales, y analizar su respuesta y resistencia a los medicamentos [19].

Desarrollo de un generador de gotas microscópicas para el encapsulado de principios activos en multi-regímenes

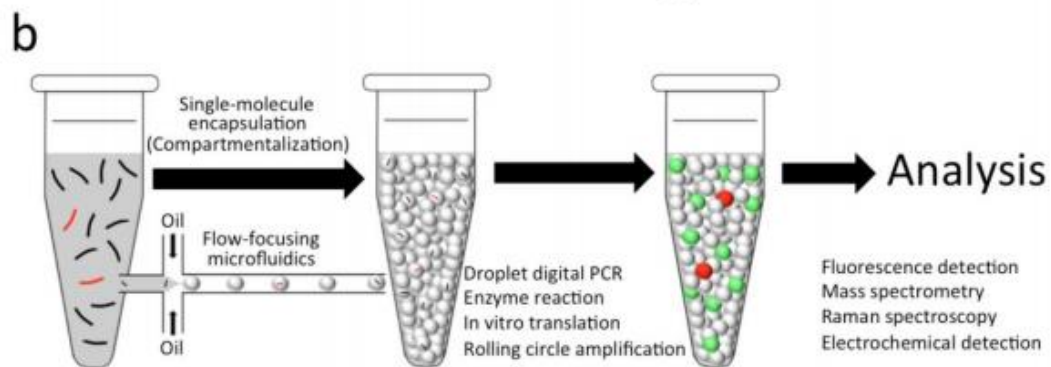


Fig 6 – Proceso de encapsulamiento de las moléculas para su posterior análisis biológico[19].

Con estos dos ejemplos, vemos que esta técnica es clave para el avance en varios campos de investigación biomédica y, que además el tipo de gota generada es importante también para el tipo de aplicación a desarrollar.

3 Materiales y métodos

Para el diseño y montaje de la plataforma necesaria para este experimento se ha tomado como referencia el trabajo de *Benson et al*[20] que consiguieron formar gotas de una manera controlada por medio de microfluidos a partir de materiales muchísimo más accesibles que los chips normalmente utilizados para estas técnicas de microfluidos (Figura 7).



Fig 7 – Ejemplo de chip de microfluidos.

Para el experimento se utilizaron dos fluidos, como fase continua se usó agua desionizada, que tiene 997 Kg/m^3 de densidad y una viscosidad cinemática de 1 cst. En el caso de la fase dispersa se usó una disolución al 2% de volumen de surfactante span 80 en aceite comertcial johnsson&jhonsson®, que tiene una viscosidad cinemática de 32.23 cst. La propiedad más importante de estos fluidos es que son inmiscibles entre ellos, lo que nos permitirá la formación de las gotas,

3.1 Montaje de la plataforma y eliminación de *Licking*:

En el trabajo de *Benson et al* [16] se puede observar que para la formación de gotas utilizan una estructura formada por un *Flangeless Fitting System* (FFS) o sistema de montaje sin bridas que sirve como andamio y punto de unión para los diferentes tubos utilizados para la creación de gotas. Este FFS es usado formando dos estructuras en forma de "T"; esta forma de "T" se consigue conectándolos como se ve en la Figura 8.

Por otra parte, los tubos utilizados serán, un tubo de vidrio de sección cuadrada interna de $900 \mu\text{m}$ y $180 \mu\text{m}$ de pared por donde entrará y circulará la fase continua de nuestro experimento, y dos capilares de sección circular interna de $700 \mu\text{m}$ de diámetro, en el que uno servirá como entrada para la fase dispersa y el otro para recoger las gotas ya formadas (Figura 8).

La disposición de estos tubos es la siguiente: el tubo de sección cuadrada envuelve a los otros dos, por lo tanto, la fase continua irá por fuera, mientras que los dos tubos circulares irán por dentro del tubo cuadrado y sus puntas se situarán a una distancia aproximada de 1 mm entre ellas. Los tubos circulares además se estrecharán para convertirse en boquillas con pico en la punta y obligar a la fase dispersa a salir del tubo a velocidades más altas.

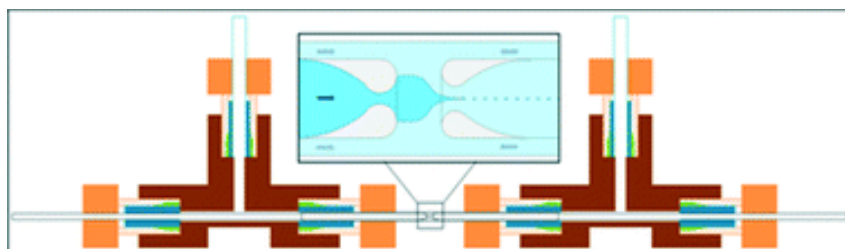


Fig 8 - Disposición usada en la referencia [20]

Uno de los objetivos de este trabajo es replicar el ensamblaje propuesto por *Benson et al.*[20] Para el montaje de la estructura hubo algunos problemas debido a que nuestra referencia no especificaba algunos detalles del ensamblaje, como por ejemplo la inserción de los líquidos a los tubos o la manera de estrechar las puntas de los capilares de sección circular; por lo tanto, se probaron varias maneras de hacer entrar los fluidos a la estructura y de apretar las juntas del FFS para evitar fugas o "Licking".

Para esta tarea se utilizaron tubos elásticos de plástico, de la marca Tygon® y del tipo E-3603. También se usaron otro tipo de tubos de plástico con un diámetro que se ajustaba bien al diámetro de la jeringuilla utilizada para inyectar los fluidos ("PEEK Tubing Green 1/16" OD x .030" ID x 5ft").

En el caso de las juntas del FFS para que los tubos se ajustaran y no hubiera pérdidas se utilizaron unas gomas de sección cónica que al apretar la junta se cierran, llamadas "P-300 ferrule".

Para comprobar el correcto funcionamiento de la plataforma se usaron dos colorantes alimenticios y se inspeccionó visualmente su llegada sin pérdidas al interior de los capilares correspondientes. Uno de los principales problemas que se encontraron fue el retroceso de uno de los fluidos (el que simulaba la fase continua) debido a una gran presión en la junta del tubo cuadrado con una de las "T"; para arreglar esto aflojamos levemente la presión de esta junta para así adaptarla mejor al tubo cuadrado.

Para unir los tubos de plástico a los que se insertan la fase dispersa y el capilar por donde debe circular se usó una conexión similar a las "T", pero en este caso con solo una entrada y una salida. Además, para empalmar los diferentes tubos de plástico se usó teflón.

Para apoyar el montaje de la plataforma se diseñó y fabricó un soporte de metacrilato. De esta forma se pudo fijar los diferentes microcapilares y así evitar posibles desequilibrios y rupturas. Además, se hizo una ventana en el metacrilato en el lugar donde las gotas se formarían para facilitar la visualización sin artefactos de por medio.

Desarrollo de un generador de gotas microscópicas para el encapsulado de principios activos en multi-regímenes

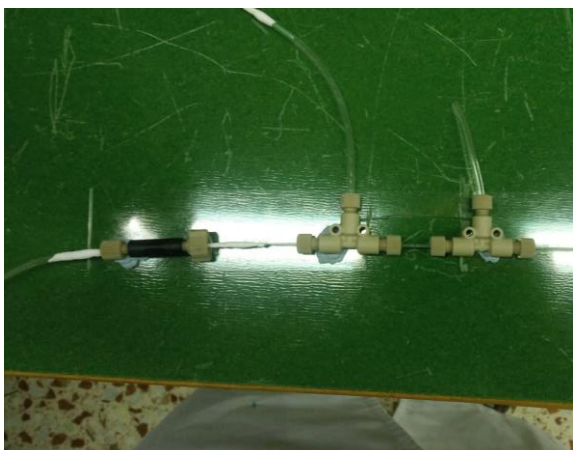


Fig 9 - Disposición final de la estructura

Para la inyección de las dos fases de nuestro experimento se utilizaron dos bombas de jeringa Fusion Touch (Figura 10); el motivo de usar dos es que la velocidad de la fase continua siempre ha de ser mayor, por lo tanto, necesitamos una bomba para inyectar cada una de las fases.



Fig 10- Bomba Fusion Touch utilizada para el experimento

Con toda la plataforma para la generación de gotas ya montada, para la visualización de las diferentes pruebas con diferentes caudales, se utilizó un microscopio Motic AE-30/31 (Figura 11), más concretamente el objetivo x2 del mismo, además del software que le acompaña para permitirnos captar en video lo que graba la cámara del microscopio. Además, se utilizó la debida calibración para este objetivo para así poder realizar medidas precisas de tamaños y longitudes.



Fig 11- Microscopio Motic utilizado para visualizar los resultados.

Finalmente, tras eliminar todas las fugas que aparecieron se consiguió visualizar la formación de gotas en el lugar esperado.

3.2 Análisis de los videos:

Una vez conseguido que la plataforma funcionara sin pérdidas y haber visto que la dinámica de formación de las gotas se asemejaba a lo esperado, se tomaron varias medidas variando los diferentes flujos volumétricos de los fluidos, para así cambiar el “*capillary number*”, y por lo tanto ensayar diferentes regímenes de formación de gotas.

Se tomaron videos para poder medir posteriormente la frecuencia de generación de gotas. Además, se hicieron capturas de pantalla para, más tarde y gracias a la correcta calibración del microscopio y las herramientas del software que lo acompaña, poder medir el diámetro de las gotas formadas.

Para el análisis de los videos resultantes, se desarrolló un aplicativo con el programa Matlab capaz de analizar y medir la frecuencia de formación de gotas; con el fin de medir el tamaño de las gotas se usó la calibración de la cámara del microscopio que nos permitía saber el diámetro de las mismas.

3.2.1 Explicación del aplicativo:

La funcionalidad principal del programa es la de binarizar y postprocesar cada imagen o “frame” de los videos generados con el microscopio a fin de que únicamente se vea la gota que se ha creado, y así por lo tanto, obtener la evolución temporal de los píxeles blancos (las gotas); por ello, cada pico de nuestro gráfico será una gota y así podremos medir fácilmente la frecuencia a la que estas se forman.

A continuación, explicaré paso a paso cada línea y el funcionamiento de este código de Matlab para medir la frecuencia de formación de las gotas.

Primero, como vemos en la Figura 12, se carga la imagen en una variable para posteriormente mostrar el primer *frame* del video y seleccionar un rectángulo, que será la región de interés a analizar; esta región de interés deberá ser la zona donde se están generando las gotas. El programa no continuará con su ejecución hasta que el rectángulo de interés no sea seleccionado.

Desarrollo de un generador de gotas microscópicas para el encapsulado de principios activos en multi-regímenes

```
dropletVid = VideoReader('200-150.mp4')  
  
imshow(read(dropletVid,1));  
h = imrect;  
roi = wait(h); % rectangle of interes  
startImage = imcrop(rgb2gray(read(dropletVid,1)), roi);
```

Fig 12 – líneas de Código para cargar el video y seleccionar el área a analizar.

Como paso siguiente, se obtiene el valor límite para la binarización de las imágenes con el método "sobel"; además se aplica más tarde este valor para obtener una máscara binaria que contendrá la gota segmentada (Figuras 13 y 14).

```
[~,threshold] = edge(startImage,'sobel');  
fudgeFactor = 0.5;  
BWs = edge(startImage,'sobel',threshold * fudgeFactor);  
imshow(BWs)|
```

Fig 13 – Código para obtener el valor umbral para la segmentación de la gota.



Fig 14 – Gota segmentada.

Posteriormente se mejorará la máscara para que únicamente deje como píxeles en blanco la gota que se busca. Para ello se usarán diversas funciones (Figura 15) que tiene MatLab para el tratamiento de la imagen. Estas funciones son:

- *Imdilate()*: Esta función dilatará los bordes, evitando así posibles huecos en estos que podrían hacer que el programa no detectará bien las gotas.
- *Imfill()*: Con ésta se consigue que los huecos de dentro de nuestra imagen dilatada se rellenen.
- *Imclearborder()*: Esta función elimina los objetos anclados al borde de la imagen (en nuestro caso los contornos de los tubos) para así centrarnos en los objetos de interés.
- *Imerode()*: En nuestro caso erosionamos la imagen dos veces con un elemento diamante para así suavizarla.

Usando estas cuatro funciones se consigue una imagen segmentada con las gotas a detectar perfectamente diferenciadas del resto de la imagen (figura x), que queda en negro (Figura 16).

Desarrollo de un generador de gotas microscópicas para el encapsulado de principios activos en multi-regímenes

```
se90 = strel('line',3,90); se0 = strel('line',3,0);
BWsdil = imdilate(BWs,[se90 se0]); imshow(BWsdil); title('Dilated Gradient Mask')
BWdfill = imfill(BWsdil,'holes'); imshow(BWdfill); title('Binary Image with Filled Holes')
BWnobord = imclearborder(BWdfill,4); imshow(BWnobord); title('Cleared Border Image')
seD = strel('diamond',1); BWfinal = imerode(BWnobord,seD); BWfinal = imerode(BWfinal,seD);
imshow(BWfinal); title('Segmented Image');
```

Fig 15 – Código para obtener la gota segmentada perfectamente.

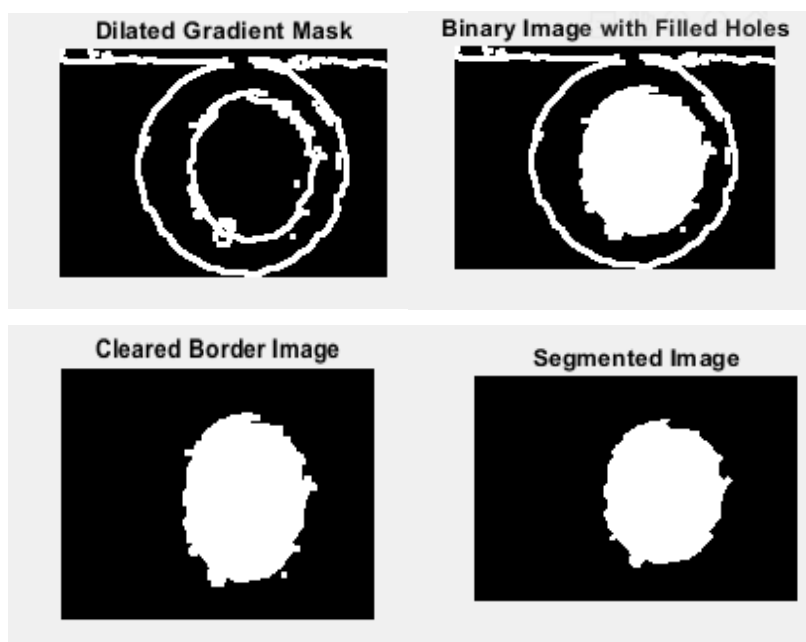


Fig 16 – Evolución de la segmentación de un frame.

El proceso descrito anteriormente irá dentro de un bucle en el que en cada iteración del mismo analizará un frame y obtendrá la cantidad de píxeles que definen la gota. Por último, como he comentado al principio, la frecuencia de gotas se medirá en gotas por segundo gracias a un gráfico que obtenemos al final del proceso.

```
Volume(i)= sum(SegmentedImages(:, :, i), 'all');
time(i)=i*1/dropletVid.FrameRate;
end
close(video); %close the file
plot(time, Volume/max(Volume))
```

Fig 17- Código para calcular el tiempo y los píxeles en blanco de cada frame y para imprimir por pantalla el gráfico tiempo/píxeles blancos.

El gráfico que generamos al final de nuestro programa (Figura 18) nos permitirá calcular la frecuencia de gotas ya que cada pico que encontremos en el será una gota generada y por lo tanto el número de picos encontrados entre el tiempo total (eje x de nuestro gráfico) será la frecuencia de formación de gotas.

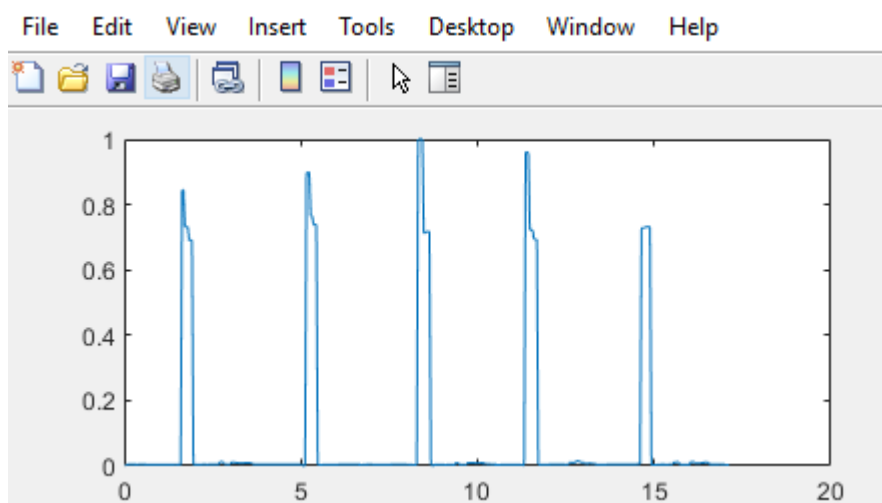


Fig 18 – Ejemplo de gráfico de frecuencia de gotas, como se ha explicado cada pico es una gota.

3.2.2 Problemas encontrados en el procesamiento de los videos:

Tras aplicar el programa de tratamiento de imagen a todos los videos obtenidos de nuestros experimentos, se encontraron problemas en la detección de algunas gotas en los videos en los que la frecuencia de formación de estas era muy elevada; estos problemas eran debidos a una cantidad insuficiente de *frames* por segundo (fps) en los videos (30 fps), lo que hacía que algunas de las gotas pasaran desapercibidas para el programa, resultando un gráfico de frecuencia de gotas incorrecto.

Para corregir este error se probaron algunos métodos como agrandar la región de interés descrita o cambiar algunos valores umbral de la segmentación, pero estos métodos no obtuvieron resultados convincentes.

Por ello, finalmente, para poder obtener resultados de los experimentos con una frecuencia muy elevada correctamente, tuvimos que cambiar la cámara de obtención de videos acoplada a un microscopio, por una capaz de grabar más *frames* por segundo (>1000 fps). Con esta cámara sí que el posterior procesado daba resultados correctos de frecuencia de gotas, detectando todas y cada una de ellas; la tasa de frames a la que se grabaron estos nuevos experimentos fue de 100 fps.

Cabe destacar que el uso de esta nueva cámara tuvo una desventaja, el software que la acompañaba era más básico y no disponía de una calibración para poder medir tamaños de gotas, y por lo tanto de estos videos solo pudimos obtener los datos de frecuencia de formación.

Por último, los datos obtenidos, además de las variables del experimento (*Capillary number*, caudal de los fluidos, etc...) fueron añadidos a una hoja de cálculo para poder obtener diferentes gráficas comparando estos valores.

4 Resultados

4.1 Resultados brutos:

Los primeros resultados que se pueden empezar a analizar son los propios videos en crudo que obtenemos de la grabación del microscopio durante el experimento, en ellos podemos observar ya diferencias en las gotas formadas con los diferentes caudales que se van probando.

Tabla 1 - Diferentes Experimentos realizados en el trabajo.

Caudal fase continua [$\mu\text{l}/\text{min}$]	Caudal fase dispersa [$\mu\text{l}/\text{min}$]	capillary number (fase continua)	capillary number (fase dispersa)
200	2	200	64,46
200	20	200	644,6
200	100	200	3223
100	2	100	64,46
100	5	100	161,15
100	50	100	1611,5
20	5	20	161,15

Primeramente, en la Figura 19, observaremos los diferentes resultados con un caudal de la fase continua de $100 \mu\text{L}/\text{min}$ variando el caudal de la fase dispersa (siempre siendo menor que el de la fase continua).

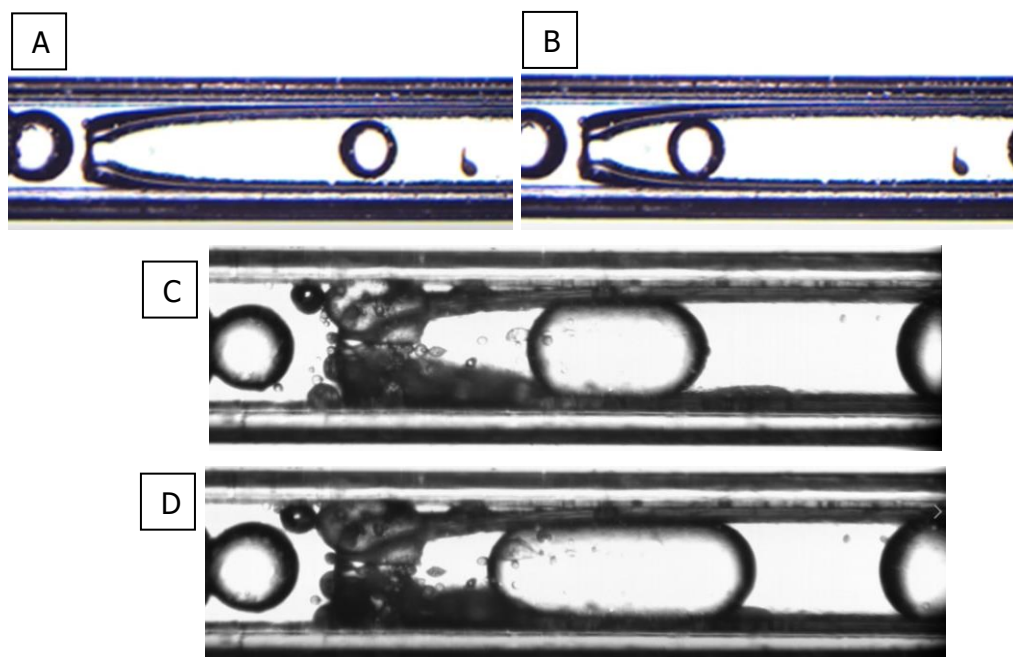


Fig 19 – Frames de los experimentos hechos con un caudal de la fase continua de $100 \mu\text{L}/\text{min}$. A) Caudal de la fase dispersa: $2 \mu\text{L}/\text{min}$. B) Caudal de la fase dispersa: $5 \mu\text{L}/\text{min}$. C) Caudal de la fase dispersa: $50 \mu\text{L}/\text{min}$. D) Caudal de la fase dispersa: $2 \mu\text{L}/\text{min}$.

Desarrollo de un generador de gotas microscópicas para el encapsulado de principios activos en multi-regímenes

A continuación, en la Figura 20, veremos también la progresión de los diferentes experimentos tomados con un caudal de la fase continua de $200 \mu\text{L}/\text{min}$ mientras el caudal de la fase dispersa va cambiando.

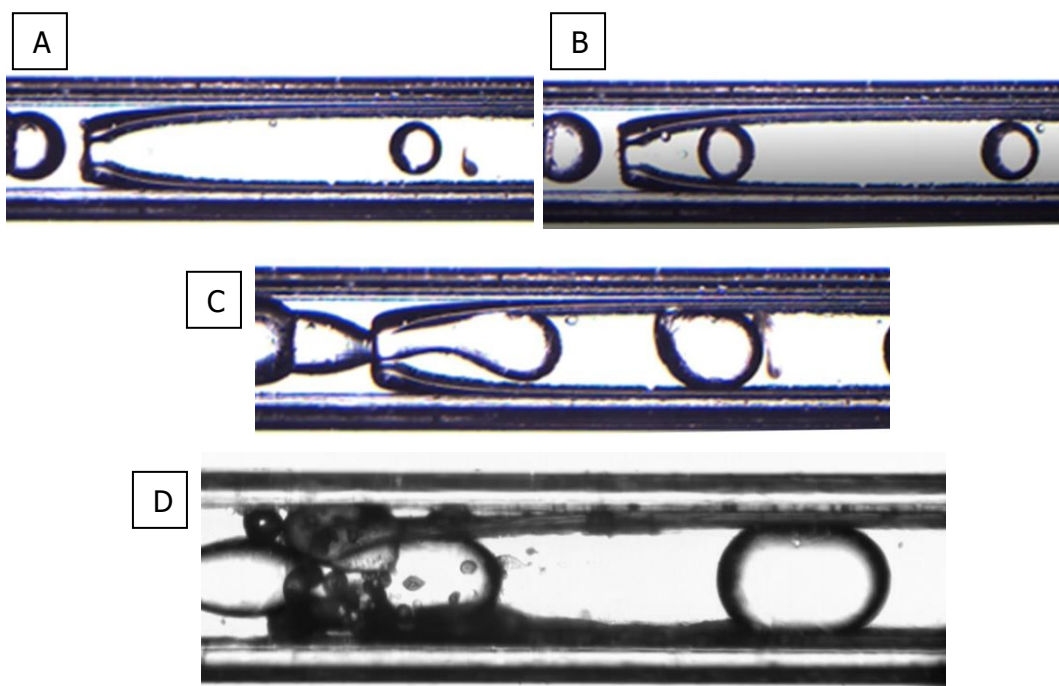


Fig 20 - Frames de los experimentos hechos con un caudal de la fase continua de $200 \mu\text{L}/\text{min}$. A) Caudal de la fase dispersa: $2 \mu\text{L}/\text{min}$. B) Caudal de la fase dispersa: $20 \mu\text{L}/\text{min}$. C) Caudal de la fase dispersa: $50 \mu\text{L}/\text{min}$. D) Caudal de la fase dispersa: $100 \mu\text{L}/\text{min}$.

4.2 Tamaños de las gotas:

Posteriormente, analizamos los diferentes tamaños de las gotas generadas para cada experimento, como se ha dicho en la anterior sección, gracias a la calibración del software de la cámara que incorporaba el microscopio para su aumento de $\times 2$; estos resultados serán útiles más adelante para compararlos con diferentes variables del experimento.

Ahora veremos los diferentes tamaños medidos con dicho software (Figura 21):



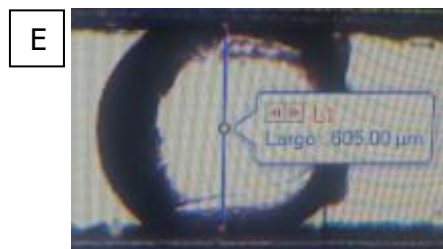


Fig 21 – Tamaños de las gotas medidos con el software descrito. A) Diámetro de gota formada con un caudal de fase continua de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ y fase dispersa de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. B) Diámetro de gota formada con un caudal de fase continua de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ y fase dispersa de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. C) Diámetro de gota formada con un caudal de fase continua de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ y fase dispersa de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. D) Diámetro de gota formada con un caudal de fase continua de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ y fase dispersa de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. E) Diámetro de gota formada con un caudal de fase continua de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ y fase dispersa de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Los tamaños que no observamos en la Figura 21 son debidos a que las imágenes correspondientes a esos experimentos fueron tomadas con otra cámara que era capaz de grabar con una mayor tasa de fotogramas por segundo y que no permitía medir, cosa que si hacía la anterior. Aun así, este problema fue solucionado gracias a que el tamaño de las gotas superaba el tamaño del tubo donde se formaban, ya que estas se alargaban debido al choque con las paredes del tubo; por lo tanto, podemos asumir que el tamaño de estas gotas es mayor a 700 μm , el tamaño del tubo circular.

Los datos obtenidos fueron incluidos en una hoja de cálculo para el posterior análisis.

4.3 Resultados obtenidos del programa de tratamiento de imagen:

Posteriormente, se cargaron uno por uno todos los videos obtenidos de los experimentos en el aplicativo desarrollado en Matlab para así poder obtener la frecuencia de generación de gotas para cada uno de los casos.

A continuación, en la figura x, observaremos los datos crudos que salieron del programa para cada caso de caudales de los fluidos; estos datos son un gráfico para cada experimento que relaciona el tiempo con el volumen de píxeles de gotas normalizado en cada *frame*. Esta información nos permitirá obtener el dato de frecuencia.

Primero observaremos la progresión para los experimentos en los que el caudal de la fase continua es de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Desarrollo de un generador de gotas microscópicas para el encapsulado de principios activos en multi-regímenes

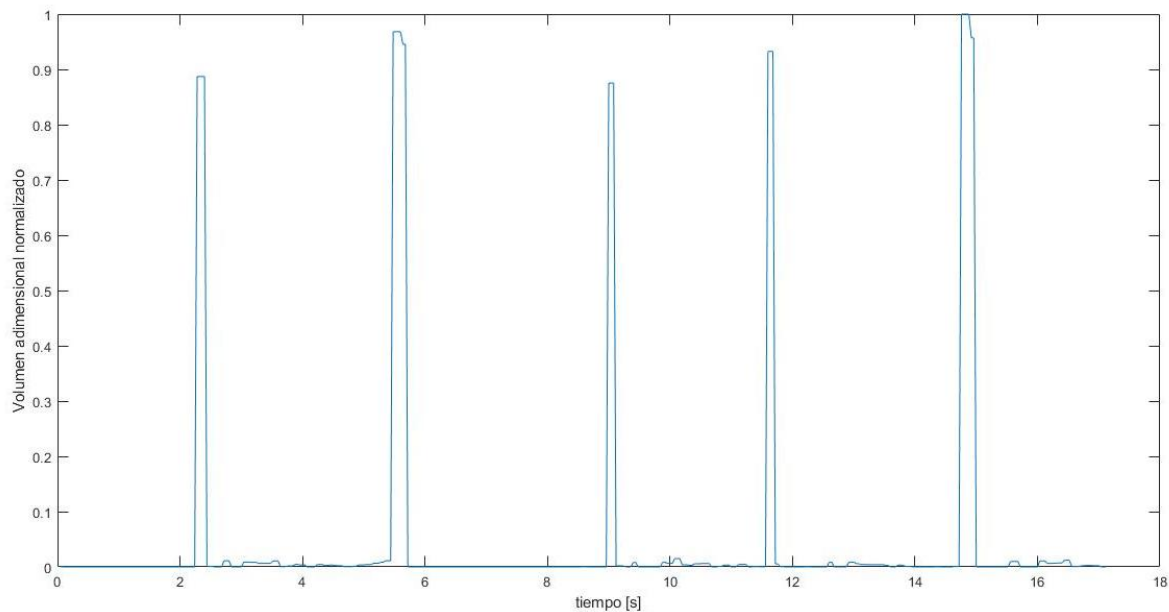


Fig 20 – Gráfico resultante del experimento con un caudal de la fase continua de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ y para la fase dispersa 2 $\mu\text{L}/\text{min}$.

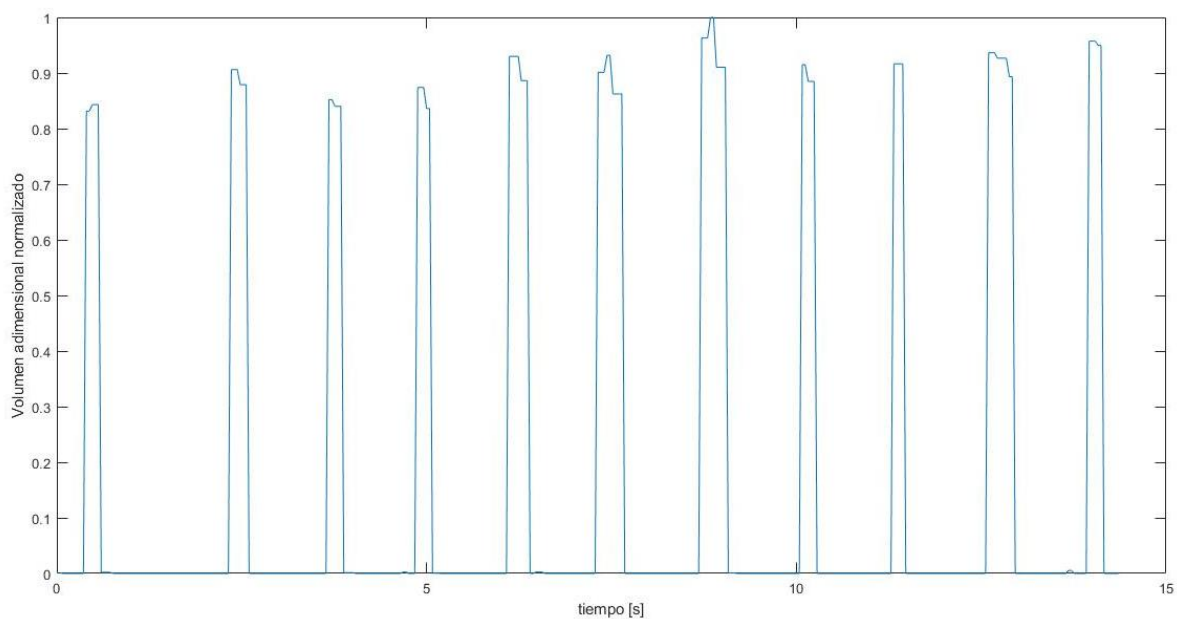


Fig 21 - Gráfico resultante del experimento con un caudal de la fase continua de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ y para la fase dispersa 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Desarrollo de un generador de gotas microscópicas para el encapsulado de principios activos en multi-regímenes

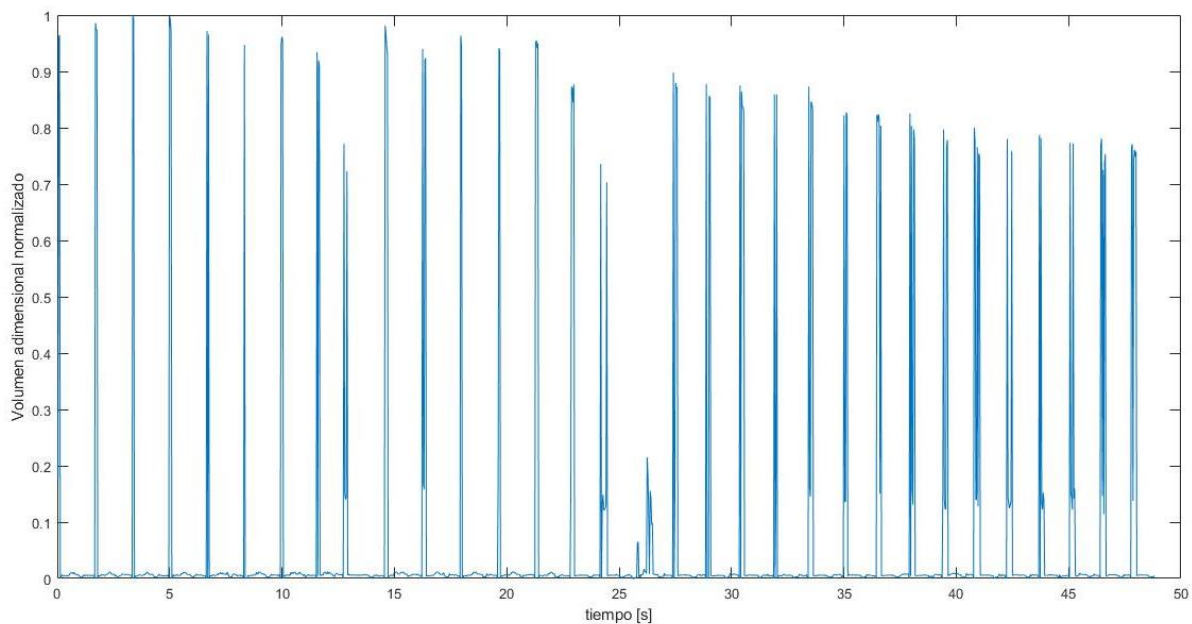


Fig 22 - Gráfico resultante del experimento con un caudal de la fase continua de 100 µL/min y para la fase dispersa 50 µL/min.

Ahora veremos esta misma progresión de gráficos, pero para los experimentos en los que se usó un caudal de la fase continua de 200 µL/min.

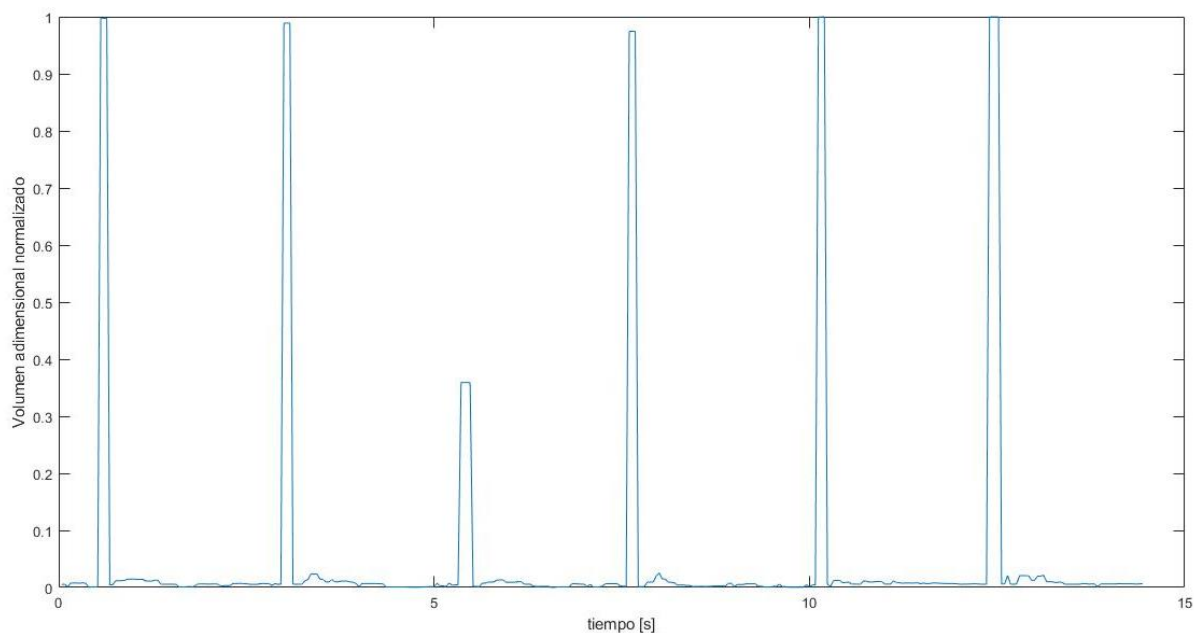


Fig 23 - Gráfico resultante del experimento con un caudal de la fase continua de 200 µL/min y para la fase dispersa 2 µL/min.

Desarrollo de un generador de gotas microscópicas para el encapsulado de principios activos en multi-regímenes

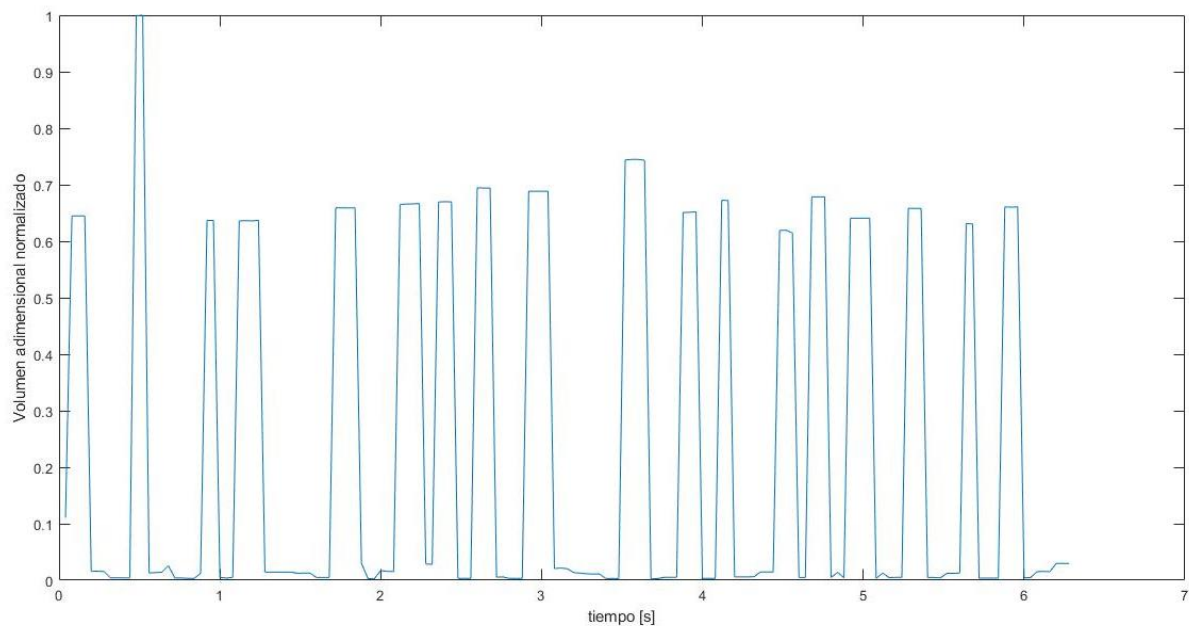


Fig 24 - Gráfico resultante del experimento con un caudal de la fase continua de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ y para la fase dispersa 20 $\mu\text{L}/\text{min}$.

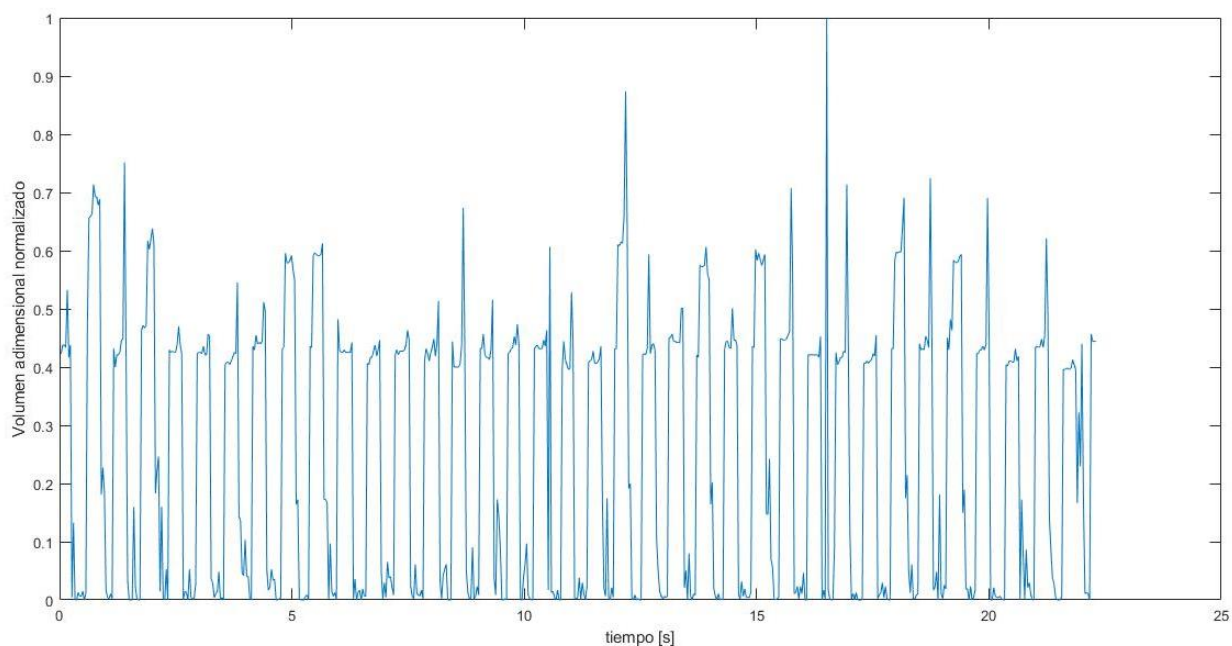


Fig 25 - Gráfico resultante del experimento con un caudal de la fase continua de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ y para la fase dispersa 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Con estos datos, tanto de tamaños como de frecuencia, obtenidos se hicieron algunas comparaciones con parámetros de los fluidos, para así poder encontrar relaciones que nos permitieran deducir conclusiones útiles para futuros usos de esta técnica.

4.4 Evolución de las gotas incrementando el caudal de la fase dispersa:

Para empezar este análisis se tomaron los datos para los dos principales caudales utilizados para la fase continua (100 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 200 $\mu\text{L}/\text{min}$) y se observó la evolución que seguían, aumentando el caudal utilizado para la fase dispersa.

En primer lugar, veremos la progresión que siguen los datos obtenidos para el caudal de la fase continua de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ y para los caudales de la fase dispersa de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ (figura x):

Tabla 2 - Valores de frecuencia de formación de gotas y tamaño de estas para un caudal de la fase continua de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Caudal fase continua [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Caudal fase dispersa [$\mu\text{L}/\text{min}$]	Frecuencia de formación de gotas [gotas/s]	Tamaño de gotas [μm]
100	2	0,34	425
100	5	0,78	505
100	50	2,1	>700

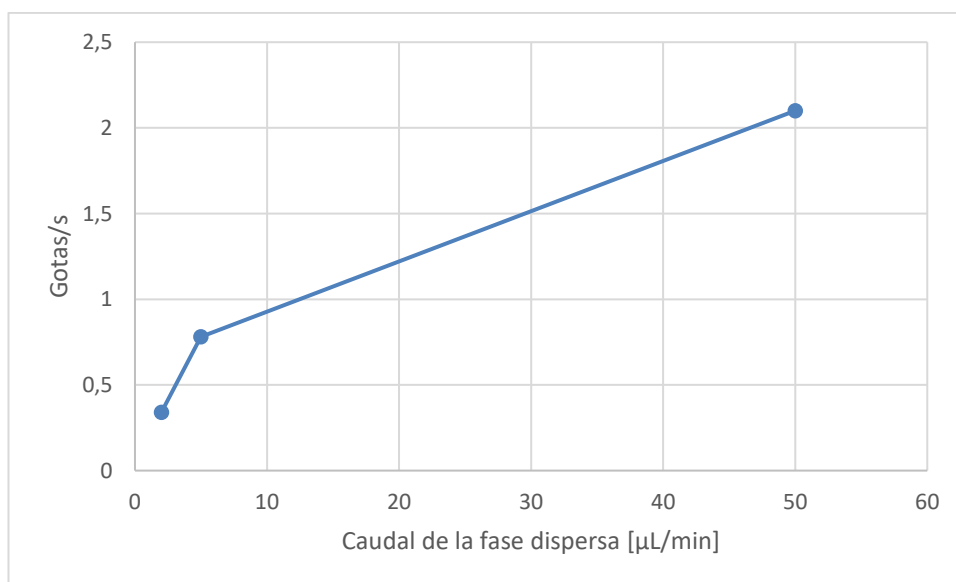


Fig 26 – Gráfico comparando, en el eje x el caudal de la fase dispersa en $\mu\text{L}/\text{min}$ y la frecuencia de formación de gotas en gotas/segundo en el eje y; el caudal de la fase continua es 100 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Desarrollo de un generador de gotas microscópicas para el encapsulado de principios activos en multi-regímenes

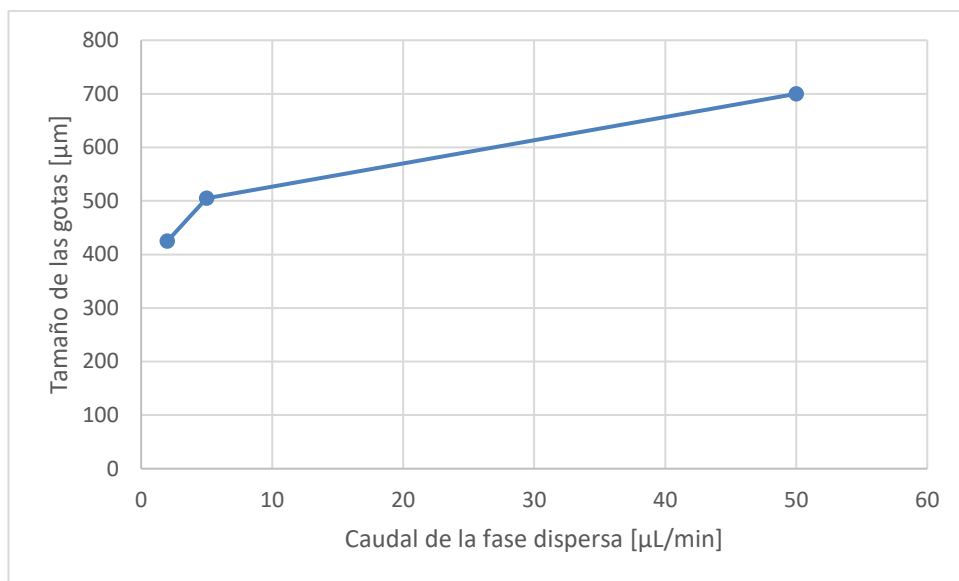


Fig 27 - Gráfico comparando, en el eje x el caudal de la fase dispersa en µL/min y el tamaño de las gotas en µm en el eje y; el caudal de la fase continua es 100 µL/min.

En segundo lugar, analizaremos, también de la misma manera, los datos obtenidos de frecuencia y tamaño, pero esta vez con un caudal de la fase continua de 200 µL/min y unos caudales de la fase dispersa de 2 µL/min, 20 µL/min y 100 µL/min.

Tabla 3 - Valores de frecuencia de formación de gotas y tamaño de estas para un caudal de la fase continua de 100 µL/min.

Caudal fase continua [µl/min]	Caudal fase dispersa [µl/min]	Frecuencia de formación de gotas [gotas/s]	Tamaño de gotas [µm]
200	2	0,41	490
200	20	3,5	510
200	100	4,84	>700

Desarrollo de un generador de gotas microscópicas para el encapsulado de principios activos en multi-regímenes

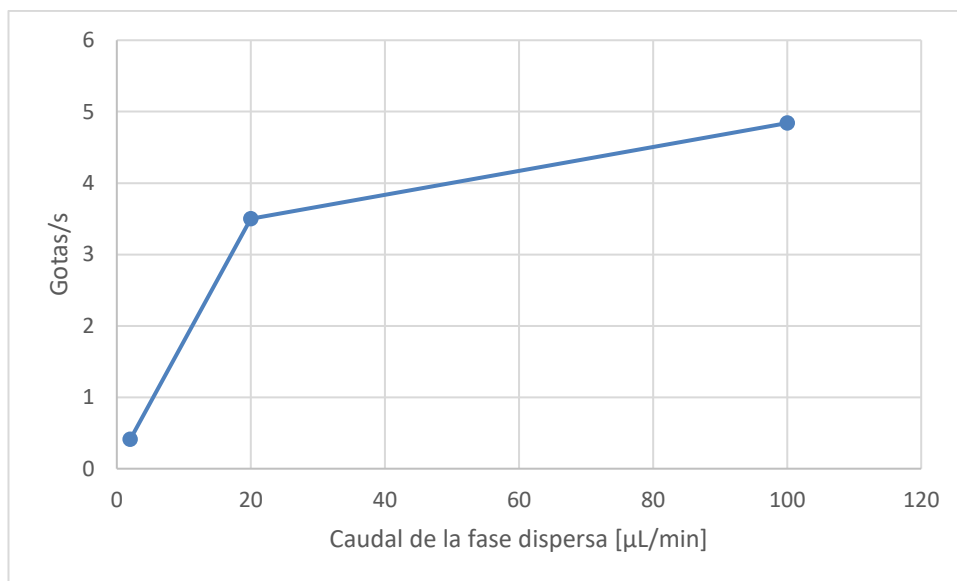


Fig 28 - Gráfico comparando, en el eje x el caudal de la fase dispersa en $\mu\text{L}/\text{min}$ y la frecuencia de formación de gotas en gotas/segundo en el eje y; el caudal de la fase continua es $200 \mu\text{L}/\text{min}$.

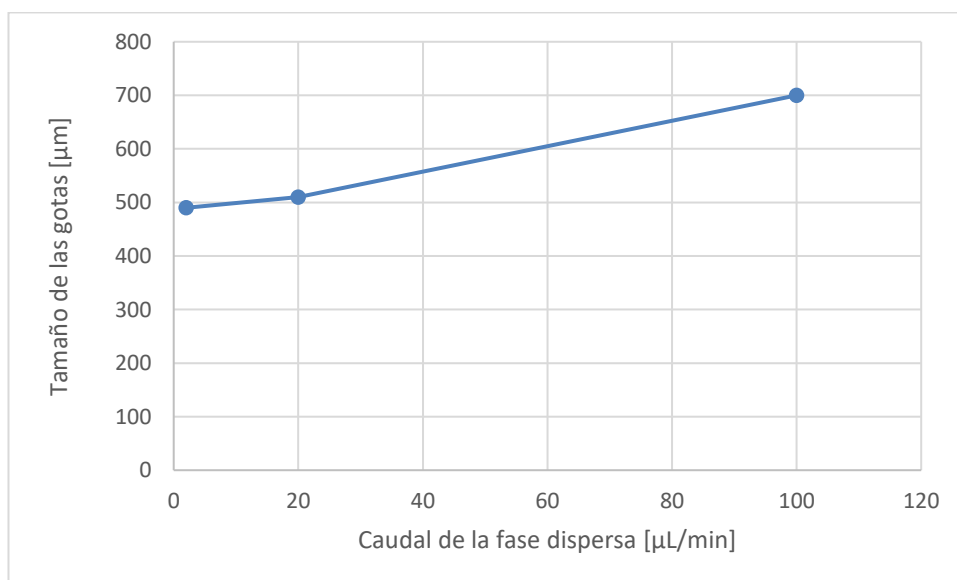


Fig 29 - Gráfico comparando, en el eje x el caudal de la fase dispersa en $\mu\text{L}/\text{min}$ y el tamaño de las gotas en μm en el eje y; el caudal de la fase continua es $100 \mu\text{L}/\text{min}$ y.

Tras el estudio de los resultados comparándolos con los diversos caudales usados para ambos fluidos, se efectuaron comparaciones también de los datos obtenidos, pero esta vez con el *capillary number*.

4.5 Variaciones de las gotas generadas con el *capillary number*:

El *capillary number* es el parámetro que determina las condiciones para la rotura del flujo y, por lo tanto, la formación de una gota. Este parámetro normalmente se varía ajustando los caudales de los fluidos utilizados para el experimento, y como hemos visto, esta es la forma que hemos aplicado nosotros de cambiarlo. No obstante, depende de otros parámetros, que

Desarrollo de un generador de gotas microscópicas para el encapsulado de principios activos en multi-regímenes

también pueden cambiarse para variar su valor, como ya hemos observado con anterioridad; estos parámetros serían la tensión interfacial y la viscosidad.

Vista la importancia de este número para determinar el tipo de gota resultante, ahora analizaremos los resultados de los experimentos comparándolos con este valor.

En nuestro caso no sabemos el valor de la tensión interfacial en nuestro experimento, por lo tanto, el *capillary number* lo dejaremos expresado en función de este.

A continuación, veremos cómo progresan, tanto el tamaño de las gotas como la frecuencia de formación de estas cuando cambia el número capilar de la fase continua.

Tabla 4- Valores de frecuencia de formación de gotas y tamaño de estas cambiando el número capilar de la fase continua.

Capillary number	Frecuencia de formación de gotas [gotas/s]	Tamaño de gotas [μm]
200	3,5	510
100	0,78	505
20	0,38	605

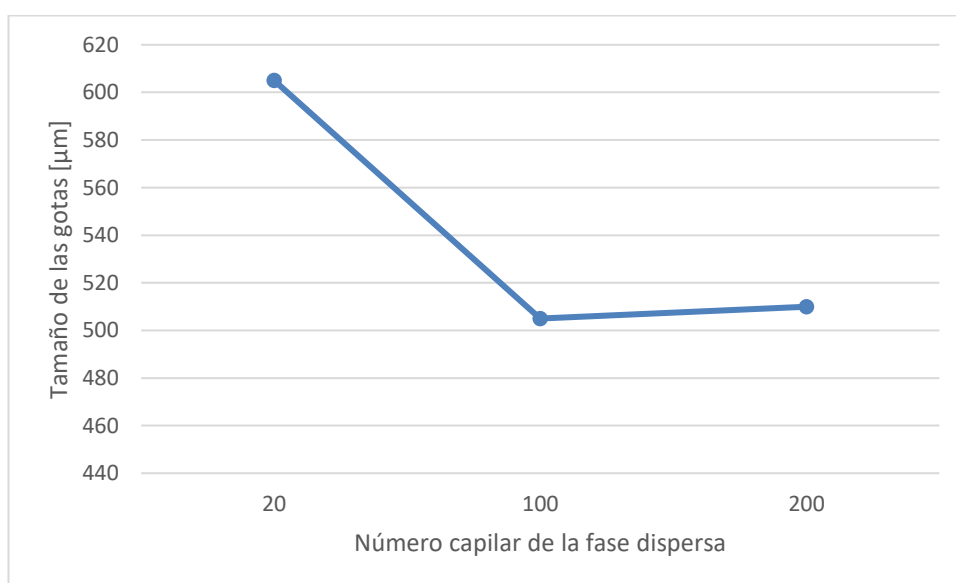


Fig 31 - Gráfico comparando, en el eje x el número capilar de la fase continua y el tamaño de las gotas en μm en el eje y.

Desarrollo de un generador de gotas microscópicas para el encapsulado de principios activos en multi-regímenes

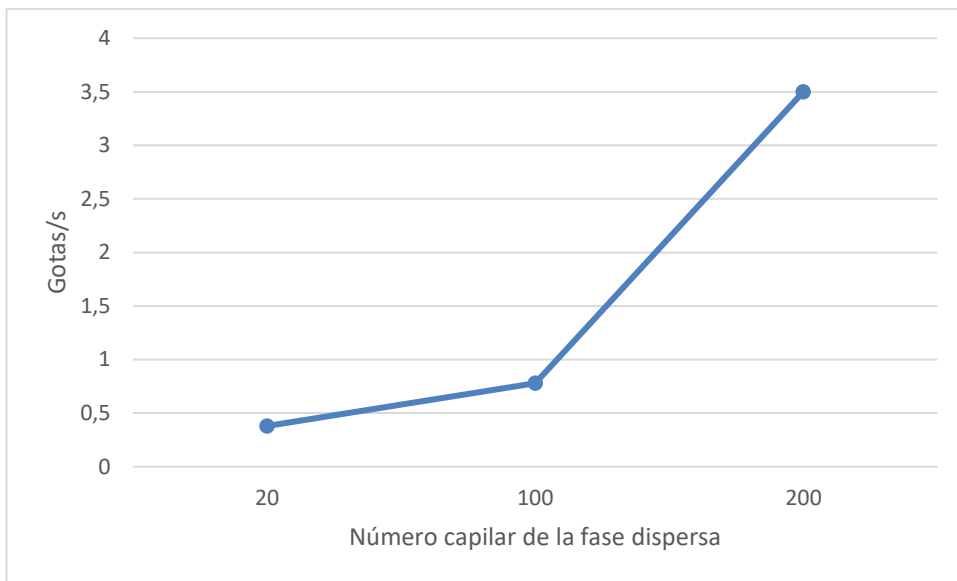


Fig 32 - Gráfico comparando, en el eje x el número capilar de la fase continua y la frecuencia de formación de las gotas en $\mu\text{L/s}$ en el eje y.

Ahora veremos esta misma evolución pero para un *capillary number* de la fase continua constante, mientras el de la fase dispersa varía.

Tabla 5 - Valores de frecuencia de formación de gotas y tamaño de estas cambiando el número capilar de la fase dispersa.

Capillary number	Frecuencia de formación de gotas [gotas/s]	Tamaño de gotas [μm]
64,46	0,34	425
161,15	0,78	505
1611,5	2,1	700

Desarrollo de un generador de gotas microscópicas para el encapsulado de principios activos en multi-regímenes

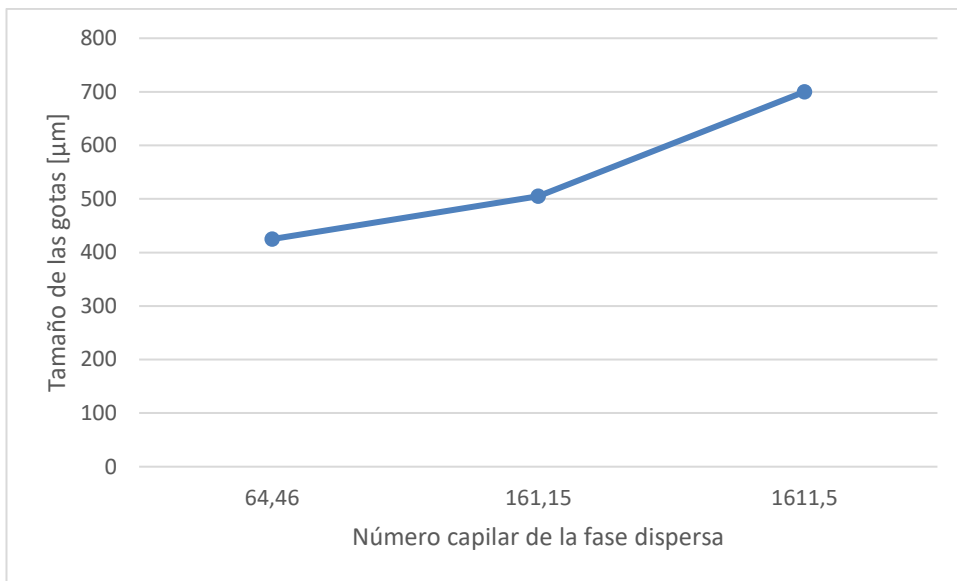


Fig 33 - Gráfico comparando, en el eje x el número capilar de la fase dispersa y el tamaño de las gotas en μm en el eje y.

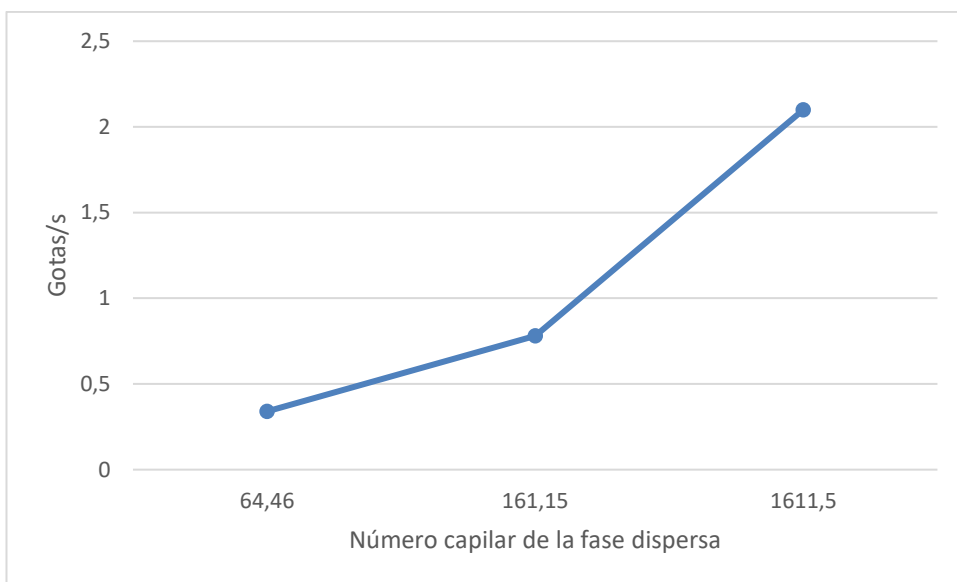


Fig 34 - Gráfico comparando, en el eje x el número capilar de la fase dispersa y la frecuencia de formación de las gotas en $\mu\text{L/s}$ en el eje y.

5 Discusión:

A partir de los videos obtenidos directamente del experimento ya podemos empezar a observar ciertas tendencias en el tipo de gota formada dependiendo de los parámetros de cada prueba.

Primeramente, observando las imágenes de los experimentos con un caudal de la fase continua de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ ya podemos apreciar que cuanto más se sube el caudal de la fase dispersa más aumenta el tamaño de la gota formada, llegando a un punto ya donde se observa un régimen de "squeezing", ya que la gota formada alcanza las paredes del tubo, obstruyendo este conducto de recogida de las gotas.

También de estas primeras imágenes se puede observar que a medida que se aumentaba el caudal de la fase dispersa, también aumentaba la velocidad de formación de las gotas, por lo tanto, tanto el tamaño de las gotas, como su frecuencia de formación aumentan, para un caudal en fase continua constante, aumentan a la par que el caudal en fase dispersa.

De los experimentos con 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ de la fase continua, a simple vista podemos observar que se repite lo ya dicho anteriormente, pero con un tamaño de gotas ligeramente más grande. También en algunos experimentos con este caudal se podía llegar a apreciar cierto principio de cambio de régimen hacia el "jetting", sin llegar a completarlo. Este cambio de régimen de "dripping" a "jetting" no llega a terminar de efectuarse debido a que el capilar colector de gotas tenía una distancia demasiado pequeña con el capilar por el que circulaba la fase dispersa, deteniendo así el "jet" o chorro y volviendo así a un régimen de "dripping".

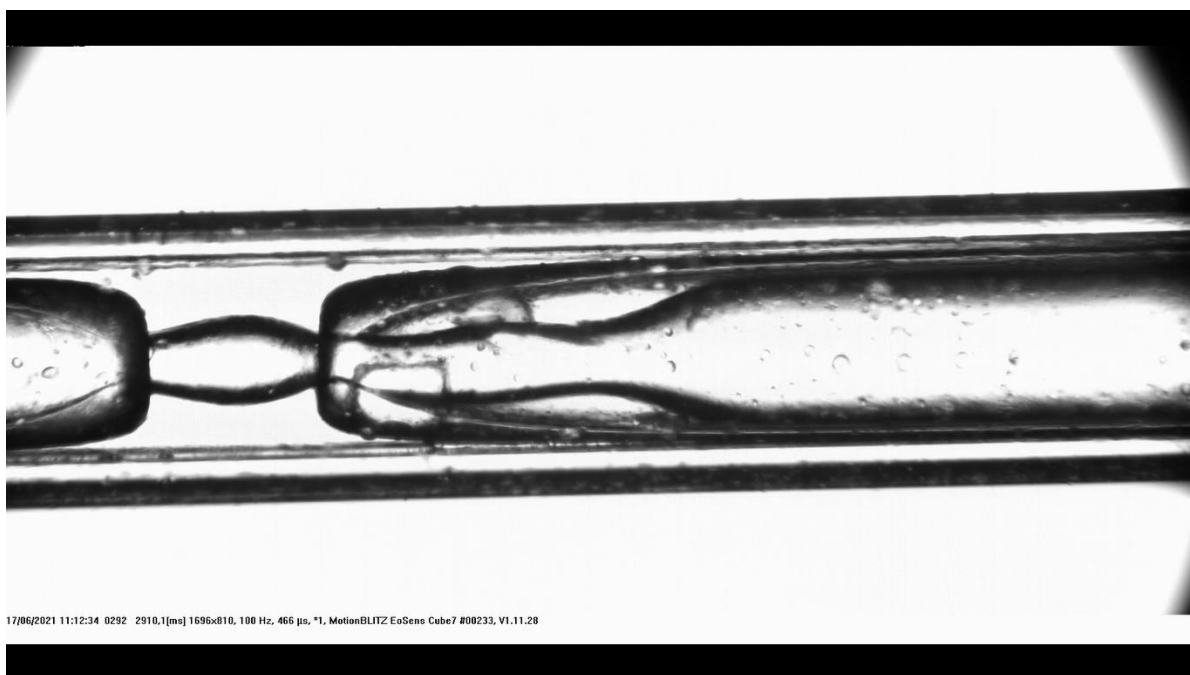


Fig 10 – Fotografía en el que se puede observar un principio de "jetting" (Caudal de la fase continua = 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, caudal de la fase dispersa = 50 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Viendo los resultados obtenidos del procesado de los videos podemos observar ciertos comportamientos de las gotas en cuanto a su frecuencia de formación de gotas; también podemos detectar ciertos fallos o posibles mejoras en el programa de detección de gotas.

Se puede observar que, aumentando el caudal de la fase dispersa, aumenta también la frecuencia a la que las gotas se forman, ya que en los gráficos aparecen más picos.

También podemos apreciar que esta frecuencia de formación aumenta con la subida del caudal de la fase continua, cosa que también habíamos comenzado a observar. Este fenómeno era de esperar, ya que cuanto más velocidad lleve el fluido de la fase continua, más rápido se desprenderá una gota del brazo principal de la fase dispersa.

En cuanto a la efectividad del algoritmo de MatLab utilizado podemos ver que si el rectángulo de interés (la zona del video que el programa analizará) no lo seleccionamos bien, es posible que haya artefactos que se cuelan en la imagen dificultando el análisis de algunos frames y dando resultados erróneos, pudiendo aparecer picos de más que no corresponden a una gota.

Además, también se puede observar que, para videos con una frecuencia de formación de gotas muy elevada, la zona de interés ha de ser pequeña, ya que, se ha visto que, si no, es posible que en un mismo fotograma aparezcan dos extremos de gotas diferentes, y el programa confunda el espacio intermedio entre las dos con otra gota, y por lo tanto también obtendríamos una gráfica con picos de más.

Si observamos los resultados obtenidos del análisis de los datos extraídos con respecto a la variación de caudales, se puede observar que, para un caudal constante de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ en la fase continua, si vamos aumentando el caudal de la fase dispersa veremos como el tamaño de la gota crece a su vez, pero de forma exponencial; esto quiere decir que para caudales pequeños aumenta rápidamente, pero cuanto más aumentamos el caudal de la fase dispersa el tamaño de la gota crece más lentamente.

El comportamiento que vemos en la frecuencia de formación de gotas con el mismo caudal constante de la fase continua es similar al observado en el tamaño de las gotas, ya que crece de forma similar cuanto más aumentamos el caudal de la fase dispersa.

Cuando el caudal de la fase continua lo mantenemos constante, pero con un valor más alto, 22 $\mu\text{L}/\text{min}$, observamos que, aumentando el de la fase dispersa, los valores de frecuencia y tamaño crecen de forma similar otra vez, aunque los valores obtenidos ahora son algo más grandes. Este comportamiento no sería el esperado para el tamaño, ya que un caudal de la fase continua mayor, en principio, haría desprender la gota de la fase dispersa antes y, por lo tanto, daría gotas más pequeñas. Este comportamiento inesperado puede ser debido a un factor que no se ha tenido en cuenta, la distancia entre los dos capilares circulares.

Ahora, si analizamos los valores obtenidos con respecto al "capillary number", podemos ver dos comportamientos diferentes según el "capillary number" que variamos, el de la fase continua o el de la fase dispersa.

Si el que vamos variando es el de la fase continua podemos observar que el tamaño de la gota disminuye a la vez que el número capilar aumenta; aunque para un número capilar de 200/ γ el tamaño es mayor que para 100/ γ , y esto se deba seguramente a que para la prueba realizada con 200/ γ el caudal de la fase dispersa era mayor que el de la prueba realizada con 100/ γ , afectando así al comportamiento decreciente ya visto.

Para un aumento del número capilar de la fase continua también se observa un aumento de la frecuencia de formación de gotas. Este fenómeno era esperable porque el único valor que hemos ido variando para cambiar el "capillary number" es el caudal, y por lo tanto a mayor caudal más ritmo de desprendimiento de gotas.

Por último, los resultados vistos si se aumenta el número capilar de la fase dispersa son esperables debido a los resultados vistos si se aumentaba el caudal de la fase dispersa, ya que es la única variable del número capilar que alteramos. Por eso el aumento en tamaño y frecuencia es lógico.

Por lo tanto, con estos resultados podemos predecir que comportamiento tendrán las gotas si se varían la μ o la γ de los fluidos.

6 Conclusión:

Tras los experimentos realizados en este trabajo y el análisis de los datos extraídos de estos, podemos sacar varias conclusiones que podrán ayudarnos en futuros usos de esta técnica de formación de gotas por microfluidos.

Lo primero que podemos concluir de este trabajo es que con esta técnica utilizada se pueden obtener gotas que varían en tamaño, y que, no solo eso, variando los parámetros del experimento (caudales, viscosidad, tensión interfacial...) podemos controlar el tamaño de estas. Por lo tanto, gracias a este control de tamaño podremos aplicar esta técnica a sus diferentes aplicaciones, que como hemos visto antes, dependiendo de para que finalidad necesitemos la gota, esta deberá tener un tamaño u otro.

También se ha demostrado que, con materiales mucho más baratos de los utilizados habitualmente para la obtención de emulsiones, se pueden crear gotas de manera eficaz y, como ya he dicho tener un control sobre las mismas.

Este abaratamiento del proceso permite acercar un poco más tecnologías tan avanzadas como el "drug delivery" o la simulación de la matriz extracelular a países, centros de investigación u hospitales con unos recursos y un presupuesto más limitados, ya que pueden obtener la base de estas tecnologías, que son las gotas que permitirán encapsular, por ejemplo, los medicamentos, con materiales accesibles para ellos.

Por último, hay que destacar que uno de los parámetros más importantes en el control de las gotas resultantes es el caudal, tanto el de la fase dispersa como el de la continua, ya que la viscosidad y la tensión interfacial se mantienen constantes. La variación de estos implica cambios importantes en el tamaño y frecuencia de formación de las emulsiones. Por ello, también podemos decir que el número capilar también es un parámetro importante en el control de esta técnica, ya que depende directamente del caudal utilizado.

En resumen, la posibilidad de desarrollar esta técnica de esta forma tan accesible abre las puertas a que sea más global y que se pueda investigar en más centros. Esto podría permitir un mayor uso de esta, lo que podría desembocar en posibles mejoras de la técnica y sus aplicaciones, e incluso en el descubrimiento de nuevas aplicaciones.

7 Referencias:

- [1] S. Mashaghi, A. Abbaspourrad, D. A. Weitz, and A. M. van Oijen, "Droplet microfluidics: A tool for biology, chemistry and nanotechnology," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 82. pp. 118–125, 2016, doi: 10.1016/j.trac.2016.05.019.
- [2] "Microfluidic chips," *III-Vs Rev.*, vol. 17, no. 2, p. 24, 2004, doi: 10.1016/s0961-1290(04)00257-1.
- [3] W. Li *et al.*, "Microfluidic fabrication of microparticles for biomedical applications," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 47, no. 15, pp. 5646–5683, Jul. 2018, doi: 10.1039/C7CS00263G.W.-K. Chen, *Linear Networks and Systems* (Book style). Belmont, CA: Wadsworth, 1993, pp. 123–135.
- [4] Vasiliauskas R, Liu DF, Cito S, Zhang HB, Shahbazi MA, Sikanen T, Mazutis L and Santos HA, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, 7, 14822–14832.
- [5] Velasco D, Tumarkin E and Kumacheva E, *Small*, 2012, 8, 1633–1642.
- [6] Le Goff GC, Srinivas RL, Hill WA and Doyle PS, *Eur. Polym. J.*, 2015, 72, 386–412.
- [7] Tan YC, Hettiarachchi K, Siu M and Pan YP, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 5656–5658.
- [8] Malvern Panlytical, "Medición de la viscosidad y principios de la viscosidad | Malvern Panalytical," 2019. <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/measurement-type/viscosity> (accessed Jul. 19, 2021).
- [9] S. Jakiela, S. Makulska, P. M. Korczyk, and P. Garstecki, "Speed of flow of individual droplets in microfluidic channels as a function of the capillary number, volume of droplets and contrast of viscosities," *Lab Chip*, vol. 11, no. 21, pp. 3603–3608, Oct. 2011, doi: 10.1039/C1LC20534J.
- [10] "tensión interfacial | Oilfield Glossary." https://glossary.oilfield.slb.com/es/terms/i/interfacial_tension (accessed Jul. 19, 2021).
- [11] J. D. Wehking, M. Gabany, L. Chew, and R. Kumar, "Effects of viscosity, interfacial tension, and flow geometry on droplet formation in a microfluidic T-junction," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 16, no. 3, pp. 441–453, 2014, doi: 10.1007/s10404-013-1239-0.
- [12] Hong, Y., Wang, F. Flow rate effect on droplet control in a co-flowing microfluidic device. *Microfluid Nanofluid* 3, 341–346 (2007). <https://doi.org/10.1007/s10404-006-0134-3>.
- [13] Dollet B, van Hoeve W, Raven J P, Marmottant P, Versluis M 2007 *Phys. Rev. E* submitted
- [14] Cohen I, Brenner M P, Eggers J and Nagel S R 1999 *Phys. Rev. Lett.* 83 1147–5.
- [15] J. K. Nunes, S. S. H. Tsai, J. Wan, and H. A. Stone, "Dripping and jetting in microfluidic multiphase flows applied to particle and fibre synthesis," *J. Phys. D: Appl. Phys.*, vol. 46, no. 11, p. 114002, Feb. 2013, doi: 10.1088/0022-3727/46/11/114002.
- [16] M. Fatehifar, A. Revell, and M. Jabbari, "Non-Newtonian Droplet Generation in a Cross-Junction Microfluidic Channel," *Polym.* 2021, Vol. 13, Page 1915, vol. 13, no. 12, p. 1915, Jun. 2021, doi: 10.3390/POLYM13121915.
- [17] Utada AS, Fernandez-Nieves A, Stone HA, Weitz DA. Dripping to jetting transitions in coflowing liquid streams. *Phys Rev Lett.* 2007 Aug 31;99(9):094502. doi: 10.1103/PhysRevLett.99.094502. Epub 2007 Aug 28. PMID: 17931011.
- [18] B. Herranz-Blanco *et al.*, "Microfluidic assembly of multistage porous silicon-lipid vesicles for controlled drug release," *Lab Chip*, vol. 14, no. 6, pp. 1083–1086, 2014, doi: 10.1039/c3lc51260f.
- [19] D. K. Kang, M. Monsur Ali, K. Zhang, E. J. Pone, and W. Zhao, "Droplet microfluidics for single-molecule and single-cell analysis in cancer research, diagnosis and therapy," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 58. pp. 145–153, 2014, doi: 10.1016/j.trac.2014.03.006.
- [20] B. R. Benson, H. A. Stone, and R. K. Prud'homme, "An 'off-the-shelf' capillary microfluidic device that enables tuning of the droplet breakup regime at constant flow rates," *Lab Chip*, vol. 13, no. 23, pp. 4507–4511, Oct. 2013, doi: 10.1039/C3LC50804H.

Agradecimientos:

En primer lugar, agradecer a mis tutores, el doctor Salvatore Cito y la doctora Sylvana Verónica, por guiarme y ayudarme durante todo el proceso de realización de este trabajo. También a todos los profesores que me han enseñado durante estos cuatro años importantes conocimientos y valores para mi futura vida profesional y personal. Por último, me gustaría agradecer a mi familia y amigos por estar tanto en los momentos difíciles como en los felices.