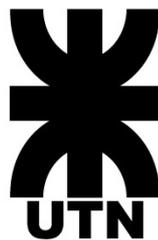


DESARROLLO DE CANALES DE
MICROFLUIDICA PARA ESTUDIO DE
CRECIMIENTO CELULAR Y ANÁLISIS
DE FLUJO EN MEDIOS POROSOS

Ana Belén Peñaherrera Pazmiño

Tesis presentada para aspirar al grado de Doctor
en Ingeniería, mención Materiales

Facultad Regional La Plata



Universidad Tecnológica Nacional

2020

- Este trabajo se llevó a cabo en la Universidad Tecnológica Nacional, Facultad regional Haedo Centro de Ingeniería de Recubrimientos Especiales y Nanoestructuras (IREN) bajo la dirección del Dr. Carlos Lasorsa y la co-dirección de la Dra. Betiana Lerner.

- Se presenta a la consideración de las autoridades de la Universidad Tecnológica Nacional para aspirar al grado académico de Doctor en Ingeniería, mención Materiales.

Agradecimientos

Esta aventura de comenzar un postgrado inició en 2012 cuando viaje para realizar una maestría, aún recuerdo a mi familia y al amor de mi vida en el aeropuerto, deseándome lo mejor con las miradas inundadas de emoción. Esta tesis de doctorado está dedicada a ellos quienes han sido los pilares sobre los que mi motivación se construye cada día. Gracias por darme el amor, la fuerza para tomar ese avión y volar hacia todos los lugares donde esta oportunidad me llevó. Gracias a Dios por cuidarme y permitirme vivir tantas valiosas experiencias, este camino me ha dado la oportunidad de crecer profesional y espiritualmente. El precio de estar lejos es muy alto y por eso he hecho que cada día valga la pena. Durante este recorrido, he conocido a muchos científicos de quienes he aprendido invaluable lecciones, a todos ellos mis sinceros agradecimientos por cultivar en mí la pasión por la ciencia.

El doctor Carlos Lasorsa por guiarme en este sendero, por su apoyo, por compartir conmigo sus conocimientos y anécdotas. A la doctora Betiana Lerner quien me recibió en su laboratorio y me orientó en la carrera científica. Al doctor Maximiliano Pérez por enseñarme a ser resolutiva y práctica. Al Doctor Alexis Debut por presentarme la microscopía electrónica e incentivarme a disfrutar del doctorado. Al Doctor Luis Cumbal por motivarme y establecer colaboración con los laboratorios. Al Doctor Daniel Frankel, por recibirme con tanto cariño el aeropuerto de Newcastle en Reino Unido y en su laboratorio de Microscopía de Fuerza Atómica. Al doctor José Casanovas por permitirme formar parte de su laboratorio en Madrid, por estar ahí para aconsejarme, para formarme como científica y por su exigencia. Al doctor José Luis Torán quien me transfirió los conocimientos y habilidades para disfrutar de la microbiología, biología molecular y la virología. Al doctor César Santiago por compartir conmigo sus conocimientos y brillantes ideas. Al Doctor Roland Mertelsmann por

invitarme a Friburgo y por el respaldo de su fundación Biothera. A la doctora Marie Follo quien me mostró la clase de científica que quiero ser, una mujer impresionante que no solo es una excelente investigadora, sino que es un espectacular ser humano que nos invitó a su laboratorio en Friburgo, nos facilitó los recursos para desarrollar nuestros experimentos y se dio el tiempo para mostrarnos a Gustavo y a mí la magia de la navidad que descubrimos en Alemania.

Mi profundo agradecimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por creer en mi y otorgarme la beca que me permitió realizar el doctorado.

A mi padre, quien me enseñó a dar lo mejor de mi en cada labor, llenó mi vida de incontables momentos de alegría, me motivó a buscar oportunidades y me transmitió esa vocación para explicar las cosas de la forma en que me gustaría que me las explicaran a mí. Gracias papáito por construirme una vida hermosa.

A mi madre, la mujer luchadora que con dulzura y valentía nos enseñó a vencer las adversidades y nos demostró con su ejemplo que lo que uno se propone lo consigue. Gracias mami por enseñarme a creer en mi misma y por ayudarme a alcanzar mis sueños.

A mi hermana Michelle, gracias por inyectarme cariño, valor y seguridad. Cada día me enorgulleces con tu forma de ser y me inspiras con tu fortaleza. Gracias chiquita mía por compartir conmigo tantas vivencias.

A mi mejor amigo y esposo Gustavo, gracias por ser tan comprensivo, divertido, chef y sabio. Eres mi compañero ideal, gracias por estar a mi lado, por solucionarlo todo en cada desventura y por ayudarme a volver a estar feliz. Por tus románticas sorpresas y porque juntos construimos nuestro futuro.

A Iván Rosero y Mónica Yáñez, por su cariño incondicional, por ayudarnos a Gustavo y a mi y por apoyarnos en cada decisión.

A mi familia, mis abuelitos, a los que me cuidan desde el cielo y en especial a Mamá Charito, gracias por sus oraciones y su gran amor. A mis tíos y primos de Quito y de Ambato, gracias por motivarme y por transmitirme fuerza desde los diferentes países. Por cada encuentro inesperado en el lindo Madrid donde pude volver a ver a Pauli, Eric y Benjamín. Donde la vida me reunió más de una vez con mi tío Ramiro Peñaherrera quien me presentó el tinto de verano. Donde conocí a mi primo Christian Paúl y a mi tía Bethy que junto a su esposo Edgar me cuidaron como padres en esta bella ciudad. Y desde donde pude ir a Valencia a disfrutar con mi tía Germania Pazmiño y mi prima Ahinoa, gracias por compartir tanto conmigo.

A mis padrinos, Franklin y Magui por rodearme de cariño, motivación y ayudarme siempre.

A mis tíos Alfonso y Verónica por ser nuestros segundos padres. Gracias por querernos a Gustavo y a mí como a sus hijos y por tener en su hogar un lugar para nosotros, por cada conversación, por sus consejos y por su apoyo.

A la tía Lucía Yáñez por su alegría, sus anécdotas y ese cariño tan especial. A las tías Rita, Margarita y Mariana por las constantes muestras de amor.

A mis amigos, desde mis queridas compañeras del jardín de infantes, la comunidad de la taza que formamos en la universidad hasta los que conocí mientras realizaba el doctorado.

A mi mejor amiga Yessi, mi cómplice. Gracias por cultivar esta amistad tan linda y duradera. Por tu comprensión, cariño, generosidad y por compartir conmigo tantas travesuras que con solo acordarse hacen que la felicidad nos

llene. A Cristian por su cariño y predisposición a ayudar en todo momento. Quiero dedicar también este trabajo a él o la bebé que con su llegada me inspiró durante la escritura de esta tesis.

A Claudia, gracias por transmitirme la pasión por el baile, por alegrarme con tus mensajes y por inspirarme con tu perseverancia. A Diana, gracias por motivarme a ser independiente, emprendedora y por cada experiencia juntas. A Daniela, mi ángel que me mostró y me enseñó a explorar las obras artísticas. Gracias amiga por festejar juntas nuestros cumpleaños número 33. A Sofi Moya, por tu fuerza de carácter y por la emoción con la que disfrutas la vida. Gracias por inspirarme a conocer lugares y por estar siempre dispuesta a ayudar.

A Gaby Orquera, Nadia Cumbal, Carito Mogrovejo y Lore Oña por cada vivencia juntas en la universidad, por inspirarme con su dedicación y por cada risa en las aulas y junto a la palmera.

A Mario García y Mauricio Moreno por cada conversación y risas juntos.

A mis amigos dentro y fuera del laboratorio.

A Andrea Vaca, por transmitirme valentía, fuerza, por su apoyo y por todas esas vivencias inolvidables en Buenos Aires.

A la doctora Nayaret Acosta por su cariño, entusiasmo y el ejemplo de perseverancia.

A la doctora Marina Sierra a quien admiro por ser una mujer trabajadora, por lo lindo que la pasamos en el laboratorio de Buenos Aires y también por el reencuentro en España. Gracias por cada ciudad que me permitiste conocer Marina.

A la doctora Carol Olmos, por enseñarme a defenderme, por contagiarme la pasión por escribir artículos científicos y por tratarnos con tanto cariño a los doctorandos. Por preocuparse siempre por nuestro bienestar y por motivarme a aplicar a la beca que me condujo a España.

A la doctora Tamara Fernández, a quien admiro por la forma en la que combina la fuerza de carácter y la dulzura. Gracias por compartir conmigo tantas experiencias lindas desde tus libros favoritos hasta tu bella ciudad Madrid donde tus padres y tus suegros me han hecho sentir como parte de la familia.

A la doctora Natalia Bourguiñon por su alegría, sus ganas para trabajar en equipo, su cariño y por las chocotortas.

Al doctor Cristian Payés, quien me enseñó con su ejemplo que el esfuerzo hace que el doctorado sea una experiencia gratificante y por mostrarme las costumbres argentinas.

A la doctora Anahí Sanluis, por su generosidad, su sinceridad y por todos los momentos de risas en Buenos Aires y Madrid.

Al doctor Igor Sá, por su predisposición a solucionarlo todo en el lab y por su buen humor.

A Johannes Burger por ser tan carismático y valorar la riqueza del intercambio cultural. Por tantas alegrías vividas en Buenos Aires y en Friburgo. Gracias por ayudarme a vencer mis miedos y enseñarme a esquiar, por mostrarme las costumbres alemanas y por ser un gran amigo. Te espero en Ecuador.

A Pamela Schriber, quien nos recordó lo fácil que es sonreír, al columpiarse y volver a ser niños.

A Julia Pinter, por apreciar la comida ecuatoriana y por mostrarnos a Gustavo y a mi la belleza del Schwarzwald (bosque negro), Manheim y Sinsheim.

A Juan Pablo Yáñez, el hermano mayor que nunca tuve ha sido un ángel a quien la oportunidad de ir a Alemania me permitió conocer. Gracias por tanto cariño, tus ganas de ayudarnos a establecernos en Alemania, por cada hermoso lugar al que nos llevaste y por viajar a Madrid para visitarme.

A Hans Hoch y su familia por abrir las puertas de su hermoso hogar en Gottenheim y darnos la oportunidad de vivir en esta hermosa y tranquila villa alemana. Gracias por cada invitación a su casa, por cada conversación en inglés y por su infinita generosidad.

A Manuel Der por cada vivencia que compartimos en el lab y sobretodo por cada cumpleaños que celebramos juntos.

A Juan Mahecha y Paola Pineda, siempre estaré agradecida con la vida por permitirnos converger en Buenos Aires y disfrutar juntos de todo lo que pudimos.

A David Almendral, por llevarme a los rincones más lindos de Madrid y Sevilla, por enseñarme su historia, por reírnos hasta casi llorar y por mostrarme tantos sabores nuevos, siempre regresaremos por unas zamburiñas.

A María Ángeles Noriega, por motivarme y hacer que los meses en el laboratorio de España sean más bonitos aún. Por contagiarme tu fuerza y por tus ganas de mejorar la forma de hacer cada una de las cosas.

Al doctor Luis Alfredo Martínez quien me cautivó con su forma de enseñar

física y filosofía. He disfrutado mucho cada una de nuestras clases, gracias por todo.

A Darío Ruarte y Gisela Pattarone con quienes trabajamos juntos en Friburgo y compartimos bellos momentos en el Mont Blanc.

A Camilo Pérez por su ayuda con los experimentos y a todos los doctorandos del lab, con quienes tuve la oportunidad de compartir las reuniones y sobretodo el partido de Liga-Boca en la Bombonera. Gracias Geovanni por contagiarnos tu emoción por el fútbol.

Mis agradecimientos se extienden también al personal del Centro Nacional de Biotecnología, quienes siempre nos tienen los medios listos y el material autoclavado. Además, al personal de instrumentación quienes nos ayudaron con la fabricación del conmutador y con la reparación del baño María.

Publicaciones

A continuación, se detallan los trabajos publicados en revistas internacionales con referato y presentaciones a congresos realizadas durante esta tesis.

1. Ana Peñaherrera, Cristián Payés, Marina Sierra-Rodero, Milena Vega, Gustavo Rosero, Betiana Lerner, Gustavo Helguera, y Maximiliano S. Pérez, 'Evaluation of Cell Culture in Microfluidic Chips for Application in Monoclonal Antibody Production', *Microelectronic Engineering*, 158 (2016), 126-29.
2. Natalia Bourguignon, Carolina Attallah, Paola Karp, Ross Booth, Ana Peñaherrera, Cristian Payés, Marcos Oggero, Maximiliano S. Pérez, Gustavo Helguera, y Betiana Lerner, 'Production of Monoclonal Antibodies in Microfluidic Devices', *Integrative Biology*, 10 (2018), 136-44.
3. Denise Belgorosky, Tamara Fernández-Cabada, Ana Peñaherrera, Yanina Langle, Ross Booth, Shekhar Bhansali, Maximiliano S. Pérez, Ana María Eiján, y Betiana Lerner, 'Analysis of Tumoral Spheres Growing in a Multichamber Microfluidic Device', *Journal of Cellular Physiology*, 233 (2018), 6327-36.
4. Maximilian Georg, Tamara Fernández-Cabada, Natalia Bourguignon, Paola Karp, Ana Peñaherrera, Gustavo Helguera, Betiana Lerner, Maximiliano S. Pérez, y Roland Mertelsmann. 'Development of Image Analysis Software for Quantification of Viable Cells in Microchips', *PLOS ONE*, 13 (2018), e0193605.
5. Natalia Bourguignon, Carol M. Olmos, Marina Sierra-Rodero, Ana Peñaherrera, Gustavo Rosero, Pedro Pineda, Karla Vizuete, Carlos R. Arroyo,

- Luis Cumbal, Carlos Lasorsa, Maximiliano S. Perez, and Betiana Lerner, 'Accessible y Cost-Effective Method of Pdms Microdevices Fabrication Using a Reusable Photopolymer Mold', *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 56 (2018), 1433-42.
6. Olmos, C., Rosero G., Peñaherrera, A., Lasorsa, C., Boschan, A., Lerner, B., Perez, M., Desarrollo de nuevas metodologías para estudios de Recuperación Asistida de Petróleo (EOR). REVISTA PETROQUIMICA PETROLEO, GAS & QUIMICA 2016, ISSN: 0329-5001. <http://revistapetroquimica.com/desarrollo-de-nuevas-metodologias-para-estudios-de-recuperacion-asistida-de-petroleo-eor/>
 7. Gustavo Rosero, Ana Peñaherrera, Carol Olmos, Alejandro Boschan, Pablo Granel, Federico Golmar, Carlos Lasorsa, Betiana Lerner, y Maximiliano Perez, 'Design and Analysis of Different Models of Microfluidic Devices Evaluated in Enhanced Oil Recovery (Eor) Assays', *Matéria (Rio de Janeiro)*, 23 (2018).
 8. Carol M. Olmos, Andrea Vaca, Gustavo Rosero, Ana Peñaherrera, Camilo Perez, Igor de Sá Carneiro, Karla Vizuete, Carlos R. Arroyo, Alexis Debut, Maximiliano S. Pérez, Luis Cumbal, y Betiana Lerner, 'Epoxy Resin Mold and Pdms Microfluidic Devices through Photopolymer Flexographic Printing Plate', *Sensors and Actuators B: Chemical*, 288 (2019), 742-48.
 9. Gustavo Rosero, Carol M. Olmos, Ana Peñaherrera, Andrea Vaca, Karla Vizuete, Alexis Debut, Luis Cumbal, Diana Masiero, Maria I. Hernandez, Carlos Lasorsa, Maximiliano S. Pérez, y Betiana Lerner, 'Influence of Thermal Treatment and Aging Time on the Stability and Swelling Properties of Nano/Micron-Sized Polymeric Spheres for Improved Oil Recovery Application', *Journal of Applied Polymer Science*, 136 (2019), 48030.

10. Olmos, Peñaherrera, A., Rosero, G., Vizuite, K., Ruarte, D., Follo, M., Vaca, A., Arroyo, C., Debut, A., Cumbal, L., Pérez, M., Lerner, B., Mertelsmann, R., 'Cost-Effective Fabrication of Photopolymer Molds with Multi-Level Microstructures for PDMS Microfluidic Device Manufacture', *RSC Advances*, 10 (2020), 4071-79.

Durante este trabajo de tesis se realizaron 10 presentaciones a congresos, de los cuales 4 fueron congresos internacionales.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo de tesis es desarrollar e investigar dispositivos de microfluídica para aplicarlos al cultivo de células eucariotas y al estudio de fluidos en medios porosos.

Para lograr este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Generar microgotas en dispositivos de microfluídica para efectuar reacciones químicas, procesos biológicos y monitorear el crecimiento de células.
- Evaluar el crecimiento celular en canales de microfluídica para la producción de anticuerpos monoclonales.
- Analizar la capacidad de recuperación de petróleo que posee la poliacrilamida, mediante dispositivos de microfluídica fabricados con tecnología de sistemas micromecánicos (MEMS).

Resumen

Durante este trabajo de tesis se han desarrollado exitosamente dispositivos de microfluídica, los cuales fueron aplicados en el cultivo de células tanto adherentes como en suspensión y en el análisis de flujo en medios porosos tal como se planteó en el objetivo general del plan de trabajo.

Se ha desarrollado un nuevo método de fabricación de dispositivos de microfluídica que hace posible la fabricación de microdispositivos en el país (y en otros países en desarrollo), sin la necesidad de acceso a cuarto limpio (cleanroom), lo cual hará posible la masificación de la microfluídica.

Se realizaron más de 30 diferentes diseños de dispositivos. Se han evaluado distintos moldes para replicar el diseño de los microcanales y se ha investigado la capacidad del fotopolímero utilizado para la elaboración de moldes en profundidad a partir de los cuales se obtiene la red de microcanales en relieve mediante resina epóxica. A partir de esta resina se han obtenido réplicas en polidimetilsiloxano (PDMS) para ensamblar los dispositivos de microfluídica. Esta capacidad para transferir el diseño desde la resina epóxica hacia el PDMS fue comprobada mediante la producción de microgotas.

Estos dispositivos han sido utilizados para monitorear el crecimiento celular mediante la adquisición de imágenes para evaluar su desarrollo a través de análisis de imágenes. En cuanto a las células adherentes de mamífero se evidenció la factibilidad para producir anticuerpos monoclonales, mientras que las células en suspensión se usaron para comprobar el mecanismo de captura mediante dispositivos multinivel.

Por otro lado, se desarrollo una nueva aplicación de los dispositivos de microfluídica, para evaluar el envejecimiento de nanoesferas. Se aplicaron los microdispositivos para cuantificar la variación de tamaño de nanomateriales como las esferas poliméricas utilizadas para la recuperación mejorada de petróleo. Finalmente, los dispositivos permitieron determinar los volúmenes porales necesarios para empujar el petróleo en una geometría que simula las gargantas porales y zonas de baja permeabilidad que se encuentra en los reservorios de petróleo.

La escritura de esta tesis se organiza mostrando los resultados de acuerdo con lo propuesto en los objetivos generales y específicos.

Primero se muestra el desarrollo de la nueva metodología de fabricación de microdispositivos, en concordancia con lo propuesto en el objetivo general. Así como también la aplicación de estos en el crecimiento celular y la producción de microgotas (Capítulos 2, 3 y 4). Tal como se propuso en el primer y segundo objetivos específicos.

En el capítulo 4 se muestra el trabajo realizado para la evaluación del crecimiento celular para producción de anticuerpos monoclonales (objetivo 2).

Luego se muestra en el capítulo 5 la fabricación y utilización de los dispositivos de microfluídica para el estudio de recuperación asistida de petróleo, así como también para el estudio de envejecimiento de nanocompuestos (Capítulo 6) utilizados en EOR (objetivo final número 3).

Índice

Agradecimientos	ii
Publicaciones.....	ix
Objetivos.....	xii
Resumen.....	xiii
Índice.....	xv
Capítulo 1	1
Microfluídica y aplicaciones	1
1.1 Introducción.....	2
1.1.1 Conceptos básicos de líquidos y gases.....	2
1.1.1.1 Viscosidad de fluidos	2
1.1.1.2 Tensión Superficial	5
1.1.1.3 Capilaridad.....	6
1.1.1.4 Difusión de masa.....	6
1.1.1.5 Capacidad calorífica.....	6
1.1.2 Microfluídica	7
1.1.2.1 Técnicas para producir microdispositivos.	9
1.1.2.2 Física en los microcanales	11
1.1.2.3 Ley de Pascal.....	12
1.1.2.4 Ley de Laplace.....	13
1.1.2.5 Ecuación de Bernoulli	16
1.1.2.6 Ecuación de Poiseuille.....	16
1.1.2.7 Perfil de velocidad del flujo laminar en una tubería circular.....	18
1.1.2.8 Tiempo de reacción.....	18
1.1.2.9 Formación de gotas en microfluídica.....	19
1.1.3 Aplicaciones en ensayos celulares.....	21
1.1.4 Aplicaciones químicas	24
1.1.5 Microscopía electrónica	25
1.1.5.1 Microscopía electrónica de barrido	25
1.1.5.2 Microscopía electrónica de transmisión.....	26
1.2 Referencias	28
Capítulo 2	33
Desarrollo de dispositivos de microfluídica para cultivo de células y estudio de fluidos en medios porosos.....	33
2.1 Introducción.....	34

2.2	Metodología.....	36
2.2.1	Fabricación del Fmold.....	36
2.2.2	Fabricación del microdispositivo de PDMS	39
2.2.3	Caracterización	39
2.2.4	Aplicaciones	40
2.2.5	Generación de microgotas.....	41
2.2.6	Adquisición de imágenes de las microgotas.....	41
2.3	Resultados y discusión.....	42
2.3.1	Caracterización del molde.....	42
2.3.2	Fabricación de microdispositivos de PDMS.....	48
2.3.3	Dispositivo de PDMS aplicado a inyección de fluido y análisis EOR.....	54
2.3.4	Generación de microgotas.....	56
2.3.5	Comparación de disponibilidad, costos y resolución de deferentes tecnologías de manufactura de moldes.....	57
2.4	Conclusiones	61
2.5	Referencias	62
Capítulo 3		69
Microdispositivos multinivel para cultivo de células en suspensión.		69
3.1	Introducción.....	70
3.2	Materiales y métodos	72
3.2.1	Fabricación del molde de ftopolímtero.....	72
3.2.1.1	Fabricación de microestructuras mediante variación tanto del tiempo de exposición a la luz UVA como el ancho del canal.	73
3.2.2	Caracterización del molde.....	76
3.2.3	Aplicación.....	76
3.2.3.1	Fabricación del dispositivo de microfluídica	76
3.2.3.2	Cultivo celular	77
3.2.3.3	Análisis de imágenes	78
3.2.3.4	Cuantificación del área ocupada por las células Jurkat.....	79
3.2.3.5	Identificación de células muertas	79
3.3	Resultados y discusión.....	80
3.3.1	Fabricación de microestructuras al variar el tiempo de exposición a la luz UVA. 80	
3.3.2	Fabricación de microestructuras mediante la variación tanto del tiempo de exposición a la luz UVA como del ancho del canal.....	82
3.3.3	Caracterización del molde.....	82

3.3.4	Aplicación.....	84
3.3.4.1	Microdispositivo de PDMS.....	84
3.3.4.2	Cultivo celular y proliferación en el dispositivo de microfluídica.....	85
3.4	Conclusiones	91
3.5	Referencias	92
Capítulo 4		98
Producción de anticuerpos monoclonales en dispositivos de microfluídica.....		98
4.1	Resumen	99
4.2	Introducción.....	99
4.3	Metodología.....	102
4.3.1	Diseño y fabricación de los dispositivos de microfluídica	102
4.3.2	Caracterización del campo de flujo mediante modelamiento computacional de flujo	105
4.3.3	Cultivo celular y distribución	106
4.3.4	Cuantificación del crecimiento celular a través de análisis de imágenes.....	107
4.3.5	Cuantificación del anticuerpo monoclonal.....	108
4.3.6	Evaluación de los atributos de calidad del MAb.....	109
4.4	Resultados y discusión.....	111
4.4.1	Modelamiento computacional de flujo.....	111
4.4.2	Crecimiento celular y producción de anticuerpos monoclonales.....	113
4.4.3	Evaluación de los atributos de calidad del MAb.....	119
4.5	Conclusiones	121
4.6	Referencias	123
Capítulo 5		126
Ensayos de recuperación asistida de petróleo en dispositivos de microfluídica		126
5.1	Introducción.....	127
5.2	Metodología.....	131
5.2.1	Diseño y fabricación del dispositivo de microfluídica.....	131
5.2.2	Análisis digital de imágenes	134
5.3	Resultados.....	134
5.4	Discusión	140
5.5	Conclusiones	142
5.6	Referencias	144

Capítulo 6	147
Influencia del tratamiento térmico y envejecimiento sobre la estabilidad y propiedades de nano/microesferas poliméricas para recuperación mejorada de petróleo.....	147
6.1 Resumen	148
6.2 Introducción.....	148
6.3 Metodología.....	153
6.3.1 Materiales	153
6.3.2 Preparación de la dispersión de esferas poliméricas	154
6.3.3 Solución inicial	154
6.3.4 Dispersión acuosa inicial de esferas poliméricas.....	154
6.3.5 Remoción de la fase oleosa y el estabilizador de dispersión de las esferas poliméricas	154
6.3.6 Envejecimiento de la dispersión de las esferas poliméricas: en el dispositivo de microfluídica.	155
6.3.7 Envejecimiento de la dispersión de las esferas poliméricas: fuera del dispositivo de microfluídica	156
6.3.8 Mediciones y caracterización	156
6.3.8.1 En el dispositivo de microfluídica.....	156
6.3.8.2 Fuera del dispositivo de microfluídica.....	156
6.3.9 Análisis estadístico	157
6.4 Resultados y discusión.....	157
6.4.1 Morfología y tamaño de partícula de las esferas poliméricas.....	157
6.4.2 Monitoreo de las partículas poliméricas en el tiempo	159
6.4.3 Influencia del tratamiento térmico y tiempo de envejecimiento sobre las propiedades de hinchamiento y estabilidad de las esferas poliméricas en AD. 164	
6.4.4 Influencia de la remoción de la fase oleosa y estabilizador dispersante en las propiedades de estabilidad es las esferas poliméricas en AD.	170
6.5 Conclusiones	172
6.6 Referencias	173
Capítulo 7	176
Conclusiones	176
7.1 Referencias	180

Capítulo 1

Microfluídica y aplicaciones

1.1 Introducción

1.1.1 Conceptos básicos de líquidos y gases

Los fluidos, a diferencia de los sólidos, se deforman mientras una fuerza sea aplicada y determinada por la interface o el límite sólido que los rodee. El movimiento del fluido está controlado por la interacción y la tensión entre las capas del fluido o las interfaces con el sólido que lo rodea. Los gases pueden ser expandidos y comprimidos más fácilmente que los líquidos debido a la menor densidad y mayor espaciamento entre sus moléculas. A escala molecular (\approx nanómetro) las interacciones entre las capas involucran colisiones de muchas moléculas[1]. En la macroescala ($>100 \mu\text{m}$), las propiedades físicas de un fluido resultan del promedio estadístico de esas interacciones moleculares[2].

1.1.1.1 Viscosidad de fluidos

A diferencia del estado sólido donde las moléculas están usualmente vibrando en posiciones fijas, las moléculas en los líquidos son libres para moverse y están limitadas únicamente por las fuerzas de cohesión que dan lugar a los efectos viscosos, que son afectados principalmente por la temperatura y levemente por la presión. Por lo tanto, al igual que los sólidos, los líquidos son tratados como incompresibles. Es por esto que la viscosidad es más importante para las moléculas de los líquidos, particularmente en el análisis de transporte de masa y calor de las interfaces líquido-líquido y gas-líquido[2].

La viscosidad (μ) o la viscosidad dinámica de un fluido es aquella propiedad que determina la cantidad de resistencia opuesta a las fuerzas cortantes. La viscosidad se debe primordialmente a las interacciones entre las moléculas

del fluido[3]. Es una medida de su resistencia a la deformación gradual por el esfuerzo de corte que se discute en términos de flujo de *Couette*. Como se muestra en la Figura 1. 1 un fluido contenido entre dos placas limítrofes: una estacionaria y otra placa móvil, que se mueven a velocidad horizontal constante. La mayoría de los fluidos tienen viscosidad diferente de cero. Un fluido que no presenta resistencia a la fuerza de cizalla se conoce como un fluido ideal. La viscosidad cero se observa únicamente a temperatura muy baja en superfluidos, como dos isótopos de helio, helio-3 y helio-4, debido a que son licuados a temperatura criogénica[2].

La magnitud de esta fuerza F es proporcional a la velocidad u y el área A de cada placa e inversamente proporcional a su separación y .

$$F = \mu A \frac{u}{y}$$

Ecuación 1.1

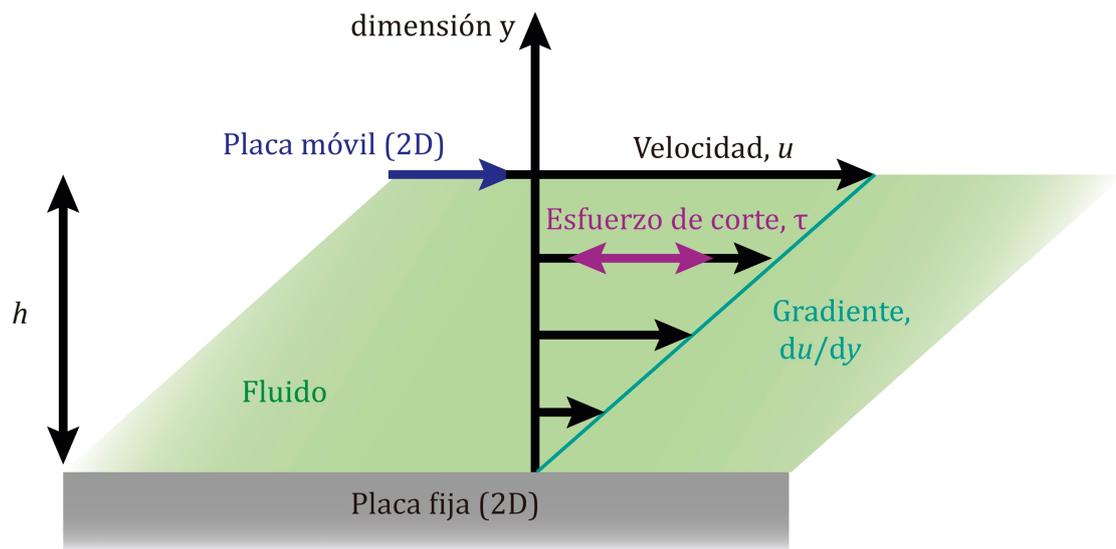


Figura 1. 1 Corte laminar del fluido entre dos placas. Fricción entre el fluido y los límites en movimiento causa que el fluido corte debido a la tensión (τ) causado por el gradiente de velocidad (du/dy) a una velocidad relativa del fluido (u). La fuerza requerida para esta acción es una medida de la viscosidad del fluido. Adaptado de Nam-Trung, *et al* 2019 [2].

El factor proporcional μ en esta fórmula es la viscosidad del fluido. En la macroescala el dispositivo *Couette* de flujo, la velocidad del fluido inmediatamente junto a la superficie será igual a la velocidad de la superficie. Si un fluido es Newtoniano, como el agua la velocidad del fluido cambia progresivamente de cero en la superficie estacionaria hasta la velocidad de la superficie móvil, o el gradiente espacial de la velocidad del fluido du/dy es una constante. En un flujo general paralelo (como el que ocurre en una tubería recta), la fuerza de cizalla es proporcional al gradiente de velocidad, como en la sección transversal de un microcanal rectangular. La relación u/y se denomina la tasa de deformación o velocidad de cizalla es la derivada de la velocidad del fluido en dirección perpendicular a las placas. Isaac Newton expresó las fuerzas viscosas mediante la ecuación diferencial.

$$\tau = \mu \frac{du}{dy}$$

Ecuación 1.2

donde τ es la tensión o esfuerzo de corte, $\tau=F/A$ y du/dy es el gradiente de velocidades. Esta fórmula asume que el flujo se está moviendo a través de líneas paralelas y el eje y , perpendicular al flujo, señala en dirección de la máxima velocidad de deformación tangencial. Esta ecuación puede ser usada donde la velocidad no varíe linealmente con y , como es el caso de un fluido que fluye a través de una tubería redonda, la cual es más apropiada para el tipo de flujo en un microcanal redondo.

La viscosidad de un fluido Newtoniano depende únicamente de la temperatura y la concentración. Para algunos fluidos, particularmente polímeros derretidos o fluidos biológicos como la sangre, su viscosidad depende también del estrés interno. Estos fluidos se clasifican como no-Newtonianos. Su viscosidad decrece con el incremento de la tasa de la tensión cortante $d\tau/dt$ aplicada a un fluido que fluye entre dos superficies

paralelas, una moviéndose a velocidad constante y otra estacionaria, y está definida por:

$$\frac{d\tau}{dt} = \frac{u}{h}$$

Ecuación 1.3

donde u es la velocidad de movimiento de la superficie y h es la distancia entre las dos superficies paralelas. Los fluidos no newtonianos exhiben comportamiento viscoelástico y algunos de ellos requieren una fuerza de cizalla inicial antes de empezar a moverse. Los fluidos viscoelásticos presentan un tiempo de relajación, que va desde milisegundos a segundos, está dado por el recíproco de la tasa de fuerza de cizalla crítica. Esta tasa crítica de la fuerza de cizalla corresponde al umbral en el que la viscosidad empieza a cambiar o en el caso de los polímeros derretidos, donde las cadenas poliméricas sufren la transición de una configuración enrollada a una estirada.

1.1.1.2 Tensión Superficial

Una molécula en el interior de un líquido está sometida a la acción de fuerzas atractivas en todas las direcciones, siendo la resultante nula. Pero si la molécula está en la superficie del líquido, sufre la acción de un conjunto de fuerzas de cohesión, cuya resultante es perpendicular a la superficie. De aquí que sea necesario consumir cierto trabajo para mover las moléculas hacia la superficie venciendo la resistencia de estas fuerzas, por lo que las moléculas superficiales tienen más energía que las interiores.

La tensión superficial de un líquido es el trabajo que debe realizarse para llevar moléculas en número suficiente desde el interior del líquido hasta la superficie para crear una nueva unidad de superficie (kgm m^{-2})[3].

1.1.1.3 Capilaridad

La elevación o descenso de un líquido en un tubo capilar (o en situaciones físicas análogas, tales como en medios porosos) vienen producidos por la tensión superficial, dependiendo de las magnitudes relativas de la cohesión del líquido y de la adhesión del líquido a las paredes del tubo. Los líquidos ascienden en tubos que mojan (adhesión > cohesión) y descienden en tubos a los que no mojan (cohesión > adhesión). La capilaridad tiene importancia en tubos de diámetros aproximadamente menores a 10 mm[3].

1.1.1.4 Difusión de masa

El mezclado de los fluidos depende no solo de su viscosidad sino también de su coeficiente de difusión de masa (D), que es el parámetro físico básico usado en la ley de Fick. La difusión representa la velocidad de la migración de la masa debido al movimiento térmico de las moléculas, átomos o iones sin el movimiento de la masa completa, lo cual puede ocurrir por uno o más movimientos de objetos entre las fases. Es proporcionalmente constante entre el flujo molar debido a la difusión y el gradiente de moléculas, átomos o iones en la concentración de las especies en los fluidos o la fuerza que conduce a la difusión. La unidad del Sistema Internacional (SI) para la capacidad de difusión es m^2s^{-1} , la misma que la viscosidad cinemática.

D es muy importante en el análisis y cálculo de la transferencia de masa, absorción, desorción y procesos de catálisis. La capacidad de difusión de las sustancias depende de la temperatura, la presión y la morfología del medio[2].

1.1.1.5 Capacidad calorífica

La capacidad calorífica es una cantidad física medible igual a la relación de calor (Q) añadida o removida de un objeto al cambio de temperatura resultante (ΔT), que es una propiedad extensiva de la materia o es proporcional al tamaño del sistema. La unidad en el SI de la capacidad calorífica es JK^{-1} o $\text{kg m}^2 (\text{Ks}^2)^{-1}$. Cuando expresamos el mismo fenómeno

como una propiedad intensiva, la capacidad calorífica está dividida por la cantidad de sustancia, masa o volumen, por lo tanto la cantidad es independiente el tamaño de la muestra y se denomina capacidad calorífica específica la cual es la cantidad de calor necesaria para elevar la temperatura de 1 kg de masa ($C_{P,m}$, $C_{V,m}$, J (kg K)⁻¹) o 1 m³ de volumen ($C_{P,v}$, $C_{V,v}$, J (m³ K)⁻¹) en 1 K[2].

Las moléculas polares que contienen hidrógeno (agua, etanol, tetrahidrofurano, amonio, glicerina, *N*-metilpirrolidona) tienen enlaces de hidrógeno intermoleculares poderosos en su fase líquida. Estos enlaces proveen posiciones adicionales donde el calor puede ser almacenado como energía potencial de vibración, incluso a temperaturas muy bajas.

En física, la conductividad térmica (κ) es la propiedad de un material para conducir el calor. Esta relacionada al transporte de electrones o fonones. Existen varios factores que afectan este parámetro, como la temperatura, fases, rutas de cambio de fases, orientación del cristal, conductividad electrónica, microestructura y densidad, campos magnéticos y tipos de flujo[2]. La característica espacial de escala en la microfluídica es el micrómetro, el cual está suficientemente alejado de la escala a la que pertenece el camino libre medio (λ) del movimiento molecular. Por lo tanto, la fase completa del fluido debe obedecer la ley de medio continuo, que puede ser tratado por la ecuación de continuidad. Consecuentemente, las propiedades de un fluido (densidad, presión, velocidad) permanecen constantes a cualquier punto definido y los cambios en estas propiedades debido a movimientos moleculares son insignificantes. Las propiedades físicas de los fluidos pueden ser definidas como funciones continuas de tiempo y espacio. Las ecuaciones básicas en mecánica de fluidos son aplicables a la microfluídica.

1.1.2 Microfluídica

La ciencia y tecnología de los sistemas que procesan o manipulan bajas (10^{-9} a 10^{-18} litros) cantidades de fluidos (líquido o gas) mediante canales con dimensiones de 10 a cientos de micrómetros se conoce como microfluídica[4]. En los últimos 30 años, la microfluídica ha evolucionado y florecido como una plataforma avanzada para proveer un ambiente simplificado y controlado. Según Whitesides[4], el campo de la microfluídica tiene cuatro padres: análisis molecular, biodefensa, biología molecular y microelectrónica. Las tecnologías de microfluídica han sido exploradas en su mayoría por disciplinas como la química, farmacéutica y la biología[5, 6]. De todas formas, también han sido aplicadas a la ciencia de la física para el control de sistemas, manejo de calor[7, 8] y generación de energía[9]. Además, la microfluídica ha convergido con la ingeniería de tejidos para dar lugar a la tecnología órgano en chip (OoC por sus siglas en inglés Organ-on-chip) para ofrecer soluciones efectivas a problemas persistentes en el desarrollo de medicamentos y tratamiento personalizado de enfermedades[10]. El origen de la microfluídica se produjo en la misma manera que la microelectrónica. Impulsado por la necesidad de mejorar las propiedades mecánicas usadas en las líneas telefónicas. Sin embargo, una manera importante en la que difiere la microfluídica de la microelectrónica es que la física fundamental cambia a medida que la escala se reduce[1]. William Shockley, Walter Brattain y John Bardeen de los laboratorios de la compañía telefónica Bell inventaron el transistor en 1947[11]. Esta fue la base del trabajo de Jay Andrus quien patentó la técnica del fotograbado, la cual fue previamente usada para crear patrones para imprimir tarjetas de circuitos para crear detalles más finos que permitieron imprimir en silicio dispositivos semiconductores[12]. La microfabricación ha aprovechado los procesos establecidos por la industria de semiconductores para la elaboración de circuitos integrados[13]. Los métodos de microfabricación han permitido organizar canales de microfluídica inspirados en situaciones *in vivo* dentro de microdispositivos. Esta tecnología ha logrado que la comunidad de los biomateriales y la de la ingeniería de tejidos dirijan sus esfuerzos hacia la plataforma OoC[14].

Los dispositivos de microfluídica han sido fabricados en materiales como vidrio, silicona, policarbonato(PC), polimetilmetacrilato (PMMA), placas de circuitos impresos (PCB), papel y polidimetilsiloxano (PDMS)[15]. La selección del material depende de la compatibilidad química, temperatura y presión así como también de la factibilidad de fabricación e integración[16]. Uno de los materiales extensamente explorados para construir estos dispositivos es el elastómero de silicona, PDMS. George Whitesides y su grupo en Harvard fueron los pioneros en usarlo[17]. El PDMS es biocompatible, posee la capacidad de replicar estructuras cuyo tamaño está a nanoescala, tiene un precio económico[18], posee alta permeabilidad al oxígeno O₂ y CO₂ lo que lo hace ideal para cultivo celular, además es transparente lo cual permite realizar observaciones morfológicas directas bajo el microscopio, visualizar y cuantificar eventos en tiempo real lo que les confiere a los microdispositivos la capacidad para ser una herramienta de diagnóstico[15].

1.1.2.1 Técnicas para producir microdispositivos.

En los últimos 40 años, se ha producido un énfasis cada vez mayor en la fabricación de dispositivos con dimensiones cada vez menores que están dispersos en múltiples escalas de longitud. Como se ilustra en la Figura 1.2, los sistemas multiescala involucran miniaturización mecánica que incluye los sistemas microelectromecánicos (MEMS), sistemas de microanálisis total (μ TAS) y sistemas químicos de micro energía (MECS)[19].

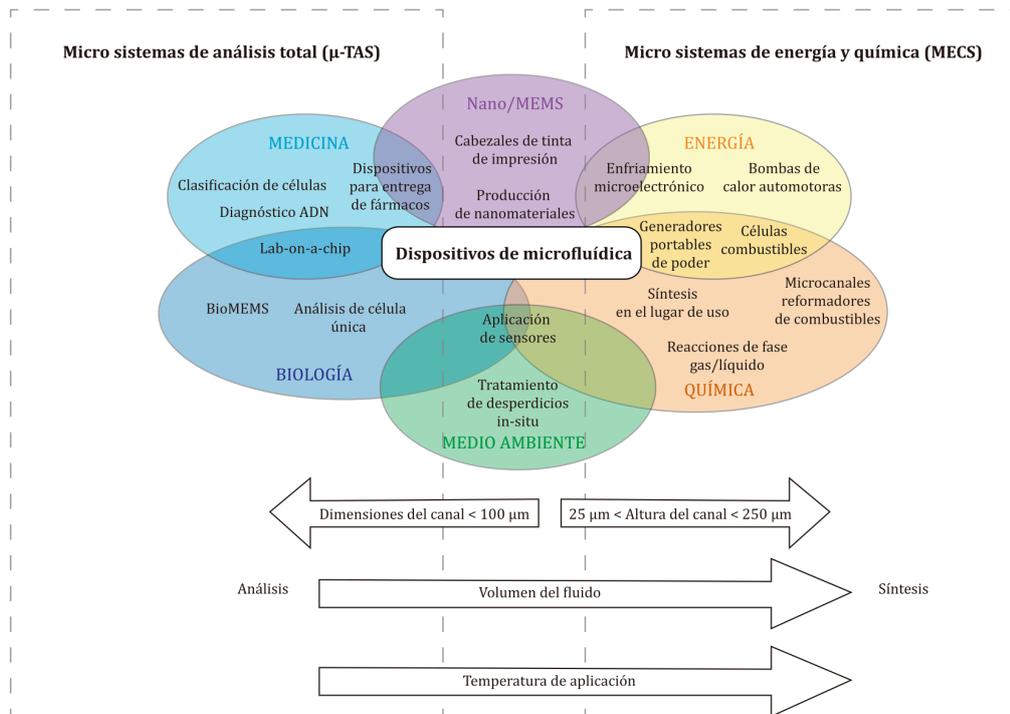


Figura 1. 2 Sistemas multiescala y aplicaciones de la microfluídica. Adaptado de Mahalik 2006 [19].

Existen diferentes técnicas para producir microdispositivos como micromecanizado, litografía, ablación láser[20] de éstos, la litografía suave es el proceso tradicional estándar para producción a baja escala[6]. Los moldes a partir de los cuales el PDMS replicará las estructuras, se fabrican mediante una máscara y una fuente lumínica para transferir el patrón a una resina negativa fotosensible, SU-8 desarrollada por IBM, que tomará la forma de la máscara.

Según la resolución requerida, la máscara se imprime a través de láser sobre una transparencia (resolución: 1200 dpi/250 μm), sobre una película delgada de polímero transparente para lograr una resolución más alta (10000 dpi/30 μm), y sobre cromo depositado en cuarzo para conseguir una fotomáscara de alta resolución (420000 dpi/600 nm). Las máscaras de más alta resolución son varios órdenes de magnitud más costosas y este factor limita el tamaño del microdispositivo a alrededor de 100 mm sobre un portaobjetos[18]. Por este motivo la búsqueda de alternativas para

fabricar dispositivos de microfluidica de forma accesible es uno de los aspectos en los que se enfoca esta tesis en la cual se describe la utilización del fotopolímero Flexcel [21] como alternativa a la resina SU-8 en el capítulo 2. El desempeño de los dispositivos fabricados mediante Flexel fue probado con la elaboración de microgotas[22].

1.1.2.2 Física en los microcanales

En la macroescala los fluidos se mezclan por convección, consecuentemente, la inercia domina el comportamiento del fluido mientras que en la microescala, cuando dos fluidos viajan juntos por un microcanal, fluyen paralelamente y la única mezcla que ocurre es el resultado de la difusión de moléculas a lo largo de la interface entre los fluidos[4]. La física de los fluidos está dominada por la relación entre las fuerzas de inercia y viscosidad. El número de Reynolds (Re) describe esta relación. Al reducir la escala, el efecto de la fuerza viscosa llega a ser dominante en la microfluidica a diferencia de lo que ocurre en la macroescala donde la fuerza inercial domina el comportamiento del flujo. Por lo tanto, el tipo de transporte de masa que domina deja de ser la convección y a microescala corresponde a la difusión[2].

$$Re = \frac{\rho v L}{\mu}$$

Ecuación 1.4

Donde ρ es la densidad del fluido, v es la velocidad, L es la dimensión lineal del sistema y μ es la viscosidad dinámica. De esta ecuación, se calcula un Re menor a 2000 cuando las dimensiones se reducen por lo tanto el régimen que gobierna esos sistemas es laminar. Consecuentemente, el transporte molecular en régimen laminar difiere del turbulento ya que no existe

mezclado por convección, únicamente por difusión. Adicionalmente el número de Péclet proporciona información sobre el transporte de masa de un fluido.

$$Pe = \frac{vL}{D}$$

Ecuación 1.5

Donde D es el coeficiente de difusión y Pe describe la relación entre el transporte por advección y difusión de moléculas en el fluido.

El comportamiento de la superficie del fluido difiere entre la macro y la microescala. La tensión superficial describe la afinidad de un fluido a modificar su superficie hacia una interface de aire para reducir su energía libre[12]. A diferencia de la tensión interfacial que rige el mismo fenómeno pero en dos fluidos inmiscibles como el agua y el aceite. Este fenómeno ha sido utilizado en el campo de la microfluídica de gotas[23].

En la escala micrométrica estas fuerzas dominan con respecto a la gravedad que es la fuerza dominante en la macroescala. y pueden ser usadas como un método para conducir fluidos sin la necesidad de bombas de infusión. Las fuerzas capilares dominan a la fuerza gravitacional a medida que las dimensiones se reducen. Estas fuerzas capilares describen la fuerza en un fluido que le permite desplazarse a través de un material poroso o un capilar angosto[12].

1.1.2.3 Ley de Pascal

Usualmente, la diferencia de presión es la fuerza que conduce el movimiento del fluido, sus unidades corresponden a pascal (Pa, $N\ m^{-2}$). Blaise Pascal fue un matemático y filósofo famoso francés que resumió la famosa ley de Pascal en canales: La presión ejercida en cualquier lugar sobre un fluido

estático, incompresible y encerrado se transmite íntegramente en todas las direcciones a lo largo del fluido. La presión ejercida por un fluido estático se denomina presión del fluido estático, la cual se origina del peso del fluido y también depende de la profundidad h , densidad ρ y la aceleración de la gravedad g :

$$P_{\text{fluido estático}} = \rho gh$$

Ecuación 1.6

La ley de Pascal indica que cualquier cambio de presión aplicada en un punto dado del fluido se transmite sin disminución a lo largo del fluido. Como se ilustra en la Figura 1. 3, esto hace posible que se multiplique la fuerza y constituye la base de la operación de la prensa hidráulica que provee la fuerza para levantar un peso utilizando una fuerza menor, o micro para transmitir una fuerza superior utilizando una palanca hidráulica[2].

1.1.2.4 Ley de Laplace

La relación entre la presión del fluido y la tensión de la pared de los recipientes de diferentes formas y tamaños puede ser descrita por la ley de Laplace quien fue un profesor francés cuyo trabajo contribuyó al desarrollo de la matemática, estadística, física y astronomía. También desarrollo la idea del potencial escalar y lo aplicó en la velocidad potencial de un fluido. La ley de Laplace establece que la tensión sobre la pared de una cámara de forma cilíndrica corresponde al producto de la presión por el radio del cilindro. Consecuentemente, un recipiente de radio amplio requerirá una mayor tensión en su pared que uno de radio menor para resistir la presión interna de un fluido dado. Además, para un recipiente de radio y presión interna dados, un recipiente esférico tendrá la mitad de la tensión de pared que un recipiente cilíndrico como se muestra en la Figura 1. 4 y se explica en la Figura 1. 5, si la presión del fluido permanece constante, la

componente ($\tau \sin \theta$) de la presión de la pared debe mantenerse en el mismo valor. Como la curvatura de la pared es menor ($\sin \theta$), la tensión total de la pared debe aumentar para obtener la misma componente de tensión.

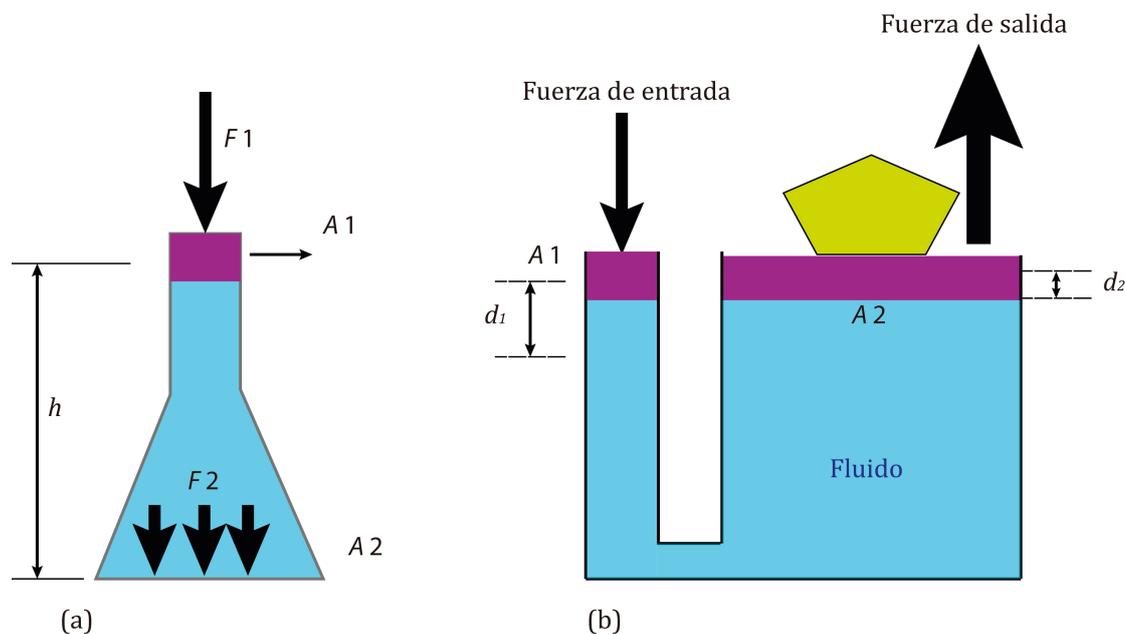


Figura 1. 3 Ilustración de la ley de Pascal. (a) La presión en el recipiente se transmite equitativamente a lo largo del fluido, o $F_1 A_1 = F_2 A_2$. (b) la operación de la prensa hidráulica se basa en el hecho de que cualquier cambio en la presión aplicada en cualquier punto dado de un fluido se transmite íntegramente a lo largo del fluido. Adaptado de Nam-Trung Nguyen, *et al.* 2019 [2]

Consecuentemente, los reactores esféricos tienen una forma más eficiente que los reactores cilíndricos aunque son más difíciles de elaborar a microescala. El flujo de sangre en las arterias y venas (tratados como un microcanal) son un buen ejemplo de la ley de Laplace en acción. Las paredes de las arterias más largas del cuerpo soportan tensiones superiores que las arterias más pequeñas que tienen una presión de sangre comparable. Las arterias están reforzadas por bandas fibrosas para fortalecerlas contra los riesgos de un aneurisma (los capilares con paredes delgadas funcionan por su radio pequeño). Si una arteria desarrolla un punto débil y se expande, la

expansión compromete a la pared debilitada a una tensión todavía mayor. La pared debilitada puede continuar expandiéndose y da lugar a un aneurisma que conduce a la ruptura del conducto. Es por esto que los aneurismas requieren una atención médica inmediata. Este aspecto también se toma en cuenta en el diseño de los microcanales. Por lo tanto, una fabricación sin defectos es significativa en los microcanales.

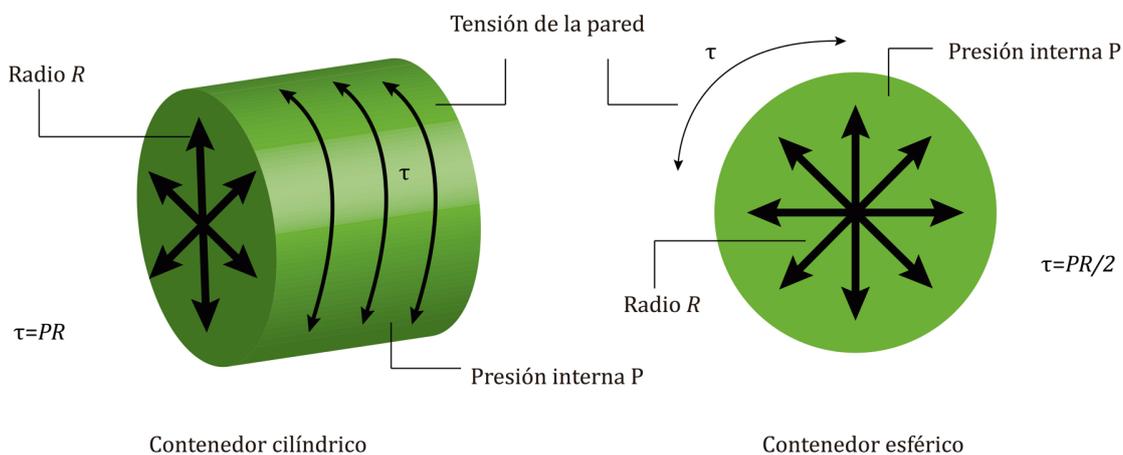


Figura 1. 4 La ley de Laplace indica que la tensión de la pared de un contenedor cilíndrico es el doble de uno esférico con el mismo radio y presión interna. Adaptado de Nam-Trung Nguyen, *et al.* 2019 [2]

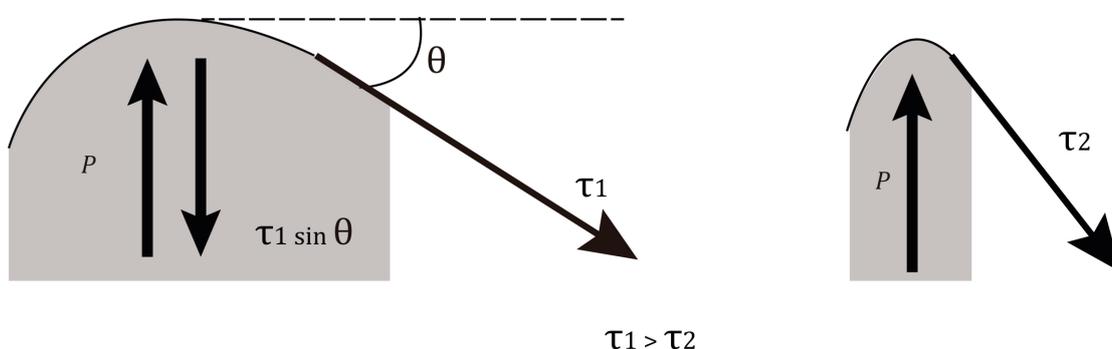


Figura 1. 5 La tensión de la pared τ aumenta con el radio de curvatura del contenedor debido a que a una presión interna fija P , la componente de la tensión de la pared ($\tau \sin \theta$) debe ser igual a P . Adaptado de Nam-Trung Nguyen, *et al.* 2019 [2].

1.1.2.5 Ecuación de Bernoulli

Una forma simple de esta ecuación es válida para fluidos incompresibles y para gases compresibles que se mueven a velocidades mucho menores que la velocidad del sonido en un gas particular. Esta ecuación puede ser derivada del principio de la conservación de la energía que señala que en un flujo estable de un fluido, la suma de todas las formas de energía mecánica permanecen constantes a lo largo de la línea de flujo. El fluido posee energía cinética debido a su movimiento, y también tiene energía potencial debido a su posición en el campo gravitacional de la Tierra. Además, se realiza trabajo sobre el fluido debido a la presión estática que actúa sobre él. Si no hay pérdidas por fricción, se aplica la ley de conservación de energía y la ecuación de Bernoulli es la siguiente:

$$P + \rho gh + \frac{1}{2}\rho u^2 = \text{constante}$$

Ecuación 1.7

Donde P es la presión hidrostática, h corresponde al altura sobre el nivel de referencia, u es la velocidad, ρ es la densidad y g es la aceleración debida a la gravedad en cualquier elemento de volumen en la línea de flujo del fluido. El término ρgh se conoce con el nombre de presión hidráulica y la expresión $\frac{1}{2}\rho u^2$ se denomina presión dinámica[2, 3].

1.1.2.6 Ecuación de Poiseuille

El principio de Bernoulli asume que el flujo del fluido no es influenciado por fuerzas viscosas. En 1840 Poiseuille derivó experimental y luego teóricamente la siguiente relación para el flujo de fluido a través de tuberías de sección transversal circular al asumir un flujo laminar en canales.

$$\Delta P = \frac{8\mu LQ}{\pi r^4}$$

Ecuación 1.8

Donde L es la longitud de la tubería, r es su radio interno y μ es la viscosidad dinámica del fluido. Esta relación se conoce también como la relación de *Hagen-Poiseuille* en reconocimiento a las contribuciones realizadas por Hagen.

En la práctica, los canales de microfluidica de sección transversal rectangular o semicircular son más fáciles de fabricar que aquellos con sección transversal circular, particularmente para los dispositivos LOC. El diferencial de presión ΔP de un canal rectangular con una alta relación de aspecto (ancho $w \gg$ altura h) puede ser calculado utilizando la siguiente fórmula al asumir flujo de tipo laminar:

$$\Delta P = \frac{12\mu LQ}{wh^3}$$

Ecuación 1.9

Mientras que para un canal cuya sección transversal es semicircular está definida por un radio de curvatura r , la caída de presión será calculada como:

$$\Delta P = \frac{64\mu LQ}{3r^4}$$

Ecuación 1.10

Consecuentemente, para cualquier geometría de canal, la caída de presión del flujo es directamente proporcional a la viscosidad del fluido. Si las paredes no son perfectamente lisas y suficientemente rugosas para inducir componentes en 3D del flujo del fluido cerca de las superficie de las paredes,

la caída de presión tenderá a ser mayor que la predicha por las ecuaciones anteriores y la caída de la presión del fluido será mayor[2].

1.1.2.7 Perfil de velocidad del flujo laminar en una tubería circular

El flujo laminar en un tubo de sección transversal circular adopta la forma de un tubo concéntrico de pared delgada y su velocidad aumenta desde cero en la pared de la tubería hasta ser máxima en la línea central de la tubería como se observa en la Figura 1. 6. El flujo es direccionado hacia el eje de la tubería y no hay gradientes de presión a través del diámetro de la tubería[2]. El desarrollo del perfil de velocidad a través de la sección transversal del microcanal puede ser determinado mediante la solución de las ecuaciones que gobiernan el movimiento del fluido, las ecuaciones de Navier-Stokes y la ecuación de la continuidad[24].

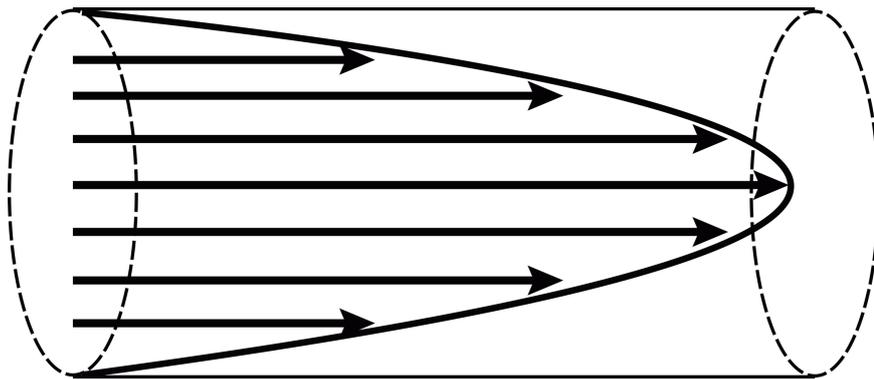


Figura 1. 6 El flujo laminar exhibe un perfil de velocidades parabólico. La velocidad es cero en las paredes del canal y alcanza su máximo valor en la línea central del canal. Adaptado de Pethig y Smith (2013)[25].

1.1.2.8 Tiempo de reacción

Los tiempos de reacción son mucho más reducidos en sistemas microfluídicos que en dispositivos convencionales. Esto se debe a las dimensiones más pequeñas del sistema que conducen a menores tiempos de difusión para cualquier molécula dada. Una aproximación del tiempo de difusión se muestra en la siguiente ecuación.

$$t \approx \frac{x^2}{2D}$$

Ecuación 1.11

Donde x es la distancia recorrida por una molécula de soluto a lo largo de un eje después de un tiempo, t , y D es el coeficiente de difusión del soluto. De la ecuación anterior es aparente que:

$$t \propto x^2$$

Ecuación 1.12

Por lo tanto, como las dimensiones del sistema se reducen, el tiempo en el que las moléculas se difunden por el sistema es menor. Consecuentemente, los tiempos de reacción son más rápidos en los dispositivos de microfluídica. Adicionalmente, el tamaño de los sistemas logra un consumo menor de reactivos que los dispositivos convencionales, esta propiedad los hace candidatos ideales cuando el costo de los reactivos es un limitante.

1.1.2.9 Formación de gotas en microfluídica

La técnica de fabricación de gotas es una subcategoría de la microfluídica que ha emergido como una herramienta versátil[15] para explorar el comportamiento de una célula almacenada en una microgota[26], rastrear en tiempo real los cambios en los flagelos del alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*[27], observar, cultivar e inmovilizar al

nemátodo *Caenorhabditis elegans*[28]. Las muestras y los reactivos pueden ser segmentados permitiendo varios procesos de selección. La compartimentalización de muestras y reactivos en volúmenes de nano y femtolitros en una fase continua inmiscible posibilita la creación de miles de volúmenes de reacción[29].

La tensión superficial actúa de forma que reduce el área interfacial y el estrés viscoso actúa de manera que extiende y arrastra la interfase en dirección a la corriente. Estos estreses desestabilizan la interfase y causan la formación de gotas. Una ventaja de esta estrategia es que se pueden producir gotas monodispersas (variación de volumen de gota menor al 5%), debido a la naturaleza determinística de los flujos de microfluídica[1]. Las emulsiones de agua en aceite se obtienen al dispersar una fase acuosa en una fase oleosa transportadora, usualmente suplementada con una molécula surfactante para estabilizar la emulsión. Sin embargo, el flujo laminar adoptado por los líquidos circulantes en los microcanales no es suficiente para generar las gotas con volumen controlado. La producción de emulsiones monodispersas requiere el uso de geometrías definidas.

En los procesos de microfluidica, un fenómeno interesante e importante que resulta del efecto de la tensión superficial es la interrupción de corrientes de fluido en gotas, la denominada inestabilidad Plateau-Reyleigh, y particularmente la formación de gotas entre fluidos inmiscibles, donde la tensión superficial/interfacial afecta significativamente la dinámica de las superficies e interfaces libres [1, 30].

Los generadores de gotas que producen gotas de tamaño controlado utilizan geometrías que aplican tensión de corte a la fase dispersa. En los primeros años del siglo XXI, Umbanhowar *et al.* [31] introdujeron la estrategia del co-flujo, donde la fase dispersa es liberada desde un capilar hacia la fase oleosa transportadora fluyendo en una dirección paralela fuera del capilar. Sin embargo, la complejidad de integrar capilares a través de los procesos de microfabricación convencionales ha excluido el uso de esos dispositivos.

Actualmente, el generador de gotas más utilizado tiene geometría plana que consiste en canales intersectados donde convergen a las fases acuosa y oleosa. Entre ellas, la unión T es frecuentemente usada para la producción de gotas grandes mientras que el flujo enfocado hidrodinámico es preferencialmente usado para generar gotas de menor tamaño o alta frecuencia de producción. Thorsen *et al.* (2001) demostró que los microdispositivos tienen la capacidad para la creación controlada gotas de emulsiones en fluidos no miscibles mediante la inyección de agua en una corriente de aceite en una unión en forma de T[32]. Además, el flujo enfocado pinned-jet es una atractiva variación de la unión T que permite producir gotas con una frecuencia que concuerda con la frecuencia operativa del módulo contiguo (ej. Combinador o clasificador de gotas)[33]. Actualmente, Agnihotri et al. (2020)[29] han demostrado la capacidad de controlar la división de gotas en dos ubicaciones mediante dos uniones T consecutivas para desarrollar una válvula que permita separar gotas seleccionadas.

1.1.3 Aplicaciones en ensayos celulares

El cultivo celular es una técnica biológica fundamental para varias investigaciones como el estudio de la química[34], fisiología[35] de las células y su respuesta a diferentes sustancias[36]. En las prácticas convencionales de cultivo celular, las células se siembran en recipientes como cajas Petri, o microplacas de distinto número de pocillos. Durante el transcurso del cultivo, el medio se provee manualmente y se reemplaza regularmente. Aunque esta operación está estandarizada y se utiliza ampliamente en la actualidad, restringe el rendimiento, limita la recapitulación del microambiente fisiológico[24] y la posibilidad de automatización[2]. El desarrollo de la microfluidica provee las capacidades para estudiar poblaciones menores de células y crear ambientes miniaturizados para su cultivo lo que facilita el rastreo y la simulación

dinámica. Este nivel de control ha permitido a los investigadores desarrollar plataformas para cultivo de tejidos.

En cuanto a las células adherentes a las paredes, el control hidrodinámico del microambiente afecta no solo a la tasa de la entrega de nutrientes y el reabastecimiento, también define la tasa de dispersión de moléculas extracelulares así como también del estrés mecánico como la fuerza de corte sobre las células adheridas a la pared[24]. Además los pequeños volúmenes aumentan la concentración de las proteínas secretadas[37].

Cuando las células son introducidas en un canal de microfluidica, las células presentan forma redondeada, éstas se sedimentan, se adhieren a la superficie del canal mediante atracción electrostática, o mediante proteínas sobre la superficie del canal a través de integrinas[38]. Una vez que las células se han adherido, éstas se aplanan y secretan proteínas de la matriz extracelular y empiezan a proliferar (Figura 1.7).

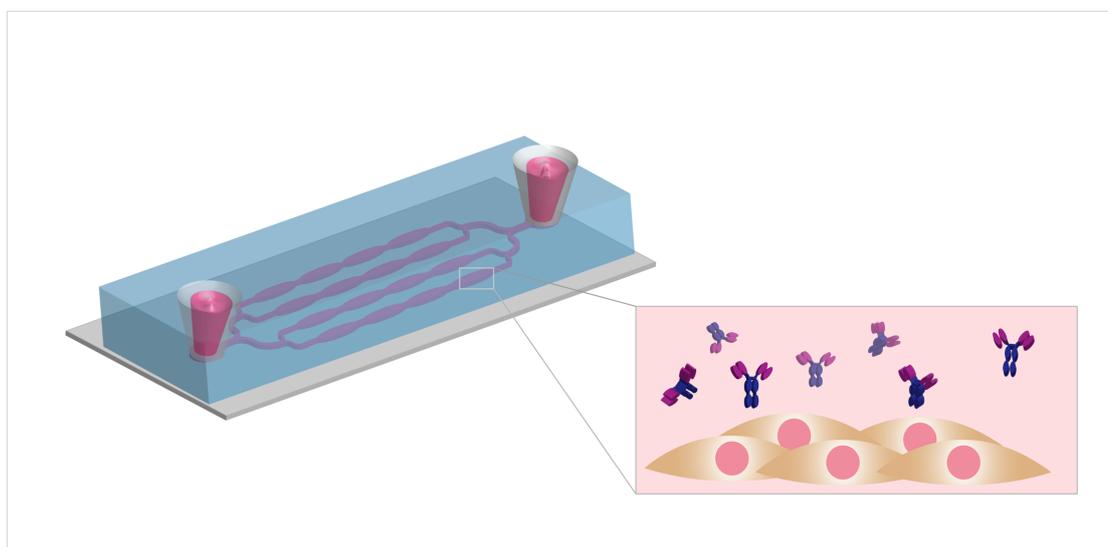


Figura 1. 7 Esquema de las células adheridas a la superficie del microcanal que secretan anticuerpos. Modificado de Bourguignon, *et al.* (2018) [50].

La adherencia celular es importante para dar inicio a la liberación de señales que regulan la diferenciación, el ciclo celular, la migración y la supervivencia celulares[39]. El flujo del fluido en los canales produce una tensión de corte sobre las células, la misma que compite con las fuerzas de adherencia entre las células y su sustrato[40]. Los flujos hemodinámicos presentan una

tensión de corte elevada (>1 Pa), esta tensión de corte induce una respuesta de estrés en las células adherentes, que puede conducir a la alteración de las propiedades de adherencia de las células, por lo que presentan forma redondeada, separación de la superficie y cambios en la expresión de proteínas de adherencia. La reconfiguración del citoesqueleto podrían provocar apoptosis de la célula en determinados escenarios[24, 41]. Mientras que a baja tensión de corte (<1 Pa) como en el intersticial, flujo extravascular en el cuerpo, las fuerzas hidrodinámicas constituyen una señal mecanotáctica que puede conducir al movimiento de una célula y afectar su diferenciación[24].

Con respecto a las células en suspensión en microescala, las fuerzas hidrodinámicas controlan la trayectoria celular y han sido ampliamente utilizadas en estudios celulares[24].

El establecimiento de modelos tridimensionales biofabricados representa un gran interés para descifrar las complejas interacciones celulares[42]. Los dispositivos de microfluidica también se han propuesto para fabricar cámaras de distinta profundidad al canal donde pueden almacenarse células. Esta idea se desarrolla en el capítulo 3 donde se detalla la fabricación de los dispositivos de multinivel cuya aplicabilidad se evaluó mediante el cultivo de células Jurkat como se ilustra en la Figura 1.8.

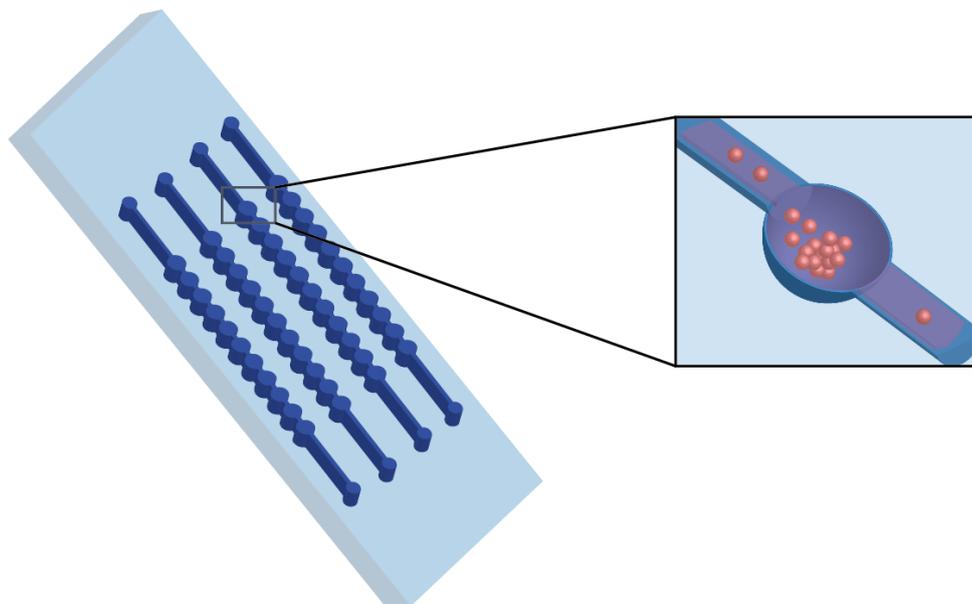


Figura 1. 8 Esquema de las células Jurkat suspendidas en una de las microcámaras del microdispositivo.

1.1.4 Aplicaciones químicas

Entre las aplicaciones de los dispositivos de microfluídica sobresale el estudio de la recuperación mejorada de petróleo (EOR por sus siglas en inglés *Enhanced Oil Recovery*). La utilización de dispositivos que simulan reservorios de petróleo ha sido propuesta para mejorar el entendimiento de estos complejos sistemas físico-químicos[43]. Los procesos críticos a macro escala que definen la extracción de petróleo están controlados por procesos a microescala como la mojabilidad, adhesión y tensión superficial. Los microdispositivos han sido aplicados para investigar métodos que reduzcan la saturación residual de petróleo. Los procesos de EOR pueden ser estudiados de mejor manera si se visualiza el desplazamiento los fluidos en redes porales micrométricas para entender cómo está atrapado el petróleo en los microporos. Es por esto que los micromodelos transparentes facilitan el análisis de la trayectoria de los fluidos ya que permiten observar el transporte del fluido en sistemas complejos que

involucran multifase, fracturas y geometría poral tanto en tiempo real como *in situ*[44].

En el capítulo 5 se describe la arquitectura de los dispositivos utilizados para visualizar los procesos en microescala[45].

Dada la transparencia del PDMS, la inspección y monitoreo de microesferas almacenadas en microcanales es posible y esta capacidad ha sido aprovechada para estudiar como se describe el capítulo 6, la influencia del tratamiento térmico y el envejecimiento en la estabilidad de microesferas utilizadas en recuperación mejorada de petróleo[46]. El comportamiento de las nanoesferas fue monitoreado mediante microscopía electrónica.

1.1.5 Microscopía electrónica

1.1.5.1 Microscopía electrónica de barrido

El Microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscope) es uno de los instrumentos disponibles más versátiles para la examinación y el análisis de las características microestructurales de objetos sólidos, y uno de los más utilizados en los trabajos de caracterización de esta tesis. La principal razón acerca de la utilidad del SEM es la alta resolución que puede ser obtenida al examinar objetos; valores en el orden de 2 a 5 nm (20-50 Å). Otra característica importante del SEM es la apariencia tridimensional de la imagen del espécimen, un resultado directo del campo profundo así como también de efecto de sombra y relieve de los electrones secundarios y la deflexión de los mismos.

En el SEM el rayo de electrones se llama “sonda”, a causa de la intensidad del rayo de electrones que para por la superficie del objeto. Los electrones en la sonda al encontrar un objeto, serán desviados por átomos en el objeto,

llamándose a esto “electrón disperso”. Sin embargo, a la vez algunos electrones en la sonda causan la emisión de “electrones secundarios” cerca de la superficie y los “rayos X” emitidos desde la sub-superficie del área del objeto[47].

La columna de electrones consiste de un cañón de electrones y dos o más lentes condensadoras que operan en vacío. El cañón de electrones produce una fuente de electrones y los acelera hasta alcanzar una energía en el rango de 1- 40 keV. El diámetro del haz producido directamente por el cañón de electrones convencional es demasiado amplio para generar una imagen enfocada y de alta magnificación. Los lentes de electrones son usados para reducir el diámetro de esta fuente de electrones y ubican un haz pequeño y dirigido sobre el espécimen[48].

1.1.5.2 Microscopía electrónica de transmisión

El Microscopio electrónico de transmisión (TEM por sus siglas en inglés Transmission Electron Microscope) utiliza un haz de electrones para visualizar y generar una imagen altamente magnificada. Los TEMs magnifican objetos hasta 2 millones de veces. Es el análogo al microscopio de luz, por el principio de la formación de imagen[47].

Un TEM emplea un haz de electrones a alto voltaje para crear una imagen. El cañón de electrones emite electrones que viajan a través del tubo de vacío del microscopio. En lugar de utilizar lentes de vidrio que enfoquen la luz, los TEM utilizan condensadores electromagnéticos que focalizan los electrones en un fino haz. Este haz pasa a través del espécimen, que es muy delgado, y los electrones que son despedidos o chocan con la pantalla fluorescente del fondo del microscopio[49].

La imagen en el microscopio electrónico está formada por grados de brillantez (oscuro y brillante). Cuando los rayos de electrones pasan muy cerca de un núcleo atómico o de un átomo en el espécimen, ellos se desvían mediante ángulos relativamente grandes, sin la pérdida de energía, a este fenómeno se lo conoce como Esparción Elástica.

El número de electrones desviados aumenta de acuerdo al espesor del espécimen y es también proporcional al número atómico del elemento (masa y espesor).

1.2 Referencias

1. Squires, T.Q., Stephen, *Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale*. Reviews of modern Physics, 2005. **77**(3): p. 977-1026.
2. Nam-Trung Nguyen, S.T.W., Seyed Ali Mousavi Shaegh, *Fundamentals and Applications of Microfluidics, Third Edition*. Artech House integrated microsystems series, ed. Artech House. 2019. 576.
3. Giles, R.V., *Mecánica de los fluidos e hidráulica*. 2da edición ed, ed. M.G. Hill. 1970.
4. Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 368-373.
5. Chi PY., T.F., Genot E., Chou CF., Taloni A. , *Cell migration in Microfluidic Devices: Invadosomes Formation in Confined Environments.*, in *Cell Migrations: Causes and Functions* Z.S. La Porta C., Editor. 2019, Springer, Cham: Advances in Experimental Medicine and Biology.
6. Ho, C.M.B., et al., *3D printed microfluidics for biological applications*. Lab on a Chip, 2015. **15**(18): p. 3627-3637.
7. Lian, Z., et al., *Measurements and modeling of two-phase flow in microchannels with nearly constant heat flux boundary conditions*. Journal of Microelectromechanical Systems, 2002. **11**(1): p. 12-19.
8. Valueva, E.P. and M.S. Purdin, *Heat exchange at laminar flow in rectangular channels*. Thermophysics and Aeromechanics, 2016. **23**(6): p. 857-867.
9. Ferrigno, R., et al., *Membraneless Vanadium Redox Fuel Cell Using Laminar Flow*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(44): p. 12930-12931.
10. Mastrangeli, M.M., S.; partners, T.O.; van den Eijnden-van Raaij, J., *Organ-on-Chip In Development: Towards a roadmap for Organs-on-Chip*. Preprints, 2019.
11. Warner, J., *Microelectronics: its unusual origin and personality*. IEEE Trans Electron Devices, 2001. **48**(11): p. 2457-2467.

12. Convery N., G.N., *30 years of microfluidics*. Micro and Nano Engineering, 2019(2): p. 76-91.
13. Barry, R. and D. Ivanov, *Microfluidics in biotechnology*. Journal of nanobiotechnology, 2004. **2**(1): p. 2-2.
14. Bhatia, S.N. and D.E. Ingber, *Microfluidic organs-on-chips*. Nature Biotechnology, 2014. **32**: p. 760.
15. Ai, Y., et al., *Microfluidics for Biosynthesizing: from Droplets and Vesicles to Artificial Cells*. Small. **0**(0): p. 1903940.
16. Jensen, K.F., *Silicon-Based Microchemical Systems: Characteristics and Applications*. MRS Bulletin, 2011. **31**(2): p. 101-107.
17. McDonald, J.C., et al., *Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. ELECTROPHORESIS, 2000. **21**(1): p. 27-40.
18. Friend, J. and L. Yeo, *Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane*. Biomicrofluidics, 2010. **4**(2): p. 026502.
19. Mahalik, N.P., *Micromanufacturing and Nanotechnology*, ed. Springer-Verlag. 2006, Germany.
20. David, J.B., a. Glennys A. Mensing, and M.W. Glenn, *Physics and Applications of Microfluidics in Biology*. Annual Review of Biomedical Engineering, 2002. **4**(1): p. 261-286.
21. Novaković, D., Dedijer, S. i Mahović Poljaček, S., *A model for improving the flexographic printing plate making process*. Tehnički vjesnik, 2010. **17**(4): p. 403-410.
22. Bourguignon, N., et al., *Accessible and Cost-Effective Method of PDMS Microdevices Fabrication Using a Reusable Photopolymer Mold*. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 2018. **56**(21): p. 1433-1442.
23. Shang, L., Y. Cheng, and Y. Zhao, *Emerging Droplet Microfluidics*. Chemical Reviews, 2017. **117**(12): p. 7964-8040.
24. Huber, D., et al., *Hydrodynamics in Cell Studies*. Chemical Reviews, 2018. **118**(4): p. 2042-2079.
25. Ronald, R.P.S., Smith, *Introductory Bioelectronics: For Engineers and Physical Scientist*, ed. Wiley. 2012. 462.

26. Clausell-Tormos, J., et al., *Droplet-Based Microfluidic Platforms for the Encapsulation and Screening of Mammalian Cells and Multicellular Organisms*. Chemistry & Biology, 2008. **15**(5): p. 427-437.
27. Ai, X., et al., *Controlling gas/liquid exchange using microfluidics for real-time monitoring of flagellar length in living Chlamydomonas at the single-cell level*. Lab on a Chip, 2012. **12**(21): p. 4516-4522.
28. Ying, D., et al., *A droplet-based microfluidic device for long-term culture and longitudinal observation of Caenorhabditis elegans*. BioChip Journal, 2012. **6**(3): p. 197-205.
29. Agnihotri, S., et al., *Microfluidic Valves for Selective On-chip Droplet Splitting at Multiple Sites*. Langmuir, 2020.
30. Quere, P.-G.d.G.F.B.-W.D., *Capillarity and Wetting Phenomena, Drops, Bubbles, Pearls, Waves*. 2004, New York: Springer-Verlag. 292.
31. Umbanhowar, P.B., V. Prasad, and D.A. Weitz, *Monodisperse Emulsion Generation via Drop Break Off in a Coflowing Stream*. Langmuir, 2000. **16**(2): p. 347-351.
32. Thorsen, T.R., R.; Arnold, F.; and Quake, S., *Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device*. Physical Review Letters, 2001. **86**.
33. Autour A, R.M., *Ultrahigh-Throughput Improvement and Discovery of Enzymes Using Droplet-Based Microfluidic Screening*. Micromachines, 2017. **8**(4): p. 128.
34. Samavedi, S., A.R. Whittington, and A.S. Goldstein, *Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior*. Acta Biomaterialia, 2013. **9**(9): p. 8037-8045.
35. Metallo, Christian M. and Matthew G. Vander Heiden, *Understanding Metabolic Regulation and Its Influence on Cell Physiology*. Molecular Cell, 2013. **49**(3): p. 388-398.
36. Ko, H.C. and B.D. Gelb, *Concise review: drug discovery in the age of the induced pluripotent stem cell*. Stem cells translational medicine, 2014. **3**(4): p. 500-509.
37. Lecault, V., et al., *Microfluidic single cell analysis: from promise to practice*. Current Opinion in Chemical Biology, 2012. **16**(3): p. 381-390.

38. Albelda, S.M. and C.A. Buck, *Integrins and other cell adhesion molecules*. The FASEB Journal, 1990. **4**(11): p. 2868-2880.
39. Huang, S. and D.E. Ingber, *The structural and mechanical complexity of cell-growth control*. Nature Cell Biology, 1999. **1**(5): p. E131-E138.
40. Zhu, X., R. Bouffanais, and D.K.P. Yue, *Interplay between motility and cell-substratum adhesion in amoeboid cells*. Biomicrofluidics, 2015. **9**(5): p. 054112-054112.
41. DeMeester, S.L., et al., *Stress-induced fractal rearrangement of the endothelial cell cytoskeleton causes apoptosis*. Surgery, 1998. **124**(2): p. 362-371.
42. Schmidt, S.K., Schmid, Rafael., Arkudas, Andreas., Kengelbach-Weigand Annika, Bosserhoff, Anja K., *Tumor Cells Develop Defined Cellular Phenotypes After 3D-Bioprinting in Different Bioinks*. Cells, 2019. **8**(10): p. 1295.
43. Lifton, V.A., *Microfluidics: an enabling screening technology for enhanced oil recovery (EOR)*. Lab on a Chip, 2016. **16**(10): p. 1777-1796.
44. Conn, C.A., et al., *Visualizing oil displacement with foam in a microfluidic device with permeability contrast*. Lab on a Chip, 2014. **14**(20): p. 3968-3977.
45. Rosero, G., et al., *Design and analysis of different models of microfluidic devices evaluated in Enhanced Oil Recovery (EOR) assays*. Matéria (Rio de Janeiro), 2018. **23**.
46. Rosero, G., et al., *Influence of thermal treatment and aging time on the stability and swelling properties of nano/micron-sized polymeric spheres for improved oil recovery application*. Journal of Applied Polymer Science, 2019. **136**(41): p. 48030.
47. Amano, Y.C., Linda, *INTRODUCCIÓN A LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA PRINCIPIOS - APLICACIONES*. Instituto Nacional de Investigaciones en Salud Pública INSPI. 2015, Ecuador.
48. Goldstein, J., Newbury, D.E., Joy, D.C., Lyman, C.E., Echlin, P., Lifshin, E., Lyman, C., Roming, J.R., *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*, ed. P. Press. 1992, New York.
49. Cheadle Center for biodiversity & ecological restoration, C.C.f.b.E. *The transmission Electron Microscope*. 2007.

50. Bourguignon, N., Attallah, C., Karp, P., Booth, R., Peñaherrera, A., Payés, C., Pérez, M., Helguera, G., Lerner, B., *Production of monoclonal antibodies in microfluidic devices*. Integrative Biology, 2018. **10**(3): p. 136-144.

Capítulo 2

Desarrollo de dispositivos de microfluídica para cultivo de células y estudio de fluidos en medios porosos.

2.1 Introducción

Teniendo como objetivo general de esta tesis el desarrollo de dispositivos de microfluídica para su aplicación en cultivo celular y estudio de fluidos en medios porosos, se han explorado diversas tecnologías de fabricación para encontrar la forma óptima de cumplir con este objetivo.

Entre las tecnologías utilizadas se pueden mencionar la fabricación por medio de moldes con fotoresina SU-8 en cleanrooms, ablación láser, mecanizado por control numérico por computadora (CNC), impresión 3D y finalmente, moldes con polímero Flexcel.

El último de los métodos desarrollados (moldes Flexcel) ha demostrado numerosas ventajas y ha permitido realizar varias publicaciones. Los dispositivos de microfluídica fabricados por este método, han permitido utilizarlos con éxito en numerosas aplicaciones, y cumplir de esta manera los objetivos específicos planteados para esta tesis.

A continuación, se describen en detalle los trabajos realizados, comenzando por el desarrollo de los dispositivos microfluídicos en el polidimetilsiloxano (PDMS).

El PDMS ha sido ampliamente utilizado en la fabricación de dispositivos de microfluídica, porque este elastómero transparente ofrece resistencia química y biocompatibilidad[1]. Además, los dispositivos de PDMS son fáciles para fabricar y habilitan un amplio rango de aplicaciones. Los microdispositivos de PDMS se fabrican en su mayoría mediante la tecnología de litografía[2], a través de la fotoresina SU-8 que es la más utilizada para este propósito[3]. Esta técnica permite la creación de microestructuras con alta resolución ($\cong 1\mu\text{m}$)[4]. Sin embargo, la SU-8 tiene desventajas significativas: los moldes se elaboran sobre obleas de silicio que son frágiles, su tamaño es limitado (normalmente no puede ser más ancho

que 4 o 6 pulgadas), y la fotoresina es susceptible a delaminarse[4]. Adicionalmente, la fabricación de los moldes de SU-8 requiere instalaciones como un cuarto limpio, el cual no está disponible en todos los países por lo que limitan su uso a los laboratorios que tienen acceso a equipos costosos para generalizar las máscaras y realizar el proceso litográfico.

El aumento de las aplicaciones lab-on-a-chip en varios campos de la investigación concede la oportunidad de desarrollar nuevas metodologías de bajo costo y alta viabilidad para la fabricación de dispositivos de microfluídica. La literatura reporta muchas alternativas de técnicas de fabricación que no requieren litografía como bloques de construcción de termoplásticos[5], máscara transferida por tóner[6], moldes de cera[7, 8], moldes líquidos[9, 10], ablación láser y PDMS reusable[11], tratamiento láser para aumento de tamaño en PMMA[12], grabado de semicontacto[13], sellos de acero inoxidable[14], formación de capilares[15], películas de impresión de fotopolímeros[16] e impresión de transferencia[17]. De todas formas, la mayoría de estas técnicas no consiguen la resolución de las fotoresinas, o su procesado es costoso.

La motivación de este trabajo ha sido la fabricación de dispositivos de PDMS para estudios de Recuperación Mejorada de Petróleo (EOR), mediante el uso de una alternativa costo-efectiva que no requiere litografía. En los últimos años, ha incrementado el interés en el uso de los microdispositivos para ensayos de EOR. Los dispositivos de microfluídica para EOR ofrecen una nueva metodología para obtener información sobre compuestos potenciales en la exploración de petróleo y su producción, permitiendo un mejor entendimiento de los mecanismos de acción de los fluidos en el reservorio[18, 19].

Los dispositivos de microfluídica para evaluar métodos de EOR tienen varias ventajas como la relación costo-efectividad, reproducibilidad, requieren un volumen bajo de reactivos, disminuyen los tiempos de prueba, ofrecen versatilidad en el diseño y son portables[20]. Los ensayos de EOR

proveen menor impacto ambiental, ya que se consumen menor cantidad de reactivos en los ensayos. Consecuentemente, se generan menos residuos de laboratorio. Karadimitriou y Hassanizadeh explicaron en detalle los métodos de microfabricación para estudiar flujo de dos fases en medios porosos y la relevancia de los sistemas de microfluídica para EOR[20]. La microfabricación ofrece nuevas alternativas para el estudio de los procesos de EOR al diseñar y manufacturar microsistemas que imitan las formaciones de roca porosa porque la longitud del poro en las rocas que albergan el petróleo está en el rango de la microescala[21].

En este capítulo, se describe un proceso simple y accesible para la fabricación de dispositivos de PDMS mediante el uso de una lámina de fotopolímero. El fotopolímero se denomina Flexcel y ha habilitado la fabricación de moldes maestros con dimensiones de hasta 1270x 2062 mm², en cuanto al altura, está comprendida en el rango desde 53 a 1500 μm[22]. Este fotopolímero otorga dimensiones precisas y una reproducción de punto mínimo de 10 μm. La fidelidad de reproducción, estabilidad y durabilidad del molde fotopolimérico (Fmold) fue evaluada al producir has 50 réplicas de PDMS. Las características morfológicas superficiales del Fmold y las réplicas de PDMS fueron examinadas por microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), y perfilometría. La fabricación y la funcionalidad de los dispositivos de microfluídica fueron evaluadas a través de ensayos de EOR como prueba de concepto.

2.2 Metodología

2.2.1 Fabricación del Fmold

La lámina de impresión de fotopolímero Flexcel SRH y la película DITR usada en la fabricación de moldes (Fmold) fueron provistas por Eastman

Kodak[23]. Se seleccionaron láminas de 1270 x 1062 mm² del Flexcel SRH y la película DITR para la fabricación de los moldes. El espesor del fotopolímero corresponde a 1.14 mm[24]. La lámina flexográfica está compuesta por un polímero a base de elastómero y estireno sobre una lámina a base de polietileno y teraftalato [25, 26]. Esta lámina flexográfica fue lavada con solvente. Los compuestos orgánicos fueron entrecruzados a través de la exposición a longitudes de onda UVA como iniciadores del entrecruzamiento y longitudes de onda UVC se utilizaron para finalizar la reacción, para generar estructuras molecularmente estables e insolubles en la solución de revelado.

Para fabricar el molde Fmold (Figura 2. 1), la red de microcanales fue diseñada con el software Layout editor[27], el diseño fue transferido a la película DITR mediante un láser infrarrojo de 2400 ppi. Luego, la película fue colocada sobre la lámina de impresión flexográfica no expuesta antes de ser expuesta a la luz UVA a 0.45 J en el lado reverso mientras que el lado frontal fue expuesto a luz UVA a 19 J durante 360s. El tiempo de la exposición UVA en el lado reverso varía durante el proceso. Después de la exposición, la película fue removida. Finalmente, la película de impresión flexográfica fue lavada con solvente PROSOL N-1 a 360 mm min⁻¹ y fue secada en un horno a 50°C durante 30 minutos.



Figura 2. 1 Método de fabricación del Fmold.

En el último paso, la lámina de impresión flexográfica fue expuesta a luz UVC a 10 J durante 17 minutos y luz UVA a 4 J por 2 minutos en la parte frontal. El mismo procedimiento se aplicó para preparar el Fmold usado para fabricar la réplica de PDMS-piso sin aplicar diseño.

El Fmold obtenido fue recubierto con una capa ultrafina de SiO_2 a través de deposición de vapor química mejorada por plasma. Un reactor PECVD fabricado en el laboratorio proveyó una fuente de poder eléctrico continuo de descarga de 900 V con capacitancia e impedancia correspondiente. La cámara de vacío fue construida con un tubo de vidrio Pyrex de 80 cm de largo y 15 cm de diámetro.

Se utilizó hexametildisilazano (HMDS) (Dow Corning) como monómero precursor. La entrada del gas de trabajo (O_2) fue localizada al final de la cámara de vacío, lejos del sustrato, esto posibilitó la ionización en el área de generación de la descarga y la producción del recubrimiento de SiO_2 . El

proceso de recubrimiento fue desarrollado según las condiciones establecidas por Lasorsa *et al* [28]. Las condiciones de trabajo del PEVCD fueron: flujo de O₂ 8 ml.s⁻¹, presión de gas 1mbar, tiempo de exposición 3 h. Cabe recalcar que el Fmold sin ningún tratamiento se considera Fmold mientras que el molde cubierto con una película ultrafina de SiO₂, se denomina Fmold-T (tratado con SiO₂).

2.2.2 Fabricación del microdispositivo de PDMS

Los microdispositivos de PDMS (Sylgard 184, Dow Corning, USA) fueron fabricados de la forma descrita en Peñaherrera *et al*[29]. Brevemente, el prepolímero PDMS fue mezclado con su agente curante en una relación 10:1. Luego la mezcla se colocó en vacío para remover las burbujas de aire producidas durante la mezcla. A continuación, la mezcla se vierte sobre el Fmold-T y se cura en un horno a 40°C hasta el siguiente día. Antes de fabricar el dispositivo, el Fmold-T fue silanizado utilizando tricloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctil) silano (Sigma-Aldrich, Argentina) por deposición de vapor en vacío.

Después del curado, la réplica de PDMS se desprendió del molde y se elaboraron el inlet y outlet con un sacabocados para conectar el dispositivo con la bomba de infusión a jeringa (ADOX-Activa A22). Para ensamblar el microdispositivos, la réplica de PDMS fue enlazada de forma irreversible al piso de PDMS utilizando plasma de oxígeno en un reactor PECVD. Las superficies del PDMS fueron activadas por plasma de O₂ (900 V, 1 mbar, 30 s) para dar lugar a la formación del grupo -SiOH sobre la superficie del PDMS. Después de la activación, las réplicas de PDMS ponen en contacto inmediatamente.

2.2.3 Caracterización

La morfología de la superficie de los Fmold y de las réplicas de PDMS fue determinada mediante el microscopio electrónico de barrido (TESCAN FEG SEM MIRA3). Para evitar disturbar la muestra, las mediciones de SEM se llevaron a cabo aplicando voltajes entre 3 y 5kV. Previamente, los moldes fueron metalizados con una capa de oro de 20 nm de espesor. La rugosidad del Fmold fue determinada a través de microscopía de fuerza atómica (Dimension Icon con ScanAsyst, Bruker, Ecuador). Las imágenes de AFM fueron adquiridas en el modo ScanAsyst a temperatura ambiente utilizando una punta con constante elástica 0.71 N/m. La rugosidad promedio (Ra) se determinó al aplicar el software de Análisis Nanoscope a múltiples imágenes adquiridas a posiciones aleatorias en áreas de escaneo de 50 x 50 μm^2 . Las imágenes de AFM reportadas en este trabajo fueron reproducibles en al menos 5 puntos sobre la superficie de la muestra. Las mediciones de perfilometría fueron realizados mediante el perfilómetro Dektak XT de Bruker y el análisis fue conducido en el software Visio 64. Las imágenes de Fmolds y de los microdispositivos de PDMS fueron tomadas con un magnificador binocular (Biotraza) acoplado a una cámara digital.

2.2.4 Aplicaciones

Para evaluar la funcionalidad de la metodología de fabricación de microdispositivos a partir del Fmold propuesto, se diseñaron dispositivos de microfluídica para ser empleados en aplicaciones de EOR. La Figura 2.2 muestra el diseño del dispositivo de microfluídica usado para los experimentos de EOR. La porosidad, volumen poral (PV) y la altura corresponden a 32%, 22 μL , 81 μm , respectivamente. Los tamaños de garganta poral son 400 y 650 μm .

El experimento de recuperación de petróleo fue realizado con petróleo crudo, agua desionizada con colorante acid blue, y el polímero poliacrilamida (1000 ppm). El petróleo crudo usado en este experimento presentó una densidad de 0.81 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y una viscosidad de 4.42 cP a 25°C.

Antes de la inyección de petróleo en el dispositivo, se removieron sus impurezas por centrifugación. El magnificador binocular fue usado para observar el flujo dentro del canal. Se acopló una cámara digital Canon T3-1 para registrar el fenómeno. Las imágenes del experimento fueron obtenidas y el análisis se realizó utilizando el software Fiji Image J[30].

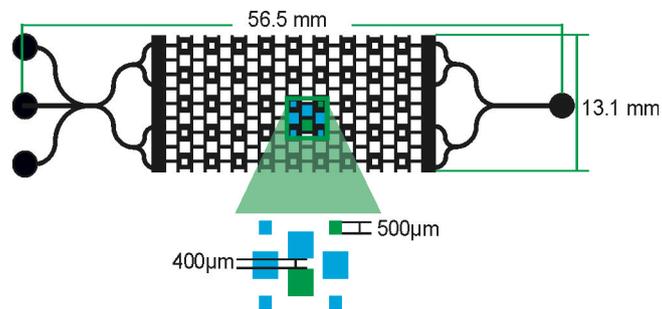


Figura 2. 2 Diseño del dispositivo de microfluídica para los experimentos de EOR.

2.2.5 Generación de microgotas

Se diseñó un dispositivo de microfluidica que genera gotas de emulsión simple. Está formado por una boquilla de 70 μm de ancho. Como fase dispersa se utilizó una solución de anilina al 2% (w/v) que fue impulsada mediante una bomba de infusión a jeringa (AcTIVA ADOX A22) a un flujo constante de 0.03 mL h^{-1} , la fase continua que se usó fue el aceite mineral (Sigma-Aldrich) con surfactante (10% p/v) SPAN 80 (Sigma-Aldrich) con un flujo de 0.01 mL h^{-1} .

2.2.6 Adquisición de imágenes de las microgotas

Para capturar las imágenes de la formación de las microgotas, se utilizaron los objetivos 5X y 10X del microscopio Olympus BX40 y una cámara digital Canon T3-I Rebel acoplada al microscopio. A partir de las múltiples

adquisiciones se creó una serie de imágenes para analizar la distribución de tamaño de las microgotas generadas. Para esto, se midió el área de 100 microgotas utilizando el procesador de imágenes Fiji y se reportó el diámetro promedio y la desviación estándar.

2.3 Resultados y discusión

El objetivo de este estudio fue proveer un método accesible y costo efectivo para fabricar microdispositivos de PDMS comparado con los métodos convencionales. Los datos obtenidos mediante la caracterización aportaron la información para su aplicación en el campo de la microfluídica como los ensayos de EOR.

2.3.1 Caracterización del molde

La Figura 2.3 describe la altura de las estructuras en función de la longitud escaneada. La exposición a luz UVA durante 35, 40 y 48 segundos generó moldes con alturas de 297, 211 y 81 μm , respectivamente. Estos resultados demostraron una relación inversa entre el tiempo de exposición a la luz UVA y la altura de la estructura.

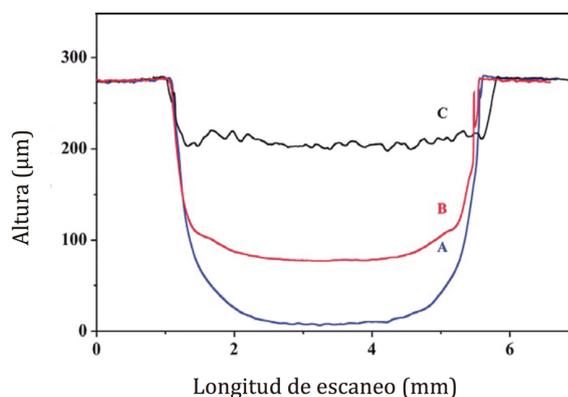


Figura 2. 3 Medición de altura de las estructuras formadas en el Fmold. Tiempo de exposición a la luz UVA sobre el lado reverso: A:35 s, B: 40 s, y C: 48 s. Las mediciones de alturas fueron obtenidas mediante la técnica de perfilometría.

Se estudió el efecto del tiempo de exposición a la luz UVA sobre la morfología de la superficie a través de la medición de la rugosidad de los moldes Fmold. La Figura 2. 4 presenta las imágenes obtenidas por el AFM y la rugosidad promedio correspondiente (Ra). Estas mediciones e imágenes muestran los cambios superficiales producidos por el efecto del tiempo de exposición a la luz UVA.

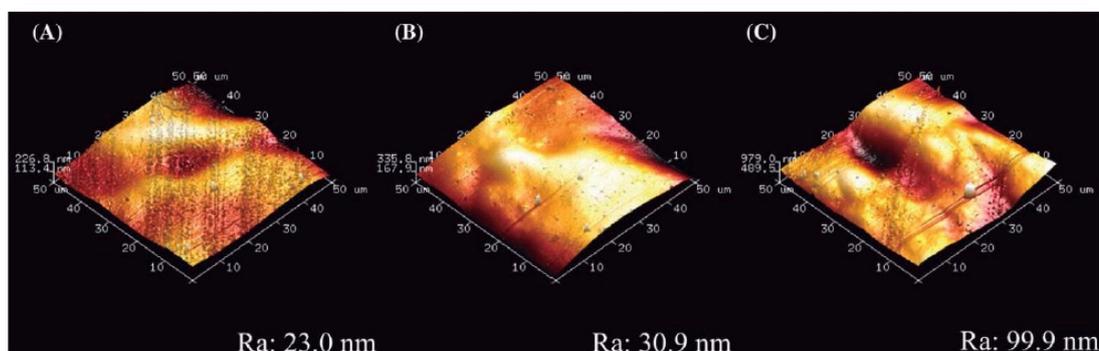


Figura 2. 4 Imágenes de la superficie del molde obtenidas con el microscopio de fuerza atómica (AFM). Ra representa el valor promedio de la rugosidad. El tiempo de exposición sobre el lado reverso: A: 35 s, B: 40 s, y C: 48 s.

El orden de los valores de los parámetros de rugosidad es el siguiente, A: 23 nm (35 s) < B: 30.9 nm (40 s) < C: 99.9 nm (48 s). El molde Fmold C es mucho más rugoso que los moldes Fmold B y A. Específicamente, los cambios en la superficie del Fmold pueden ser atribuidos a cambios en el grado de entrecruzamiento del material[31], así como también modificaciones del tipo de enlaces en la capa superficial[32] causados por el tratamiento con UVA. En comparación con otros moldes tradicionales, los moldes Fmold presentan una rugosidad más alta que la resina SU-8 (10 nm) [33] pero más

baja que la rugosidad del molde fabricado por 3D Systems ($2\ \mu\text{m}$) [34, 35] microtallado ($0.5\ \mu\text{m}$) [34] y ablación láser ($7\ \mu\text{m}$) [34, 36].

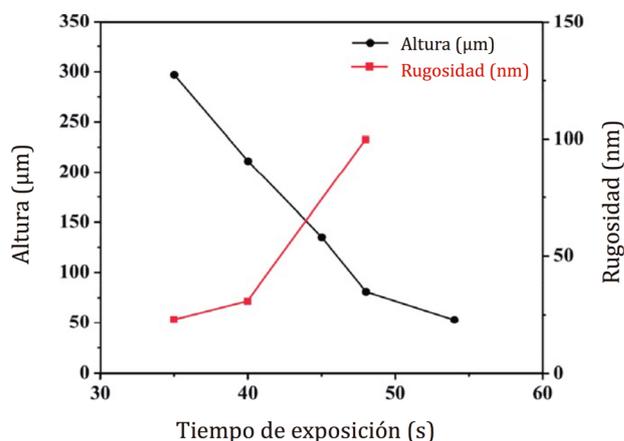


Figura 2. 5 Efecto del tiempo de exposición a la luz UVA del lado reverso en la altura de las estructuras y la rugosidad de la superficie.

Se encontró una dependencia directa entre el tiempo de exposición a la luz UVA y la rugosidad de la superficie, en contraste, una prolongada exposición a la radiación UVA causa la disminución de altura (Figura 2. 5). Estos resultados proveen información valiosa sobre las propiedades superficiales las cuales son relevantes en la aplicación de los dispositivos de microfluídica.

Los moldes Fmold con dimensiones correspondientes a la prueba estándar USAF 1951[37] fueron fabricados al aplicar un tiempo de exposición de 54 s y 45 s sobre el lado reverso. Esto resultó en alturas de 53 y 135 μm , respectivamente. Estas mediciones se incluyen en la Figura 2. 6.

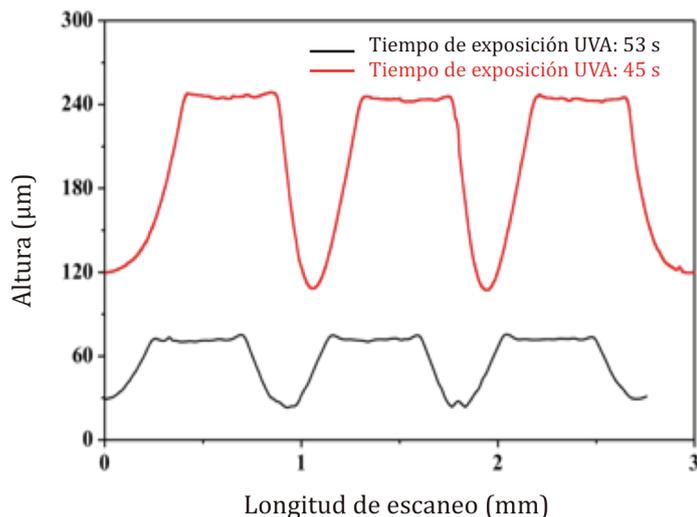


Figura 2. 6 Mediciones realizadas por perfilometría de alturas obtenidas a diferentes tiempos de exposición a la luz UVA del Fmold-T con dimensiones estándares USAF 1951.

La Figura 2. 7 muestra imágenes de SEM del Fmold con estructuras rectangulares y dimensiones adquiridas de ensayos estándares USAF 1951. Las estructuras diseñadas con el software Layout Editor resultaron en el rango entre 10 y 520 μm . Las imágenes indican formas rectangulares distribuidas uniformemente, con estructuras con tamaño comprendido en el rango de 25 a 520 μm . Las imágenes de SEM del molde Fmold evidencian la inclinación de las estructuras a cada lado. Además, los anchos menores a 25 μm no fueron resueltos. La relación de la inclinación a cada lado con la exposición UV ha sido previamente reportada por Lui *et al*[38], quienes investigaron la influencia del tiempo de exposición de la cara frontal sobre el ángulo que se forma. Mientras el tiempo de exposición de la cara frontal aumenta de 2 a 15 minutos, el ángulo incrementa significativamente de 22° a 33°, respectivamente.

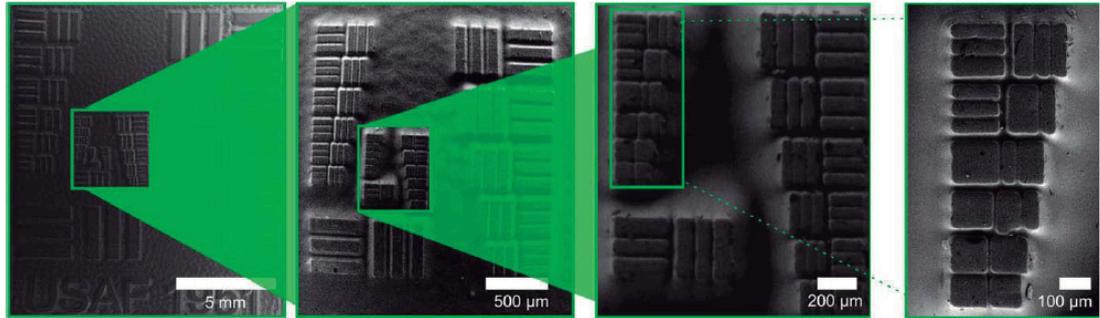


Figura 2. 7 Imágenes adquiridas mediante SEM de las estructuras talladas en el Fmold. Condiciones de fabricación: primer paso, tiempo de exposición a la luz UVA sobre el lado reverso=54 s; tiempo de exposición a la luz UVA sobre el lado frontal= 360 s.

La uniformidad de la altura de la estructura se evaluó mediante perfilometría. La Figura 2. 8 muestra que la altura de las estructuras asignadas 1-9 en la figura miden en promedio 53 μm , mientras que las estructuras 10 y 11 muestran valores de 42 y 38 μm , respectivamente. La diferencia de alturas se debe a la inclinación de las estructuras que causan solapamiento.

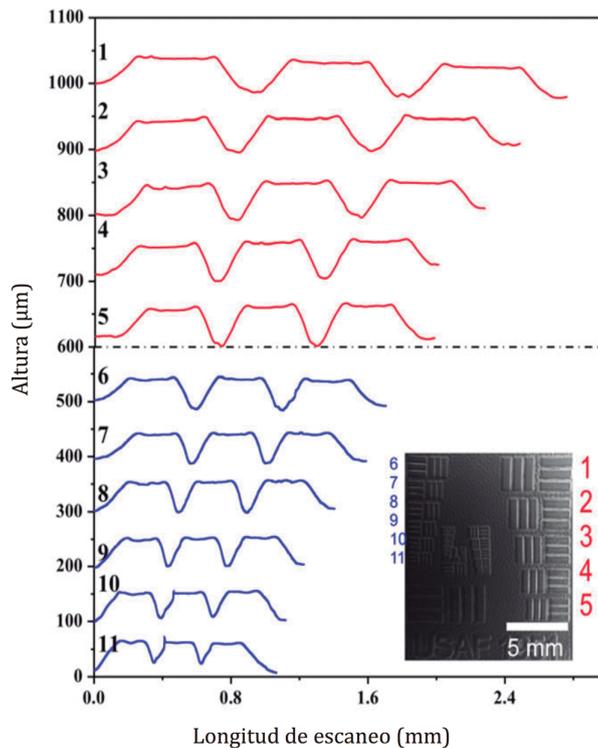


Figura 2. 8 Mediciones de alturas del Fmold registradas por perfilometría. Imagen de SEM ubicada al lado derecho. Condiciones de fabricación: primer paso, tiempo de exposición a la luz UVA sobre el lado reverso = 54 s; tiempo de exposición a la luz UVA sobre el lado frontal= 360 s. Las mediciones de las Alturas fueron determinadas por la técnica de perfilometría ($n= 3$).

La Figura 2. 9 (a,b) muestra imágenes de SEM de la sección transversal del molde Fmold, se observan formas trapezoidales en la estructura. Estas formas características generan un solapamiento de estructuras contiguas y se muestra en una representación (Figura 2. 9(c)).

Figura 2. 9(d) muestra la comparación de las alturas de las estructuras a diferentes distancias de separación. La altura es uniforme mientras la distancia de separación entre las estructuras es mayor a $170 \mu\text{m}$, esto demuestra que la forma trapezoidal no representa una limitación para la fabricación de dispositivos de PDMS. Recientemente, Kang et al. [39] reportó estructuras de SU-8 con esta forma aplicados a la fabricación de dispositivos de microfluídica para cultivo de neuronas.

En resumen, los resultados demuestran que la tecnología propuesta permite la obtención de moldes Fmold con canales de diferentes dimensiones (largo, ancho y profundidad). Las estructuras con un ancho mínimo de $25 \mu\text{m}$ y alturas de hasta $1500 \mu\text{m}$ [24, 40]. Por lo tanto, se consigue una relación de aspecto de 60. Con respecto a la longitud, es posible elaborar moldes múltiples con una amplia variedad de dimensiones. Además, cabe recalcar que es posible fabricar moldes de $1270 \times 2062 \text{ mm}^2$ [41].

2.3.2 Fabricación de microdispositivos de PDMS

El molde Fmold se elaboró utilizando un diseño que contiene cuadrados homogéneos con dimensiones de 1000 μm y separación entre estructuras de 400 μm . Se pueden obtener varias réplicas de un mismo molde como resultado de la afinidad entre el polímero Flexcel y el PDMS (Figura 2. 10a). Para resolver este aspecto, se recubrió el molde con una capa de SiO_2 . Consecuentemente, al utilizar el molde recubierto (Fmold-T), se consiguió un desmolde adecuado y no se observaron residuos de PDMS en el molde (Figura 2. 10b). Esto se debe a que la capa de SiO_2 depositada sobre el Fmold-T evita la adherencia indeseada entre el PDMS y el molde. Como alternativa al proceso de fabricación de los dispositivos de PDMS, el Fmold se usó para fabricar réplicas en resina epóxica.

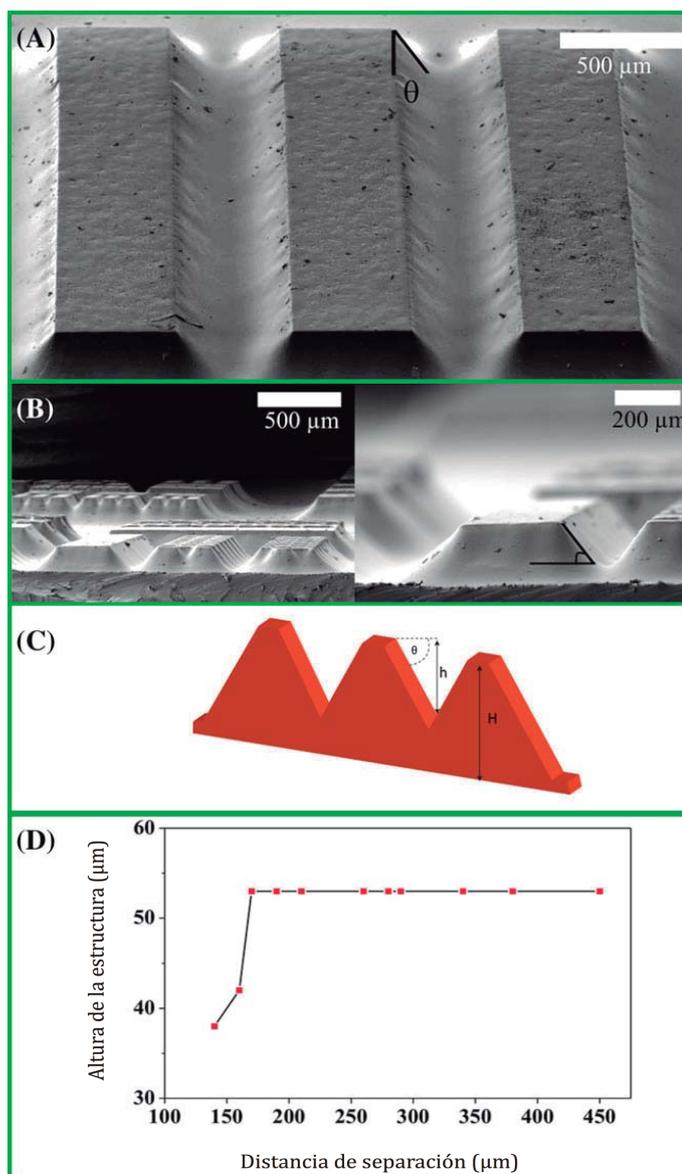


Figura 2. 9 (A, B) Imágenes de SEM de la sección transversal del Fmold, (C) representación esquemática de la altura de las estructuras resultantes del solapamiento, (D) altura de las estructuras a diferentes distancias de separación.

Se conoce que el tratamiento de silanización con triclorosilano (1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl) sobre una superficie, es un método para facilitar el proceso de desmoldado así como también para proteger la integridad del molde maestro. El enlace de las moléculas de organosilano perfluorinado a la superficie del silicio disminuye la energía de superficie del silicio y favorece el desprendimiento del PDMS[42, 43]. Por consiguiente, se llevó a cabo el tratamiento de silanización del Fmold-T. Dos

tratamientos de exposición a silano fueron evaluados a 1 y 3 horas. No se encontró diferencia significación entre ambos tiempos por lo que el Fmold-T fue silanizado utilizando el menor tiempo (1h).

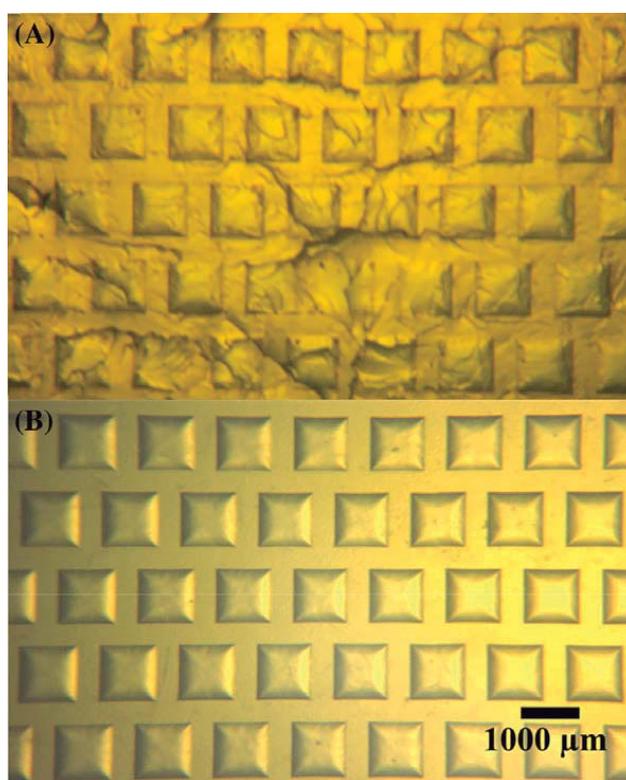


Figura 2. 10 Imágenes del Fmold obtenidas después de la elaboración de la réplica de PDMS. (a) Fmold original y (b) F-mold-T recubierto con SiO₂.

Para demostrar la fidelidad de reproducción de este método, se fabricaron 50 réplicas de PDMS utilizando el mismo Fmold-T. La Figura 2. 12a muestra la imagen del Fmold las imágenes adquiridas con el estereoscopio de las réplicas 1ra, 4ta, 8va y 50va réplicas. Para la obtención de réplicas se utilizó un diseño con cuadrados heterogéneos. La Figura 2. 12b muestra las mediciones de las alturas obtenidas por el perfilómetro del molde Fmold-T y de las réplicas de PDMS. La comparación entre las dimensiones de las estructuras del Fmold-T y de las réplicas de PDMS indican que la variación

de las alturas y las profundidades es menor al 10%, lo que demuestra que el PDMS puede ser replicado con alta fidelidad, estos valores son comparables a los tolerados en fotolitografía que es aproximadamente 10%[4]. En el análisis del molde Fmold-T y la réplica del PDMS con la prueba estándar USAF 1951 realizado mediante SEM y perfilometría también se observó una alta fidelidad de replicación. La comparación del ancho, alto y profundidad de los canales mostró una variación baja (<10%) en el rango de canales Figura 2. 11 y Tabla 2. 1. Además, la reutilización y duración del Fmold-T fueron estudiadas.

El molde Fmold-T puede ser usado muchas veces para obtener réplicas de PDMS sin degradación aparente en las dimensiones del molde y por lo tanto disminuyendo los costos de manufactura.

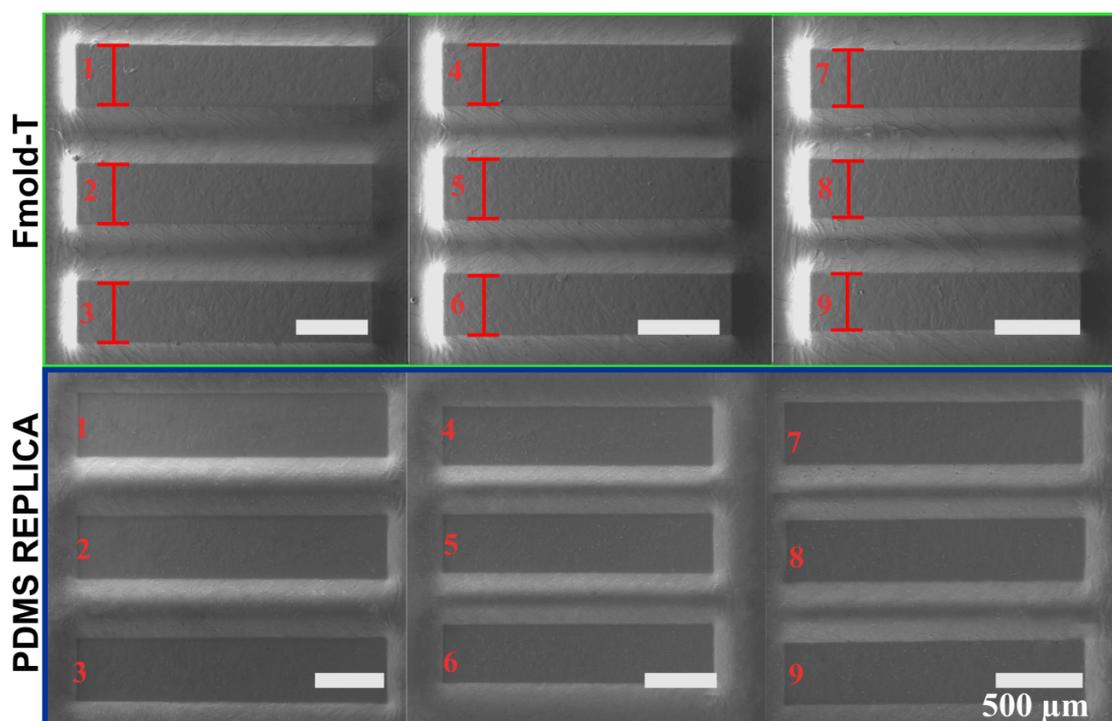


Figura 2. 11 Precisión para fidelidad de estructuras del Fmold a la réplica de PDMS. Imágenes de SEM de secciones selectas para la fabricación del Fmold-T (fila enmarcada en verde) y réplica de PDMS (fila enmarcada en azul).

Tabla 2. 1 Fidelidad Fmold-T/replica de PDMS. Mediciones de profundidad, ancho y altura de los microcanales después del paso de moldeo.

Sección	Fmold	Réplica de PDMS	Variación (%)	Fmold	Réplica de PDMS	Variación (%)
	Altura (μm) ^a	Profundidad (μm) ^b		Ancho (μm) ^b		
1	140	137	~6	436	465	~2
2	138	138	~6	436	465	-
3	138	129	~6	436	465	~7
4	131	125	~6	405	430	~5
5	133	125	~6	405	430	~6
6	135	126	~6	405	430	~7
7	138	131	~6	348	372	~5
8	135	129	~6	348	372	~5
9	140	133	~6	348	372	~6

- ^a Mediciones de alturas determinadas por la técnica de perfilometría (n=3).
- ^b Mediciones de profundidad determinadas por la técnica de perfilometría (n=3).
- ^c Mediciones de ancho determinadas por la técnica de SEM.

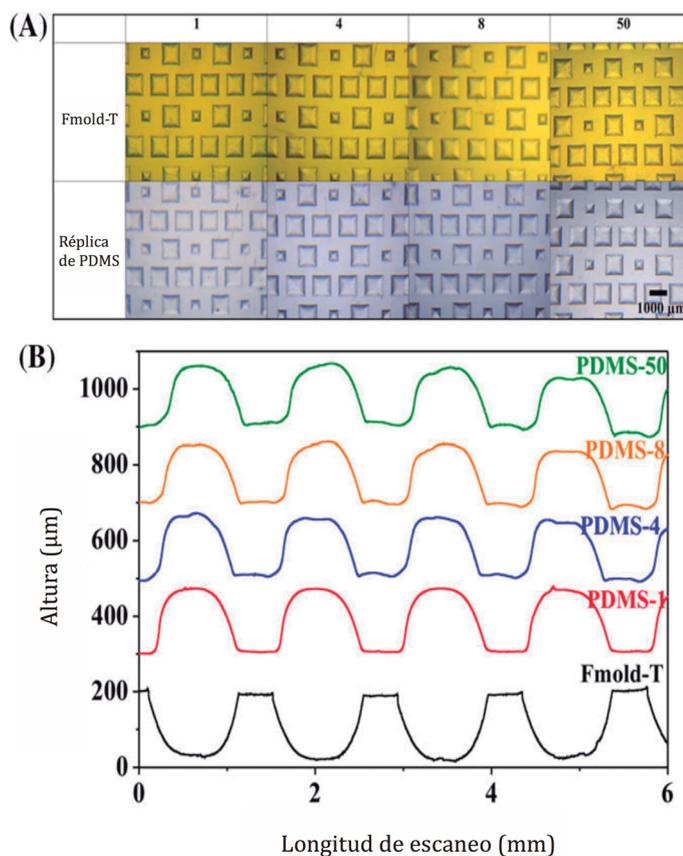


Figura 2. 12 Réplica de PDMS obtenida mediante el molde maestro Fmold-T. (a) Imágenes adquiridas con el magnificador binocular y (b) mediciones de altura de la 1ra, 4ta, 8va y 50va replicas de PDMS obtenidas a partir del Fmold-T registradas por el perfilómetro. Condiciones de fabricación: Primer paso, tiempo de exposición a la luz UVA sobre el lado reverso = 42 s. (Barra de escala: 1000 µm.) Las mediciones de Alturas fueron determinadas por la técnica de perfilometría (n=3).

Se sabe que los moldes elaborados con obleas de silicio a partir de fotoresina tienen una vida útil [3] porque las estructuras creadas con SU-8 son vulnerables a desprenderse de la oblea de silicio. En el caso del Fmold-T, el molde con las estructuras de interés forma un elemento único por esto se elimina la posibilidad de separación de las estructuras. Además, la inclinación de las paredes laterales puede reducir el contacto y la resistencia friccional entre la el PDMS y el molde Fmold-T, permitiendo un mejor desmoldado[44]. Este hecho es una ventaja especialmente cuando las estructuras formadas en un molde tienen una alta relación de aspecto. En el caso de la resina SU-8, los ángulos del molde son aproximadamente de 90° y presentan dificultades durante el proceso de desmolde. Es por esto que la resina SU-8 tiende a ser delaminada del soporte, especialmente cuando las estructuras tienen una alta relación de aspecto[45].

La fabricación de dispositivos mediante la impresión de películas de fotopolímeros ha sido descrita previamente[16, 46, 47]. De todas formas, la metodología desarrollada muestra por primera vez la fabricación de un molde maestro de tamaño 1270 x 2062 mm², a bajo costo y comercialmente disponible a nivel mundial.

2.3.3 Dispositivo de PDMS aplicado a inyección de fluido y análisis EOR.

Se han desarrollado varios estudios de sistemas microfluídicos para EOR. Los ensayos de inundación son realizados con diferentes compuestos químicos como la mezcla surfactante/agua[48], polímero como el HPAM[49], espumas[50], nanopartículas[51] o micromodelos para simular el proceso de EOR con microorganismos[52]. En este capítulo, se evaluó la funcionalidad del microdispositivo EOR mediante la inyección de aceite, agua y polímero comercial poliacrilamida.

El dispositivo se llenó con petróleo a un flujo de 1 ml.h⁻¹ hasta que fue atrapado en el espacio poral, el siguiente paso fue inyectar agua a un flujo

de 0.5 y 2 ml.h⁻¹ para alcanzar la saturación residual de petróleo. Luego, la solución de poliacrilamida (1000 ppm) se inyectó a 0.5 y 1 ml.h⁻¹. Se adquirieron imágenes para determinar el porcentaje de petróleo recuperado a través del análisis en el software Image J. La diferencia entre el estado inicial (píxeles negros) y el estado final fue interpretado como recuperación de petróleo.

La Figura 2. 13 ilustra la recuperación de petróleo en relación con volúmenes porales y las imágenes obtenidas en cada etapa, que muestran la inundación con agua y polímero fluyendo en el espacio poral mientras desplazan al petróleo. El flujo de 0.5 ml.h⁻¹ con el que fue impulsada el agua, desplaza el petróleo por los canales, lo que resulta en 37% (1.25 PV) de recuperación, cuando el caudal incrementa a 2.0 ml.h⁻¹, la recuperación aumenta a 46% (4 PV). Además, la inundación con polímero recupera 5% (6.1 PV) a un caudal de 0.5 ml.h⁻¹ y 21% (8 PV) a un flujo de 1.0 ml.h⁻¹, lo que permite recuperar 21% del petróleo. La recuperación de petróleo total alcanzada fue de 67%.

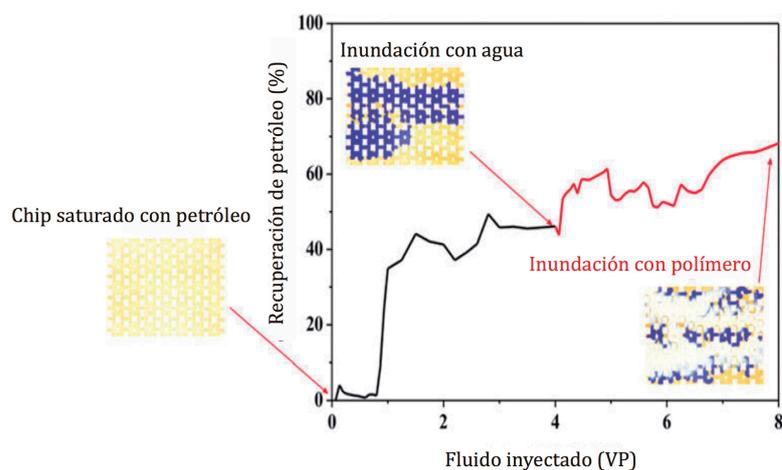
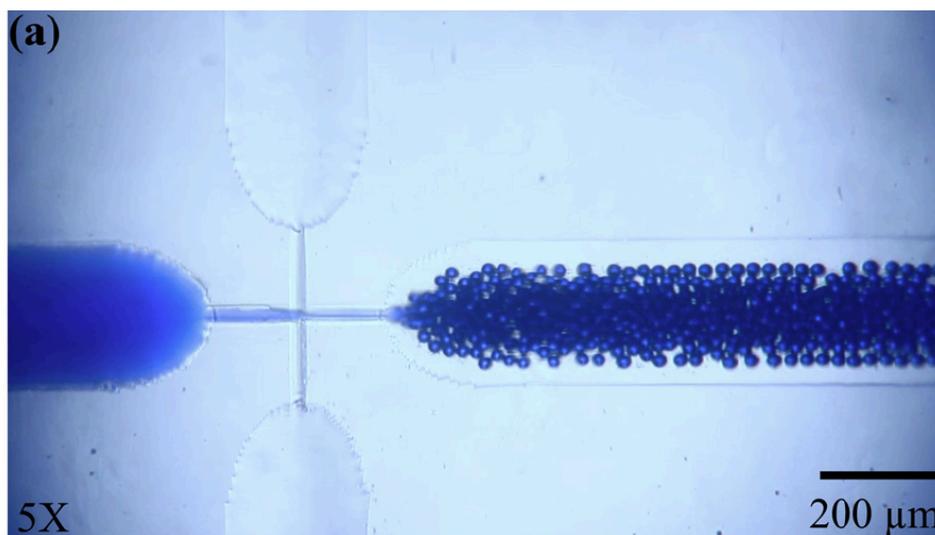


Figura 2. 13 Análisis de la recuperación de petróleo. Representación de la recuperación acumulada de petróleo en función de los volúmenes porales (VP) de agua y polímero, respectivamente. Se muestran las imágenes del chip saturado de petróleo, la inundación con agua y la inundación con polímero.

2.3.4 Generación de microgotas

En concordancia con el objetivo específico planteado al inicio de la tesis, se han desarrollado microdispositivos productores de gotas.

Los dispositivos microfluídicos para la generación de microgotas son de gran importancia. en muchas aplicaciones químicas, biomédicas e industriales[53-55]. En este estudio se fabricó un dispositivo de PDMS utilizando la metodología propuesta para la generación de microgotas. Una imagen representativa del microscopio de la formación de microgotas se muestra en la figura El histograma de los tamaños de gota se muestra en la Figura 2. 14b, el análisis estadístico muestra tamaños que van desde 47.4 μm a 63.1 μm con una desviación estándar inferior al 4%, lo que indica un alto nivel de monodispersidad de gotas. Los datos experimentales muestran que este dispositivo microfluídico es capaz de generar microgotas de tamaño controlado.



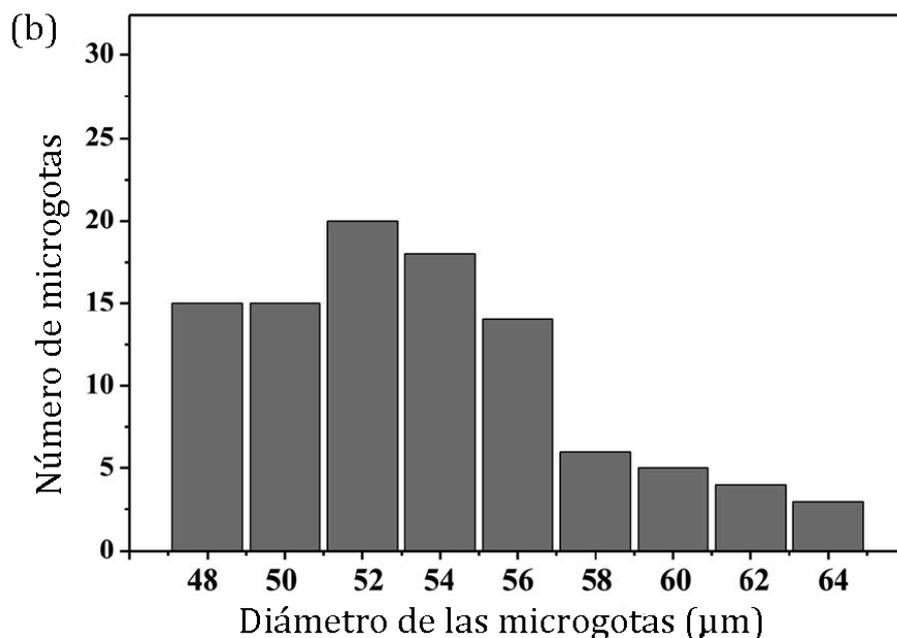


Figura 2. 14 Generación de microgotas mediante la utilización de un dispositivo de encuentro de flujos. (a) Imagen de microscopio óptico representativa (magnificación 5X). (b) Distribución de tamaño de 100 microgotas generadas en el mismo experimento. Los flujos de las fases continua y dispersa se mantuvieron constantes a 0.01 mLh^{-1} y 0.003 mLh^{-1} , respectivamente.

2.3.5 Comparación de disponibilidad, costos y resolución de diferentes tecnologías de manufactura de moldes

Se conoce que los países desarrollados tienen más laboratorios de alto nivel y publicaciones un en revistas de alto impacto en casi todas las áreas de la ciencia que los países en vías de desarrollo. En el caso de la microfluídica, este efecto está particularmente marcado porque la fabricación de dispositivos de calidad y buena resolución es necesario tener equipos sofisticados para fabricar fotomáscaras y moldes. Mientras que el costo de los moldes de SU-8 es relativamente bajo para los grupos de investigación que cuentan con cuartos limpios (sin considerar los costos de mantenimiento de estos y la amortización de los equipos), el costo de

adquirir moldes de SU-8 es muy alto para los grupos de investigación que carecen de estas facilidades.

Debido al alto costo, estas facilidades son prácticamente inexistentes a lo largo del hemisferio sur. Por ejemplo, en el país donde este artículo es generado, únicamente existen 3 cuartos limpios, los cuales no siempre están disponible para los grupos de investigación externos a la institución. Una opción para llevar a cabo los ensayos sería contratar los servicios de fabricación de dispositivos en el exterior, pero hay pocas compañías o universidades en el planeta que ofrezcan este servicio. El precio de un molde de SU-8 está en £375 y £525 dependiendo de la resolución (Cotizado por Flow-JEM). Estos precios son muy altos para laboratorios de investigación en países en vías de desarrollo, donde los subsidios en promedio no exceden los £3000 al año[56].

Consecuentemente, en el hemisferio sur existen únicamente 8 grupos de investigación en microfluídica del total de 344 grupos de investigación reportados[57]. Algo similar ocurre con respecto a las compañías de microfluídica, se reporta una en todo el hemisferio sur[58].

El método propuesto en este trabajo proveerá considerables avances en el campo de la microfluídica porque otorga a todos los laboratorios la habilidad de trabajar en el área de la microfluídica (incluyendo a países en vías de desarrollo) sin la necesidad de equipos y facilidades de fabricación para crear un molde maestro. La tecnología Flexcel puede ser obtenida comercialmente a mucho menor costo que los moldes SU-8. Esta tecnología se utiliza comúnmente en la industria gráfica y puede ser adquirido mundialmente (incluidos los países en vías de desarrollo). Con respecto a la disponibilidad, en contraste a los 20 compañías o universidades que ofrecen servicios de fotolitografía, existen más de 400 compañías distribuidas en 60 países que ofrecen los servicios de fabricación de moldes Fmold[59]. Con respecto a los costos, un molde Fmold de 220 x 350 mm², cuesta £28 en Argentina[60] y £40 en España[61]. Estos valores corresponden al 7.47% y

al 10.67% del valor del molde en SU-8, respectivamente. Estos precios son al menos 10 veces menos costosos que los moldes comerciales SU-8[62] y más accesibles en laboratorios en países en vías de desarrollo.

Actualmente, existen otras metodologías alternativas a los moldes de SU-8, algunas de estas se muestran en la Tabla 2. 2. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas no consiguen la resolución de la fotoresina o los procesos son costosos e inaccesibles por lo tanto la técnica tradicional de los moldes de fotoresina continúa siendo la más utilizada en microfluídica.

La Tabla 2. 2 muestra una comparación entre el ancho mínimo del canal conseguido por el molde Fmold y otro método no tradicional de fabricación de moldes de microfluídica. Estos valores están comprendidos en el rango de los 21 y 200 μm , por lo tanto, el ancho mínimo del canal obtenido en este trabajo es apropiado para la elaboración de dispositivos de microfluídica.

Tabla 2. 2 Ancho de canal mínimo obtenido mediante métodos no tradicionales para manufactura de moldes de microfluídica.

Técnica para elaboración de molde	Ancho del canal (μm)	Referencia
Estampado de acero inoxidable	21	[14]
Fmold	25	Este trabajo
Tóner	26.6	[6]
Moldeo líquido	40	[10]
Impresión 3D	45	[63]
Moldeo líquido	60	[9]
Construcción en bloques	100	[5]
Ablación láser	120	[11]
Escritura de semi-contacto	140	[13]
Hinchamiento mediante láser	190	[12]
Impresión 3D	200	[35, 64]
Molde de cera	200	[8]

La impresión en 3D es una de las técnicas alternativas más conocidas; sin embargo, actualmente su aplicabilidad está limitada en parte por la limitación técnica de imprimir microcanales confiables con dimensiones menores a cientos de micrones en un dispositivo de tamaño razonable[34, 64] a un precio accesible. Entre las principales desventajas de la impresión 3D se encuentra la remoción del material de soporte de las estructuras de menores dimensiones a partir del cual los canales poseen superficies rugosas[35].

Existe un gran número de equipos de impresión 3D que permiten producir moldes o dispositivos que han sido reportados en la literatura. Sin embargo, a medida que el costo del equipo decae, la resolución obtenida del canal disminuye también. Por ejemplo, el costo del dispositivo de PDMS producido por impresión 3D fue reportado como £1.50 pero con una sección transversal de área de $200 \mu\text{m}$ [66].

Los canales de alta resolución mediante impresión 3D han sido reportados en algunos trabajos de investigación, pero el costo del equipo es muy alto (EnvisionTEC, £74.900 resolución: $16 \mu\text{m}$)[67], o el equipo es construido en el laboratorio[68]. En ambos casos, los moldes producidos no están comercialmente disponibles a nivel global, a diferencia del molde Fmold.

También es posible obtener estructuras que alcancen anchos a nanoescala utilizando fotoreinas expuestas a alta resolución con cuarzo o máscaras de vidrio y litografía de láser electrónico o láser enfocado de iones[69]. En trabajos posteriores se puede investigar la combinación de estas técnicas con el polímero Flexcel. En este capítulo se describió la obtención de un ancho mínimo de $25 \mu\text{m}$, lo que demuestra que la tecnología Flexcel es prometedora para la fabricación de dispositivos de microfluídica convencionales a bajo costo que normalmente tienen canales con anchos mayores a $100 \mu\text{m}$. Por lo tanto, se considera que la metodología propuesta

podría dar lugar a un progreso en el desarrollo de tecnologías de microfluidica y Lab-on-a-chip (LOC).

2.4 Conclusiones

El molde Fmold provee una alternativa a los métodos de fabricación de microdispositivos de fotoresina sobre obleas de silicio. La fidelidad de replicación, estabilidad y durabilidad del Fmold fueron probadas. El molde puede utilizar múltiples veces con la adquisición de réplicas confiables, sin delaminación ya que el molde y la estructura constituyen una pieza única. Este método permite la fabricación de moldes de microfluídica que logran dimensiones ($1270 \times 2062 \text{ mm}^2$), además consigue un tamaño mínimo de estructura de $25 \mu\text{m}$ y alto de estructuras en un rango comprendido entre 53 a $1500 \mu\text{m}$. Actualmente no ha sido reportado un material o tecnología al que se le atribuyan estas características y que haya sido utilizado como molde para la fabricación de dispositivos de microfluídica, que permiten la interacción de múltiples funciones de laboratorio y sistemas de detección en una misma plataforma.

Otra ventaja de esta tecnología es que los moldes Fmold pueden conseguirse a mucho menor costo que los moldes de SU-8. Además, la tecnología Flexcel se utiliza comúnmente en la industria gráfica por lo que los Fmold pueden ser adquiridos alrededor del mundo.

Esta tecnología contribuye positivamente a la evolución en el campo de la microfluídica, sirviendo como apoyo a muchos laboratorios que carecen de las facilidades para la fabricación especialmente a los laboratorios pertenecientes a países en vías de desarrollo.

La funcionalidad y versatilidad de la metodología ha demostrado con éxito la fabricación de varias topologías microfluídicas y empleadas en la fabricación de los dispositivos generadores de microgotas.

2.5 Referencias

1. Bubendorfer, A., Liu X., Ellis A.V., *Microfabrication of PDMS microchannels using SU-8/PMMA moldings and their sealing to polystyrene substrates*. Smart Materials and Structures, 2007. **16**(2): p. 367 - 371.
2. Duffy, D.C., et al., *Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane)*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(23): p. 4974-4984.
3. B.-H. Jo, L.M.V.L., K.M. Motsegood, D.J. Beebe, *Three-dimensional micro-channel fabrication in polydimethylsiloxane (PDMS)* Journal of Microelectromechanical Systems, 2000. **9**(1): p. 76 - 81.
4. Desai, S.P., D.M. Freeman, and J. Voldman, *Plastic masters—rigid templates for soft lithography*. Lab on a Chip, 2009. **9**(11): p. 1631-1637.
5. Stoller, M.A., et al., *Thermoplastic building blocks for the fabrication of microfluidic masters*. RSC Advances, 2015. **5**(119): p. 97934-97943.
6. Easley, C.J., et al., *Rapid and inexpensive fabrication of polymeric microfluidic devices via toner transfer masking*. Lab on a Chip, 2009. **9**(8): p. 1119-1127.
7. Chung, C., et al., *Fabrication of PDMS passive micromixer by lost-wax casting*. International Journal of Precision Engineering and Manufacturing, 2015. **16**(9): p. 2033-2039.
8. Li, Z.a., et al., *Preparation of PDMS microfluidic devices based on drop-on-demand generation of wax molds*. Analytical Methods, 2014. **6**(13): p. 4716-4722.
9. Liu, X., et al., *A facile “liquid-molding” method to fabricate PDMS microdevices with 3-dimensional channel topography*. Lab on a Chip, 2009. **9**(9): p. 1200-1205.
10. Lijun, Y., et al., *Fabrication of PDMS microfluidic chips used in rapid diagnosis by micro jetting*. Multimedia Tools Appl., 2018. **77**: p. 3761–3774.
11. Z Isiksacan, M.G., B Aydogdu, I Bilican, C Elbuken., *Capacitive solvent sensing with interdigitated microelectrodes*. Journal of Microelectromechanics and Microengineering, 2016. **26**(3): p. 35008.

12. Ednan Joanni, J.P., Patricia Silva Domingues, Grazielle de Oliveira Setti, Dosil Pereira de Jesus, *Fabrication of molds for PDMS microfluidic devices by laser swelling of PMMA*. RSC Advances, 2015. **5**(32): p. 25089-25096.
13. Gutzweiler, L., et al., *Semi-contact-writing of polymer molds for prototyping PDMS chips with low surface roughness, sharp edges and locally varying channel heights*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2016. **26**(4): p. 045018.
14. Kotowski, J. and D. Šnita, *Fabrication and application of stainless steel stamps for the preparation of microfluidic devices*. Microelectronic Engineering, 2014. **125**: p. 83-88.
15. De Volder, M., et al., *Diverse 3D Microarchitectures Made by Capillary Forming of Carbon Nanotubes*. Advanced Materials, 2010. **22**(39): p. 4384-4389.
16. Browne, A.W., et al., *A rapid prototyping method for polymer microfluidics with fixed aspect ratio and 3D tapered channels*. Lab on a Chip, 2009. **9**(20): p. 2941-2946.
17. Carlson, A., et al., *Transfer Printing Techniques for Materials Assembly and Micro/Nanodevice Fabrication*. Advanced Materials, 2012. **24**(39): p. 5284-5318.
18. Conn, C.A., et al., *Visualizing oil displacement with foam in a microfluidic device with permeability contrast*. Lab on a Chip, 2014. **14**(20): p. 3968-3977.
19. Schneider, M., *Wettability Patterning in Microfluidic Systems and Applications in the Petroleum Industry*, in *Laboratoire Microfluidique, MEMS, Nanostructures (MMN)*. 2011, Université Pierre et Marie Curie Paris VI.
20. Karadimitriou, N.K. and S.M. Hassanizadeh, *A Review of Micromodels and Their Use in Two-Phase Flow Studies*. Vadose Zone Journal, 2012. **11**(3).
21. Lifton, V.A., *Microfluidics: an enabling screening technology for enhanced oil recovery (EOR)*. Lab on a Chip, 2016. **16**(10): p. 1777-1796.
22. Bourguignon, N., et al., *Accessible and Cost-Effective Method of PDMS Microdevices Fabrication Using a Reusable Photopolymer Mold*. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 2018. **56**(21): p. 1433-1442.

23. Novaković, D., Dedijer, S. i Mahović Poljaček, S., *A model for improving the flexographic printing plate making process*. Tehnički vjesnik, 2010. **17**(4): p. 403-410.
24. Kodak. *Flexcel SRH Flexographic Pltes*. 2018 [cited 2018; Available from: http://www.ratcliffe-sa.com.ar/documentos/Kodak_Flexcel_SRH.pdf].
25. Tomašegović, T., S.M. Poljaček, and M. Leskovac, *UVA and UVC modification of photo polymeric surface and application for flexographic deposition of thin coatings*. Journal of Applied Polymer Science, 2016. **133**(24).
26. Knoll, R., *Photopolymerizable Flexographic Printing Elements comprising SIS/SBS Mixtures as Binder for the Production of Flexographic Printing Plates*. 2002.
27. KLayout. *High Performance Layout Viewer and Editor*. 2018 2019-09-10 [cited 2018; Available from: <http://www.klayout.de/index.php>].
28. Lasorsa, C., P.J. Morando, and A. Rodrigo, *Effects of the plasma oxygen concentration on the formation of SiO_xCy films by low temperature PECVD*. Surface and Coatings Technology, 2005. **194**(1): p. 42-47.
29. Peñaherrera, A., et al., *Evaluation of cell culture in microfluidic chips for application in monoclonal antibody production*. Microelectronic Engineering, 2016. **158**: p. 126-129.
30. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nature Methods, 2012. **9**(7): p. 676-682.
31. Zeng, H., *Polymer Science & Technology General*, ed. Wiley. 2013, Estados Unidos.
32. Wolf, R.A., *Plastic Surface Modification, Surface Treatment and Adhesion*. Hanser Publishers, ed. Hanser. 2010, Munich.
33. Walther, F., et al., *Surface hydrophilization of SU-8 by plasma and wet chemical processes*. Surface and Interface Analysis, 2010. **42**(12 - 13): p. 1735-1744.
34. Hoople, G.D., et al., *Comparison of Microscale Rapid Prototyping Techniques*. Journal of Micro and Nano-Manufacturing, 2014. **2**(3).

35. Waheed, S., et al., *3D printed microfluidic devices: enablers and barriers*. Lab on a Chip, 2016. **16**(11): p. 1993-2013.
36. Mohammed, M.I., et al., *Fabrication of microfluidic devices: improvement of surface quality of CO₂ laser machined poly(methylmethacrylate) polymer*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2016. **27**(1): p. 015021.
37. GLYN, E.F. *USAF 1951 and Microscopy Resolution Test Charts*. efg's, Tech. 2018 [cited 2018].
38. Liu, X., J.T. Guthrie, and C. Bryant, *A study of the processing of flexographic solid-sheet photopolymer printing plates*. Surface Coatings International Part B: Coatings Transactions, 2002. **85**(4): p. 313-319.
39. Kang, M., et al., *Fabrication of functional 3D multi-level microstructures on transparent substrates by one step back-side UV photolithography*. RSC Advances, 2017. **7**(22): p. 13353-13361.
40. Kodak. *Flexcel NX*. 2017 Feb 1, 2018]; Available from: https://http://www.kodak.com/uploadedFiles/Flexcel_NXC_Plates_brochure.pdf.
41. Kodak. *DITR film*. 2018; Available from: https://http://www.kodak.com/PK/en/print/Products/Flexographic/KODAK_DITR_Film/default.htm.
42. Bhushan, B.H., Derek; Lee, Kang Kug *Surface modification of silicon and polydimethylsiloxane surfaces with vapor-phase-deposited ultrathin fluorosilane films for biomedical nanodevices*. Journal of Vacuum Science & Technology A 2006. **24**(1197).
43. Gilles, S., *Chemical Modification of Silicon Surfaces for the Application in Soft Lithography*. 2007, Freiburg University.
44. Zhang, J., M.B. Chan-Park, and S.R. Conner, *Effect of exposure dose on the replication fidelity and profile of very high aspect ratio microchannels in SU-8*. Lab on a Chip, 2004. **4**(6): p. 646-653.
45. Kim, S.-J., et al., *Study of SU-8 to make a Ni master-mold: Adhesion, sidewall profile, and removal*. ELECTROPHORESIS, 2006. **27**(16): p. 3284-3296.
46. Kim, S., et al., *Ultrathin high-resolution flexographic printing using nanoporous stamps*. Science advances, 2016. **2**(12): p. e1601660-e1601660.

47. Olkkonen, J., K. Lehtinen, and T. Erho, *Flexographically Printed Fluidic Structures in Paper*. Analytical Chemistry, 2010. **82**(24): p. 10246-10250.
48. He, K.X., L.; Gao, K.; Neeves, K.; Yin, X.; Bai, B.; Ma, Y.; Smith, J. , *SPE Improved Oil Recovery Symposium, Tulsa, Oklahoma, USA*. Society of Petroleum Engineers, 2014.
49. Howe, A.M., A. Clarke, and D. Giernalczyk, *Flow of concentrated viscoelastic polymer solutions in porous media: effect of MW and concentration on elastic turbulence onset in various geometries*. Soft Matter, 2015. **11**(32): p. 6419-6431.
50. Hendraningrat, L., S. Li, and O. Torsater, *Effect of Some Parameters Influencing Enhanced Oil Recovery Process using Silica Nanoparticles: An Experimental Investigation*, in *SPE Reservoir Characterization and Simulation Conference and Exhibition*. 2013, Society of Petroleum Engineers: Abu Dhabi, UAE. p. 10.
51. Shamsijazeyi, H.M., C.; Wong, M.; Tour, J.; Verduzco, R., *Polymer-Coated Nanoparticles for Enhanced Oil Recovery*. Journal of Applied Polymer Science, 2014(131): p. 40576.
52. Khajepour, H.M., M.; Biria, D.; Ayatollahi, S., *Investigation of wettability alteration through relative permeability measurement during MEOR process: A micromodel study*. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2014(120): p. 10-17.
53. Chou, W., Lee, P., Yang, C., Huang, W., Lin, Y. , *Recent Advances in Applications of Droplet Microfluidics*. Micromachines, 2015. **6**: p. 1249-1271.
54. Simon, M.G. and A.P. Lee, *Microfluidic Droplet Manipulations and Their Applications*, in *Microdroplet Technology: Principles and Emerging Applications in Biology and Chemistry*, P. Day, A. Manz, and Y. Zhang, Editors. 2012, Springer New York: New York, NY. p. 23-50.
55. Wang, J.L., G., *Formation of Tunable, Emulsion Micro-Droplets Utilizing Flow-Focusing Channels and a Normally-Closed Micro-Valve*. Micromachines, 2013. **4**: p. 306-320.
56. CONICET. *Convocatorias CONICET*. February 1, 2018]; Available from: <https://convocatorias.conicet.gov.ar/investigacion-y-desarrollo/>.

57. International, O. *International microfluidics research groups*. 2014 February 1, 2018]; Available from: [http://research.omicsgroup.org/index.php/List of microfluidics research groups](http://research.omicsgroup.org/index.php/List_of_microfluidics_research_groups).
58. Fluidcmems. *List of microfluidics Lab-on-a-chip and biomems companies*. February 1, 2018]; Available from: <https://http://www.fluidcmems.org/microfluidic-companies>.
59. Graafine, L. *Flexcel NX System, changed the capabilities of flexo printing*. Available from: [http://www.lahdengraafinen.fi/File/NX Overview.pdf?427393](http://www.lahdengraafinen.fi/File/NX_Overview.pdf?427393).
60. Flexoemagen. *Digital photopolymers*. 2020 February 1, 2018]; Available from: <http://www.flexoemagen.com.ar>.
61. Troflex. *Digital photopolymers*. 2016 February 1, 2018]; Available from: <http://www.troflex.com>.
62. FlowJEM. *Polymer Microfluidic Technology*. 2018 February 1, 2018]; Available from: <https://http://www.flowjem.com/design-rules.html>.
63. Kamei, K.M., Y.; Fockenber, C.; Nakashima, M.; Nakajima, M.; Li, J.; Chen, Y., *3D printing of soft lithography mold for rapid production of polydimethylsiloxane-based microfluidic devices for cell stimulation with concentration gradients*. *Biomedical Microdevices*, 2015. **17**(2).
64. Bhattacharjee, N., et al., *The upcoming 3D-printing revolution in microfluidics*. *Lab on a Chip*, 2016. **16**(10): p. 1720-1742.
65. Hwang, Y.P.O.H.C., Robert N. , *3D printed molds for non-planar PDMS microfluidic channels*. *Sensors and Actuators A: Physical*, 2015. **226**(234): p. 137-142.
66. Mohammadi, S., M. Masihi, and M.H. Ghazanfari, *Characterizing the Role of Shale Geometry and Connate Water Saturation on Performance of Polymer Flooding in Heavy Oil Reservoirs: Experimental Observations and Numerical Simulations*. *Transport in Porous Media*, 2012. **91**(3): p. 973-998.
67. O'Neill, P.F., et al., *Advances in three-dimensional rapid prototyping of microfluidic devices for biological applications*. *Biomicrofluidics*, 2014. **8**(5): p. 052112.

68. Lee, W.L., V.; Polio, S.; Keegan, P.; Lee, JH.; Fischer, K.; Park, JK.; Yoo, SS., *On-demand three-dimensional freeform fabrication of multi-layered hydrogel scaffold with fluidic channels*. Biotechnology Bioengineering, 2010. **105**(6): p. 1178-86.
69. Duan, C., W. Wang, and Q. Xie, *Review article: Fabrication of nanofluidic devices*. Biomicrofluidics, 2013. **7**(2): p. 026501.

Capítulo 3

Microdispositivos multinivel para cultivo de células en suspensión.

3.1 Introducción

Durante los últimos años se han desarrollado varios métodos para fabricar estructuras de microfluídica en multi-nivel para fomentar el desempeño y/o para incrementar las capacidades de la variedad de dispositivos de microfluídica[1]. Entre los métodos existentes se destacan la disposición de membranas a manera de sánduche[2], reacción de difusión[3], procesos multicapa[4], erosión mediante exposición a luz UV difusa[5], labrado[6], fabricación láser[7], reflujo de fotoresistencia[8], microtallado[9], impresión 3D[10], electroplateo[11], fotolitografía[12] y moldeo líquido[13]. Recientemente, se han reportado aplicaciones de microestructuras en multi-nivel para separación de partículas coloidales[14], extracción y separación de micropartículas[15], cultivo de neuronas[12], mezcladores microfluídicos[5], aplicaciones en investigación en cáncer[16], procesamiento químico[17], producción de redes cardiovasculares para sistemas de laboratorio *in vitro*[11], entre otras. En este contexto, el desarrollo de métodos nuevos y costo-efectivos para la fabricación de dispositivos de microfluídica con estructuras den multi-nivel ha ganado atención considerable en las comunidades científica e industrial.

En biología celular, las microestructuras en multi-nivel presentan gran potencial para el cultivo y proliferación celular. En este sentido, el cultivo de células en suspensión en sistemas de microfluídica representa un reto ya que simplemente la renovación del medio puede conducir a una pérdida accidental de células al carecer de un mecanismo de retención[18, 19]. Yue *et al.* reportó la fabricación de canales en multi-nivel para la cuantificación celular y el cultivo celular mediante el uso del método de impresión que emplea una pantalla porosa[20]. Además, microcanales con sección transversal trapezoidal han sido utilizados como mecanismo de retención que permite la captura y cultivo en suspensión de células de mamífero a través inercia[21, 22]. Adicionalmente, un dispositivo de microfluídica que mimetiza un microambiente ha sido fabricado con un microcanal provisto

de una estructura a manera de micro-cavidad ramificada para simular las interacciones en el entorno tumoral[23]. En la actualidad, cavidades esféricas han sido utilizadas como un sistema de cultivo a manera de micro-bolsillo para retener agregados de células de cáncer de mama[19]. Además, el cultivo de células inmunes y su monitoreo para adquisición de imágenes a largo plazo es necesario debido a su naturaleza no adherente[24]. Consecuentemente, varias estrategias han sido utilizadas con el objetivo de resolver estos inconvenientes. Entre estas están la micro encapsulación en gotas[25], retención óptica[26] y arreglos para aislar células[27]. Por lo tanto, la fabricación de moldes con microestructuras multi-nivel para la fabricación de dispositivos de microfluidica presenta un potencial útil para aplicaciones biológicas[18, 20, 28, 29].

En el capítulo 2 se reportó la fabricación de dispositivos de microfluídica de PDMS a partir de fotopolímero flexográfico como molde estas investigaciones han sido publicadas[30, 31]. Se demostró las ventajas relacionadas con la resolución, el tamaño del molde, la relación de aspecto, la rugosidad disponibilidad, escalabilidad y costo[30]. Es posible obtener anchos de canal mínimos más bajos que con las técnicas no tradicionales como la ablación láser con CO₂[32], bloques de construcción[33], ablación láser [34], hinchamiento mediante ablación láser [35], escritura de semi-contacto[36], impresión 3D [37, 38]y moldes de cera[39]. Con respecto a la rugosidad, el Fmold presenta estructuras menos rugosas en contraste a las técnicas como la ablación láser mediante CO₂[32], ablación láser[34] e impresión 3D[37, 38]. Por otro lado, entre las metodologías para obtención de dispositivos de bajo costo están la microfluídica basada en papel, basado en PMMA y basada en F-mold[30, 40-42]. Por lo tanto, es posible obtener dispositivos de costo menor que los fabricados por labrado de láser focalizado de iones (FIB)[43], litografía (fotoresinas)[43-45], litografía de láser electrónico[46] y técnicas tradicionales. Finalmente, la metodología reportada permite la obtención de moldes con topologías y dimensiones de canales diferentes (longitud, ancho y altura). Además, se posibilita la elaboración de moldes grandes con dimensiones de 1270x2062 mm²,

mientras que la altura de las estructuras está comprendida en el rango de 53 a 1500 μm y se mantiene la misma resolución (10 micrones) que son obtenidos en los moldes del tamaño de las obleas de silicio[31].

En este capítulo se describe el desarrollo de una metodología no convencional para la fabricación de moldes con multi-nivel con microestructuras tanto positivas como negativas a través del uso del fotorolímico flexográfico. Las estructuras multi-nivel fueron elaboradas mediante la variación del tiempo de exposición a la luz UVA y el cambio del ancho del canal. Los resultados fueron caracterizados por microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM) y perfilometría. Además, se realizaron ensayos para probar las microestructuras multi-nivel fabricadas en los dispositivos de microfluídica de PDMS para demostrar su viabilidad biológica y su funcionalidad mediante el monitoreo y la proliferación de células Jurkat.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Fabricación del molde de fotorolímico

La fabricación del molde fue realizada mediante la utilización de un procedimiento semejante al descrito en la sección de metodología del capítulo 2. En este capítulo, se presenta un esquema de la fabricación del molde con las modificaciones correspondientes (Figura 3.1).

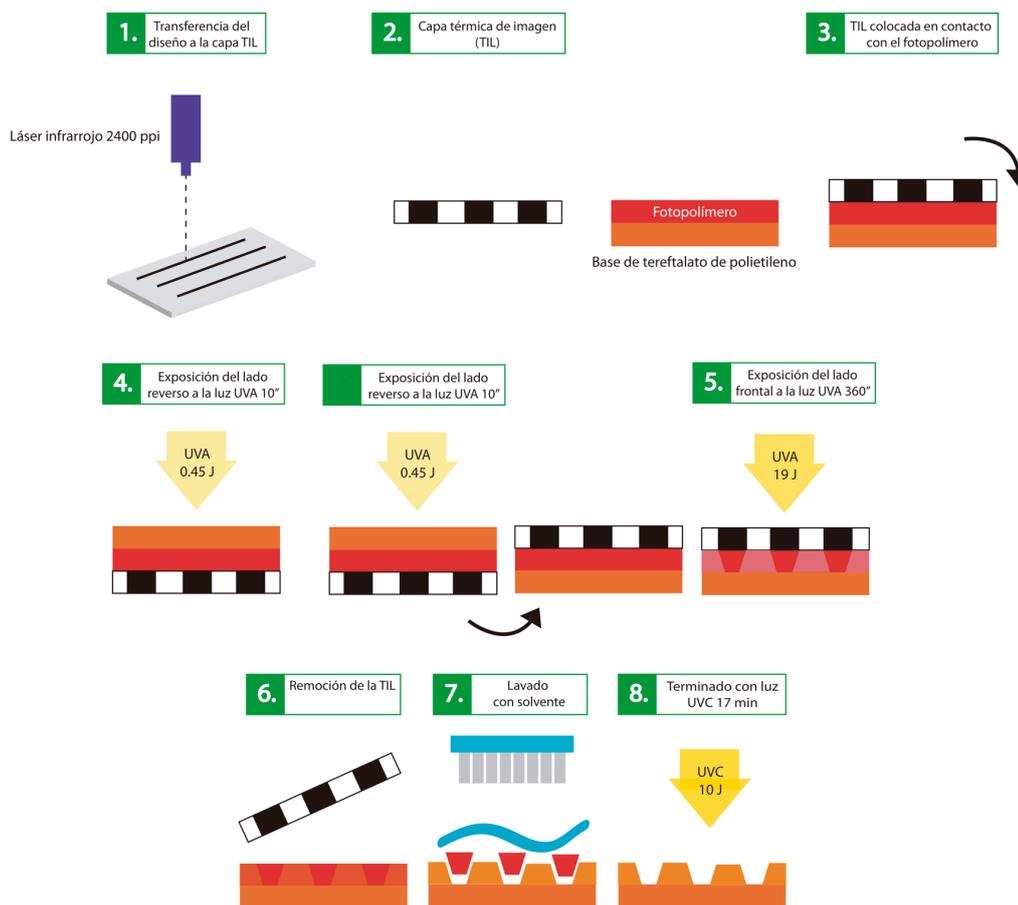


Figura 3. 1 Ilustración del proceso de fabricación del molde Fmold a partir de la lámina de fotopolímero Flexcel NX y la capa térmica de imagen (TIL).

3.2.1.1 Fabricación de microestructuras mediante variación tanto del tiempo de exposición a la luz UVA como el ancho del canal.

El fotopolímero Flexcel NX y la capa térmica de imagen TIL (por sus siglas en inglés Thermal Imaging Layer) provista por Eastman Kodak[47] fueron utilizados en la fabricación de los moldes. El proceso de fabricación de moldes consta de los siguientes pasos: (1) Diseño de la arquitectura de microcanales en el programa Layout editor [48] y la transferencia del diseño a la capa térmica de imagen (TIL) mediante el uso de una fuente de láser infrarrojo de 2400 ppi (2). El diseño consiste en estructuras adyacentes con un ancho de 1000 μm (Figura 3. 2a). La capa TIL fue extendida sobre la placa del fotopolímero aún no expuesto, (3) el lado

reverso de la placa de fotopolímero fue expuesta a la luz UVA a 0.45 J durante 10 s, (4) una parte del fotopolímero fue cubierto con una máscara sobre el lado reverso, (5) el lado reverso de la placa de fotopolímero fue expuesta a luz UVA a 0.45 J durante 20 s, (6). Los pasos (4) y (5) fueron repetidos una vez, (7) el lado frontal fue expuesto a la luz UVA a 19 J durante 360 s, después la capa TIL fue removed, (8) la placa de fotopolímero se lavó con el solvente PROSOL N-1 (provista por Eastman Kodak) a 360 mm.min⁻¹ y se secó en un horno a 50 °C durante 30 minutos, (9) el lado frontal de la capa de fotopolímero fue expuesta a luz UVC a 10 J por 17 minutos y a luz UVA a 4 J por 2 minutos. Los pasos (2) y (6) se muestran en la Figura 3. 3.

Cada sección presenta estructuras rectangulares adyacentes con un ancho de 50 μm, 100 μm, 150 μm, 200 μm, 250 μm, 300 μm, 350 μm, 400 μm, 450 μm, 500 μm, 550 μm y 600 μm. La exposición a la luz UVA a 0.45 J sobre el lado reverso durante 10, 30 y 50 s se realizó sobre las secciones 1, 2 y 3 respectivamente (Figura 3. 2b).

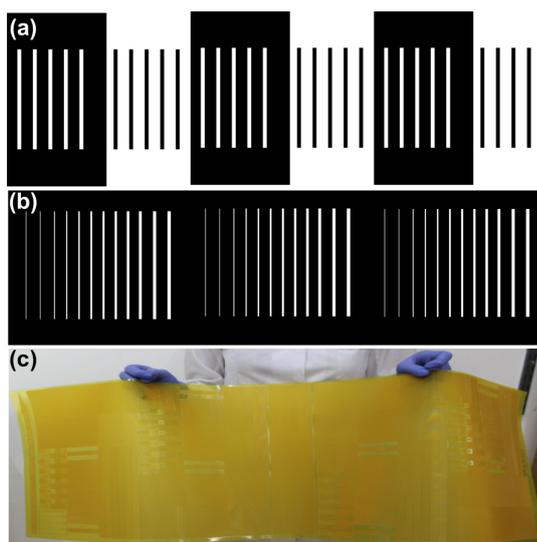


Figura 3. 2 Fabricación del molde. (a)Arquitectura de microcanales diseñada para fabricar microestructuras en multi-nivel variando el tiempo de exposición a la luz UVA, (b) Red de microcanales diseñada para la fabricación de microestructuras en multi-nivel variando el ancho de los microcanales y el tiempo de exposición a la luz UVA. (c) Estructuras multi-

nivel en una sola placa de fotopolímero. Los diseños del molde exhibidos en las secciones a y b fueron elaborados en la misma placa de fotopolímero.

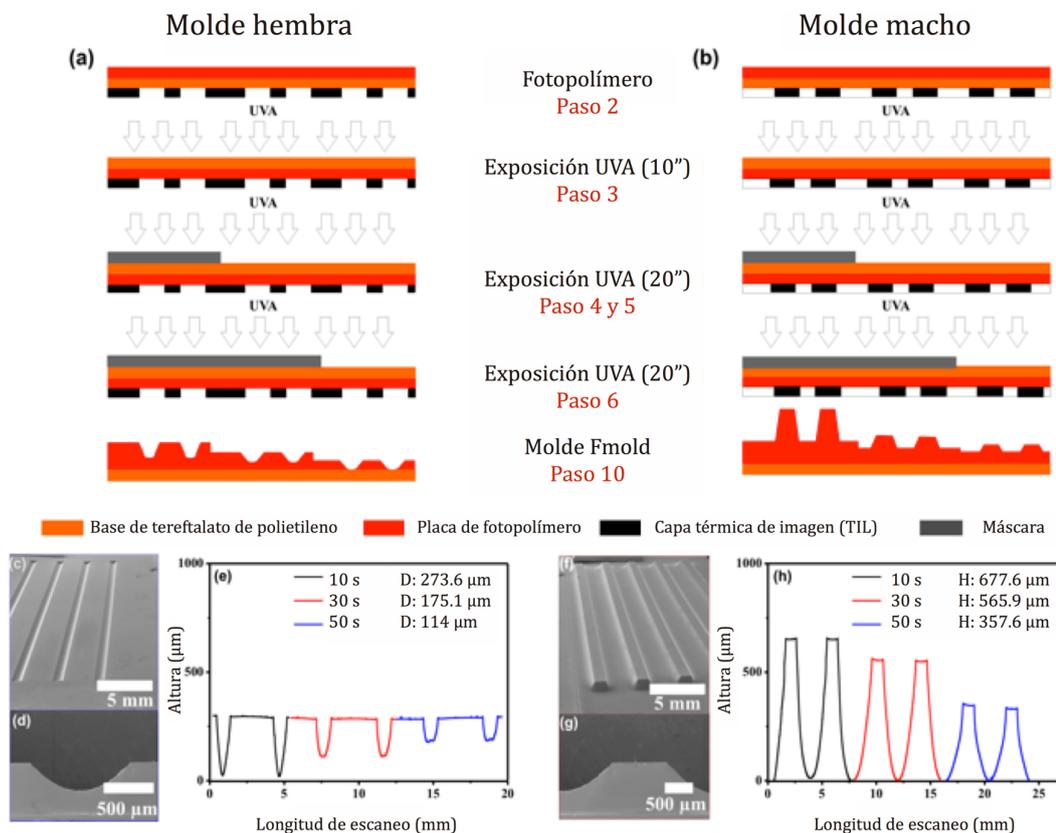


Figura 3. 3 Estructuras multi-nivel en moldes hembra y macho. (a)(b) Ilustración de los diferentes pasos para fabricar microcanales en multinivel, (c) (f) imágenes SEM de la vista superior de los moldes hembra y macho, (d)(g) Sección transversal de los moldes hembra y macho, (e)(h) profundidad y altura de los canales medidas mediante perfilometría. El ancho del canal dibujado en el programa L-edit fue de 1000 μm . El lado reverso de tres secciones de la placa de fotopolímero fue expuesto a luz UVA a 0.45 J durante 10 s, 30 s, y 50 s, respectivamente. Esto corresponde a los tres tiempos de exposición a la luz a UVA de 10 s, 20 s y 20 s. D: Profundidad del canal, H: Altura del canal.

3.2.2 Caracterización del molde

La caracterización morfológica de los moldes fue realizada en un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) (TESCAN FEG SEM MIRA3). Previamente al análisis, los moldes fueron recubiertos con una capa de 20 nm de oro mediante un evaporador parpadeante (Quorum Q150R ES). Las mediciones en el SEM se condujeron a 7 kV mientras que las mediciones cuantitativas fueron realizadas con el programa MIRA TC versión 4.2.24.0. En cuanto a las mediciones de perfilometría, se utilizó el perfilómetro Dektak XT de Bruker mientras que los análisis se ejecutaron en el programa Vision 64. Se hicieron escaneos lineales con una punta de 25 μm de radio a una velocidad de escaneo de 90 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a una velocidad de muestreo de 0.01 $\text{Hz}\cdot\text{mm}^{-1}$. Previamente a la caracterización, los moldes fueron preparados a través de la exposición a nitrógeno a presión para remover el polvo y luego fueron limpiados mediante ultrasonido en etanol (70 %v/v) durante 10 minutos (este paso fue repetido 5 veces). Después, los moldes fueron secados en un horno a 40 °C durante 1 hora. Las imágenes de AFM fueron adquiridas en modo ScanAyst bajo condiciones ambiente. Se utilizó una punta cuya constante elástica correspondió a 0.71 Nm^{-1} . El parámetro rugosidad promedio (R_a) fue determinado al aplicar el programa Nanoscope Analysis 1.8 en múltiples imágenes adquiridas en posiciones al azar sobre áreas de 50 x 50 μm^2 . Las imágenes reportadas en este trabajo fueron obtenidas de forma reproducible sobre al menos cinco puntos sobre la superficie de la muestra.

3.2.3 Aplicación

3.2.3.1 Fabricación del dispositivo de microfluídica

El primer paso fue la fabricación del molde. La arquitectura de los microcanales fue diseñada utilizando el software Layout Editor y luego fue transferida a la capa TIL. Subsecuentemente, la fabricación del molde hembra de fotopolímero (Fmold) se realizó siguiendo los pasos descritos en la sección previa (Fabricación de microestructuras al variar el tiempo de exposición a la luz UVA). De todas formas, el lado reverso de la placa de

fotopolímero fue expuesta una vez durante 10 s. El diseño consiste en 4 líneas con once pocillos en serie en cada una. Las posiciones de los pocillos se denominan según L_iW_j , donde L_i corresponde al número de línea, mientras que W_j , al número de pocillo (Figura 3. 7a).

En el siguiente paso, dos réplicas de PDMS (réplica de PDMS del piso y la réplica de PDMS con el diseño) fueron elaboradas para fabricar el dispositivo de microfluidica. Brevemente, la mezcla de epoxi-resina y su agente curante (Cristal-Tack, Novarchem-Argentina) se dispensó sobre el molde hembra para replicar el diseño en relieve. Después del curado, el molde de epoxi-resina (ERmold) se desprendió del Fmold para formar el molde macho. Subsecuentemente, la mezcla de PDMS y su agente curante mezclados en relación 10:1 (p/p) (Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit) fue dispensado sobre el molde ERmold y curado en un horno a 40 °C durante toda la noche.

En cuanto a la réplica de PDMS se servirá como piso del dispositivo, se utilizaron 3 gramos de la mezcla PDMS-agente curante que se dispensó sobre un portaobjetos de vidrio insertado en un soporte de acrílico para contener la mezcla líquida. Una vez curado, el piso de PDMS y la réplica de PDMS con el diseño fueron expuestos a plasma de oxígeno generado por el equipo BD-10^a generador de alta frecuencia (Electro-Technic Products, USA) para unir las dos piezas irreversiblemente.

3.2.3.2 Cultivo celular

Los canales de los dispositivos de microfluídica fueron lavados con etanol 70%, posteriormente con NaOH (0.5 M) durante 30 minutos y agua ultra pura antes de sembrar las células. La línea celular Jurkar (ACC-282, de la colección de microorganismos y cultivos celulares DSMZ del instituto alemán Leibniz) fue cultivada en medio 1640 del instituto Roswell Park Memorial (RPMI) (Gibco) suplementado con suero fetal bovino (10%) y 1%

de la mezcla penicilina/estreptomicina (P/S) ($10000 \mu\text{gml}^{-1}$ penicilina, $10000 \mu\text{gml}^{-1}$ estreptomicina; Gibco). Las células Jurkat fueron incubadas a 37°C en una incubadora que provee una atmósfera húmeda que contiene $5\% \text{CO}_2$. Las células fueron pasadas a una botella de cultivo con medio fresco cada tres días. Un volumen de $65 \mu\text{L}$ de suspensión de células Jurkat a una concentración de $3.33 \times 10^5 \text{células.ml}^{-1}$ fue inyectada en cada canal del dispositivo de microfluídica utilizando una bomba de infusión a jeringa (ADOX, Argentina) modelo A22 a una caudal de $26 \mu\text{L.min}^{-1}$ durante 3 minutos. La bomba de jeringa se rotó 90° para prevenir la sedimentación de las células sobre la pared lateral de la jeringa. El medio de cultivo fue renovada al día 3 a un caudal de $2 \mu\text{L.min}^{-1}$ durante 35 minutos para cada línea del microdispositivo. La concentración celular en el medio extraído de las salidas de los canales fue medida con el contador automático de células TC10™ Bio-Rad (Lighthouse Core Facility, Alemania). Las células Jurkat fueron monitoreadas microscópicamente y las imágenes fueron adquiridas en los días 1-5 con un microscopio invertido Zeiss Observer (Lighthouse Core Facility, Alemania) con los objetivos EC Plan-Neofluar $2.5\text{x}/0.075$ y $10\text{x}/0.3$. Para prevenir la evaporación, el dispositivo de microfluídica se colocó dentro de una caja Petri provista con reservorios con agua. La caja Petri con el dispositivo fue retirada de la incubadora para transportar el dispositivo al microscopio invertido.

3.2.3.3 Análisis de imágenes

Se midió el área ocupada por la suspensión de células para estimar la proliferación mediante una macro escrita en el programa FIJI Image J. El día de la siembra se consideró como el Día 1 mientras que el día siguiente, cuando las células se han sedimentado, se denominó Día 2. El área de toda la imagen se consideró como el 100% y se reportó el porcentaje de área ocupado por las células. Se monitorearon microscópicamente siete pocillos y se adquirieron imágenes diariamente.

3.2.3.4 Cuantificación del área ocupada por las células Jurkat

La escala espacial (pixel-pixel) de la imagen se adquiere del microscopio invertido de fluorescencia (Zeiss AxioObserver.Z1 / Apotome, Lighthouse Core Facility Freiburg) que esta provista de una cámara climatizada. La escala corresponde a $0.65\mu\text{m} = 1$ pixel.

Para ejecutar un método automatizado para refinar las imágenes y cuantificar el número de células por cada imagen, se escribió una macro en la plataforma FIJI (versión 1.49, <http://imagej.nih.gov/ij/>; provisto por el Instituto Nacional de salud, Bethesda, MD, USA) que fue aplicada para estimar el área ocupada por las células en suspensión. Primero se optimizó el contraste mediante un filtro denominado Band pass. Luego, se utilizó la herramienta Convolve para aumentar la resolución y el brillo de la imagen para cuantificar las células. Después se aplico un umbral para crear una máscara y se aplicó la herramienta Measure para reporte el porcentaje de área cubierto por las células.

3.2.3.5 Identificación de células muertas

La detección de eventos de muerte celular se llevó a cabo siguiendo la metodología utilizada en el estudio reportado por Wlodkowic *et al* [49] donde $0.25\ \mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ de yoduro de propidio (PI) se disuelven en el medio de cultivo RPMI. Este medio RPMI suplementado con PI se utilizó para renovar el medio de cultivo al día 5. El yoduro de propidio es un tinte intercalante que no pasa a través de la membrana plasmática de las células vivas como lo describe Zaretsky *et al.* [50]. Las imágenes fueron adquiridas con el microscopio invertido Zeiss Observer utilizando el filtro para PI. Para determinar el porcentaje de células muertas, se consideró el área celular total vista en campo claro como el 100% mientras que el área celular marcada como PI-positiva se reportó como el área de células muertas. Esta medida permitió determinar la viabilidad biológica de las estructuras multinivel del dispositivo de microfluídica.

3.3 Resultados y discusión

La fabricación de los moldes descrita en esta tesis fue realizada mediante el proceso de fotopolimerización[31]. La fotopolimerización de la placa de polímero con exposición a la luz UVA sobre el lado reverso es el paso que controla la altura/profundidad de las estructuras y el soporte de los detalles finos[31]. Este paso comienza con la reacción de un radical de la cadena de monómeros reactivos que reacciona con otros monómeros para formar una red entrecruzada. La polimerización continúa siempre y cuando la exposición UVA esté funcionando[31]. Con respecto a lo mencionado, en el capítulo anterior se identificó una relación inversa entre el tiempo de exposición a la luz UVA y la altura de las estructuras[31]. Adicionalmente, la exposición del lado frontal a la luz UVA se realiza para formar las estructuras sobre el polímero. Después de la exposición a la luz UVA sobre el lado frontal, la placa de fotopolímero se lava mecánica y químicamente. Por lo tanto, las zonas del polímero que no han sido expuestas a la luz UVA son removidas y de esa forma se fabrican las estructuras [51]. En este sentido, la metodología descrita en este trabajo posibilita la elaboración de estructuras multi-nivel en un mismo molde al variar el tiempo de exposición a la luz UVA y/o el ancho del canal. En las siguientes secciones se explican la variación de cada uno de estos factores, así como también el resultado de modificar ambos factores al mismo tiempo. Adicionalmente, se muestra una aplicación del dispositivo de microfluídica con estructuras multi-nivel.

3.3.1 Fabricación de microestructuras al variar el tiempo de exposición a la luz UVA.

Las Figura 3. 3a y Figura 3. 3b muestran los pasos principales para fabricar moldes con microcanales multi-nivel machos y hembras. Como se observa en la figura, el molde de fotopolímero fue expuesto varias veces. En las Figura 3. 3c y Figura 3. 3g se muestran imágenes de SEM representativas de los moldes macho y hembra manufacturados. Las mediciones de altura y profundidad realizadas con el perfilómetro están incluidas en las Figura 3.

3e y Figura 3. 3h. Los resultados demuestran que la relación altura/profundidad de las estructuras varía de acuerdo con el tiempo de exposición a la luz UVA de 10, 30 y 50 s, se obtuvieron estructuras positivas (moldes macho) con una altura de 677.6, 565.9 y 357.6 μm , respectivamente. En la misma placa de fotopolímero, se fabricaron estructuras negativas (moldes hembra) con una profundidad de 273.6, 175.1 y 114 μm , respectivamente. A partir de estos resultados se observa que existe una relación inversa entre el tiempo de exposición a la luz UVA y la altura/profundidad.

Adicionalmente, se observa que los moldes hembra muestran estructuras con menor espesor en comparación con los moldes macho, esto sucede debido al solapamiento de las paredes laterales (Figura 3. 3d). Para los molde macho, las alturas de las estructuras son dependientes del espacio entre las estructuras individuales como ha sido reportado en el capítulo 2 y publicado por Bourguignon *et al*[31]. Los resultados demuestran que, en una misma placa de fotopolímero, es posible obtener moldes macho y hembra con una gran variedad de dimensiones para altura/profundidad de las microestructuras al variar el tiempo de exposición (Figura 3. 4).

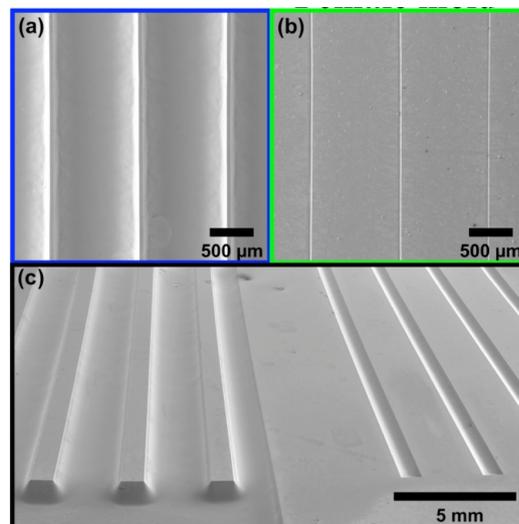


Figura 3. 4 Imágenes de la vista superior de los moldes macho (a) y hembra (b). Vista frontal de los respectivos moldes (c).

3.3.2 Fabricación de microestructuras mediante la variación tanto del tiempo de exposición a la luz UVA como del ancho del canal.

La Figura 3. 5 muestra la profundidad del canal en función del ancho del canal y el tiempo de exposición a la luz UVA. Este procedimiento de la fabricación del molde consiste en la variación de los dos parámetros en una misma placa de fotopolímero. La máscara del molde se muestra en la Figura 3. 2; se dibujaron líneas adyacentes con diferentes anchos de canal.

El lado reverso del fotopolímero fue expuesto sobre el lado reverso 10 s, 30 s y 50 s, respectivamente. Las mediciones de las microestructuras se exhiben en la Figura 3. 5 a que indica que el ancho del canal entre 50 μm y 300 μm presenta una profundidad similar al aplicar los tres tiempos de exposición. Un comportamiento semejante se observó al aplicar un tiempo de exposición de 30s y 50 s a anchos de canal de menores a 400 μm . Mientras que anchos de canal superiores a 400 μm no dependen del tiempo de exposición. Este comportamiento se debe a la forma trapezoidal que presentan las estructuras; esta forma característica genera un solapamiento de las paredes laterales de las estructuras como se muestra en la representación esquemática de la Figura 3. 5c. Las imágenes de SEM mostradas en la Figura 3. 5b evidencian claramente la disminución de la profundidad de las estructuras por el efecto del solapamiento de las paredes laterales. Finalmente, los resultados indican que las estructuras multi-nivel pueden ser creadas por variación del ancho de canal y por variación del tiempo de exposición en un solo paso.

3.3.3 Caracterización del molde

El efecto del tiempo de exposición a la luz UVA sobre la morfología de la superficie fue estudiado a través de la medición de la rugosidad de los moldes del fotopolímero.

La Figura 3. 6 muestra los valores de rugosidad promedio (Ra) e imágenes representativas de SEM y AFM adquiridas de los moldes macho y hembra. En el molde hembra se observa una dependencia directa entre el tiempo de exposición a la luz UVA y la rugosidad. Mientras que la rugosidad del molde macho no muestra ninguna correlación con el tiempo de exposición a la luz UVA. Además, la rugosidad de los moldes macho/hembra fue menor a 29 nm con el tiempo de exposición de hasta 50 s. En el capítulo 2 se reportó una rugosidad media medida en moldes macho obtenidos de la placa de fotopolímero Flexcel SRH. Se obtuvieron valores de Ra entre 23 nm y 99 nm como tiempo de exposición menor a 48 s para el fotopolímero SRH. Debido a que la rugosidad de la superficie puede ser un problema para la toma de imágenes[12], es importante obtener moldes con la menor rugosidad posible. En este sentido, el fotopolímero Flexcel NX es la mejor opción para la fabricación de moldes.

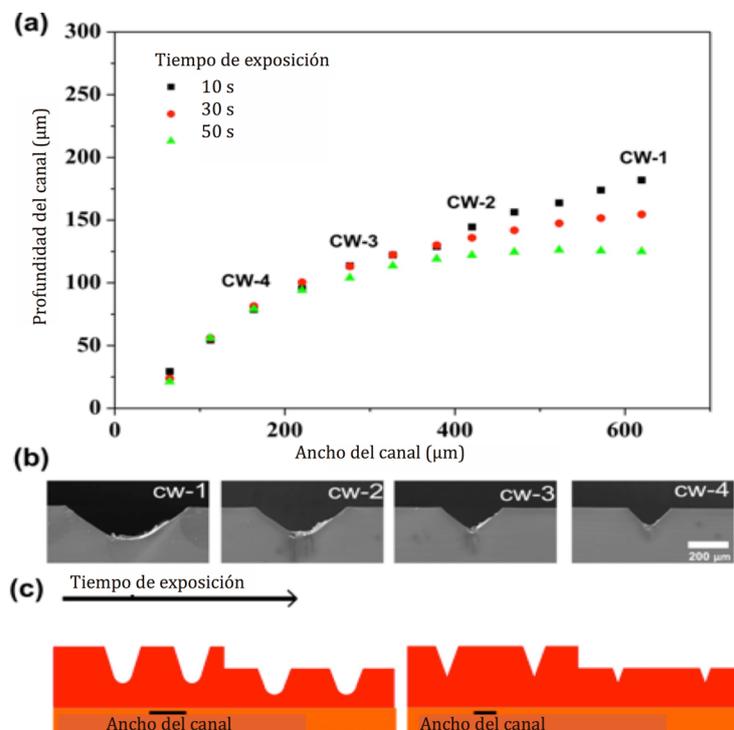


Figura 3. 5 (a) Profundidad del canal en función del ancho del canal y el tiempo de exposición a la luz UVA, (b) Sección transversal de canales obtenidos por exposición del lado reverse a luz UVA durante 10 s. (c) Representación esquemática de la profundidad de las estructuras obtenidas

al variar el ancho de los canales y el tiempo de exposición. Las mediciones de la profundidad y el ancho de los canales fueron determinados por la técnica de perfilometría (n=3). Cw: ancho del canal.

3.3.4 Aplicación

3.3.4.1 Microdispositivo de PDMS

La efectividad de la fabricación de las microestructuras en multi-nivel fue evaluada al construir dispositivos de microfluídica para cultivo y proliferación celular. La fabricación de las microestructuras en multi-nivel se desarrollo a través de la variación del ancho del canal en molde hembra. Como se muestra en la Figura 3. 7, el diseño consiste en una entrada y una salida conectada por cuatro líneas con once pocillos en serie cada línea. Las Figura 3. 7b, Figura 3. 7c y Figura 3. 7d muestran imágenes de SEM del molde. El diseño presenta topologías circulares y lineales. El ancho del canal fue 2100 μm , 2600 μm y 530 μm en la sección C, A y B, respectivamente. Las mediciones de perfilometría muestran que las dimensiones son diferentes en cada sección (Tabla 3. 1). Los resultados demuestran incrementos proporcionales en la profundidad del canal a medida que aumenta el ancho del canal. Además, se observa que los resultados concuerdan con los resultados obtenidos en la sección anterior.

Tabla 3. 1 Dimensiones obtenidas para las secciones A, B y C

Dimensiones (μm)	Sección		
	A	B	C
Ancho	2100 \pm 0.01	2600 \pm 0.01	530 \pm 2.65
Profundidad	387 \pm 3.23	458 \pm 7.14	175 \pm 0.01

3.3.4.2 Cultivo celular y proliferación en el dispositivo de microfluídica

La fabricación de microdispositivos con microestructuras en multi-nivel potencial útil para el cultivo y proliferación celular[20]. En este sentido, las células Jurkat fueron cultivadas en el dispositivo de microfluídica en multi-nivel como una prueba de concepto para capturar células no adherentes en pocillos para su subsiguiente cultivo y proliferación. Un volumen de 65 μl de suspensión de células Jurkat fue inyectado en cada línea del dispositivo de microfluídica. Se observó que las células se dispersaron en los pocillos a lo largo de cada canal (Figura 3. 8a), a continuación, las células se sedimentaron por gravedad y se agruparon en la zona más profunda de cada uno de los pocillos. Este comportamiento resalta la utilidad del dispositivo multi-nivel ya que las células son inmovilizadas en el fondo (zona B) mientras que la zona superior (zona C) permite el paso del medio de cultivo. Para estimar la proliferación de las células Jurkat sedimentadas, las células fueron examinadas microscópicamente a lo largo del tiempo y el área de la ocupada por las células se midió en las imágenes adquiridas. La Figura 3. 8 muestra la proliferación de las células Jurkat en la posición L4_W1 durante 5 días y la Figura 3. 9 presenta una colección de imágenes de los 11 pocillos de la primera línea del dispositivo, inmediatamente después de la siembra de células. La Figura 3. 8 demuestra la proliferación de las células Jurkat. Además, la Figura 3. 8e exhibe la proliferación celular representada por el incremento en el área ocupada promedio desde el día 1 al día 5. Adicionalmente, el medio fue renovado al día 3 y la concentración celular en las salidas fue menor al límite de detección del contador de células automático (5×10^4 células. ml^{-1}), no se observaron cambios en los pocillos durante el monitoreo microscópico, lo cual indica la ausencia de pérdida celular a un flujo de 2 $\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1}$.

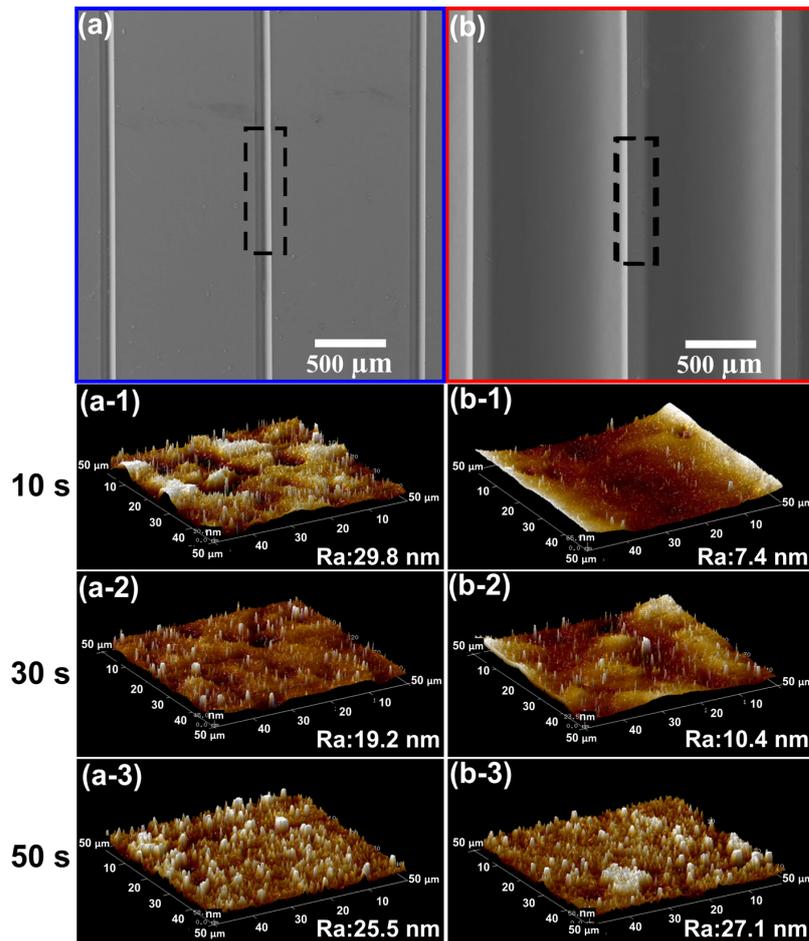


Figura 3. 6 Morfología superficial. (a) (b) imágenes representativas de SEM de loas vistas superiores de los moldes hembra y macho. Imágenes representativas de AFM y valores de rugosidad media (Ra) obtenidas para los moldes hembra (a1-a3). Imágenes representativas de AFM y valores de rugosidad media (Ra) obtenidas para los moldes macho (b1-b3). Condiciones de fabricación: Primer paso tiempo de exposición del lado reverso de la placa de fotorpolímero a la luz UVA = 10, 30 y 50 s, respectivamente. Tiempo de exposición a la luz UVA del lado frontal = 360 s, Segundo paso: tiempo de exposición del lado frontal de la placa de fotorpolímero a la luz UVA = 2 minutos, tiempo de exposición del lado frontal de la placa de fotorpolímero a la luz UVC = 17 min.

La identificación de las células muertas fue evaluada para determinar la viabilidad de las estructuras multi-nivel en los dispositivos para el cultivo y

proliferación celulares. Para esto, se cuantificó el porcentaje de células muertas a través de análisis de imágenes mediante fluorescencia de yoduro de propidio (PI) siguiendo el proceso de marcaje evaluado por Wlodkovic *et al* [49] y realizado por Zaretsky *et al* [50]. Además, el área ocupada por las células muertas se midió con el programa FIJI-Image J[52] y este fue relacionado con el área cubierta por los grupos de células en el día 5 como se ilustra en la Figura 3. 8. Se determinó un promedio del área ocupada por células de 0.95% en los pocillos lo que corresponde a 5.9% de células muertas. El valor normal de células muertas reportado por citometría de flujo es menor al 5%[53]. Mientras que los valores cuantificados por análisis de imágenes están entre $5.6 \pm 2\%$ y $6.7 \pm 2\%$ bajo condiciones normales de cultivo[49]. Se determinó un porcentaje de células muertas menor al 10% por lo tanto, se comprobó que el dispositivo de microfluídica en multi-nivel albergó células Jurkat sin afectar perjudicialmente el desarrollo celular. Estos resultados demuestran que las microestructuras en multi-nivel permiten la renovación del medio de cultivo evitando la pérdida celular.

De acuerdo con los resultados obtenidos, el dispositivo de microfluídica en multi-nivel mostró la habilidad para albergar células, lo que posibilita el monitoreo microscópico de su proliferación durante un periodo de 5 días. Además, las características del dispositivo de PDMS hicieron posible la adquisición de imágenes, así como también la disminución del espesor ($\approx 2\text{mm}$) de la réplica de PDMS que contiene el diseño de los microcanales del dispositivo, lo cual provee una distancia de trabajo apropiada al usar el objetivo 10x. Adicionalmente, el diseño propuesto posibilita albergar células en la parte más profunda de cada pocillo, lo cual permite la proliferación celular. Estos enfoques hicieron posible la caracterización del desarrollo de células en suspensión debido a los diferentes niveles que facilitaron atrapar grupos celular en los pocillos durante la renovación del medio de cultivo. La fabricación de microestructuras en multi-nivel por métodos de fotolitografía tradicionales es costosa, requiere múltiples pasos de litografía y procesos repetitivos[12]. En este contexto, esta investigación supera estos desafíos mediante el uso de moldes FMolds.

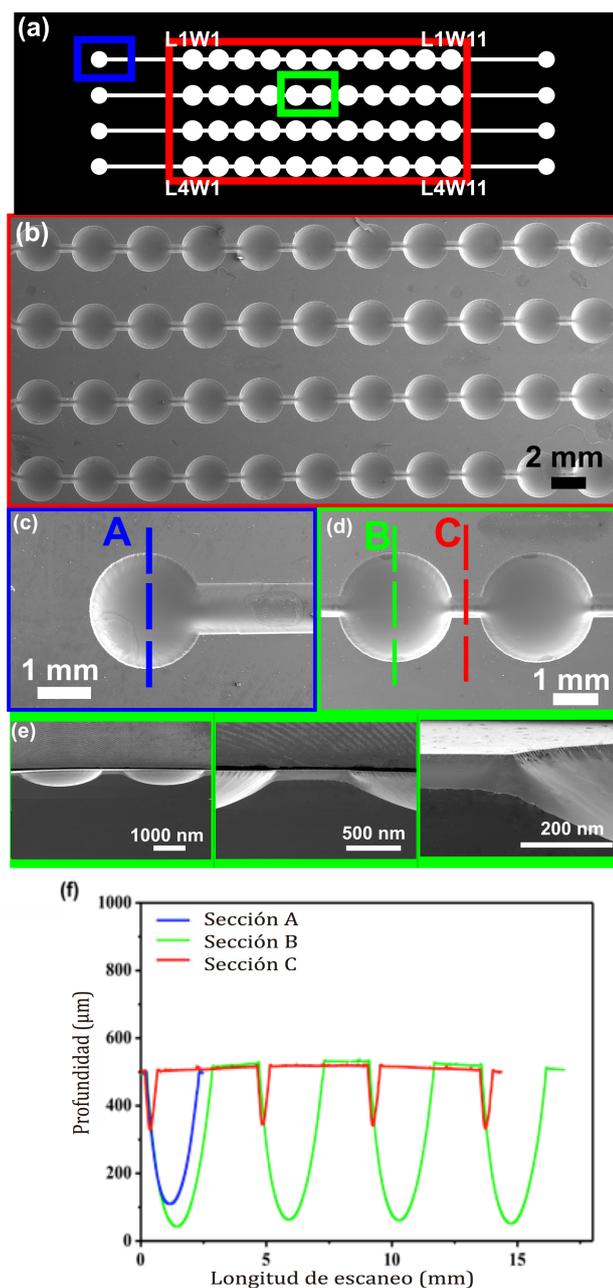


Figura 3. 7 (a) Arquitectura de los microcanales del dispositivo de microfluídica. (b) imágenes de SEM de los pocillos, (c) magnificación superior adquirida por SEM de la zona A, (d) magnificación superior adquirida por SEM de las zonas B y C, (e) Imágenes de SEM de la sección transversal del molde. (f) mediciones de profundidad obtenidas por perfilometría. Condiciones de fabricación del molde: Primer paso: tiempo de exposición a la luz UVA sobre el lado reverso= 10 s, tiempo se exposición

sobre el lado frontal= 360 s. Segundo paso: Tiempo de exposición a la luz UVA sobre el lado frontal= 2 min, tiempo de exposición a la luz UVC sobre el lado frontal= 17 min.

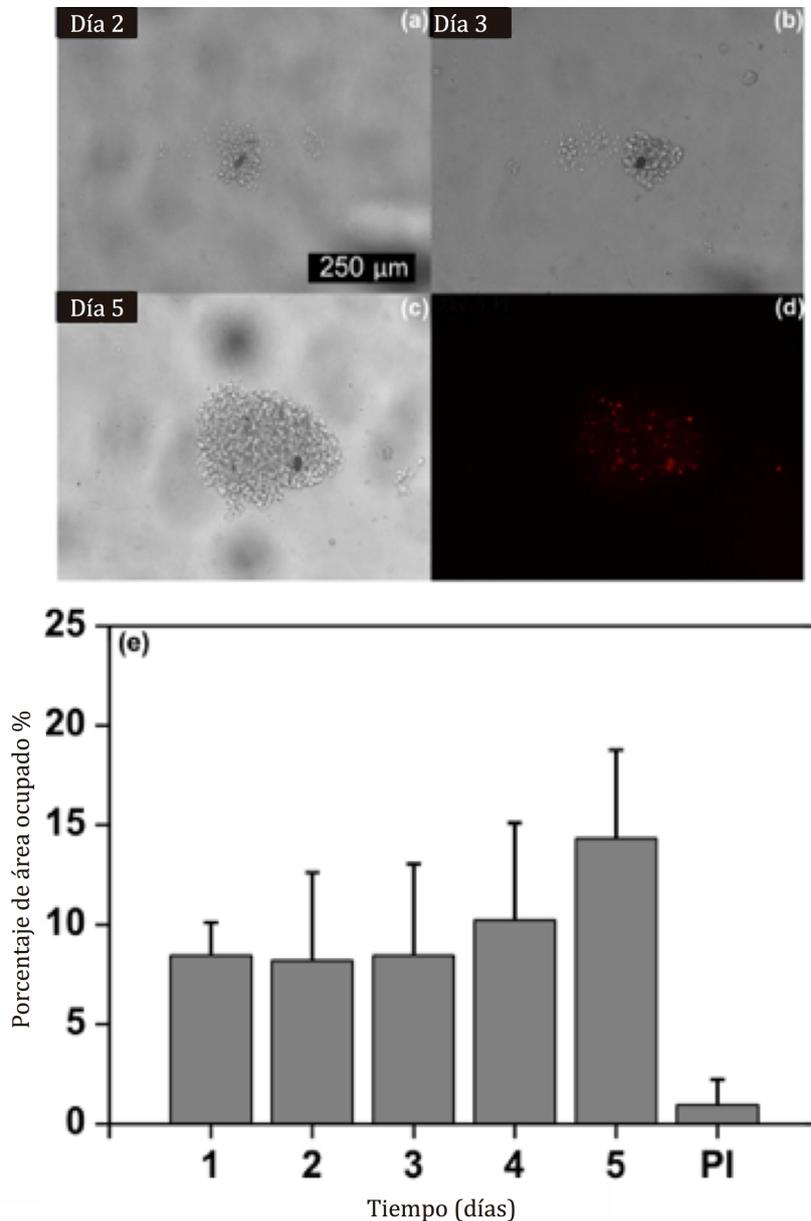


Figura 3. 8 Proliferación de las células Jurkat en la posición L4_W1 durante 5 días. (a) Día 2, (b) Día 3, (c) Día 5 y (d) Detección de células muertas marcadas con PI al día 5, (e) área promedio ocupada por células Jurkat desde el día 1 al día 5. La última barra muestra el porcentaje de área ocupada detectada para células positiva a PI. El área ocupada para células Jurkat fue analizada por FIJI-Image J. Condiciones experimentales: después

del sembrado (día 1), las células Jurkat fueron fotografiadas dentro del dispositivo de microfluidica. Al día 3 el medio de cultivo fue renovado usando un flujo de $2 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 35 minutos. Los eventos de muerte celular fueron determinados mediante el ensayo con yoduro de propidio(PI).

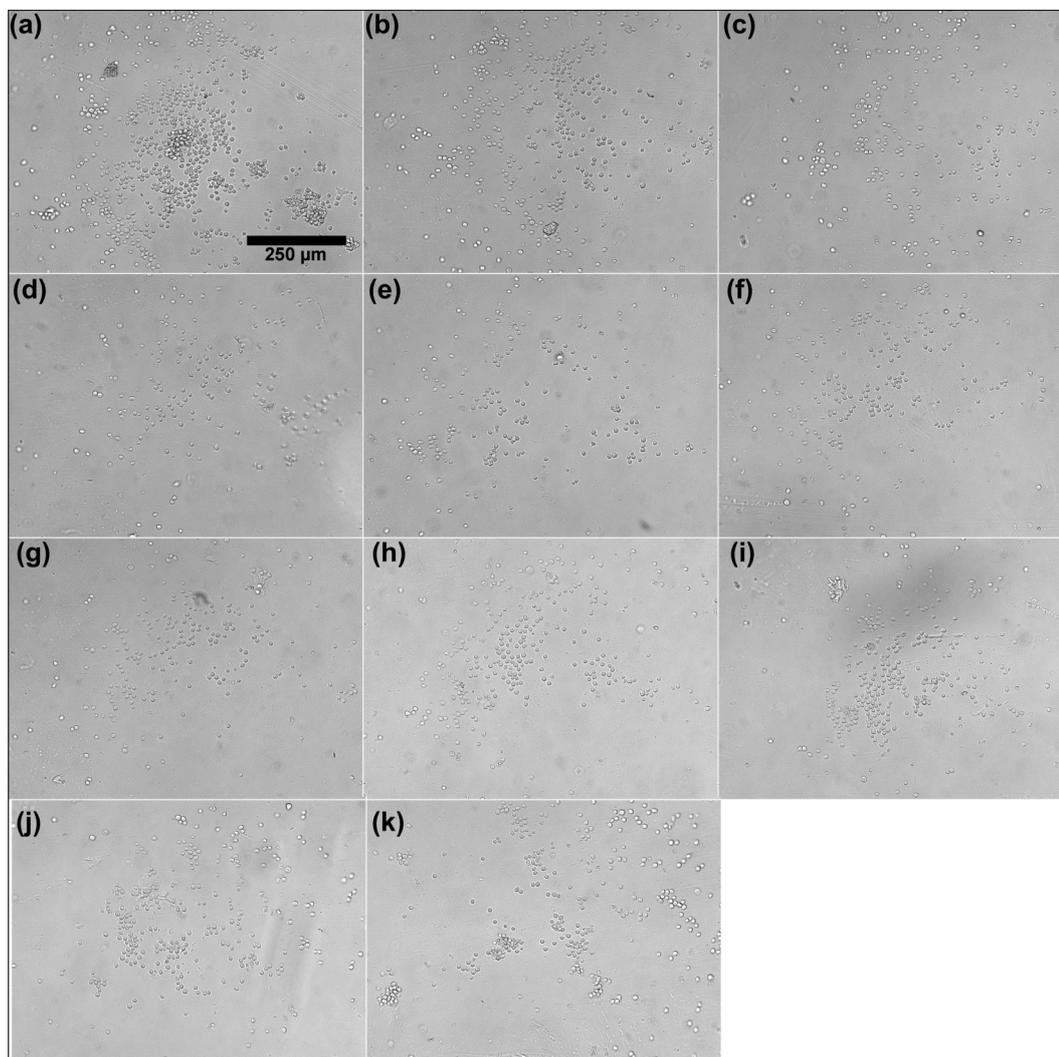


Figura 3. 9 Colección de imágenes que denotan la distribución de las células Jurkat cultivadas en el dispositivo de microfluidica. Se muestran las imágenes de 11 pocillos. (a)-(k) corresponden a los pocillos (L1_W1)-(L1-W11), respectivamente.

3.4 Conclusiones

Se demostró exitosamente la manufactura de canales en multi-nivel mediante al variar tanto el tiempo de exposición a la luz UVA sobre el lado reverso de la placa de fotopolímero como el ancho de los microcanales. Además, se demostró que la variación del ancho del canal puede controlar el espesor de las estructuras, lo cual representa una poderosa característica ya que el espesor podría ser personalizado de acuerdo con el tipo de ensayo. Adicionalmente, el método permite la obtención de múltiples moldes con una amplia variedad de dimensiones y topologías en un área grande (1270 x 2062 mm²) alcanzando un tamaño mínimo de estructura de 10 μm y una altura de estructuras comprendida en el rango de 53 a 1500 μm . Por otro lado, los moldes pueden ser obtenidos comercialmente a bajo costo y están disponibles a nivel mundial. También pueden ser usados múltiples veces con la adquisición de réplicas confiables sin delaminación ya que el molde y las estructuras diseñadas constituyen una sola pieza. Además, el molde es económico porque la tecnología Flexcel puede ser obtenida comercialmente a bajo costo. Finalmente, los resultados demuestran que el microdispositivo con estructuras multi-nivel posibilita la renovación del medio de cultivo sin afectar perjudicialmente la proliferación celular. Lo demostrado sugiere que la metodología desarrollada tiene un gran potencial en diferentes campos de la microfluídica, particularmente, en el cultivo de células no adherentes.

3.5 Referencias

1. Toepke, M.W. and J.A. Kenis, *Multilevel Microfluidics via Single-Exposure Photolithography*. Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(21): p. 7674-7675.
2. Anderson, J.R., et al., *Fabrication of Topologically Complex Three-Dimensional Microfluidic Systems in PDMS by Rapid Prototyping*. Analytical Chemistry, 2000. **72**(14): p. 3158-3164.
3. Campbell, C.K., R.; Fialkowski, M.; Grzybowski, BA., *One-step multilevel microfabrication by reaction--diffusion*. Langmuir, 2005. **21**(1): p. 418-423.
4. Liu, R.H.S., M.A.; Sharp, K.V.; Olsen, M.G.; Santiago J.G.; Adrian, R.J.; Aref, H.; Beebe, D.J., *Passive mixing in a three-dimensional serpentine microchannel*. Journal of Microelectromechanical Systems, 2000. **9**(2): p. 190-197.
5. Sayah, A.T., P.-A. Parashar, V. K. Gijs, M. A. M., *Fabrication of microfluidic mixers with varying topography in glass using the powder blasting process*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2009. **19**(8).
6. Kovarik, M.J.S., *Fabrication of three-dimensional micro- and nanoscale features with single-exposure photolithography*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(14): p. 5214-5217.
7. Lim, D.K., Y.; Cho, B.; Mazumder, J.; Takayama, S., *Fabrication of microfluidic mixers and artificial vasculatures using a high-brightness diode-pumped Nd:YAG laser direct write method*. Lab on a Chip, 2003. **3**(4): p. 18-23.
8. Huang, Z.L., X.; Martins-Green, M.; Liu, Y., *Microfabrication of cylindrical microfluidic channel networks for microvascular research*. Biomedical Microdevices, 2012. **14**(5): p. 873-883.
9. Oppliger, Y., et al., *One-step 3D shaping using a gray-tone mask for optical and microelectronic applications*. Microelectronic Engineering, 1994. **23**(1): p. 449-454.
10. Hansen, C.S., R.; Kolesky, DB.; Vericella, JJ.; Kranz, SJ.; Muldowney, GP.; Christensen, KT.; Lewis, JA., *High-throughput printing via microvascular multinozzle arrays*. Advanced Materials, 2012. **25**(1): p. 96-102.

11. Borenstein, J.T., MM.; Mack, PJ.; Weinberg, EJ.; Khalil, AS.; Hsiao, J.; García-Cardena, G., *Functional endothelialized microvascular networks with circular cross-sections in a tissue culture substrate*. Biomedical Microdevices, 2010. **12**(1): p. 71-79.
12. Kang, M., et al., *Fabrication of functional 3D multi-level microstructures on transparent substrates by one step back-side UV photolithography*. RSC Advances, 2017. **7**(22): p. 13353-13361.
13. Liu, X., et al., *A facile "liquid-molding" method to fabricate PDMS microdevices with 3-dimensional channel topography*. Lab on a Chip, 2009. **9**(9): p. 1200-1205.
14. Amziah, N.Y., M.; Green, N., *Fabrication of microfluidic device channel using a photopolymer for colloidal particle separation*. Microsystem Technologies, 2010. **16**: p. 2099-2107.
15. Nam, Y., M. Kim, and T. Kim, *Pneumatically controlled multi-level microchannel for separation and extraction of microparticles*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014. **190**: p. 86-92.
16. Lai, D.L., J.; Kim, J.; Luker, G.; Shikanov, A.; Takayama, S., *Simple Multi-level Microchannel Fabrication by Pseudo-Grayscale Backside Diffused Light Lithography*. RSC Advances, 2013. **3**(4): p. 19467-19473.
17. Tokeshi, M., et al., *Continuous-Flow Chemical Processing on a Microchip by Combining Microunit Operations and a Multiphase Flow Network*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(7): p. 1565-1571.
18. Lecault V, V.M., Sekulovic S, Knapp DJ, Wohrer S, Bowden W, Viel F, McLaughlin T, Jarandehi A, Miller M, Falconnet D, White AK, Kent DG, Copley MR, Taghipour F, Eaves CJ, Humphries RK, Piret JM, Hansen CL., *High-throughput analysis of single hematopoietic stem cell proliferation in microfluidic cell culture arrays*. Nat Met, 2011. **8**(7): p. 581-586.
19. Zhao, L.M., S.; Moraes, C., *Micropocket hydrogel devices for all-in-one formation, assembly, and analysis of aggregate-based tissues*. Biofabrication, 2019. **11**(4).
20. Yue, W., et al., *Screen printing of solder resist as master substrates for fabrication of multi-level microfluidic channels and flask-shaped*

- microstructures for cell-based applications*. Biosensors and Bioelectronics, 2013. **41**: p. 675-683.
21. Guan, G., et al., *Spiral microchannel with rectangular and trapezoidal cross-sections for size based particle separation*. Scientific Reports, 2013. **3**(1).
 22. Kwon, T., et al., *Microfluidic Cell Retention Device for Perfusion of Mammalian Suspension Culture*. Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 6703.
 23. Lee, S.H., S.; Jung, B.; Jeong, SY.; Byeon, JH.; Jeon, GS.; Choi, J.; Hwang, C., *In vitro lung cancer multicellular tumor spheroid formation using a microfluidic device*. Biotechnology Bioengineering, 2019. **116**(11): p. 3041-3052.
 24. Park, J., et al., *Dynamic live cell imaging of immune cell interactions using microfluidics cell trap*. The Journal of Immunology, 2018. **200**(1 Supplement): p. 174.40.
 25. Konry, T., et al., *Droplet-based microfluidic platforms for single T cell secretion analysis of IL-10 cytokine*. Biosensors and Bioelectronics, 2011. **26**(5): p. 2707-2710.
 26. Kuo, J.H., H., *Optical Trapping of Beads and Jurkat Cells Using Micromachined Fresnel Zone Plate Integrated with Microfluidic Chip*. Japanese Journal of Applied Physics, 2011. **50**(10): p. 100211.
 27. Di Carlo, D.A., N.; Lee, LP., *Single-cell enzyme concentrations, kinetics, and inhibition analysis using high-density hydrodynamic cell isolation arrays*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(14): p. 4925-4930.
 28. Zhu, Z., et al., *Microfluidic single-cell cultivation chip with controllable immobilization and selective release of yeast cells*. Lab on a Chip, 2012. **12**(5): p. 906-915.
 29. Zhu, Z., et al., *A Bubble-Free Microfluidic Device for Easy-to-Operate Immobilization, Culturing and Monitoring of Zebrafish Embryos*. Micromachines, 2019. **10**(3): p. 168.
 30. Olmos, C.M., et al., *Epoxy resin mold and PDMS microfluidic devices through photopolymer flexographic printing plate*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2019. **288**: p. 742-748.
 31. Bourguignon, N., et al., *Accessible and Cost-Effective Method of PDMS Microdevices Fabrication Using a Reusable Photopolymer Mold*. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 2018. **56**(21): p. 1433-1442.

32. Chen, X.S., Jienan ; Zhou, Mengde, *Rapid fabrication of a four-layer PMMA-based microfluidic chip using CO₂-laser micromachining and thermal bonding*. J. Micromech. Microeng., 2016. **26**(10): p. 107001.
33. Stoller, M.A., et al., *Thermoplastic building blocks for the fabrication of microfluidic masters*. RSC Advances, 2015. **5**(119): p. 97934-97943.
34. Isiksacan Z., G.M., Aydogdu B., Billican I., Elbuken C., *Rapid fabrication of microfluidic PDMS devices from reusable PDMS molds using laser ablation*. J. Micromech. Microeng., 2016. **26**.
35. Ednan Joanni, J.P., Patricia Silva Domingues, Grazielle de Oliveira Setti, Dosil Pereira de Jesus, *Fabrication of molds for PDMS microfluidic devices by laser swelling of PMMA*. RSC Advances, 2015. **5**(32): p. 25089-25096.
36. Gutzweiler, L., et al., *Semi-contact-writing of polymer molds for prototyping PDMS chips with low surface roughness, sharp edges and locally varying channel heights*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2016. **26**(4): p. 045018.
37. Kamei, K.M., Y.; Fockenberg, C.; Nakashima, M.; Nakajima, M.; Li, J.; Chen, Y., *3D printing of soft lithography mold for rapid production of polydimethylsiloxane-based microfluidic devices for cell stimulation with concentration gradients*. Biomedical Microdevices, 2015. **17**(2).
38. Waheed, S., et al., *3D printed microfluidic devices: enablers and barriers*. Lab on a Chip, 2016. **16**(11): p. 1993-2013.
39. Li, Z.a., et al., *Preparation of PDMS microfluidic devices based on drop-on-demand generation of wax molds*. Analytical Methods, 2014. **6**(13): p. 4716-4722.
40. Li, B., et al., *Quantum Dot-Based Molecularly Imprinted Polymers on Three-Dimensional Origami Paper Microfluidic Chip for Fluorescence Detection of Phycocyanin*. ACS Sensors, 2017. **2**(2): p. 243-250.
41. Lin, D., et al., *Low cost fabrication of microfluidic paper-based analytical devices with water-based polyurethane acrylate and their application for bacterial detection*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2020. **303**: p. 127213.

42. Yiqiang Fan, K.G., Jie Chen, Wengang Li, Yajun Zhang, *Low-cost PMMA-based microfluidics for the visualization of enhanced oil recovery*. Oil Gas Sci. Technol. – Rev. IFP Energies nouvelles, 2018. **73**: p. 26.
43. Waldbaur, A., et al., *Let there be chip—towards rapid prototyping of microfluidic devices: one-step manufacturing processes*. Analytical Methods, 2011. **3**(12): p. 2681-2716.
44. Carson T. Riche, C.Z., Malancha Gupta, Noah Malmstadt, *Fluoropolymer surface coatings to control droplets in microfluidic devices*. Lab on a Chip, 2014. **14**(11): p. 1834-1841.
45. Jeon, J., et al., *SERS-based droplet microfluidics for high-throughput gradient analysis*. Lab on a Chip, 2019. **19**(4): p. 674-681.
46. Zhang, C., et al., *Micro-fabrication method of graphite mesa microdevices based on optical lithography technology*. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2017. **27**(12): p. 125022.
47. Kodak. *Flexcel NX*. 2017 Feb 1, 2018]; Available from: https://http://www.kodak.com/uploadedFiles/Flexcel_NXC_Plates_brochure.pdf.
48. KLayout. *High Performance Layout Viewer and Editor*. 2018 2019-09-10 [cited 2018; Available from: <http://www.klayout.de/index.php>
49. Wlodkowic, D., et al., *Chip-based dynamic real-time quantification of drug-induced cytotoxicity in human tumor cells*. Analytical chemistry, 2009. **81**(16): p. 6952-6959.
50. Zaretsky, I., et al., *Monitoring the dynamics of primary T cell activation and differentiation using long term live cell imaging in microwell arrays*. Lab on a Chip, 2012. **12**(23): p. 5007-5015.
51. Olmos, C., Peñaherrera, A., Rosero, G., Vizuete, K., Ruarte, D., Follo, M., Vaca, A., Arroyo, C., Debut, A., Cumbal, L., Pérez, M., Lerner, B., Mertelsmann, R., *Cost-effective fabrication of photopolymer molds with multi-level microstructures for PDMS microfluidic device manufacture*. RSC Advances, 2020. **10**:p. 4071-4079.
52. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nature Methods, 2012. **9**(7): p. 676-682.

53. Cummings, B.S. and R.G. Schnellmann, *Measurement of Cell Death in Mammalian Cells*. Current Protocols in Pharmacology, 2004. **25**(1): p. 12.8.1-12.8.22.

Capítulo 4

Producción de anticuerpos monoclonales en dispositivos de microfluídica

4.1 Resumen

Se diseñó un dispositivo de microfluídica con cisternas para cultivar células eucariotas adherentes para la producción de proteínas recombinantes. La configuración geométrica de los microcanales en el dispositivo otorgó el flujo laminar y perfil de velocidad reducido en las cisternas lo que resultó en un microambiente adecuado para el crecimiento de células adherentes a largo plazo con bombeo pasivo en ciclos de 24 horas. Las líneas celulares adherentes CHO-ahIFN α 2b y HEK-ahIFN α 2b expresan un anticuerpo monoclonal (MAb) recombinante nuevo anti-hIFN- α 2b para el tratamiento de Lupus sistémico eritematoso (SLE) por sus siglas en inglés *Systemic Lupus Erythematosus*, fueron cultivadas en la superficie de los microcanales del dispositivo formado por PDMS/vidrio. Esta superficie fue funcionalizada con poli-D-lisina. Un cultivo de 24 días de células CHO-ahIFN α 2b resultó en la producción de una concentración de anticuerpo de hasta 166.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ por día. La productividad de las líneas celulares CHO-ahIFN α 2b y HEK-ahIFN α 2b fue superior en el dispositivo comparado con el cultivo celular en la botella de cultivo, con un incremento de 5.89 y 7.31 veces, respectivamente. Además, los análisis biológicos de los MAbs producidos en el microdispositivo no mostraron diferencias significativas con los MAbs producidos con el método de cultivo en botella. Estos resultados sugirieron que el dispositivo es apropiado para cultivos de células de mamífero a largo plazo y que pueden mejorar la productividad de las células que expresan MAbs recombinantes con potencial uso terapéutico sin afectar los atributos de calidad del producto.

4.2 Introducción

La microfluidica provee una plataforma prometedora para las aplicaciones lab-on-a-chip (LOC), abarca el uso de microdispositivos para el cultivo de células procarionas y eucariotas, como levaduras y células de mamíferos

para producir proteínas recombinantes en bioreactores[1-3]. Algunos trabajos han reportado plataformas de microfluidica para cultivo de células de mamífero[4], microreactores con control de oxígeno[5], dispositivos que permiten el modelamiento del ambiente *in vivo* en diferentes niveles de organización celular[6]. También han sido usados para desarrollar estudios de citotoxicidad[7], enriquecimiento de células madre, utilización sistemas de co-cultivo para monitorear interacciones tumor-estroma en un chip[8], entre otras aplicaciones.

El cultivo celular en dispositivos de microfluidica ha sido aplicado también para entender fenómenos relacionados con bioprocesos, analizar heterogeneidad celular durante el crecimiento de la población celular y para identificar células en estado de arresto y células en alto nivel de proliferación en distintas arquitecturas de microcanales elaborados con polidimetilsiloxano (PDMS) y polimetilmetacrilato (PMMA)[3, 9]. Además, el uso de dispositivos de microfluidica para expresión de proteínas recombinantes destinadas al uso terapéutico ofrece varias ventajas que incluyen una relación superficie/volumen superior, homogénea y microambientes controlados, reducción en los volúmenes de la muestra, costos tanto manufactura como de procesos de optimización[10]. Adicionalmente, los microdispositivos han demostrado aumento en el volumen de producción de moléculas sintéticas, con ambiente controlado mejorado y cortos tiempos de residencia del producto en el dispositivo, lo cual minimiza el impacto de modificaciones químicas o enzimáticas durante el proceso[11].

La producción de anticuerpos monoclonales para el uso terapéutico es una de las áreas de más rápido crecimiento en la industria biofarmacéutica[12, 13]. Desde que el primer MAb fue comercializado en 1986, 47 MAbs fueron aprobados en los Estados Unidos para el tratamiento de una variedad de enfermedades, como cáncer y enfermedades autoinmunes en 2014. Con la tasa de aprobación actual de cuatro nuevos productos por año, 70 MAbs estarán en el mercado y se estimó una proyección de ventas globales

combinadas que serían aproximadamente \$125 billones en este año 2020[14].

Debido a que altos niveles de interferón- α (hIFN- α) han sido reportados como un factor de riesgo hereditario para contraer SLE[15, 16], una nueva molécula recombinante a manera de anticuerpo monoclonal anti-hIFN- α (un fragmento de la cadena variable del anticuerpo fusionado al dominio cristalizante del IgG1 humano, scFv-Fc) fue desarrollado en el laboratorio de cultivos celulares de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Dra. Carolina Attallah en la Universidad Nacional del Litoral con el que tenemos colaboración[17]. Esta molécula recombinante fue expresada exitosamente en la forma activa por las células CHO-K1 y HEK293 mediante cultivo *in vitro* en botellas de cultivo. En este capítulo, se utilizó esta molécula como modelo para estudiar la habilidad de las células inmovilizadas en el dispositivo de microfluídica para expresar proteínas recombinantes funcionales con potencial uso terapéutico.

Una forma de mejorar el control de la producción de MAbs, es reducir la escala del sistema a través de la miniaturización en los microdispositivos. Uno de los grupos que ha reportado la producción de anticuerpos en dispositivos LOC es el grupo de Garza-García *et al* 2014[18]. Ellos diseñaron un dispositivo con base de PMMA y una cubierta de PDMS para producir el MAb comercial InfliximabTM como una alternativa a la producción tradicional mediante tanques de agitación. Estos autores aplicaron dispositivos de microfluídica y alcanzaron valores de productividad de tres ordenes de magnitud superiores a aquellos valores típicos reportados en cultivos en suspensión en lotes y lograron una alta densidad celular en los microcanales[1, 18].

En este capítulo se desarrolla la propuesta de un sistema de microfluídica nuevo compuesto por microcanales y cisternas que denotan un microambiente adecuado para la adhesión y crecimiento de células que producen MAbs. Se realizó una simulación de flujo dentro de los canales y

se estudió la producción del anticuerpo quimérico anti-hIFN- α 2b en dos líneas celulares. Finalmente, se condujo un análisis de calidad de atributos del producto donde se comparó la habilidad neutralizante del Mab producido en el microdispositivo con el producido en la botella de cultivo. Los resultados sugieren la factibilidad de la producción de proteínas recombinantes en los dispositivos de microfluídica.

4.3 Metodología

4.3.1 Diseño y fabricación de los dispositivos de microfluídica

Los dispositivos de microfluídica usados en este estudio fueron diseñados con el programa Layout Editor. El microdispositivo consiste en un canal de entrada y uno de salida conectados. El canal de entrada se divide en cuatro microcanales idénticos (496 μm de ancho) con 4 cisternas cada uno (1690 μm), después de los cuales los flujos convergen en el canal de salida. La altura del canal es 150 μm y el volumen interno total corresponde a 32.22 μl (Figura 4. 1). Los canales fueron enlazados a través de ondas curvas para evitar las esquinas ya que en el estudio de diseño de microcanales se observó que las esquinas que se forman en los canales de onda cuadrada contribuyen a la aglomeración de células como se explica en la Figura 4. 2[9].

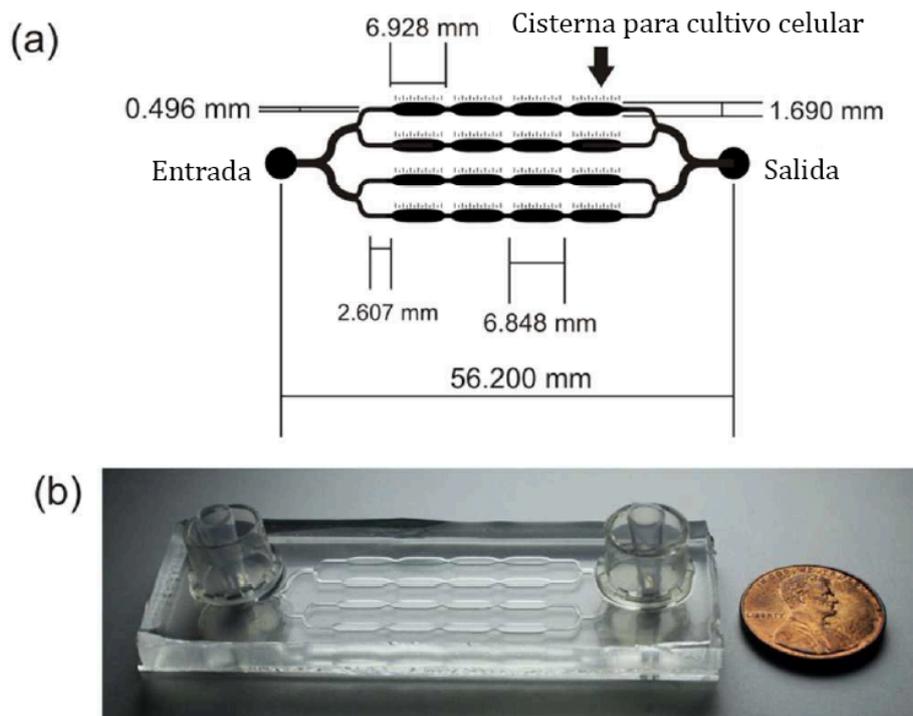


Figura 4. 1 (a) Diseño de los microcanales con un canal de entrada, uno de salida y dieciséis cisternas de cultivo celular. (b) Dispositivo de PDMS/vidrio con volumen interno total de 32.22 μL .

Consecuentemente, un molde en alto relieve fue elaborado mediante fotolitografía en una resina SU-8 de 150 μm de espesor.

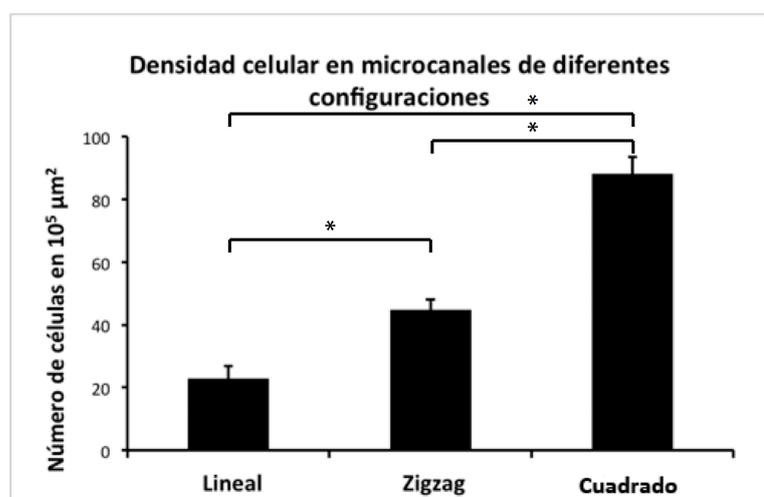


Figura 4. 2 Gráfico de barras de la cuantificación de la densidad celular de las células HEK-293T en microcanales con configuración lineal, en zigzag y

en ondas cuadradas en microdispositivos de PDMS tapizados con poli-D-lisina. Las barras de error indican la desviación estándar de los experimentos realizados por triplicado. Se indica la diferencia significativa que fue calculada mediante la prueba T de datos no apareados, con dos coles y varianzas desiguales. La diferencia significativa esta representada por * $P < 0.001$.

Los microdispositivos fueron construidos en PDMS (Sylgard 184, Dow Corning) (MicroChem, Alemania) sobre una oblea de silicio (Virginia Semiconductor, Inc.) El sustrato de silicio fue limpiado mediante sonicación en acetona y alcohol isopropílico, la superficie del sustrato fue deshidratada por diez minutos en una plancha de calentamiento de 200 °C. La resina SU-8 fue dispensada sobre el sustrato y sometida a 2 ciclos de rotación para extender la resina uniformemente. El rotador fue acelerado durante 5 segundos a 100 rpm s^{-1} hasta 500 rpm y se mantuvo a 500 rpm durante 5 s. En el ciclo de rotación, una rampa de 300 rpm s^{-1} fue aplicada hasta 2000 rpm, y se mantuvo por 30 s. La resina fue introducida al horno, primero a 65 °C por 20 minutos, y a continuación a 95 °C por 50 min. El sustrato fue alineado y la resina fue expuesta a luz UV 650 mJ. El primer paso del horneado post-exposición consistió en 65 °C durante 12 min, y el segundo paso a 95 °C por 15 min. Finalmente, la resina fue revelada por 15 min en agitación.

El PDMS se mezcló con su agente curante en relación 10:1. La mezcla se guardó en la cámara de vacío para remover las burbujas de aire. Después de esto, la mezcla se dispensó sobre el molde maestro (Figura 4. 3) ubicado en un soporte de acrílico que se colocó a su vez en vacío. El curado de la mezcla se realizó a 70 °C durante 70 min. Finalmente, el dispositivo fue extraído del soporte y se perforaron los puertos de conexión mediante un sacabocados (diámetro interno 0.51 mm). El dispositivo fue enlazado a una oblea de vidrio al ser expuesto a un generador de alta frecuencia (BD 10AS, Chicago, USA) durante 120 s.

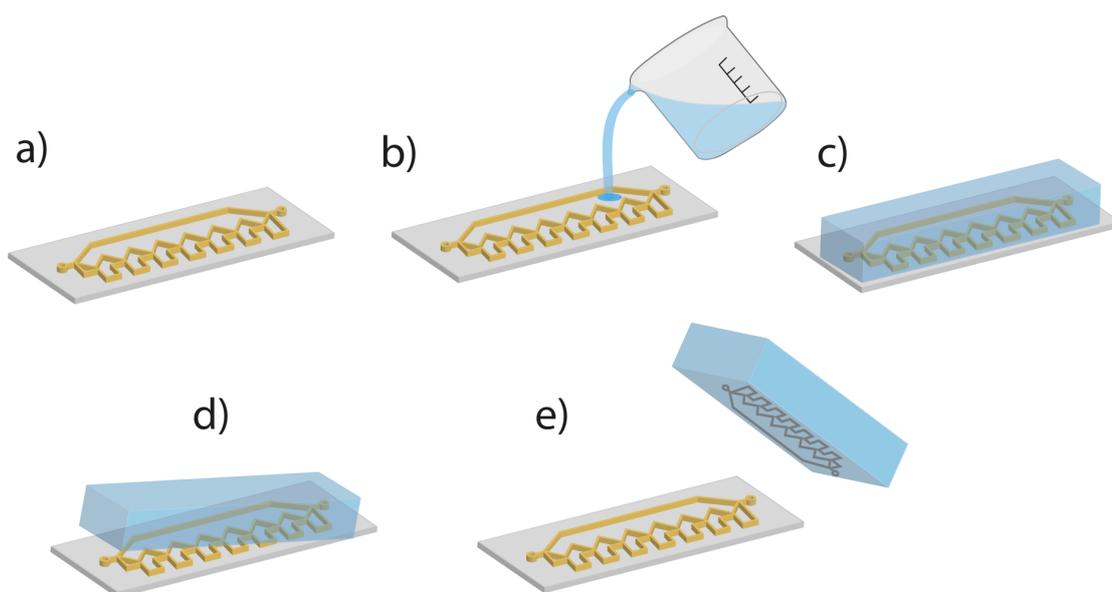


Figura 4. 3 Esquema de pasos para producir la réplica de PDMS a partir del molde maestro. (a) resina SU-8 (amarillo) sobre oblea de silicio (gris). (b) Se coloca la mezcla PDMS/agente curante sobre el molde maestro. (c) PDMS curado. (d) Desmolde de la réplica de PDMS. (e) Réplica de PDMS con microcanales.

4.3.2 Caracterización del campo de flujo mediante modelamiento computacional de flujo

Con el objetivo de definir el perfil dinámico de flujo en el dispositivo de microfluídica, se utilizó el programa COMSOL 5.2 para simular el flujo en el diseño del canal a una tasa de flujo experimental relevante de $3.28 \text{ mm}^3 \text{ s}^{-1}$. La base de la simulación consiste en la resolución de las ecuaciones de Navier-Stokes mientras que el componente de inercia es despreciable ya que el número de Reynolds es bajo en los dispositivos de microfluídica como se explicó en el Capítulo 1. Las condiciones de borde para el modelo tridimensional incluyen, flujo laminar, sin deslizamiento, cero presiones en el canal de salida y las propiedades del fluido corresponden a las del agua.

La densidad de malla se construyó de tal forma que incluye > 900,000 elementos de libertad, con un promedio de elementos de calidad de >0.6.

4.3.3 Cultivo celular y distribución

La superficie de los microcanales fue expuesta a plasma de oxígeno durante 3 minutos para modificar la superficie del PDMS de hidrofóbica a hidrofílica. Luego, se bañan las paredes de los microcanales con etanol 70% ya que el etanol tiene una tensión superficial más baja que el agua. Posteriormente, el dispositivo de microfluídica fue desinfectado utilizando NaOH 0.5 M durante 30 min, a continuación, se inyectan 4 mL de agua estéril. Antes de sembrar las células, el dispositivo se incubó con una solución estéril de hidrobromuro de poli-D-lisina 0.1 mg mL⁻¹ (Sigma, Saint Louis, E.E.U.U) durante 30 min a 37 °C para favorecer la adherencia de las células. Se utilizaron líneas celulares adherentes, células del ovario de hámster chino CHO-K1, CHO-ahIFN α 2b y células del riñón del embrión humano HEK-ahIFN α 2b. Estas células expresan las moléculas recombinantes scFv-Fc anti hIFN- α 2b que fueron generadas por transfección y subsecuente selección con puromicina como se describe en la publicación de Attallah *et al* 2017[17]. La secuencia scFv se obtuvo de la forma descrita por Depetris *et al*[19] y se modificó mediante la adición del péptido señal mSA para permitir que el scFv-Fc sea expresado en células de mamífero como lo describieron Attallah *et al*. [17].

La secuencia scFv-Fc se obtuvo a través de la fusión de la secuencia humana Fc γ 1 a la secuencia generada previamente scFv. La secuencia Fc γ 1 fue sintetizada por GeneArtTM Síntesis de genes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, E.E.U.U.) y clonada entre los sitios de restricción NheI y BamH1 en un vector pLV.

Las células CHO-ahIFN α 2b y HEK-ahIFN α 2b fueron mantenidas en cultivo en botellas de cultivo con una mezcla 50/50% de medio F12/DMEM (Gibco,

Waltham, MA, E.E.U.U.) suplementada con suero fetal de ternero, inactivado por calor, suero fetal bovino (FBS) 10% (p/v) (Internegocios, Mendoza, Argentina), gentamicina $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Invitrogen, Grand Island, NY, E.E.U.U.). NaHCO_3 2.44 g L^{-1} (F12/DMEM) y 1.5 g L^{-1} (DMEM); y solo el DMEM fue suplementado como piruvato de sodio 0.11 g L^{-1} . El medio para la producción de anticuerpos fue el mismo, pero se suplementó con 0.5% de FBS. Las células fueron resuspendidas con tripsina 0.5 mg mL^{-1} y EDTA-4Na 0.2 mg mL^{-1} (Gibco, New York, E.E.U.U.) e incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 3 min. La tripsina fue luego inactivada con FBS y las células fueron lavadas con solución tampón de fosfato (PBS: NaH_2PO_4 2.95 mM, KH_2PO_4 1.06 mM, NaCl 155 mM, pH 7.4) y centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos. Antes de realizar los experimentos, las células fueron cosechadas y resuspendidas en medio fresco y se cuantificaron el número y la viabilidad de las células usando una cámara de Neubauer y exclusión con azul de tripano (Invitrogen, Gran Island, NY, E.E.U.U.). A continuación, las células de mamífero en suspensión fueron sembradas mediante jeringa en el canal de entrada del dispositivo a una concentración de 2×10^5 células por mL. Las células se sedimentaron y el dispositivo de microfluídica fue incubado en una caja Petri a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en un incubador humidificado con 5% de CO_2 por 3 días hasta que se consigue la adhesión celular sobre la superficie del dispositivo. Luego, los dispositivos fueron suministrados con medio de producción que se renovó cada dos días. En todas las condiciones, fueron incubadas bajo las mismas condiciones.

4.3.4 Cuantificación del crecimiento celular a través de análisis de imágenes

Los microcanales fueron visualizados mediante un microscopio invertido Olympus CKX4 (Olympus, Tokyo, Japón). Se adquirieron imágenes en campo claro con los objetivos LUCPlan FLN 40X/0.60; LCAch N 20X/0.40; PlanC N 10X/0.25; y PlanC N 4X/0.10 con un Olympus QColor 5; y las imágenes fueron procesadas con el programa QCapture Pro 6.0.

Se adquirieron un total de 16 microfotografías del dispositivo al día, una de cada cisterna en la magnificación 100X en campo claro durante el experimento de proliferación celular. Se determinaron el número de células (con núcleo distinguible) y la densidad celular por mm^2 con el programa Image J (Instituto Nacional de Salud E.E.U.U., <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para la cuantificación, cada fotomicrografía se dividió en 24 secciones de 0.38 mm^2 o 16 cuadrantes iguales de 0.57 mm^2 , dependiendo del ensayo, por lo tanto, se desarrolló una serie de comandos (macro) para todas las fotografías para cuantificar las células de cada área con el contador de células Image J. A partir de las mediciones de cada cisterna, se determinó el número promedio de células nuevas por cuadrante en el dispositivo por día.

4.3.5 Cuantificación del anticuerpo monoclonal

Se realizó un ELISA indirecto en placas de 96 wells (Greiner Bio One, Kremsmünster, Austria). El tapizado se llevó a cabo a través de la incubación de las placas con 50 ng por pocillo de solución de rhIFN- α 2b en 50 mM de solución tampón de carbonato/bicarbonato (pH 9.6) durante 1 h a 37°C con albúmina de suero bovino (BSA) 1% (p/v) en solución tampón fosfato salina (PBS: Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 1.8 mM, NaCl 14 mM, KCl 2.7 mM, pH 7.4), las placas fueron incubadas con diluciones seriadas de proteína quimérica estándar o con las muestras por 1 h a 37°C .

Finalmente, se utilizó el anticuerpo policlonal de cabra marcado con la peroxidasa de rábano HRP por sus siglas en inglés (horseradish peroxidase) anti-inmunoglobulina de ratón (DAKO, Dinamarca) diluida 1:2,000 fue añadida a los pocillos. Después de 1 h de incubación, las placas fueron incubadas con la solución sustrato (3 mg mL^{-1} o fenildianmina, 0.12% (v/v) H_2O_2 en solución tampón de citrato 50 mM durante 10 minutos. Se midió la absorbancia a 492 nm con un lector de microplacas (Labsystems Multiskan MCC/340, Finlandia). Entre cada paso, la placa se lavó 6 veces con PBS que contiene 0.05% (v/v) Tween 20 (PBS-T). Las diluciones de las muestras y los anticuerpos fueron preparados en PBS-T que contiene 0.1% (w/v) BSA.

Se utilizó la proteína A purificada por afinidad scFv-Fc como estándar para preparar curvas de diluciones seriadas que van desde 1,000 ng mL⁻¹ hasta 7.8 ng mL⁻¹. El ensayo se repitió por triplicado.

4.3.6 Evaluación de los atributos de calidad del MAb

La actividad antiproliferativa de rhFN- α 2b se determina de forma rutinaria mediante la medición de su habilidad para inhibir el crecimiento de las células Daudi[20]. Contrariamente, el efecto neutralizante de los anticuerpos fue evaluado como la habilidad para permitir el crecimiento celular. Diluciones seriales 1:2 del anti-rhIFN- α 2 que contenían sobrenadante fueron pre-incubadas por 2 horas a 37 °C con volúmenes iguales de 20 U mL⁻¹ de rhIFN- α 2b en los pocillos de la microplaca. Posteriormente, las células Daudi previamente lavadas se añadieron (1x10⁴ células por pocillo) y las placas fueron incubadas a 37 °C por 96 h. La proliferación celular fue determinada utilizando un CellTiter 96™ Aqueous Non Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, WI, E.E.U.U.) Los valores de absorbancia fueron recolectados a 492 nm utilizando un lector de microplacas. Estos resultados se graficaron en función de la concentración de scFv-Fc para determinar la IC50 (concentración necesaria para inhibir el 50% de la actividad antiproliferativa de la citoquina). El ensayo fue reproducido por triplicado.

La concentración de scFv-Fc en los sobrenadantes fue determinada por ELISA específico indirecto. Para esto, la proteína A purificada por afinidad se utilizó como estándar para preparar una curva de diluciones seriadas desde 2,500 ng mL⁻¹ hasta 19.5 ng mL⁻¹.

Para evaluar la neutralización de la actividad biológica de señalización celular de rhIFN- α 2b, se sembraron células reporteras HeLaMx2/eGFP [21] en placas de 96 pocillos (1x10⁴ células por pocillo) y se incubaron por 24 h a 37 °C con CO₂ al 5%. Los sobrenadantes del cultivo celular HeLa fueron

descartados y se prepararon diluciones 1:2 de sobrenadante anti-rhIFN- α 2b que fueron añadidos y pre-incubados por 2 h a 37 °C con igual volumen de rhIFN- α 2b. Las células fueron incubadas por 24 h a 37°C con 5% de CO₂ y luego fueron tripsinizadas, a continuación, fueron suspendidas en 0.2 ml de PBS y finalmente se midió la expresión de eGFP por citometría de flujo. Se detectó la concentración de scFv-Fc en los sobrenadantes por ELISA específico indirecto. Para esto la proteína A scFv-Fc fue utilizada como estándar para preparar una curva de diluciones seriadas desde 5,000 ng mL⁻¹ hasta 39.1 ng mL⁻¹. Las concentraciones de las muestras fueron determinadas por ELISA indirecto. Se realizó citometría de flujo Guava® Easy Cyte™ (Milipore Sigma, Hayward, E.E.U.U.) Este citómetro tiene una láser azul a 488 nm para acceder a las fluorescencias usadas comúnmente, y posee detectores para medir 5 diferentes parámetros (3 canales de fluorescencia y 2 dispersores de luz). Permite la medición simultánea del dispersor lateral (SSC), del dispersor delantero (FSC) y tiene emisión fluorescente verde, amarilla y roja que son colectadas por filtros ópticos 525/30 nm, 583/26 nm y 690/50 nm, respectivamente. Adicionalmente, este equipo puede medir muestras de microplacas de 96 pocillos. La adquisición de datos y el análisis fueron realizados en el programa Guava CytoSoft™ 3.6.1. Para cada muestra se registraron 5,000 eventos y representados en un gráfico FSC en función de SSC. La calibración de flujo y el alineamiento óptico fueron realizados mediante la utilización de fluoroesferas Flow-Check (Guava® Check kit MilliporeSigma, Hayward, USA) antes de cada medición. Las células fueron evaluadas para la señal de eGFP (intensidad de fluorescencia promedio multiplicado por el porcentaje de células positivas para eGFP) que es altamente proporcional a los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm)[22]. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Modelamiento computacional de flujo

La configuración geométrica propuesta de los microcanales se planteó para proveer una velocidad de flujo homogénea óptima a lo largo de la superficie de cultivo celular in cada una de las cuatro cisternas ubicadas en paralelo (Figura 4. 4). El canal de entrada se divide en cuatro microcanales con cisternas después de las cuales los flujos convergen en el canal de salida.

Se utilizó el método de bombeo pasivo del flujo conducido por la gravedad en el sistema de microfluídica abierto, generando un flujo por diferencia de altura de los reservorios[23, 24]. Una estrategia similar ha sido utilizada por Ruiz *et al.* [25] mostrando que es posible cultivar diferentes poblaciones de células del sistema nervioso central primario en un dispositivo de microfluídica multicanal abierto. Con esta configuración ellos pudieron simular las condiciones fisiológicas y observar mejor reproducibilidad de la densidad celular durante la siembra, por eso el número de células pudo ser controlado de forma precisa.

El cálculo de las velocidades de flujo y de tensión de corte (Figura 4. 4 a y b) muestra áreas de flujo reducido (áreas azules) en las cisternas con un ambiente apropiado para el crecimiento celular, permitiendo la generación de una monocapa celular continua (Figura 4. 4 c y d). Aunque se observan bajos perfiles de velocidad en las cisternas comparados con el de los canales (Figura 4. 4 e), De hecho, se ha reportado que un flujo laminar general asegura un transporte de masa difusivo que puede resultar en un microambiente uniforme para el crecimiento celular[23].

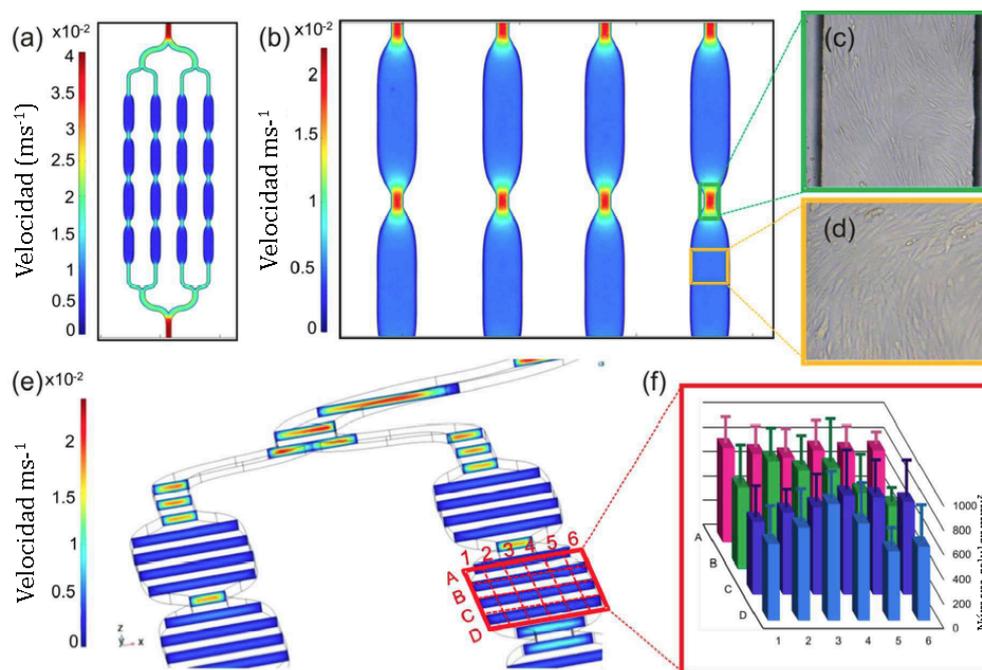


Figura 4. 4 (a,b) Magnitud de la velocidad máxima (m s^{-1}) a $75 \mu\text{m}$ de altura indicada por la simulación 3D (COMSOL 5.2a). Proliferación de las células CHO-K1 en microdispositivos en (c) conector de microcanales y (d) cisternas después de 7 días de incubación. (e) Simulación de la magnitud de velocidad en microcanales 3D y (f) distribución del número celular promedio en los cuadrantes de cuatro cisternas. Las barras de error indican la media del error estándar (MEE).

Para evaluar si las células sembradas crecen homogéneamente distribuidas en las cisternas al día 7, se usó una red imaginaria para separar en cuatro cuadrantes de cisternas, se contó el número de células en cada cuadrante y se determinó el promedio y desviación estándar (Figura 4. 4 e y f). Como se esperaba, los análisis estadísticos que comparan la densidad de células en los cuadrantes de las diferentes cisternas del dispositivo no mostraron diferencia significativa en la distribución celular observada. En contraste, otros estudios donde se utilizaron configuraciones en zig-zag y en forma de dona resultaron en flujo con vórtices y una distribución celular no homogénea[18]. Lo que sugiere que un flujo laminar homogéneo en el

sistema puede contribuir a la distribución de las células sobre la superficie del microcanal.

Se han reportado estudios que muestran que un flujo continuo puede afectar la morfología y estructura celulares de las células adherente, conduciendo a un crecimiento heterogéneo[26]. Para minimizar el estrés sobre las células cultivadas, se reemplazó el flujo continuo por un protocolo de renovación de medio con pulsos en ciclos en intervalos de 24 h. Esto permite un tiempo de residencia suficiente para que los factores liberados por las células lo cual favorece la estabilidad, crecimiento y comunicación célula-célula. Al mismo tiempo, el flujo pulsado provee el requerimiento de nutrientes y remueve los productos metabólicos[26].

4.4.2 Crecimiento celular y producción de anticuerpos monoclonales

Las células adherentes cultivadas sobre superficies de vidrio o plástico usualmente requieren ser tapizadas con moléculas hidrofílicas para promover el entrecruzamiento de la matriz extracelular, que es necesario para la adhesión y expansión celulares[4]. Se demostró que el tapizado con poli-D-lisina favorece la adhesión celular adecuada al piso del dispositivo de microfluídica[9]. Para establecer las condiciones óptimas para el cultivo celular en el dispositivo, se cultivaron células CHO-K1 y se estudio su proliferación a largo plazo mediante análisis de imágenes obtenidas por microscopía en campo claro (Figura 4. 5 a).

Los microdispositivos cubiertos con poli-D-lisina fueron cultivados a con una concentración inicial de células de 2×10^5 células por mililitro. Estas células mostraron una variedad de diámetros comprendidos en el rango de 12.2 a y 22.5 μm después adherirse al piso del dispositivo. Las imágenes indican que las células cambiaron su morfología inicial esférica característica de las células en suspensión que se observó al día 1 a la morfología de propagación desde el día 3 con apariencia de bordes que

sugieren una adherencia fuerte al piso en el arreglo tipo monocapa (Figura 4.5 a).

La morfología celular es una característica importante de las células adherentes y determina el crecimiento celular y su función[27].

Se determinó el número de células por mm^2 en función del tiempo de crecimiento mediante análisis de imágenes (Figura 4.5 a). Se observó un crecimiento lento de las células CHO-K1 en los dispositivos de microfluídica durante las primeras 48 h, esto puede haber ocurrido debido al tiempo de adaptación que requieren las células para adaptarse al nuevo sistema. Desde el día 3 al día 7 se observó una proliferación a escala logarítmica con una tasa de crecimiento de 0.0148 h^{-1} y 46.82 h de tiempo de duplicación ($R^2=0.99$). Después de 7 días de cultivo como cambio de medio diario, las células alcanzaron un porcentaje de confluencia cercano al 100% en las cisternas (Figura 4.5 a). Las células exhibieron un arreglo en monocapa por hasta 21 días de cultivo. Tiempo en el que se observó la formación de grupos de células separadas del sustrato. Desde el día 24 al día 30 el número de células disminuyó, y el día 31 una fracción de células significativa fue lavada y retirada del sistema. Las células que permanecieron en los microcanales presentaron signos de estrés celular ya que exhibieron forma esférica y citoesqueleto desorganizado. Por lo tanto, del día 35 al día 41 el cultivo celular comenzó a cubrir la superficie nuevamente, y a formó una monocapa al día 44.

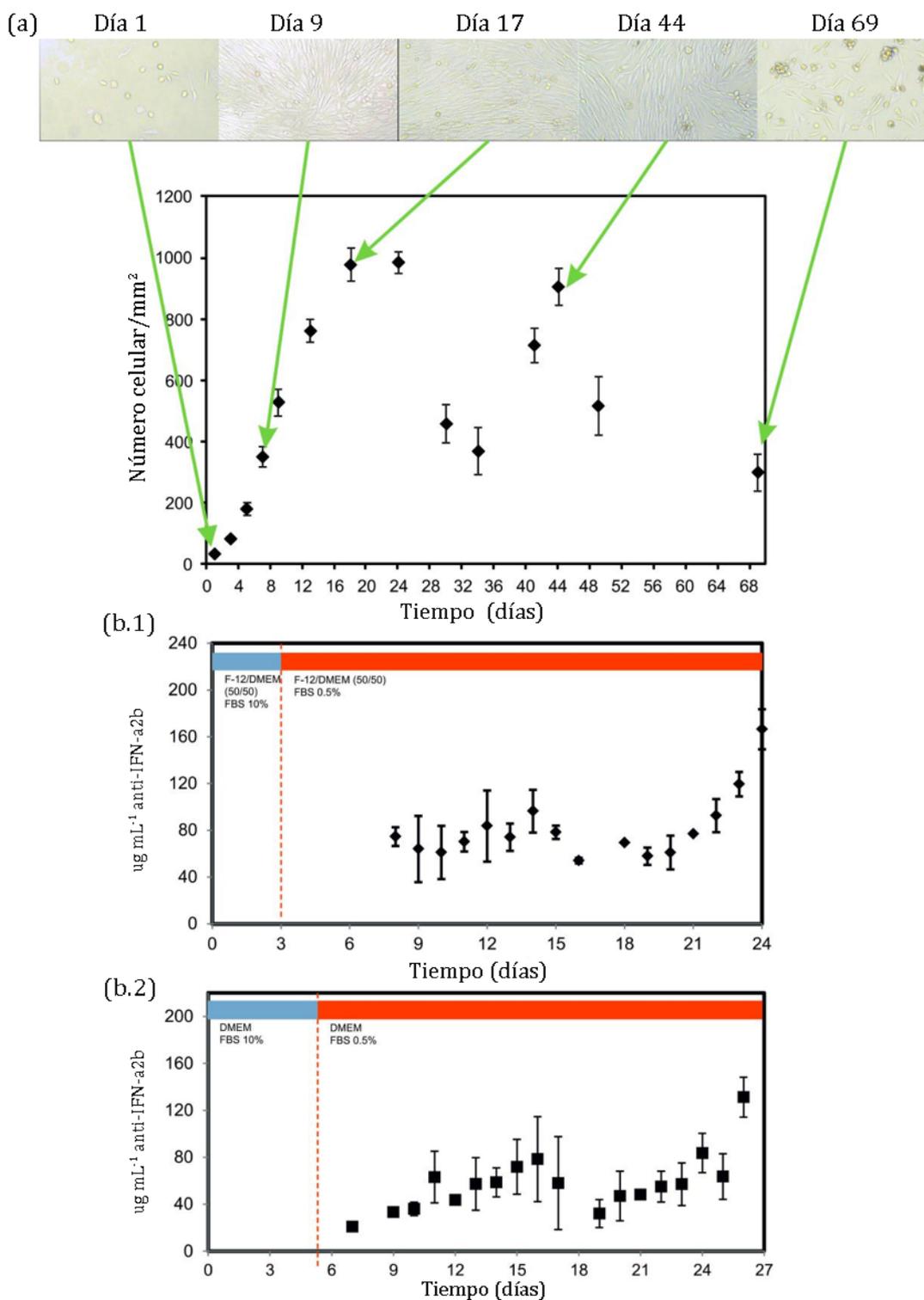


Figura 4. 5 (a) Cambio en la densidad celular de las células CHO-K1 cultivadas durante 69 días en el microdispositivo. En la parte superior se muestran imágenes de microscopía en campo claro (magnificación 10X) de las células CHO-K1 adheridas a los microcanales en forma de cisternas. (b) Concentración promedio del nivel de MAb anti-hIFN- α 2b recolectado en

ciclos de 24 horas de renovación de medio de cultivo de las líneas celulares cultivadas en los microdispositivos (b.1) CHO-ahIFN- α 2b y (b.2) HEK-ahIFN- α 2b. Las barras de error indican las determinaciones de las MEE de tres experimentos independientes.

Al día 49, se observaron signos de estrés y pérdida de adherencia a la superficie, mientras que al día 69 que fue el día de finalización, se evidenciaron pocas células adheridas, distribuidas y crecidas que mostraron las características de células viable, incluyendo extensión orientada a la superficie, cuerpo celular elongado y adherencia al sustrato[28] Figura 4. 5 a. Estos resultados demuestran que el microdispositivo provee un microambiente adecuado para el cultivo celular y la proliferación. Adicionalmente, el sistema es apropiado para sostener ciclos sucesivos de cultivo celular por un período prolongado sin la necesidad de nueva inoculación, lo cual permite tener un cultivo continuo del mismo inóculo sin la necesidad de variar el pasaje. En contraste, los estudios previos de cultivo celular en microdispositivos lograron únicamente 5 días de cultivo[18].

Después de establecer que las células CHO-K1 pueden ser cultivados en dispositivos de microfluídica, se evaluaron los cultivos de dos líneas celulares que expresan un anticuerpo quimérico anti-hIFN- α 2b, lo cual implica una aplicación potencial para la terapia de enfermedades autoinmunes[17]. Las líneas celulares CHO-ahIFN- α 2b y HEK-ahIFN- α 2b fueron cultivadas en dispositivos de microfluídica por triplicado, bajo las mismas condiciones previamente evaluadas. Ambas líneas celulares fueron cultivadas en el medio de cultivo por 3 y 5 días, hasta que lleguen casi al 100% de confluencia. Luego el medio de cultivo se reemplazo por el medio de cultivo para producción, y se recolectaron muestras del canal de salida para determinar la concentración de anticuerpos funcionales por ELISA específico indirecto. Además, se realizó un análisis de western blot para identificar el Mab en las muestras del dispositivo y compararlo con el MAb

producido por los métodos estándares. La Figura 4. 5 b muestra la producción diaria de anti-hIFN- α 2b por las células CHO-ahIFN- α 2b (Figura 4. 5 b.1) y las células HEK-ahIFN- α 2b (Figura 4. 5 b.2) durante 24 días. En los primeros dos días la concentración secretada de anticuerpo aumentó a aproximadamente $6.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ para CHO-ahIFN- α 2b y $3.33 \mu\text{g mL}^{-1}$ para las células HEK- ahIFN- α 2b, en este tiempo ambas líneas celulares alcanzaron una fase estacionaria en la expresión del anticuerpo. Subsecuentemente, la producción incrementó nuevamente desde el día 19 hasta el final del cultivo. Durante la fase de producción del cultivo, se observó un aumento en las señales de estrés en la morfología celular, lo cual es esperado debido a la reducción de la concentración de FBS en el medio de producción. Esto puede afectar el crecimiento celular y la proliferación especialmente cuando el metabolismo celular está basado principalmente en la producción del anticuerpo.

Este estudio demostró que la concentración promedio de MAb producido por CHO-ahIFN- α 2b fue superior a la producida por HEK-ahIFN- α 2b y el máximo valor de $166.4 \mu\text{g mL}^{-1}$ fue alcanzado por CHO-ahIFN- α 2b en el último día de cultivo (día 24) (Figura 4. 5 b.1 y b.2). Es importante notar que los cultivos en botellas mostraron una expresión significativamente alta de Mab producido por las células CHO comparada con la correspondiente a las células HEK[17].

Garza- García *et al.*[18] reportó que la concentración más alta de MAb producida en el dispositivo se llevó a cabo en el configuración de cámaras en serie en forma de dona y fue $7.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ con tiempos de residencia menores que un minuto de flujo constante, siendo estas tasas de producción de 3 órdenes de magnitud superior que aquellos observados en tanques bioreactores que utilizan células en suspensión. En comparación al sistema utilizado en este estudio, se alcanzó una concentración máxima 23 veces mayor que la reportado por Garza-García *et al.* [18], con valores promedio reportados en la Tabla 4. 1 entre 11 y 7 veces superiores a los reportados

por estos autores.

Tabla 4. 1 Producción promedio de MAb, productividad de Mab, productividad de Mab por día de las líneas celulares CHO-ahIFN- α 2b y HEK-ahIFN- α 2b en microdispositivos y en botellas de cultivo.

Línea Celular	Producción promedio de MAb				Productividad de Mab		Productividad de Mab por día		
	MD (ugml ⁻¹)	BC (ugml ⁻¹)	Relación (MC/BC)	MC (pg células ⁻¹)	BC (pg células ⁻¹)	Relación (MC/BC)	MC (pg células ⁻¹ Día ⁻¹)	BC (pg células ⁻¹ Día ⁻¹)	Relación (MC/BC)
1	81.22	59.46	1.36	1120.28	118.92	9.4	70.02	11.89	5.89
2	54.2	32.72	1.70	754.76	64.54	11.7	47.17	6.45	7.31

MC= microdispositivo

BC= botella de cultivo

1= CHO-ahIFN- α 2b

2= HEK-ahIFN- α 2b

La producción promedio de anti-hIFN- α 2b observada en los microdispositivos en ambas líneas celulares fue superior a la obtenida en las botellas de cultivo sembradas en paralelo, con valores 1.36 y 1.70 veces más altas en CHO-ahIFN- α 2b y HEK-ahIFN- α 2b, respectivamente Tabla 4. 1. Además, la productividad total en picogramos de anti-hIFN- α 2b por célula y la productividad por día determinada en los microdispositivos sembrados con ambas líneas celulares fue mayor comparada con la obtenida en botellas de cultivo sembradas en paralelo, con valores de 5.89 y 7.31 veces más altas en CHO-ahIFN- α 2b y HEK-ahIFN- α 2b, respectivamente. Estos resultados sugieren que existen ventajas en el cultivo de células adherentes en los microdispositivos. Se evidencia un incremento en el rendimiento del producto por períodos más largos de tiempo comparado con cultivos en condiciones a mayor escala.

La ventaja de producir MAb con células adherentes en microdispositivos

puede ser explicada porque estos dispositivos exhiben una relación superficie/volumen superior, muchas veces más alta que las placas de cultivo estándares [29]. Consecuentemente, conducen a una dosificación de nutrientes más eficiente y se evita la dilución de las moléculas secretadas. Los volúmenes de medio en nanolitros y la reducida relación de volumen célula-célula son los factores que caracterizan tanto a los microcanales de los dispositivos como a los micronichos *in vivo*[6]. Una de las preocupaciones en cuanto a los microdispositivos es la estabilidad y la robustez del sistema de cultivo en períodos extensos de operación para producción de biofármacos a escala piloto o comercial[18]. Un reporte previo en la producción de MAb e microdispositivos mostró un tiempo máximo de cultivo de 5 días[18]. En contraste, este estudio demostró que el cultivo celular en el microdispositivo puede llevarse a cabo por 69 días en dos líneas celulares diferentes que expresan un Mab terapéutico nuevo pueden ser cultivadas al menos por 24-días alcanzando concentraciones significativamente mejores que en condiciones de cultivo estándar. Estos resultados apoyan la factibilidad de operación continua del sistema a largo plazo y por lo tanto su potencial uso en la producción a escala piloto.

4.4.3 Evaluación de los atributos de calidad del MAb

Una preocupación importante para adoptar un sistema innovador para la producción de bioterapéuticos es si el proceso puede replicar las propiedades biológicas de la molécula de referencia. Para evaluar este aspecto, se realizaron pruebas de los atributos de calidad, específicamente de la habilidad del MAb para neutralizar la actividad antiproliferativa o la inhibición de la señalización por la acción de la molécula producida en los microdispositivos comparadas con la molécula producida por las mismas líneas celulares usando el método de cultivo en botellas.

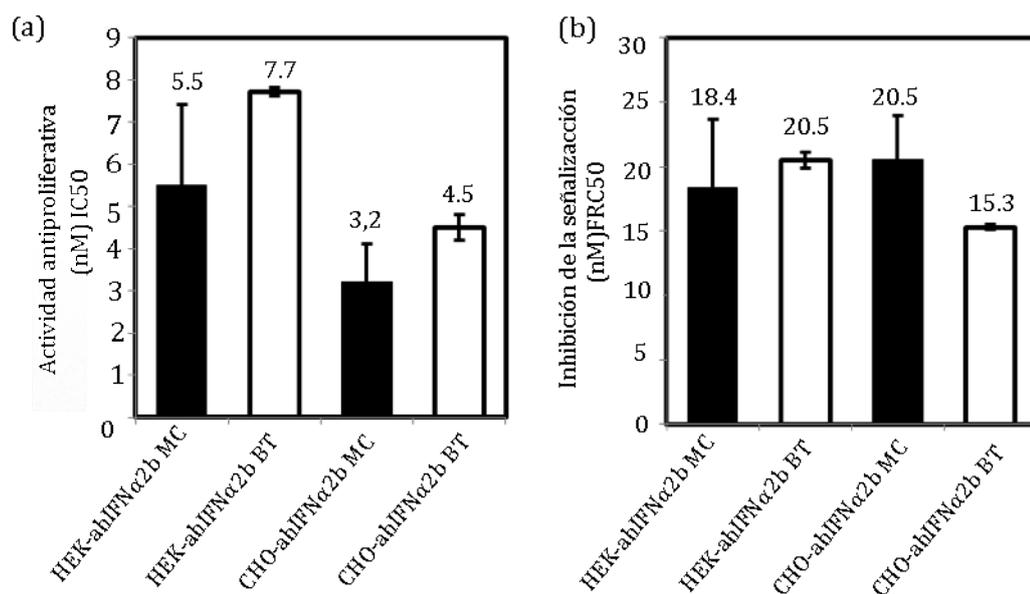


Figura 4. 6 Evaluación de la calidad de los atributos del MAb producido tanto en el microdispositivo como en las botellas de cultivo. (a) Medición de la inhibición de la actividad antiproliferativa como concentración necesaria de MAb para reducir el 50% de la potencia máxima de la citoquina (IC₅₀) mediante la utilización de células Daudi. (b) Medición de la inhibición de la señalización determinada como concentración necesaria para reducir 50% de la fluorescencia (FRC₅₀) mediante el uso de células HeLaMx2/eGFP. MC: Producción en microdispositivo. La barra de error representa SEM.

La Figura 4. 6 a muestra un gráfico de barras que representa la concentración de anticuerpo necesaria para inhibir el 50% de la actividad antiproliferativa de la citoquina (IC₅₀) cuando las células Daudi fueron incubadas con el anticuerpo producido por HEK-ahIFN α 2b y CHO-ahIFN α 2b utilizando el microdispositivo (MC) o el método de cultivo celular adherente. La IC₅₀ de los anticuerpos producidos en los microchips no fue significativamente diferente ($p < 0.05$) al IC₅₀ de los anticuerpos producidos en las botellas de cultivo según lo determinado por un ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

Además, el atributo del MAb para neutralizar la señalización hIFN se determinó mediante análisis de fluorescencia utilizando células reporteras cuya expresión de eGFP está mediada por el hIFN- α 2b inducible Promotor Mx. La Figura 4. 6 b muestra un gráfico de barras de inhibición de señalización correspondiente a la concentración necesaria para reducir el 50% de la fluorescencia (FRC50) medida por citometría de flujo del anticuerpo producido por HEK-ahIFN α 2b y CHO-ahIFN α 2b utilizando las botellas de cultivo o los microdispositivos. Como en el experimento anterior, el FRC50 de los anticuerpos producidos por ambas líneas celulares usando ambos procedimientos no exhibieron diferencias significativas ($p < 0.05$, Prueba de Tukey). Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se evalúan los atributos de calidad bioterapéutica de anticuerpos monoclonales producidos en dispositivos microfluídicos y se prueban en paralelo con los generados por cultivos celulares adherentes en botellas de cultivo. Los resultados sugieren que la producción en dispositivos microfluídicos no altera significativamente la función biológica de los anticuerpos en términos de su capacidad de unión y neutralización de la citoquina, en comparación con los producidos con células adherentes en medios de cultivo tradicionales.

4.5 Conclusiones

Este estudio representó una prueba de concepto para un dispositivo microfluídico con diseño de cisternas secuenciales para un cultivo de células de mamífero adherentes con un intercambio periódico de medio para expresar proteínas recombinante. La simulación computacional de la velocidad del flujo en los microcanales del dispositivo diseñado mostró una distribución uniforme del fluido. Además, la cuantificación de las células CHO-K1 en los diferentes dominios del dispositivo permitió observar una distribución celular homogénea, evidenciando condiciones óptimas para la adhesión y crecimiento celular. Las células podrían cultivarse en el dispositivo por más de dos meses. Células adherentes; CHO-ahIFN α 2b y

HEK-ahIFN α 2b, que expresan un anti-hIFN- α 2b MAb como candidato terapéutico. Fueron cultivados en los dispositivos microfluídicos, logrando productividades 5.89 y 7.31, respectivamente, más que los obtenidos en condiciones *in vitro* en botellas de cultivo de cultivos celulares adherentes. Por otra parte, la calidad de los atributos del MAb producido en los microchips no mostraron diferencias significativas en comparación con el anticuerpo producido con métodos de mayor escala, lo que sugiere que el sistema es adecuado y puede ser ventajoso para el desarrollo de MAb destinado a uso terapéutico.

4.6 Referencias

1. Garza-García, L.D., et al., *A biopharmaceutical plant on a chip: continuous micro-devices for the production of monoclonal antibodies*. Lab on a Chip, 2013. **13**(7): p. 1243-1246.
2. Mozdierz, N.J., et al., *A perfusion-capable microfluidic bioreactor for assessing microbial heterologous protein production*. Lab on a Chip, 2015. **15**(14): p. 2918-2922.
3. Ladner, T., et al., *15 - Application of Mini- and Micro-Bioreactors for Microbial Bioprocesses*, in *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, C. Larroche, et al., Editors. 2017, Elsevier. p. 433-461.
4. Barbulovic-Nad I, A.S., Wheeler AR., *A microfluidic platform for complete mammalian cell culture*. Lab on a Chip, 2010. **10**(12): p. 1536-42.
5. Abaci HE, D.R., Smith Q, Gerech S, Drazer G., *Design and development of microbioreactors for long-term cell culture in controlled oxygen microenvironments*. Biomedical Microdevices, 2012. **14**(1): p. 145-52.
6. Ziółkowska, K., R. Kwapiszewski, and Z. Brzózka, *Microfluidic devices as tools for mimicking the in vivo environment*. New Journal of Chemistry, 2011. **35**(5): p. 979-990.
7. Ziolkowska, K., et al., *PDMS/glass microfluidic cell culture system for cytotoxicity tests and cells passage*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2010. **145**(1): p. 533-542.
8. Menon NV, C.Y., Phey S, Zhang Y, Wu Y, Chan V, Kang Y., *Microfluidic Assay To Study the Combinatorial Impact of Substrate Properties on Mesenchymal Stem Cell Migration*. ACS Appl Mater Interfaces, 2015. **7**(31): p. 17095-103.
9. Peñaherrera, A., et al., *Evaluation of cell culture in microfluidic chips for application in monoclonal antibody production*. Microelectronic Engineering, 2016. **158**: p. 126-129.
10. Jang, M., Y.J. Kwon, and N.Y. Lee, *Non-photolithographic plastic-mold-based fabrication of cylindrical and multi-tiered poly(dimethylsiloxane)*

- microchannels for biomimetic lab-on-a-chip applications*. RSC Advances, 2015. **5**(122): p. 100905-100911.
11. Haswell, S.J., et al., *The application of micro reactors to synthetic chemistry*. Chemical Communications, 2001(5): p. 391-398.
 12. Group, I. *IMARC report, SKU IMRC4880703*. 2012.
 13. Shukla, A.A. and J. Thömmes, *Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins*. Trends in Biotechnology, 2010. **28**(5): p. 253-261.
 14. Ecker, D.M., S.D. Jones, and H.L. Levine, *The therapeutic monoclonal antibody market*. mAbs, 2015. **7**(1): p. 9-14.
 15. Kirou, K.A. and E. Gkrouzman, *Anti-interferon alpha treatment in SLE*. Clinical Immunology, 2013. **148**(3): p. 303-312.
 16. Niewold TB, H.J., Lehman TJ, Harley JB, Crow MK., *High serum IFN-alpha activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus*. Genes & Immunity, 2007. **8**(6): p. 492-502.
 17. Attallah C, E.M., Kratje R, Oggero M., *A highly efficient modified human serum albumin signal peptide to secrete proteins in cells derived from different mammalian species*. Protein Expression and Purification, 2017. **132**: p. 27-33.
 18. Garza-Garcia, L.D., et al., *Continuous flow micro-bioreactors for the production of biopharmaceuticals: the effect of geometry, surface texture, and flow rate*. Lab on a Chip, 2014. **14**(7): p. 1320-1329.
 19. Depetris M., C., P., Kratje, R., Etcheverrigaray, M. and Oggero M., *A scFv antibody fragment as a therapeutic candidate to neutralize a broad diversity of human IFN-alpha subtypes*. Journal of Immunological Methods, 2008. **334**(1-2): p. 104-13.
 20. Nederman, T., Karlström E., Sjödin L., *An in vitro bioassay for quantitation of human interferons by measurements of antiproliferative activity on a continuous human lymphoma cell line*. Biologicals, 1990. **18**(1).
 21. Bürgi, M., et al., *New reporter cell clones to determine the biological activity of human type I interferons*. BMC proceedings, 2011. **5 Suppl 8**(Suppl 8): p. P4-P4.

22. Paillusson, A., et al., *A GFP-based reporter system to monitor nonsense-mediated mRNA decay*. Nucleic Acids Research, 2005. **33**(6): p. e54-e54.
23. Huang, M., Fan, S., Xing, W., Liu, C. , *Microfluidic cell culture system studies and computational fluid dynamics*. Mathematical and Computer Modelling, 2010. **52**: p. 2036-2042.
24. Shemesh, J., et al., *Flow-induced stress on adherent cells in microfluidic devices*. Lab on a Chip, 2015. **15**(21): p. 4114-4127.
25. Ruiz, A., et al., *Testing A β toxicity on primary CNS cultures using drug-screening microfluidic chips*. Lab on a Chip, 2014. **14**(15): p. 2860-2866.
26. Azuaje-Hualde, E.G.-H., M.; Etxebarria-Elezgarai, J.; De Pancorbo, M.M.; Benito-Lopez, F.; Basabe-Desmonts, L. , *Microtechnologies for Cell Microenvironment Control and Monitoring*. Micromachines, 2017. **8**: p. 166.
27. Jaccard, N., et al., *Automated method for the rapid and precise estimation of adherent cell culture characteristics from phase contrast microscopy images*. Biotechnology and Bioengineering, 2014. **111**(3): p. 504-517.
28. Zhu B, L.Q., Yin J, Hu J, Wang Z., *Effects of laser-modified polystyrene substrate on CHO cell growth and alignment*. Journal of Biomedical Materials Research, 2004. **70**(1): p. 43-8.
29. Bourguignon, N., Attallah, C., Karp, P., Booth, R., Peñaherrera, A., Payés, C., Pérez, M., Helguera, G., Lerner, B., *Production of monoclonal antibodies in microfluidic devices*. Integrative Biology, 2018. **10**(3): p. 136-144.

Capítulo 5

Ensayos de recuperación asistida de petróleo en dispositivos de microfluídica

5.1 Introducción

La habilidad de reducir la cantidad de petróleo remanente en un pozo específico ha llegado a ser significativo ya que las fuentes de petróleo a nivel mundial disminuyen. Los métodos para recuperar petróleo serán de objeto de estudio por parte de los investigadores científicos a largo plazo[1]. Existen tres etapas para la recuperación de petróleo: primaria, secundaria y terciaria que corresponde a la recuperación asistida de petróleo. Entre el 50 y el 70% del petróleo original permanece en el campo de petróleo después de que las técnicas de recuperaciones primaria y secundaria han sido aplicadas[2]. Consecuentemente, se necesita extraer el petróleo atrapado en el reservorio. Las técnicas usadas van desde métodos que emplean inundación secundaria hasta métodos asistidos. En la recuperación mejorada el objetivo es aumentar la eficiencia de barrido de petróleo, mientras que en la recuperación terciaria la meta es inmovilizar y recuperar el petróleo residual atrapado por capilaridad[1]. La recuperación terciaria abarca varios enfoques químicos, térmicos y el uso de gas. Adicionalmente, una combinación de las dos últimas ha sido propuesto recientemente el drenaje gravitacional asistido por fluido térmico[3].

Los métodos de recuperación mejorada se centran en movilizar el petróleo que está atrapado localmente a causa de las fuerzas capilares, mediante la inundación con agua[4]. En la última etapa de esta inundación, la eficiencia del desplazamiento disminuye debido a las características geológicas del reservorio. La diferencia de viscosidad entre el petróleo y el agua inyectada conduce a la digitación viscosa en dirección al pozo productor[5]. Una solución de poliacrilamida parcialmente hidrolizada es utilizada para empujar el fluido en los pozos de inyección para barrer el petróleo desde el reservorio hacia el pozo productor[6]. Otros enfoques para mejorar la recuperación asistida es disminuir la relación de movilidades.

$$M = \frac{\frac{k_{rD}}{\mu_D}}{\frac{K_{rd}}{\mu_d}}$$

Ecuación 5. 1 Relación de movilidades.

Donde k_{rD} y μ_D son permeabilidades relativas y viscosidad de desplazamiento de fase, respectivamente y k_{rd} y μ_d representan la fase desplazada[7]. La relación de movilidades menor a 1 indica un desplazamiento positivo. Las espumas han sido utilizadas para disminuir la relación de movilidades ya que la espuma disminuye la movilidad al reducir la permeabilidad relativa del gas y también al incrementar la viscosidad efectiva μ_D [7, 8].

La inundación con polímeros y dispersiones coloidales de geles (CDG) han sido propuestos ya que incrementan la eficiencia de barrido. Las CDG están definidas como soluciones acuosas de polímero cuya concentración están comprendida en el rango de 100 a 1200 ppm. La relación entre el prepolímero y su agente entrecruzante es 20:1 o de 100:1[9]. Reciben el nombre de CDG también por la naturaleza de la solución ya que son suspensiones de aglomerados d moléculas de polímero entrecruzado o coloides. Una solución separada de aglomerados donde la mezcla esté compuesta por reacciones de forma predominante intramolecular y de forma mínima intermolecular. En contraste, los geles están formados por mecanismos de entrecruzamiento de una red intermolecular continua de moléculas de polímero[10]. Las CDG son usadas como un agente para barrido mejorado en los procesos de EOR para desplazar el petróleo donde la relación de movilidades no es favorable[10, 11].

El reto principal con los métodos químico es que cada posible variable relacionada con el fluido y las propiedades del sustrato pueden cambiar de un reservorio a otro. Por lo tanto, la química debe ser diseñada para cada

reservorio y las propiedades del petróleo también varían. Además los enfoques químicos enfrentan otros retos como su alto costo, dependiendo del precio fluctuante precio del petróleo[2].

El mecanismo a través del cual se evalúa un método particular de EOR depende en la disminución la saturación residual de petróleo y precisamente de cómo ese petróleo residual está atrapado a escala de los poros. El modelamiento d la red poral ha sido propuesto para alcanzar este objetivo. Los micromodelos de dispositivos de microfluídica con paredes transparentes han habilitado la visualización de fluidos dentro de estructuras de redes porales producidas mediante técnicas de microfabricación como el tallado químico. Los experimentos de flujo mediante la aplicación de micromodelos han sido considerados un método experimental directo y poderoso para caracterizar los mecanismos de flujo multifásico, alteración de mojabilidades y el desempeño de la recuperación de petróleo a escala poral[3, 4, 12, 13].

Las mediciones *in situ* no son prácticas por lo que los experimentos usan muestras provenientes del campo y compuestos similares al petróleo para evaluar la habilidad de los fluidos para penetrar y desplazar el petróleo de sitios donde está embebido que es el sitio donde el agente que desplaza moja el sustrato por mojabilidad natural o por procesos de modificación. Este método no representa un modelo para analizar el proceso de a nivel poral y capilar[2]. En contraste, los micromodelos han sido utilizados para investigar aspectos específicos relacionados con flujo en medios porosos[14], presión capilar[15] y tensión interfacial[16]. Kamari y colaboradores[17] aplicaron micromodelos de vidrio para obtener mediciones en medios porosos fracturados y no fracturados[17]. También se han propuesto modelos en 3D para compara el drenaje gravitacional asistido por vapor con el drenaje asistido por fluido térmico[3].

Los microdispositivos ofrecen una alternativa para simular las propiedades físicas y químicas de la arenisca. Nilsson y colaboradores[2] estudiaron el

impacto de las diferentes propiedades reológicas de los fluidos aplicados a microdispositivos diseñados para reproducir de forma precisa una sección de arenisca en dos dimensiones.

La microfluídica ofrece una alternativa para simular propiedades físicas y químicas de la arenisca. La microfluídica ha sido definida como el estudio y la manipulación de fluidos en estructuras de escala micrométrica[18]. Ha sido utilizada en muchas aplicaciones y el interés por parte de la industria petrolera está en aumento. Los dispositivos laboratorio en un chip (LOC) buscan integrar el trabajo de laboratorio en esta plataforma[19]. Dispositivos de polidimetilsiloxano (PDMS) han sido aplicados al análisis de mecanismos de desplazamiento de petróleo y movilidad de espumas. El PDMS permite diseñar un sistema que simula las zonas de alta y baja permeabilidad en la dirección de la inyección[7].

En este capítulo se detalla la aplicación de microfluídica para representar el desplazamiento del petróleo a través del empuje del agua como línea base para la recuperación de petróleo en concordancia con el tercer objetivo específico planteado en este trabajo de tesis.

La inundación con polímeros y geles se ha llevado a cabo en microcanales con geometría que refleja la porosidad de los reservorios con el objetivo de encontrar una configuración de microcanales que atrape entre 30 y 80% de petróleo después de su inyección. Los micromodeos con diferentes arquitecturas han sido utilizados para realizar inyecciones de fluidos y para extender el entendimiento del desplazamiento de petróleo a través de la inundación con agua, polímero y geles para evaluar su comportamiento al ser expuestos a las presiones de entrada de los capilares formados en los microcanales de la matriz.

5.2 Metodología

5.2.1 Diseño y fabricación del dispositivo de microfluídica

Se diseñaron tres dispositivos de microfluídica mediante el programa Layout editor (<http://www.layouteditor.net>). El primer dispositivo “E”, está provisto de tres permeabilidades y zonas porosas (baja, media y alta) donde la arquitectura comprende tres diferentes tamaños de octágonos regulares con separaciones repetitivas entre ellas para generar las distintas permeabilidades. La zona de alta permeabilidad consiste en 28 estructuras de 2 mm, con un área de 235 mm². La zona de permeabilidad media está constituida por 55 estructuras de 1 mm con un área total de 218 mm². Las zonas de permeabilidad baja contienen 109 estructuras de 0.5 mm con un área total de 100 mm² como e ilustra en la Figura 5. 1A.

El segundo dispositivo “AD0” ha sido dividido en dos zonas con dos tipos de octágonos para crear zonas con permeabilidad diferente. El área total del dispositivo es 85 mm², posee 714 estructuras, 680 de 0.25 mm² y 34 de 1mm² como se describe en la Figura 5. 1B. Los fluidos ocupan únicamente el área calculada. Finalmente, el dispositivo “AB0” está constituido por dos zonas diferentes con cuadrados de dos tamaños diferentes con separaciones constantes entre ellas para producir dos tipos de permeabilidades y porosidades en el dispositivo. Está compuesta por 275 estructuras con un área total de 85 mm², 75 de 0,25 mm² y 200 de 1 mm² como se describe en la Figura 5. 1C. La Tabla 5. 1 detalla las características de los diseños de los micromodelos utilizados.

Tabla 5. 1 Resumen de las características de los micromodelos.

CHIP	PERMEABILIDAD	POROSIDAD %	VOLUMEN PORAL (μ l)	ALTURA (μ m)	CARACTERÍSTICAS
"E"	Alta	76	\approx 180	180	3 permeabilidades
	Media	65	\approx 140		
	Baja	46	\approx 5		
"AD0" Octágonos	Alta	61	\approx 50	180	2 permeabilidades
"AB0" Cuadrados	Heterogénea	59	\approx 54	180	2 permeabilidades

Los microdispositivos fueron fabricados en polidimetilsiloxano a partir de un molde maestro. El PDMS replica las estructuras del molde maestro con alta fidelidad (décimas de nanómetros)[20]. Los diseños deseados son moldeados en alto relieve por fotolitografía en una oblea a silicio de 700 μ m de espesor (Virginia Semiconductor, Inc.), con la resina negativa SU-8 (MiroChem). El sustrato de silicona fue limpiado por sonicación con acetona e isopropil alcohol. Además, la superficie del sustrato fue deshidratada por 10 minutos a 200 °C. Después, la resina SU-8 fue dispersada sobre el sustrato y se realizaron ciclos de giro para distribuir uniformemente la resina. El plato giratorio fu acelerado durante 5 segundos a 100 rpm s⁻¹ hasta 500 rpm y mantenida a 500 rpm por 5 s. Durante el ciclo de giro se aplicó una rampa de 300 rpm s⁻¹ hasta 2000 rpm, y se mantuvo por 30 s. La resina fue incubada a 65 °C (soft baked) durante 20 minutos, y por segunda vez a 95 °C durante 50 minutos. El sustrato se alineó con la máscara y la resina fue expuesta a luz UV 650 mJ. El siguiente paso después de la exposición consiste en incubar a 65 °C durante 12 minutos, luego a 95°C por 15 min. Finalmente, la resina se revela durante 15 min en agitación. La fabricación del molde maestro de SU-8 sobre la oblea de silicio se realizó en el cuarto limpio del INTI. La fabricación del dispositivo de PDMS fue detallada en la sección de metodología del capítulo 2.

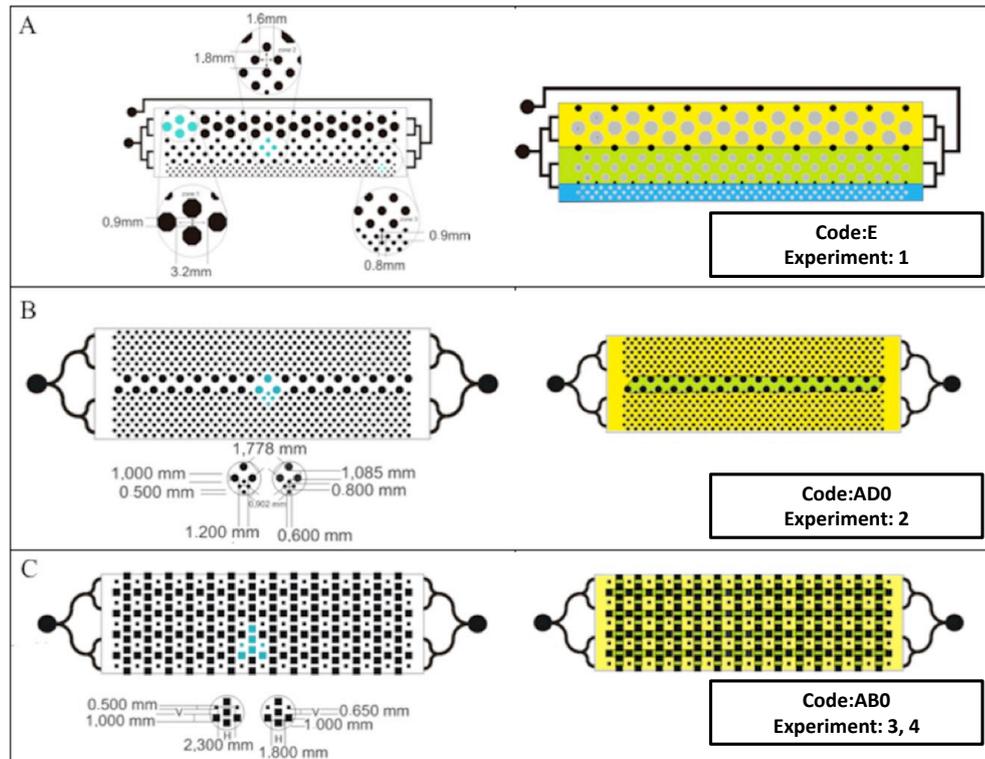


Figura 5. 1 Arquitectura de los micromodelos. A) chip “E” donde la zona de más baja permeabilidad se muestra en celeste, permeabilidad intermedia, en verde y la permeabilidad alta en amarillo. B) chip “AD0” donde la permeabilidad alta se exhibe en verde, mientras la baja permeabilidad, en amarillo. C) chip “AB0” donde la zona de baja permeabilidad se indica en color verde, mientras que la alta permeabilidad, en amarillo. Las imágenes no están a escala.

Se realizaron cuatro experimentos en los que se diseñaron tres dispositivos y se utilizaron diferentes fluidos para recuperación. Los experimentos de EOR se desarrollaron a temperatura ambiente. Entre los fluidos utilizados están los siguientes:

Poliacrilamida hidrolizada parcialmente (HPAM) que se utilizó en el experimento 1. CDG con entrecruzador 20:1 se aplicó en el experimento 2. CDG sin entrecruzador se empleó en los experimentos 3 y 4. Se utilizó agua ultrapura en todos los experimentos.

5.2.2 Análisis digital de imágenes

Se tiñó el agua con el reactivo acid blue 22 (C.I. 42755). Las propiedades fisicoquímicas del aceite utilizado son 4.43 cP y 0.8105 gcm⁻³ a temperatura ambiente. Las imágenes de la distribución del aceite remanente adquiridas después de la inyección de agua, polímero y CDG ocuparon la totalidad de la zona porosa. La saturación residual de aceite y el volumen poral fueron determinados a través de procesamiento y análisis de imágenes provenientes de la grabación en video. Cada píxel se consideró un volumen de fluido en una sola fase. Las cámaras utilizadas fueron Guppy PROF-125B/C cuya resolución corresponde a 1.2 MP con lente Nikon de 28 mm y Coolsnap CF 12 bits. El análisis de imágenes se realizó mediante el software FIJI.

5.3 Resultados

Cada experimento comprendió tres etapas A, B y C como se describe en la Figura 5. 2. Cada etapa corresponde a un fluido inyectado diferente a distinto flujo. Las condiciones se muestran en la Tabla 5. 2.

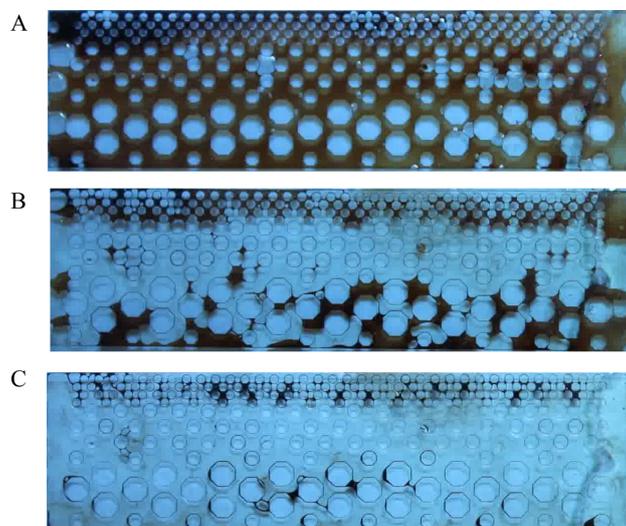


Figura 5. 2 Secuencia de imágenes de las etapas A, B y C del experimento con el chip "E".

Tabla 5. 2 Caudales utilizados para cada fluido en cada experimento.

FLUIDO	CHIP E (EXP 1) (mL.min ⁻¹)	CHIP ADO (EXP 2) (mL.min ⁻¹)	CHIP ABO (EXP 3) (mL.min ⁻¹)	CHIP ABO (EXP 4) (mL.min ⁻¹)
Etanol	-	-	-	0.5
Agua	-	5	0.5	3
Aceite	3.6	5	3	3
Agua	5	5	3	3
Fluido	3.6	5	5	5

1 Polímero

2 Mezcla CDG con entrecruzador

3 Mezcla CDG sin entrecruzador

4 Mezcla CDG sin entrecruzador

1-4 (Número de experimento)

Durante la inundación con agua de un reservorio, el agua avanza a través de medio poroso en un frente relativamente plano [21]. A pesar de un frente de agua uniforme en la macroescala, una fracción considerable de aceite está atrapado a causa de los mecanismos de entrapamiento a microescala [22]. La Figura 5. 3 muestra los resultados obtenidos del experimento realizado con el chip E. Las imágenes fueron analizadas con el software procesador de imágenes Image J para determinar las áreas ocupadas por cada fase. De esta forma se obtiene la saturación de la red poral. La etapa A muestra la inyección de agua (1.8 PV) que disminuye la saturación residual de petróleo a 32% mientras que la etapa B ilustra la inyección de polímero (0.7 PV) que reduce la saturación residual de petróleo a 5.4% aproximadamente. En el caso de la inyección de agua presentado en la etapa B de la Figura 5. 2 la fase acuosa atraviesa la zona de permeabilidad intermedia, forma un recorrido preferencial y muestra la baja eficiencia macroscópica de barrido. Con respecto al caso de la inyección de polímero (etapa B de la Figura 5. 2), se observa una mayor eficiencia de barrido. Consecuentemente, el flujo preferencial de la fase acuosa puede ser eliminado mediante la inyección

con polímero. En la zona de barrido de la inyección con polímero, la saturación residual de petróleo es baja, y los glóbulos de aceite tienden a ocupar las gargantas porales en lugar de los cuerpos porales. Se observaron algunos glóbulos de agua desprendidos y ganglios de aceite. Los glóbulos de agua desconectados tienen un tamaño pequeño y ocupan la garganta delgada. Mientras que los ganglios aislados de aceite tienen varios tamaños. Estos ganglios están desconectados y por eso son inmovilizados por glóbulos acuosos que ocupan las gargantas que pueden resultar de eventos de desprendimiento. Una vez que son atrapados por la fase acuosa que ocupa las gargantas, es complicado movilizar nuevamente los ganglios de aceite debido a que la fuerza que se necesita supera la presión capilar de entrada de la garganta.

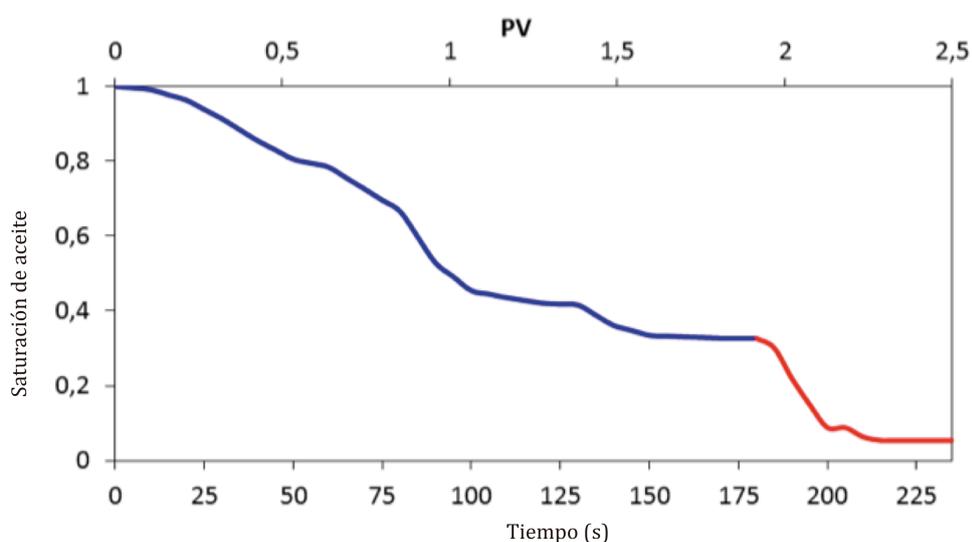


Figura 5. 3 Saturación residual de aceite en función de (eje X superior), volúmenes porales de los fluidos inyectados y (eje X inferior) en función del tiempo. Línea azul: etapa A y línea roja: etapa B. La etapa A corresponde a la inyección de agua (1.8 PV) que reduce la saturación residual de aceite a 32% mientras que la etapa B describe la inyección de polímero (0.7 PV) que disminuye la saturación residual de aceite a 5.4%.

El experimento 2 permitió la observación de la digitación viscosa en la que se desplaza de forma inestable el aceite. Este experimento fue realizado con el chip AD0 y se describe en la Figura 5. 4 que presenta las etapas A y B, que corresponden a la inyección de agua (3.3 PV) y la mezcla de CDG con entrecruzador (0.67 PV), respectivamente. La inundación con agua redujo la saturación residual de petróleo a 32.1% mientras que la mezcla CDG con entrecruzador disminuyó la saturación residual de aceite a 22.9%. Las propiedades de la mezcla CDG con su entrecruzador son particularmente útiles en formaciones heterogéneas, donde los poros resultan en un frente de inundación irregular y un barrido volumétrico incompleto[10].

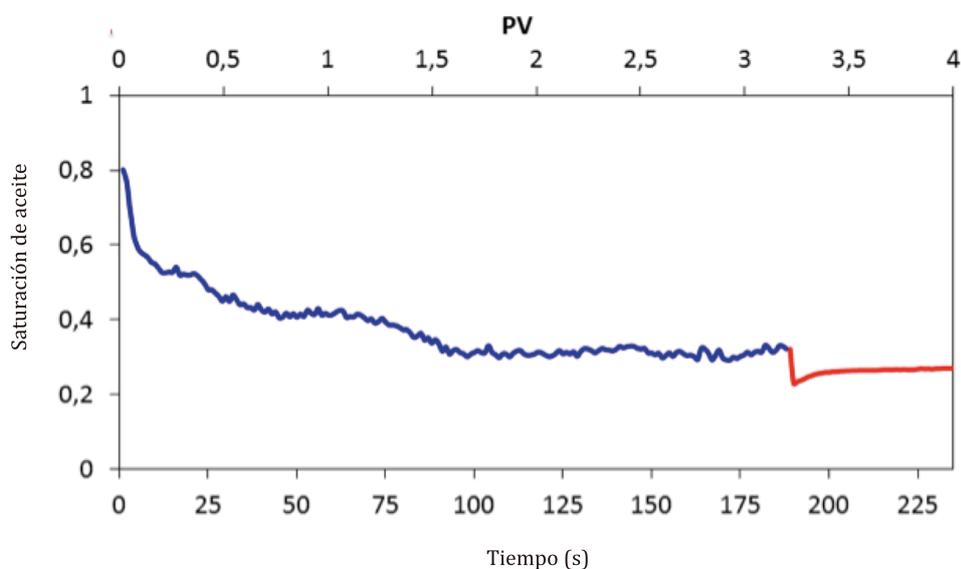


Figura 5. 4 Saturación residual de aceite en función de (eje X superior), volúmenes porales de fluidos inyectados y (eje X inferior) en función del tiempo. Línea azul: etapa A y línea roja: etapa B. La etapa A corresponde a la inyección de agua (3.3 PV) y la etapa B representa la mezcla CDG con su agente de entrecruzamiento (0.67 PV). La inundación con agua disminuyó la saturación residual de aceite a 32.1 mientras que la mezcla CDG con el entrecruzador redujo la saturación residual de aceite a 32.1% mientras que la mezcla CDG con entrecruzador disminuyó la saturación residual de aceite a 22.9%.

Los experimentos número 3 y 4 fueron realizados con el chip AB0 (Figura 5. 5 y Figura 5. 6). Estos experimentos fueron usados para evaluar la

reproducibilidad de la recuperación de aceite, el efecto de una prolongada inyección de agua y el efecto de la CDG sin entrecruzador sobre la recuperación de aceite. Se evitó la formación de burbujas mediante la inyección de etanol en los microcanales antes de la inyección de agua ya que la tensión superficial del etanol es (22.3 mNm^{-1} , $20 \text{ }^\circ\text{C}$) más baja que la tensión superficial del agua (72.8 mN^{-1} , $20 \text{ }^\circ\text{C}$) [23]. Por lo tanto, las fuerzas intermoleculares de los puentes de hidrógeno en el etanol son más bajas que las fuerzas de los puentes de hidrógeno en el agua.

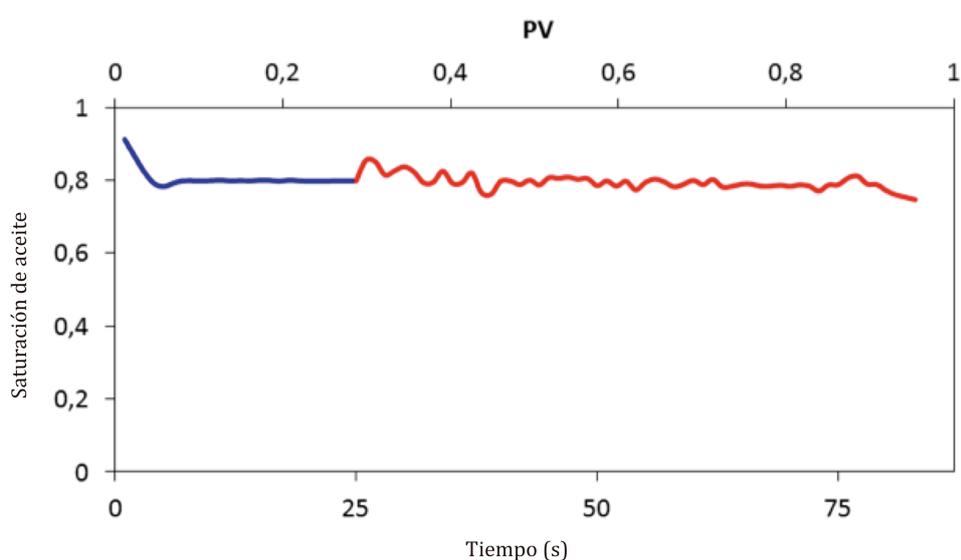


Figura 5. 5 Saturación residual de aceite (eje X inferior), volúmenes porales de fluidos inyectados (eje X superior) en función del tiempo. Línea azul: etapa A y línea roja: etapa B. La etapa A corresponde a la inyección de agua (0.3 PV) y la etapa B representa la mezcla CDG sin su agente de entrecruzamiento (0.67 PV).

La Figura 5. 6 representa los resultados del experimento número 4. Etapa A describe la inyección de agua (1 PV), mientras la etapa B describe el efecto de la mezcla CDG sin entrecruzador. Se suministró 1 PV de este fluido a un caudal de $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Sin embargo, la saturación residual de aceite se mantuvo constante.

Para ambos experimentos, se observa que la mezcla de CDG sin entrecruzador fue incapaz de reducir la saturación residual de aceite que quedó después de la inundación con agua ya que la viscosidad fue demasiado baja para superar las fuerzas capilares. Además, una inyección prolongada de agua no produce un mejoramiento en la recuperación de aceite. CDG sin entrecruzador tiene una limitada propagación a través del medio poroso. Por otro lado, la reproducibilidad de los experimentos de recuperación de aceite fue evaluada en el micromodelo AB0.

Se determinó que la mezcla CDG con entrecruzador disminuyó la saturación residual de petróleo efectivamente comparado con la mezcla CDG sin entrecruzador. Consecuentemente, tienen potencial para recuperación mejorada de petróleo[10].

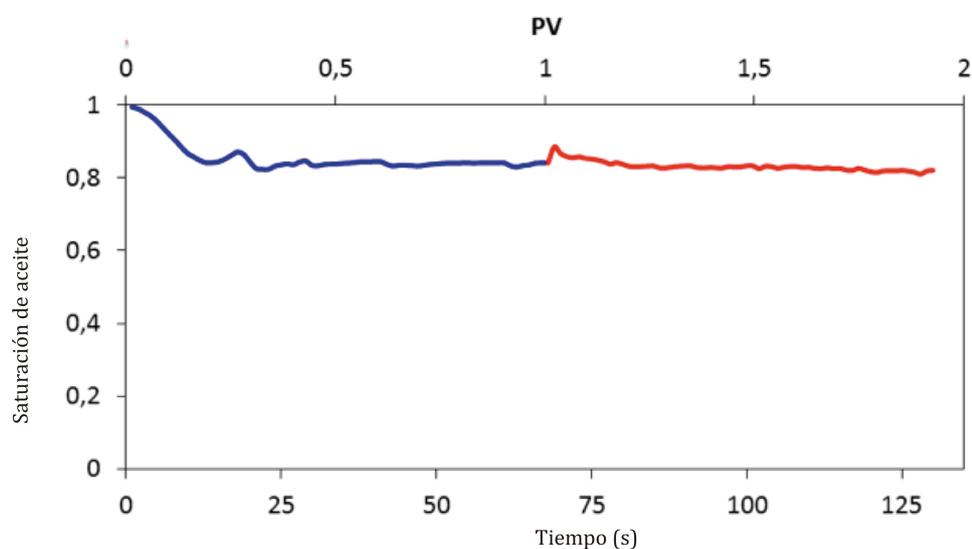


Figura 5. 6 Saturación residual de aceite en función de (eje X superior), volúmenes porales de fluidos inyectados y (eje X inferior) en función del tiempo. Línea azul: etapa A y línea roja: etapa B. La etapa A corresponde a la inyección de agua (1 PV) y la etapa B indica la mezcla CDG sin su agente de entrecruzamiento (0.9 PV).

5.4 Discusión

Se evaluaron tres diferentes arquitecturas de microcanales, su porosidad y sus distintos volúmenes porales (PV) se detallan en la Tabla 5. 1. El análisis de imágenes permitió la cuantificación de los volúmenes porales de cada fluido según la escala de grises correspondiente.

El chip E permitió la observación de la saturación de aceite (1 PV), el subsecuente desplazamiento producido por la inyección de agua (1.8 PV) y la inyección de polímero (0.7 PV) a través de tres diferentes permeabilidades. Los mecanismos mediante los cuales el agua desplaza al aceite son: desplazamiento a manera de pistón, llenado de cuerpos porales y desprendimiento[24]. El experimento con el chip E presenta entrapamiento por el mecanismo de desprendimiento donde el agua actúa como fase mojante puede avanzar como capa superficial mientras el aceite permanece en el centro de poros grandes[25]. Los poros anchos están conectados a través de pequeñas gargantas; las películas de agua en las gargantas porales frecuentemente coalescen y los glóbulos de aceite forman una fase oleosa continua. Como el aceite es la fase no mojante, la presión requerida para superar la presión capilar y mover los glóbulos de aceite a través de las gargantas estrechas que atrapan glóbulos de aceite desconectados en poros grandes[21]. Después de que el frente de agua pasa, casi todo el aceite permanece inmóvil. Debido a esta inmovilización, no hay producción de aceite después del corte de agua, por lo que la inundación con agua puede detenerse[21].

Después de la inyección de agua, la saturación residual de aceite fue 32% y el recorrido preferencial del agua fue en la zona de permeabilidad intermedia. Por lo tanto, los ganglios desconectados de aceite son observados en las zonas de permeabilidad baja y alta. Luego, la inyección de polímero y la saturación residual de aceite disminuye gradualmente de 32 a 5.4% mientras el polímero avanza. Esto se atribuye a la viscosidad y las

propiedades químicas del polímero que disminuyen la relación de movilidades. Consecuentemente, conducen a una mejora significativa de la eficiencia de barrido[1]. Durante el transcurso de la inundación de agua a polímero, se considera que las fuerzas viscosas aumentan en un orden de magnitud, lo cual se considera que no es suficiente para movilizar el aceite remanente. Por esto, el objetivo de la inundación con polímero es cualquier aceite que es pasado por alto durante la inyección de agua, pero no incluye aceite residual.

El chip AD0 muestra dos zonas con distintas permeabilidades, que son saturadas con aceite (1 PV), la inyección con agua (3.3 PV) representó la recuperación de 67.9% de aceite. El aceite que se queda después de la inundación de agua se debe a que ha sido atrapado por las fuerzas capilares o debido a que es rodeado. El aceite residual está constituido por ganglios desconectados que son inmovilizados como resultado de las fuerzas capilares. Para movilizar esta aceite, se necesita incrementar la relación entre las fuerzas viscosas y las fuerzas capilares entre las fases agua y aceite[1]. Finalmente, el fluido CDG con entrecruzados fue aplicado (0.67 PV) y la saturación residual de aceite disminuyó progresivamente desde 32.1 a 22.9%.

El Chip AB0 posee una zona de alta permeabilidad y una zona de baja permeabilidad. Este chip fue utilizado para realizar dos experimentos. Primero el chip AB0 fue inyectado con etanol para prevenir la formación de burbujas. Luego el agua fue inyectada para extraer residuos de etanol. Después el chip AB0 fue saturado con aceite (1 PV) antes de llevar a cabo la inyección de agua (0.3 PV) que logró extraer el 21% del aceite mientras que el fluido CDG sin entrecruzador (0.67 PV) barrió 4% del aceite. En cuanto al segundo experimento con el chip AB0, el chip mostró una fracción residual de aceite similar después de la inundación con agua (1PV). De todas formas, en el caso del fluido CDG sin entrecruzador, la saturación residual de aceite no disminuyó [26].

El mecanismo a través del cual el polímero mejora la eficiencia de barrido incluye la disminución de la relación de movilidad y el desplazamiento del agua inyectada hacia lugares de baja permeabilidad. Mientras el comportamiento del fluido CDG varía de acuerdo al gradiente de presión mientras fluye como una solución viscosa a alta presión para luego de un periodo de tiempo bloquear los canales de alta permeabilidad[9].

Adicionalmente, el incremento en la recuperación se atribuyó al mejoramiento en el desplazamiento microscópico de la inundación[27]. De todas formas, se necesitan más ensayos para determinar la concentración óptima del fluido CDG.

El eficiente desplazamiento del aceite conseguido por la mezcla CDG con entrecruzador (experimento número 2) concuerda con estudios previos realizados en el campo Loma Alta Sur. Los autores sugirieron que las propiedades de CDG sobre el polímero no entrecruzado son particularmente útiles en formaciones heterogéneas, donde las rocas no uniformes provocan un frente de inundación inestable y volúmenes de barrido incompletos. En este tipo de roca, el polímero no entrecruzado no es lo suficientemente fuerte para superar los efectos adversos[10]. Además, Alzate [9] determinó que el sistema CDG incrementa viscosidad comparado como el polímero cuando el agente entrecruzador es añadido.

5.5 Conclusiones

La arquitectura que refleja la saturación residual de aceite deseada corresponde al chip "AD0", este diseño tiene dos permeabilidades que atrapan los ganglios de aceite desconectados. Por lo tanto, representa un modelo prometedor para ensayos de desplazamiento de aceite residual. Los volúmenes porales de CDG y polímero fueron cuantificados por análisis de imágenes digital y se observó que el fluido CDG recuperó 10.2% de aceite adicional (de 33.1% a 22.9%) cuando 0.67 PV fueron inyectados mientras que el polímero recuperó 26.6% de aceite adicional (de 32% hasta 5.4%) al

usar 0.7 PV. Adicionalmente, se determinó que la mezcla CDG con entrecruzador disminuyó la saturación residual de aceite más que la mezcla CDG sin entrecruzador, por lo que posee un potencial significativo para la recuperación mejorada de petróleo.

5.6 Referencias

1. Sorbie, K.S., *Polymer-Improved Oil Recovery*, ed. B.a.S. Ltd. 1991, USA and Canada: CRC Press, Inc Boca Raton, Florida.
2. Nilsson, M.A., et al., *Effect of fluid rheology on enhanced oil recovery in a microfluidic sandstone device*. Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics, 2013. **202**: p. 112-119.
3. Dong, X., et al., *Multi-thermal fluid **assisted** gravity drainage process: A new improved-oil-recovery technique for thick heavy oil reservoir*. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2015. **133**: p. 1-11.
4. Ryazanov, A.V., K.S. Sorbie, and M.I.J. van Dijke, *Structure of residual oil as a function of wettability using pore-network modelling*. Advances in Water Resources, 2014. **63**: p. 11-21.
5. Feng, G. and M. Yu, *Characterization of pore volume of cumulative water injection distribution*. Petroleum, 2015. **1**(2): p. 158-163.
6. Cheraghian, G. and L. Hendraningrat, *A review on applications of nanotechnology in the enhanced oil recovery part B: effects of nanoparticles on flooding*. International Nano Letters, 2016. **6**(1): p. 1-10.
7. Conn, C.A., et al., *Visualizing oil displacement with foam in a microfluidic device with permeability contrast*. Lab on a Chip, 2014. **14**(20): p. 3968-3977.
8. Quennouz, N., et al., *Microfluidic Study of Foams Flow for Enhanced Oil Recovery (EOR)*. Oil Gas Sci. Technol. – Rev. IFP Energies nouvelles, 2014. **69**(3): p. 457-466.
9. Alzate, D., *Interpretación de los mecanismos fenomenológicos del proceso de inyección de Geles de Dispersión Coloidal (CDG) en un yacimiento de hidrocarburos.*, in Facultad de Minas, Escuela de Procesos y Energía. 2016, Universidad Nacional de Colombia: Medellín, Colombia.
10. Diaz, D., et al., *Colloidal Dispersion Gels Improve Oil Recovery in a Heterogeneous Argentina Waterflood*. 2008, Society of Petroleum Engineers.

11. Negin, C., S. Ali, and Q. Xie, *Application of nanotechnology for enhancing oil recovery- a review*. Petroleum, 2016.
12. Grate, J.W., et al., *A note on the visualization of wetting film structures and a nonwetting immiscible fluid in a pore network micromodel using a solvatochromic dye*. Water Resources Research, 2010. **46**(11): p. n/a-n/a.
13. Li, R., et al., *Experimental Investigation of Silica-based Nanofluid Enhanced Oil Recovery: The Effect of Wettability Alteration*. Energy & Fuels, 2016.
14. Sayegh, S.G. and D.B. Fisher, *Enhanced Oil Recovery by CO Flooding in Homogeneous and Heterogeneous 2D Micromodels*. Journal of Canadian Petroleum Technology, 2009. **48**(08): p. 30-36.
15. Ghazanfari, M.H., et al., *Capillary Pressure Estimation Using Statistical Pore Size Functions*. Chemical Engineering & Technology, 2007. **30**(7): p. 862-869.
16. McDougall, S.R. and E.J. Mackay, *The Impact of Pressure-Dependent Interfacial Tension and Buoyancy Forces Upon Pressure Depletion in Virgin Hydrocarbon Reservoirs*. Chemical Engineering Research and Design, 1998. **76**(5): p. 553-561.
17. Kamari, E., D. Rashtchian, and S.R. Shadizadeh, *Immiscible Displacement of a Wetting Fluid by a Non-wetting One at High Capillary Number in a Micro-model Containing a Single Fracture*. Transport in Porous Media, 2012. **94**(1): p. 289-301.
18. Isiksacan Z., G.M., Aydogdu B., Billican I., Elbuken C., *Rapid fabrication of microfluidic PDMS devices from reusable PDMS molds using laser ablation*. J. Micromech. Microeng., 2016. **26**.
19. Tang, M., et al., *A Review of Biomedical Centrifugal Microfluidic Platforms*. Micromachines, 2016. **7**(2): p. 26.
20. McDonald, J.C. and G.M. Whitesides, *Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices*. Accounts of Chemical Research, 2002. **35**(7): p. 491-499.
21. Anderson, W.G., *Wettability Literature Survey Part 5: The Effects of Wettability on Relative Permeability*. 1987.
22. Mohanty, K.K., H.T. Davis, and L.E. Scriven, *Physics of Oil Entrapment in Water-Wet Rock*. 1987.

23. AUS-e-TUTE. *Chemistry Tutorial: Surface Tension*. 2014 [cited 2016 2 October 2016]; Available from: [http://www.ausetute.com.au/index.html -.WDtazM7GyAY](http://www.ausetute.com.au/index.html-.WDtazM7GyAY).
24. Valvatne, P.H., *Predictive pore-scale modelling of multiphase flow*, in *Department of Earth Science and Engineering*. 2004, Imperial College London: United Kingdom. p. 146.
25. Schneider, M., *Wettability Patterning in Microfluidic Systems and Applications in the Petroleum Industry*, in *Laboratoire Microfluidique, MEMS, Nanostructures (MMN)*. 2011, Université Pierre et Marie Curie Paris VI.
26. Rosero, G., Peñaherrera, A., Olmos, C., Boschan, A., Granel, P., Golmar, F., Lasorsa, C., Lerner, B., Pérez, M. *Design and analysis of different models of microfluidic devices evaluated in Enhanced Oil Recovery (EOR) assays*. Matéria (Rio de Janeiro). 2018, 23
27. Skauge, T., K. Spildo, and A. Skauge, *Nano-sized Particles For EOR*. 2010, Society of Petroleum Engineers.

Capítulo 6

Influencia del tratamiento térmico y envejecimiento sobre la estabilidad y propiedades de nano/microesferas poliméricas para recuperación mejorada de petróleo.

6.1 Resumen

Dilucidar el mecanismo de hinchamiento y profundizar en las propiedades de estabilidad de las esferas poliméricas es esencial en la recuperación mejorada de petróleo; estas propiedades permitirán garantizar un bloqueo eficiente de los canales de alta permeabilidad y de las gargantas porales amplias. La emulsión de esferas poliméricas se caracterizó por microscopía electrónica de barrido (SEM). Los análisis de datos revelan estructuras uniformes y esféricas con un diámetro promedio de 47 ± 4.8 nm. Después de la hidratación, las esferas poliméricas pueden hincharse debido a la absorción de agua y alcanzan un diámetro promedio de 3.3 ± 0.2 μ m. El efecto del envejecimiento, tratamiento térmico, remoción de la fase oleosa y el estabilizador dispersante sobre el hinchamiento y la estabilidad ha sido estudiado. Se ha determinado que la estructura de las esferas poliméricas se deteriora progresivamente con el tiempo de envejecimiento, aumento de temperatura y con la remoción de la fase oleosa y estabilizador dispersante. Consecuentemente, se forman agregados con morfología fibrilar. Adicionalmente, este capítulo provee un entendimiento del comportamiento, estabilidad y el hinchamiento de las microsferas poliméricas utilizando microdispositivos de PDMS. Los resultados comprueban que el comportamiento de las esferas poliméricas puede ser beneficioso para la recuperación mejorada de petróleo.

6.2 Introducción

La industria farmacéutica, cosmética, alimenticia y química se han beneficiado del potencial de la tecnología de microencapsulación [1-5]. La microencapsulación es apropiada para la entrega eficiente de ingredientes activos debido a la amplia área superficial que confiere rápida penetración de los activos (profunda penetración de la droga en el interior de la micela)[6, 7], alta estabilidad estructural y composicional en diferentes

entornos (fluidos corporales, reservorios de fluidos)[6-8], liberación controlada de los compuestos activos[9], liberación direccionada de materiales encapsulados[6, 9], entre otros. Los sistemas microencapsulados han sido introducidos e investigados para aplicaciones médicas como el desarrollo de terapia dirigida que incluye microcápsulas poliméricas[10], micelas poliméricas[6, 11-13], dendrímeros[8] y micelas a manera de gusano[14].

Otra aplicación interesante de la tecnología de microencapsulación que tienen gran potencial está relacionada con la recuperación mejorada de petróleo (IOR). El avance del agua entre el petróleo y los pozos de agua provoca que el proceso de inyección de agua no sea efectivo para la recuperación de petróleo[15, 16]. La literatura reporta que el fenómeno de avance del agua puede ser contrarrestado mediante el bloqueo de los canales de alta permeabilidad y de las gargantas porales amplias con esferas poliméricas[16-18]. En los últimos años, las esferas poliméricas han sido usadas para reducir el corte de agua a través del bloqueo de las zonas de alta permeabilidad y la redistribución del agua para mejorar la recuperación de petróleo[16]. La Figura 6. 1(a) muestra que el agua inyectada fluye a través de las zonas de alta permeabilidad mientras que las zonas de baja permeabilidad permanecen inalcanzables al barrido por agua, por lo tanto el resultado es una recuperación de petróleo pobre. La Figura 6. 1b muestra que las esferas poliméricas se mueven hacia formaciones profundas mientras como un agente para desplazar petróleo. Luego, se propagan a través de las zonas de alta permeabilidad. Después, se hinchan y cambian la morfología por lo que empiezan a bloquear los canales de alta permeabilidad y las gargantas porales amplias (Figura 6. 1c). Las esferas poliméricas proveen una resistencia a la filtración de agua en los canales de alta permeabilidad. Además, las esferas poliméricas disminuyen la permeabilidad de los canales de alta permeabilidad y los efectos de canalización. El desplazamiento de petróleo de los canales relativamente de baja permeabilidad resulta en un aumento en la producción de petróleo y una disminución en el corte de agua (Figura 6. 1d).

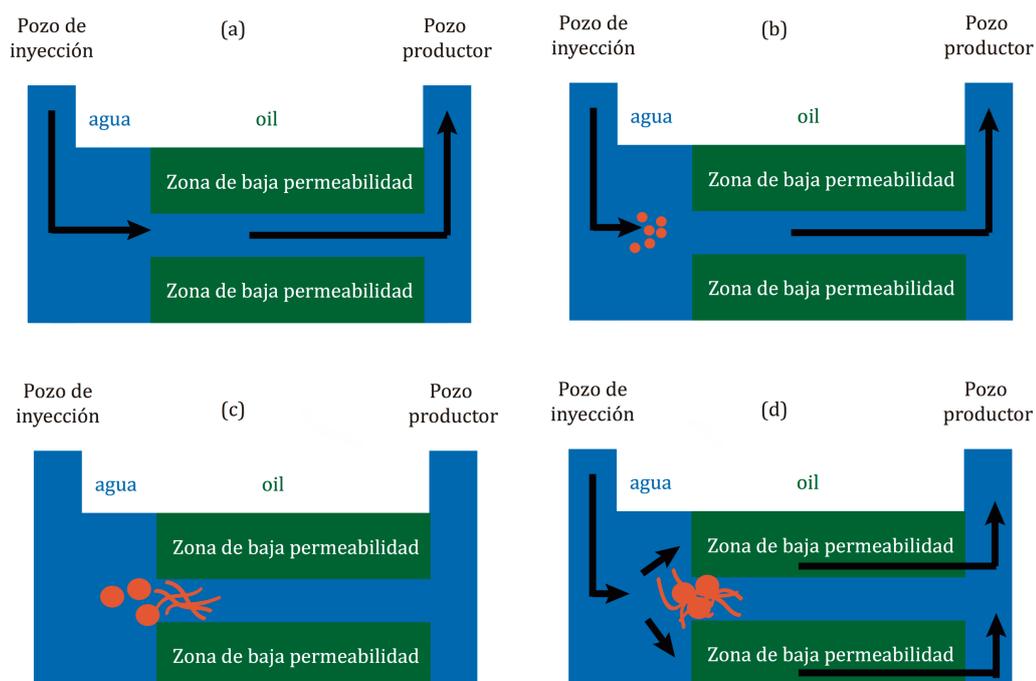


Figura 6. 1 Ilustración esquemática de la modificación del perfil y la recuperación mejorada de petróleo por el efecto de la inyección de esferas poliméricas. (a) Inyección con agua, (b) inyección de esferas poliméricas dispersas en agua. (c) esferas poliméricas que se han hinchado y han cambiado su morfología durante el tiempo de hidratación, se produce el ajuste de permeabilidad (d) el flujo de agua es direccionado hacia las zonas de baja permeabilidad por lo tanto mejora la recuperación de petróleo.

La habilidad de los diferentes tipos de esferas poliméricas como las microesferas poliméricas entrecruzadas (DCPM)[18], microesferas de baja elasticidad[16], microesferas anfífilas[19], y microesferas de DCA (divinilbenceno-co-acril-amida)[20] ha sido reportada para mejorar la recuperación de petróleo.

Autores como Xiangan *et al.*[20], Yao *et al.*[21] y Yu *et al.*[7] demostraron que las nano/micro esferas poliméricas se comportan como un tratamiento eficiente para evitar el corte de agua que modifica la heterogeneidad del flujo y mejora el desplazamiento en los reservorios del hidrocarburo.

Cuando las esferas poliméricas encuentran con el agua, éstas se hinchan y pueden migrar o quedar retenidas en el reservorio. A continuación ocurre la deformación elástica y las esferas poliméricas pueden migrar nuevamente o ser recapturadas[18]. Sin embargo, un alto factor de recuperación de las esferas poliméricas está relacionado con un alto grado de hinchamiento, carencia de sensibilidad a los minerales del reservorio, fácil inyección, modulación del tamaño en la garganta poral de formación de los reservorios, entre otras[7, 15, 19, 22, 23].

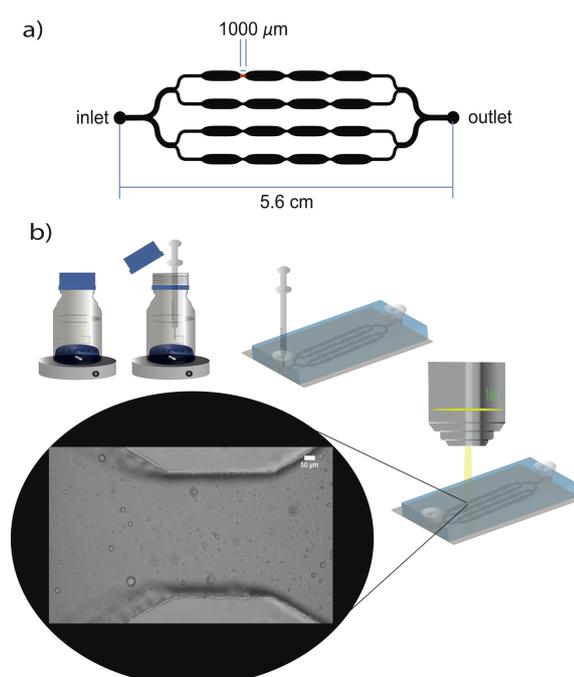


Figura 6. 2 (a) Diseño del dispositivo de microfluidica. (b) Preparación de la solución e inyección en el dispositivo y la visualización en los microcanales mediante microscopía óptica. Imagen en campo claro (magnificación 10x) de la dispersión de esferas poliméricas dentro del microcanal.

El hinchamiento y la estabilidad son propiedades clave que están directamente relacionadas a la eficacia del corte de agua[7, 16, 24]. Estas propiedades son susceptibles a la temperatura de formación[18], fuerza

iónica[21], tiempo de envejecimiento, concentración del emulsificador[18], relación de volumen entre el aceite y el agua[18], entre otros factores. La estabilidad de las esferas poliméricas dispersas de baja elasticidad fue estudiada por Yang *et al.*[16] mediante una técnica de barrido de luz múltiple. Los autores reportaron que la estabilidad está asociada con la temperatura; ya que, a altas temperaturas, las partículas coalescen y el proceso de sedimentación incrementa. Yu *et al.*[18] reportó que DCPM se degradaron gradualmente con el tiempo de envejecimiento. En 7 días, la estructura esférica casi desaparece y las estructuras fibrilares se observan al día 10. El proceso de degradación se describe desde la cantidad de agua absorbida inicialmente, la capacidad de hinchamiento hasta el apareamiento de estructuras fibrilares. Además, la polimerización por suspensión inversa es el método convencional para la síntesis de esferas poliméricas[16, 23, 25]. Particularmente, Yao *et al.* Reportó la síntesis de esferas poliméricas por polimerización en suspensión invertida de poliacrilamida (AM) y N,N'-metilen bisacrilamida (MBA) en fase oleosa con Span80 y Tween80 como estabilizadores de dispersión, y persulfato de amonio (APS) como iniciador[23].

De acuerdo con la literatura, las esferas poliméricas de tamaño nano/micro tienen varias ventajas técnicas en aplicaciones como la recuperación mejorada de petróleo. Sin embargo, su eficiencia puede estar limitada por el hinchamiento y las propiedades de estabilidad[16, 25, 26]. En este capítulo se describe la influencia del tiempo de envejecimiento y el tratamiento térmico en las propiedades de hinchamiento y estabilidad de esferas poliméricas comerciales (sintetizadas por emulsión inversa) y dispersadas en agua de formación simulada. Las esferas poliméricas comerciales han sido diseñadas para bloquear canales de permeabilidad y gargantas porales en el orden de magnitud de micrómetros. Se ha conducido una caracterización detallada por microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía óptica. También han sido estudiada la remoción del la fase oleosa y estabilizador dispersante para determinar el efecto que la fase oleosa y la remoción del estabilizador ejerce sobre la estabilidad de las

esferas poliméricas. Adicionalmente, el estudio del hinchamiento y propiedades de estabilidad de una microesfera específica fue conducido en un micromodelo transparente de PDMS, lo cual no ha sido reportado anteriormente en la literatura.

6.3 Metodología

6.3.1 Materiales

Los materiales fueron provistos por la empresa Biopack se enumeran a continuación: Cloruro de sodio (pureza $\geq 99.0\%$), sulfato ácido de amonio (pureza $\geq 99.0\%$), bicarbonato de sodio (pureza $\geq 99.0\%$), cloruro de magnesio (pureza $\geq 99.0\%$), cloruro de calcio (pureza $\geq 99.0\%$), etanol absoluto (pureza $\geq 99.0\%$) y n-hexano (pureza $\geq 99.0\%$). De acuerdo con las especificaciones del fabricante, la emulsión de esferas poliméricas de tamaño nano son un polímero entrecruzado comercializado como una nanoemulsión inversa (fase continua oleosa). La emulsión contiene aceite (60%), estabilizador dispersante (10%), y polímero entrecruzado (30%) aproximadamente. Se utilizó agua desmineralizada para preparar todas las soluciones acuosas.

Tabla 6. 1 Contenido de sales en el agua de formación simulada (SFW)

Composición	Concentración mg.L ⁻¹
Ca ⁺²	60
Mg ⁺²	2
Na ⁺¹	34 168
Cl ⁻¹	24 845
SO ₄ ⁻	3
HCO ₃ ⁻	3
Total	59 081

6.3.2 Preparación de la dispersión de esferas poliméricas

Agua de formación simulada (SWF). La composición de sales del agua de formación simulada se detalla en la Tabla 6. 1. Emulsión de esferas poliméricas de tamaño nano.

6.3.3 Solución inicial

Una gota de la emulsión de esferas poliméricas fue dispersada en 30 mL de n-hexano en agitación a 700 rpm durante 5 minutos. Esta solución se denomina solución inicial (IS).

6.3.4 Dispersión acuosa inicial de esferas poliméricas

La emulsión de esferas poliméricas (1.5 g) fue dispersada en 1 L de SFW en agitación a 700 rpm por 2 horas a temperatura ambiente. Esta solución se denominó dispersión acuosa (AD). La preparación de la AD para la inyección en los reservorios fue realizada de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6.3.5 Remoción de la fase oleosa y el estabilizador de dispersión de las esferas poliméricas

Primero, se precipita el polímero. La precipitación del polímero se ejecuta al adicionar 50 mL de etanol absoluto a 25 mL de AD, este procedimiento se realiza en agitación a 700 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, el polímero fue separado usando una centrífuga. El sobrenadante se descartó y los sólidos fueron resuspendidos en 25 mL de SFW en agitación a 700 rpm por 2 horas. A continuación, 50 mL de etanol absoluto fueron añadidos a la solución nuevamente para remover el aceite y estabilizador dispersante remanentes. Finalmente, esta solución fue centrifugada y los sólidos fueron resuspendidos en 25 mL de SFW en agitación a 700 rpm

durante 2 horas. La solución obtenida se denominó remoción etil-alcohol (EAR).

6.3.6 Envejecimiento de la dispersión de las esferas poliméricas: en el dispositivo de microfluídica.

Para los experimentos de microfluídica se utilizaron dispositivos de polidimetilsiloxano (PDMS). Los pasos para su fabricación ha sido descrita en trabajos previos[27]. Brevemente, la arquitectura de los microcanales fue diseñada utilizando el programa editor Layout[28]. La arquitectura diseñada comprende una entrada y una salida conectadas por canales que se dividen en cuatro microcanales idénticos (500 μm de ancho) con cuatro cámaras (Figura 6. 2a). La altura del canal es 150 μm y el volumen interno total es 32.22 μL .

El diseño del molde en relieve fue elaborado mediante fotolitografía con una resina SU-8 de 150 μm de espesor (MicroChem, Alemania) sobre una oblea de silicio (Virginia Semiconductor, Inc.). El prepolímero de PDMS se mezcló con su agente curante en relación peso: peso 10:1 (Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit). Luego la mezcla se colocó en vacío para remover las burbujas durante 30 minutos, a continuación, la mezcla se coloca sobre el molde de SU-8 y se cura en un horno a 70 °C durante 70 minutos. Después del curado, la réplica fue extraída del molde y se perforaron agujeros para la entrada y salida mediante un sacabocados de 1 mm de diámetro (Intefra Miltex, Ted Pella, Inc). Finalmente, la réplica de PDMS fue unida al portaobjetos de vidrio mediante exposición de ambas superficies a plasma (900 V, 1 mbar, 30 s), este proceso se realizó en un reactor de plasma de corriente continua para deposición química por plasma (PECVD) (Laboratorio de recubrimientos por plasma, UTN).

El AD fue inyectada con una bomba de jeringa en el dispositivo de microfluídica. Una vez que el dispositivo fue saturado, la entrada y la salida

fueron cerradas. El dispositivo fue colocado en una caja Petri con reservorios de agua desmineralizada para evitar la evaporación y fueron envejecidas a 25 °C durante 20 días.

6.3.7 Envejecimiento de la dispersión de las esferas poliméricas: fuera del dispositivo de microfluídica

El envejecimiento de la dispersión de las esferas poliméricas fue realizado a 25 °C (AD:25), 70 °C (AD:70) y el envejecimiento de la dispersión polimérica a 70 °C (EAR:70) fueron estudiados. Para iniciar el proceso de envejecimiento, se colocaron las soluciones AD: 25, AD: 70 y EAR:70 en tres botellas BOECO para cada solución para evaluar su comportamiento a la temperatura seleccionada en un ambiente libre de oxígeno. Las soluciones resultantes fueron colocadas a 70 °C en un horno durante 30 días sin agitación. Otro grupo de soluciones fue colocado a 25 °C y fue envejecido al mismo tiempo.

6.3.8 Mediciones y caracterización

6.3.8.1 En el dispositivo de microfluídica

Los microcanales fueron observados utilizando un microscopio óptico Olympus BX40 (Pensilvania, USA) equipado con una cámara digital Rebel Canon T3-I. Se adquirieron imágenes en campo claro con el objetivo 10x. Un total de 12 micrografías fueron adquiridas cada día. El estudio se realizó al día 0, 5, 10 y 20.

6.3.8.2 Fuera del dispositivo de microfluídica

Las esferas poliméricas fueron examinadas con un microscopio óptico Olymques BX40 y con microscopía electrónica de transmisión en el

microscopio electrónico de barrido (STEM-in-SEM) desarrollado en el equipo TESCAN FEG SEM MIRA3. Las mediciones de STEM fueron conducidos mediante la aplicación de un voltaje de 30 kV en campo claro. El modo STEM-in-SEM se escogió porque presenta varios beneficios sobre el TEM para el análisis morfológico de polímeros y es particularmente apropiado para un ambiente industrial[29].

6.3.9 Análisis estadístico

Las mediciones del diámetro fueron realizadas mediante el programa para análisis de imágenes científico (Fiji) a partir de las imágenes obtenidas en los microscopios óptico y electrónico STEM[30]. Según las imágenes representativas, los diámetros de más de 500 partículas seleccionadas al azar fueron determinados como diámetro de Feret (distancia entre dos tangentes en lados opuestos de las partículas) y se indicó la distribución del tamaño de partícula correspondiente. El promedio del diámetro de partícula (d) fue calculado según la expresión siguiente:

$$d = \sum n_i d_i / \sum n_i$$

Ecuación 6.1

donde $n_i \geq 500$. También, se determinó el diámetro de las imágenes obtenidas con el microscopio óptico como diámetro de Feret. Más de 1500 partículas fueron analizadas.

6.4 Resultados y discusión

6.4.1 Morfología y tamaño de partícula de las esferas poliméricas

La Figura 6.3 muestra una imagen representativa de STEM y la distribución del tamaño de partícula en la emulsión de esferas poliméricas (IS). Como se observa, las esferas poliméricas son partículas esféricas con una

distribución de tamaño estrecha y el tamaño promedio de partícula (d) es $47 \geq 4.8$ nm.

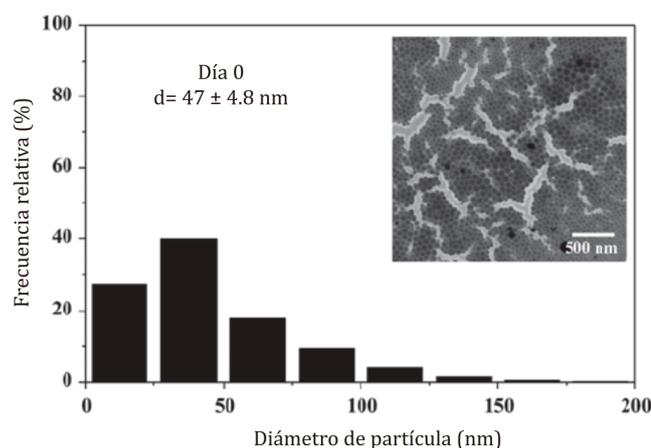


Figura 6. 3 Imagen representativa de STEM y distribución del tamaño de partícula de la emulsión de nanoesferas poliméricas (IS). El error se mide en base al tamaño del punto del láser electrónico.

La Figura 6. 4 muestra las imágenes obtenidas mediante STEM, microscopía óptica y la distribución del tamaño de partícula de las esferas poliméricas después de la hidratación (AD:25). La distribución del tamaño de partícula fue estimada por microscopía óptica. Las imágenes mostraron que las esferas poliméricas son estructuras esféricas con tamaño comprendido en el rango de los nanómetros y micrómetros. El tamaño promedio de partícula es 3.3 ± 0.2 μ m, lo que corresponde a 70 veces más grande que el tamaño promedio de partícula de la emulsión (IS). La Figura 6. 7c exhibe que la frecuencia de esferas poliméricas con tamaño menor a 5 μ m representa el 88%, únicamente el 1% de las esferas corresponden a tamaños mayores a 10 μ m. Además, el análisis revela tamaños de diámetro superiores a 21 μ m. El incremento en el tamaño de partícula indica que las esferas poliméricas tienen la habilidad de hincharse.

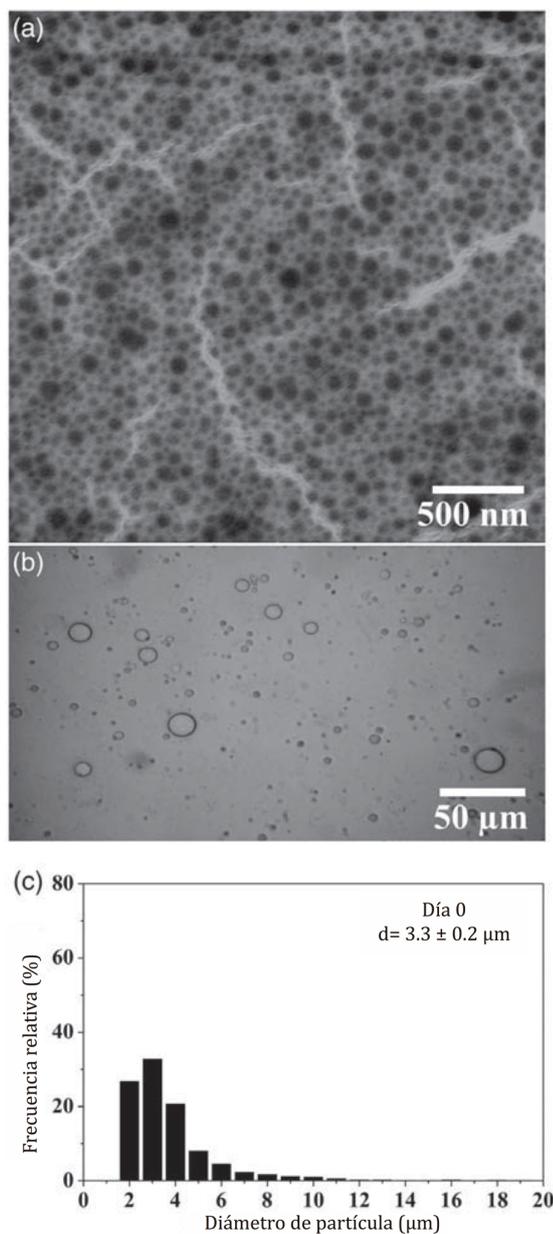


Figura 6. 4 (a) Imagen representativa de STEM, (b) imagen representativa de microscopía óptica, y (c) distribución de tamaño de partícula a partir del análisis de microscopía óptica de las esferas poliméricas dispersas. Las imágenes fueron adquiridas después de 3 horas.

6.4.2 Monitoreo de las partículas poliméricas en el tiempo

El monitoreo del envejecimiento de una partícula polimérica específica durante 20 días a 25 °C fue realizado para analizar la estabilidad y las propiedades de hinchamiento (Figura 6. 5 y Figura 6. 6). Se observó que

después de 5 días; algunas esferas poliméricas se deterioran ya que pierden la estructura esférica (flecha roja). Mientras que algunas partículas se mantuvieron estables hasta por 20 días (flecha azul). También se observó la propiedad de hinchamiento (flecha blanca): la figura muestra que el tamaño de la capa interna y externa de las microesferas cambió. El diámetro total de la partícula incrementa con el progreso del tiempo de envejecimiento. Debido a que las esferas poliméricas son partículas entrecruzadas con una estructura de red tridimensional y muchos grupos hidrofílicos (-CONH₂) internos, la propiedad de hinchamiento está asociada con la combinación entre las moléculas de agua con los grupos hidrofílicos libres[21]. La interacción estira la cadena molecular de la estructura de red, incrementando el tamaño de la estructura esférica[16].

Este comportamiento se observa en la Figura 6. 5, línea A. En contraste, la destrucción de la estructura esférica se atribuye a factores como la liberación del polímero y la pérdida del agente estabilizador en la solución. Los mecanismos posibles por los cuales el contenido del núcleo es liberado al ambiente son la disolución, ruptura o difusión[26]. Adicionalmente, los resultados muestran que el dispositivo de microfluídica de PDMS constituye una plataforma apropiada para monitorear el comportamiento de una microesfera polimérica específica.

El mejoramiento de la recuperación de petróleo puede ser realizado al ajustar la permeabilidad del reservorio mediante el efecto de hinchamiento y el cambio morfológico de las esferas poliméricas durante el tiempo de hidratación. Por esta razón, es importante entender las propiedades de hinchamiento y estabilidad de las esferas poliméricas en las condiciones del reservorio (salinidad y temperatura) así como también los requerimientos químicos de ellos. En este contexto, las secciones “Influencia del tratamiento térmico y tiempo de envejecimiento sobre las propiedades de hinchamiento y estabilidad de las esferas poliméricas en AD” e “Influencia de la remoción de la fase oleosa y el estabilizador dispersante en las propiedades de estabilidad de las esferas poliméricas en AD” evalúan la influencia del

tratamiento térmico, tiempo de envejecimiento y la remoción de la fase oleosa y el estabilizador dispersante sobre las propiedades de hinchamiento y estabilidad de las esferas poliméricas en AD.

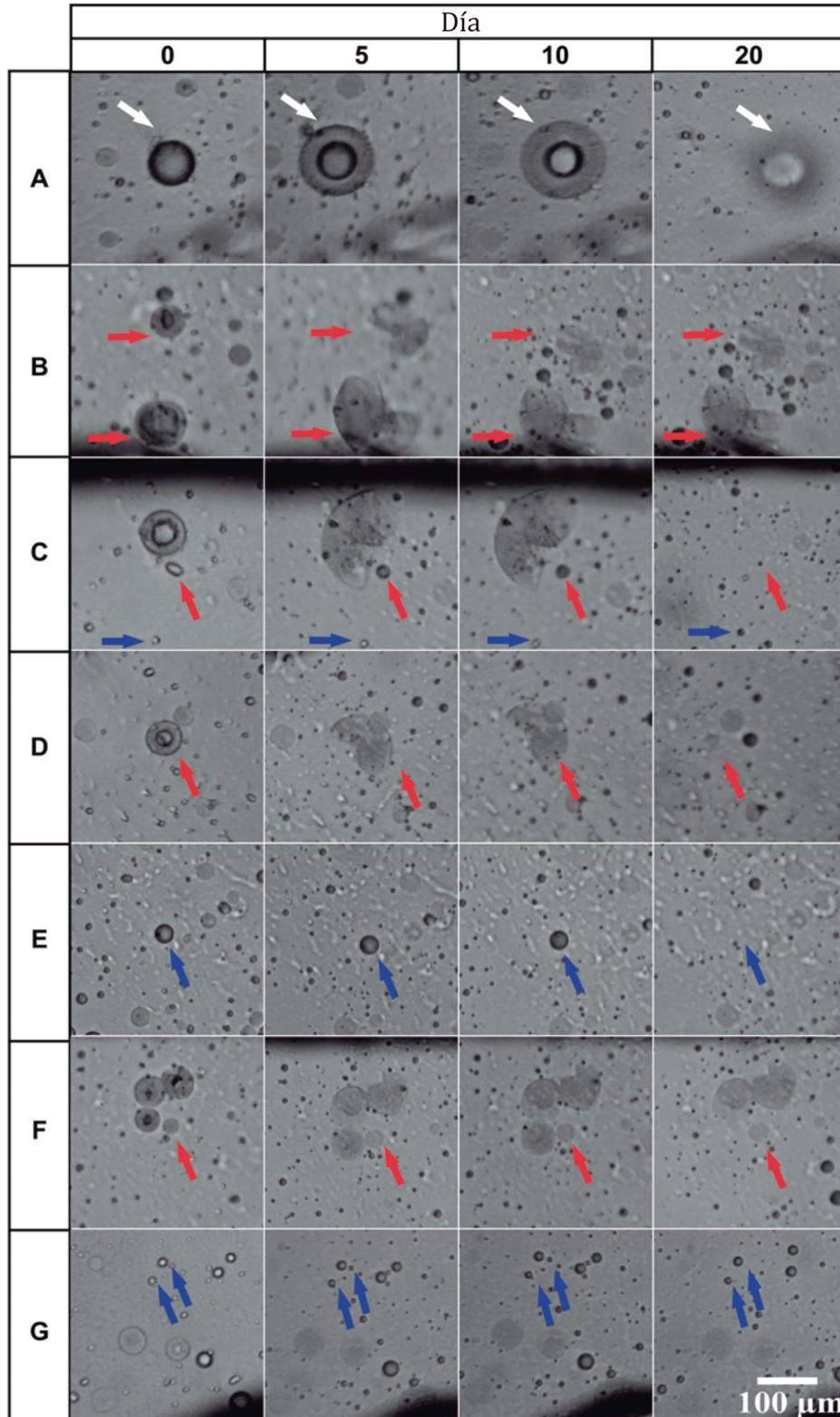


Figura 6. 5 Ensayo del monitoreo de esferas poliméricas en el dispositivo de microfluídica. Imágenes del seguimiento en microscopía óptica de las esferas poliméricas en los microcanales durante 20 días. Las flechas blancas muestran el comportamiento de hinchamiento, las flechas rojas señalan la

pérdida de la estructura esférica y las flechas azules muestran las esferas poliméricas estables en el tiempo.

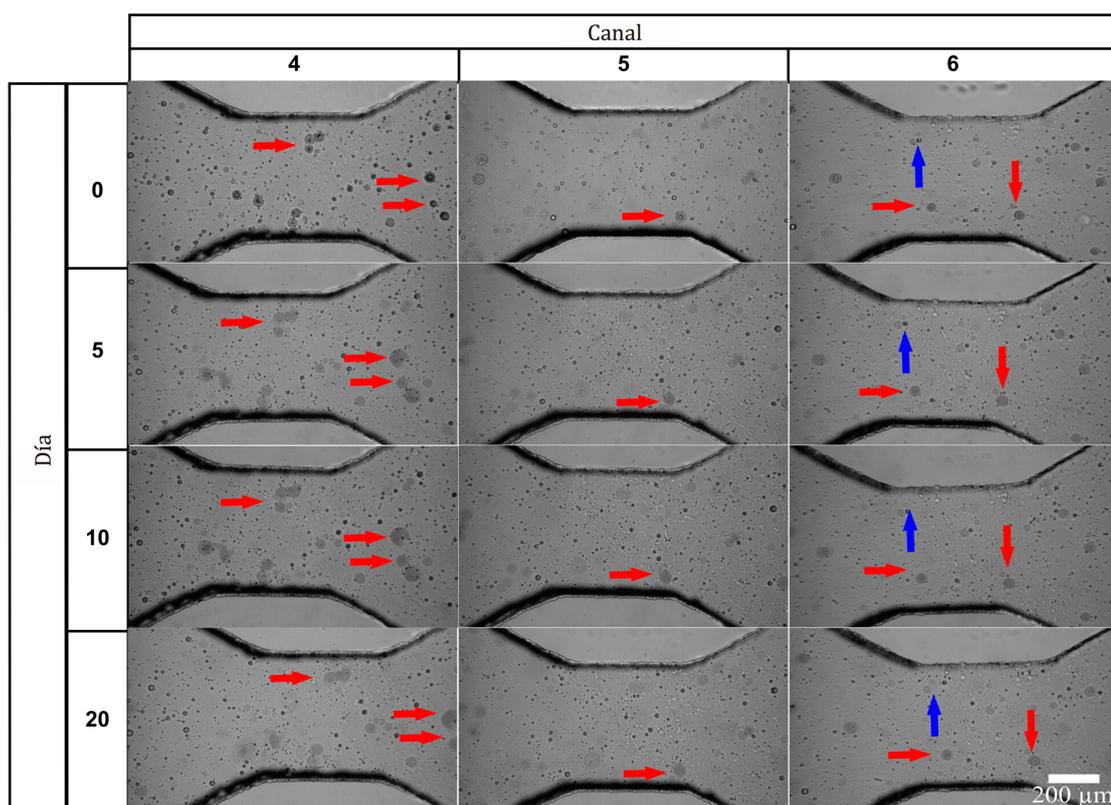
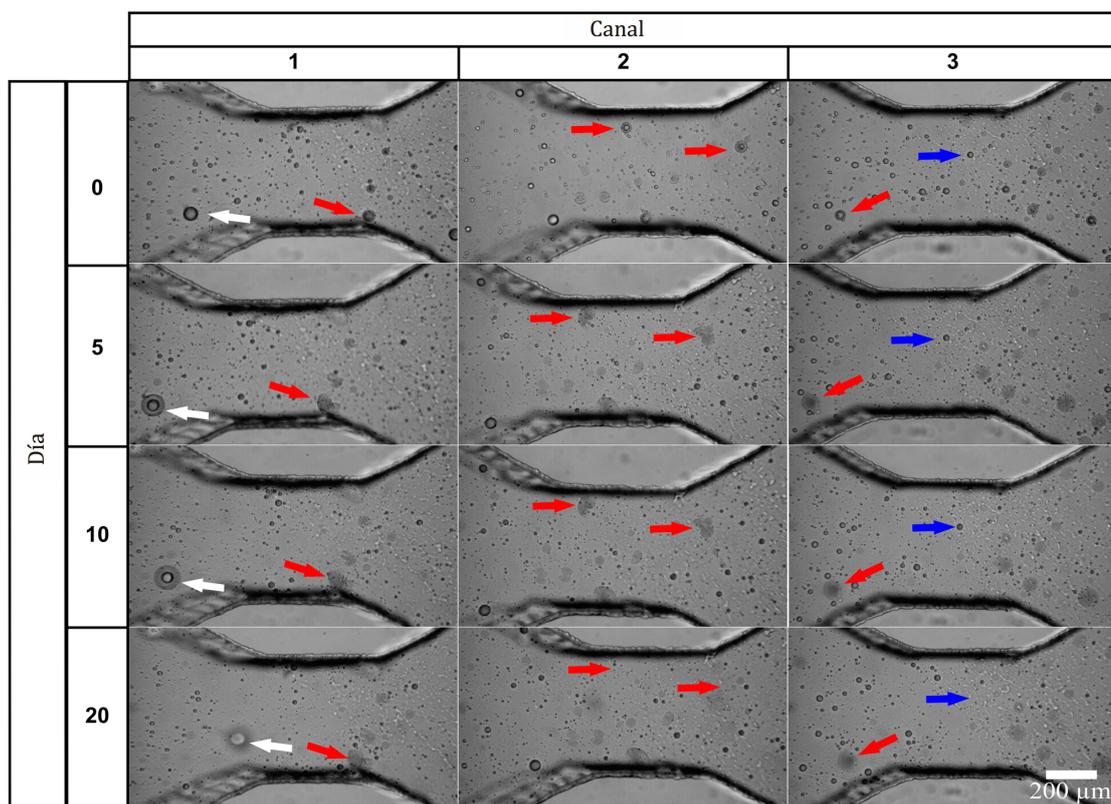


Figura 6. 6 Monitoreo de las microesferas durante 20 días en las secciones específicas de 6 microcanales. Las flechas blancas muestran el comportamiento de hinchamiento, las flechas rojas señalan la pérdida de la estructura esférica y las flechas azules muestran las esferas poliméricas estables en el tiempo.

6.4.3 Influencia del tratamiento térmico y tiempo de envejecimiento sobre las propiedades de hinchamiento y estabilidad de las esferas poliméricas en AD.

El efecto del tratamiento térmico y el tiempo de envejecimiento sobre el hinchamiento y propiedades de estabilidad de las esferas poliméricas fueron estudiados en un período de 30 días a 25 °C y a 70 °C. Se realizaron análisis tanto en el SEM como en el microscopio óptico para entender el efecto del tratamiento térmico y el tiempo de envejecimiento sobre el hinchamiento y la estabilidad de las esferas poliméricas. La Figura 6. 7 muestra las imágenes representativas de STEM y microscopía óptica de las esferas poliméricas dispersadas y envejecidas a 25 °C. Como se muestra en la figura, las esferas poliméricas exhiben estructura esférica durante 30 días de envejecimiento. La Tabla 4. 2 resume el tamaño promedio de partícula, las morfologías formadas y la frecuencia de partículas con un tamaño menor a 2 μm . Cabe recalcar que únicamente se determinó la distribución del tamaño de partícula a partir de la microscopía óptica debido a que las esferas poliméricas comerciales estudiadas en este trabajo son designadas para bloquear canales de alta permeabilidad y gargantas porales en el orden de magnitud de los micrones.

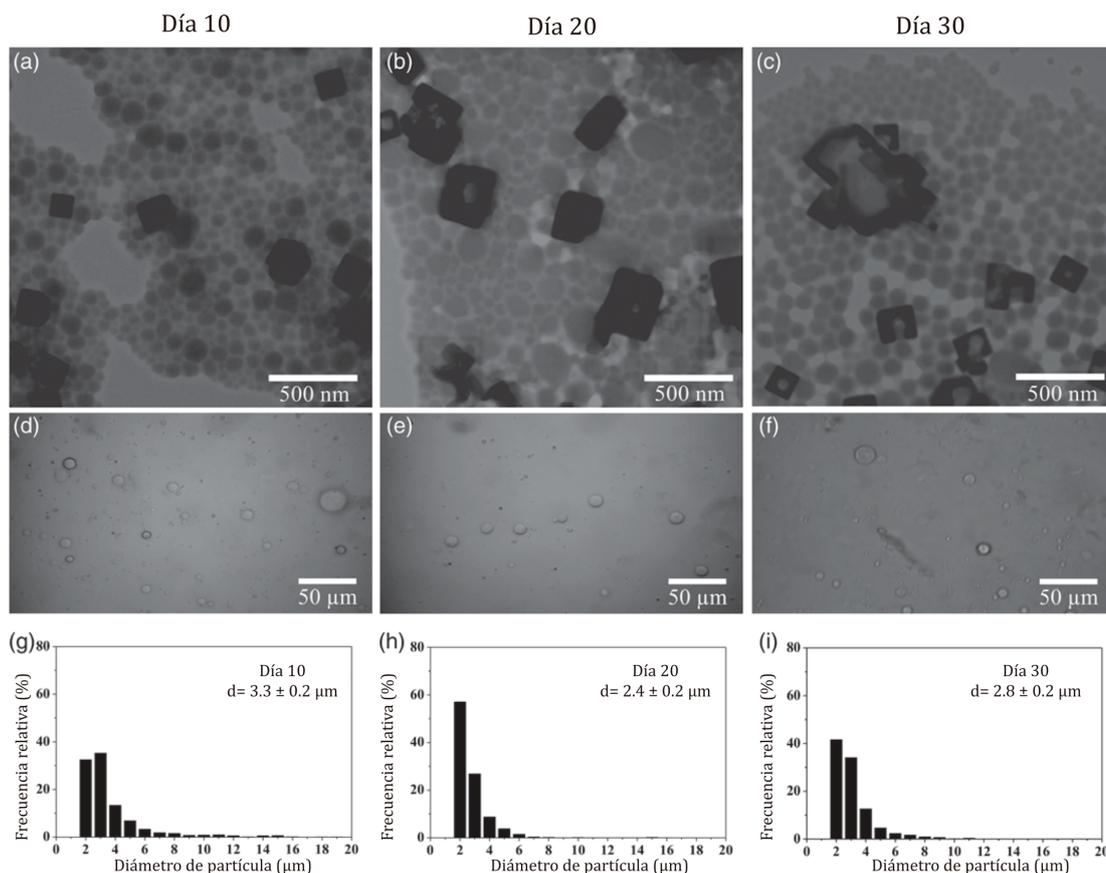


Figura 6. 7 Imágenes representativas de STEM y microscopía óptica de las esferas poliméricas dispersadas y envejecidas a 25 °C. (a,d) Día 10, (b,e) día 20 y (c,f) día 30. La distribución del tamaño de partícula (g-i) fue estimada mediante microscopía óptica.

El diámetro promedio de las esferas poliméricas hidratadas al día 0 es 3.3 μm (Figura 6. 5c). Después del tiempo de envejecimiento correspondiente a 10 días, es similar (3.3 μm). Al día 20 y 30, este diámetro disminuye a 2.4 y 2.8 μm , respectivamente. En comparación con el tamaño inicial de la emulsión (IS), las esferas poliméricas presentaron buenas propiedades de hinchamiento en la SFW. La disminución en el tamaño promedio de la partícula puede deberse a la pérdida de la estructura de las microesferas poliméricas; probablemente, las microesferas con mayor tamaño presentan un mayor grado de pérdida de la estructura esférica. Esto se evidencia en la distribución del tamaño de partícula; la frecuencia de esferas poliméricas con tamaño menor a 2 μm es más alto en la dispersión después de 20 días

de envejecimiento (> 40%) en comparación con la dispersión al día 10 de envejecimiento (32%). Además, la estructura cúbica observada mediante SEM corresponde a cristales de sal, por esta razón, se evidencia un alto contraste.

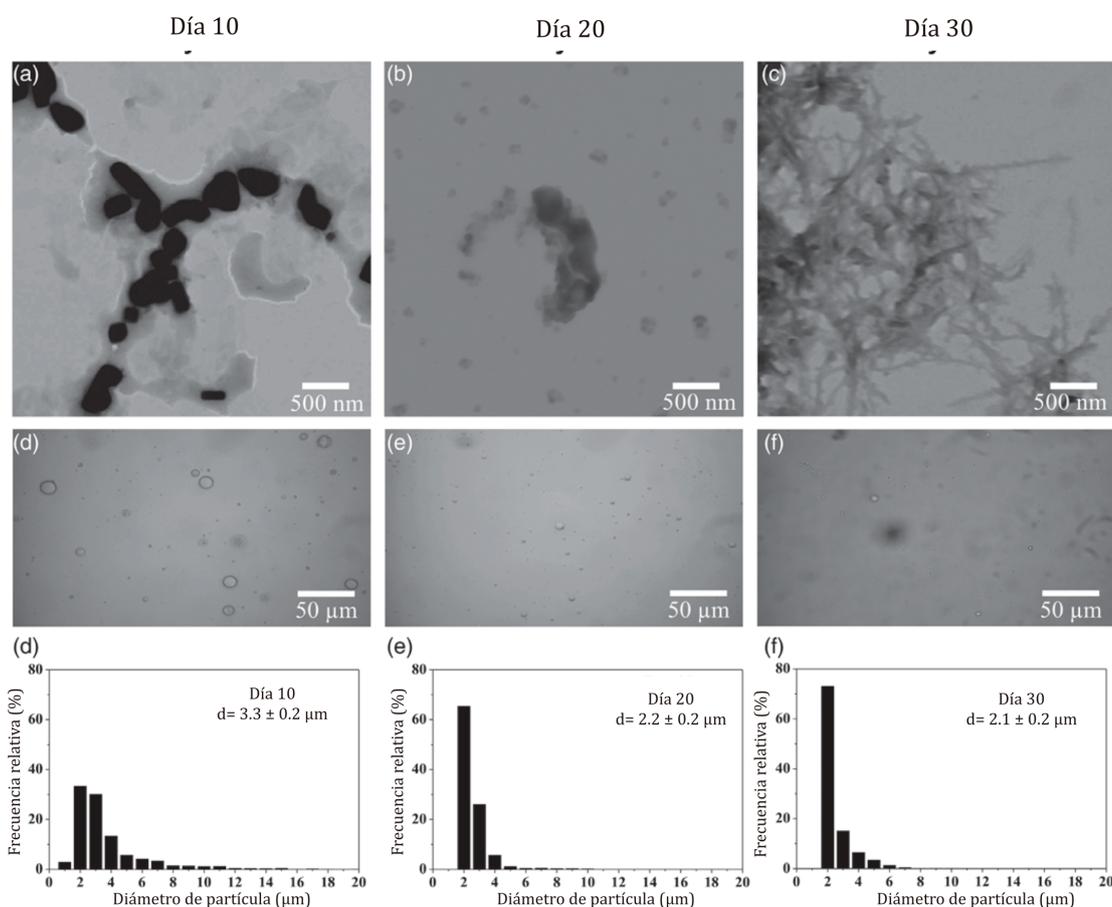


Figura 6. 8 Imágenes representativas de STEM y microscopía óptica de las esferas poliméricas dispersadas y envejecidas a 70 °C. (a,d) día 10, (b,e) día 20 y (c,f) día 30. Las distribuciones de tamaño de partícula correspondientes (g-i) fueron estimadas por microscopía óptica.

Se analizaron imágenes adquiridas en STEM y microscopía óptica para revelar el efecto del envejecimiento a 70 °C sobre las esferas poliméricas. Como se muestra en la Figura 6. 8a, al día 10 del envejecimiento las esferas poliméricas muestran estructura esférica, de todas formas, su frecuencia disminuye dramáticamente. Mientras que al tiempo de envejecimiento de 20 días (Figura 6. 8b), las estructuras esféricas casi desaparecen, las partículas se agregan unas con otras y se observan estructuras fibrilares. Al

día 30, se evidencia un incremento de las estructuras fibrilares (Figura 6. 8c). Los resultados están en concordancia con los resultados reportados previamente por Tian *et al.*[15] indicaron que estos cambios morfológicos promovieron el bloqueo de los canales de permeabilidad y de las gargantas porales. Además, las imágenes obtenidas por microscopía óptica mostraron que después de 30 días de envejecimiento, las microesferas poliméricas mantienen estructura esférica (Figura 6. 8d-f). La Tabla 6. 2 muestra que el día 10, el tamaño promedio de partícula es 3.3 μm . Al día 20, el tamaño de las partículas disminuyó a 2.2 μm mientras que al día 30, se observó un tamaño promedio de partícula de 2.1 μm . Como se discutió anteriormente, la disminución del tamaño promedio de partícula se debe al deterioro de las esferas poliméricas. Por lo tanto, a medida que progresa el tiempo de envejecimiento, la frecuencia de partículas con tamaño menor a 2 μm aumenta. Las frecuencias son 36, 65 y 73% para 10, 20 y 30 días de envejecimiento, respectivamente; estos resultados demuestran que la pérdida de estabilidad de las partículas con mayor tamaño.

Tabla 6. 2 Resultados de las morfologías formadas, tamaño promedio de particular, distribución y aumento de tamaño por hinchamiento de las esferas poliméricas dispersadas.

		25°C				70 °C		
		Tiempo de envejecimiento (días)						
Técnica	Hinchamiento	0	10	20	30	10	20	30
SEM	Morfologías formadas	ER	ER	ER	ER	EI+ER	EI+(ER+F)	EI+F+(ER)
	Tamaño promedio de partícula (nm)	47	-	-	-	-	-	-
Microscopia Óptica	Morfologías formadas	ER	ER	ER	ER	ER	ER	ER
	Tamaño promedio de partícula (μm)	3.3 \pm 0.2	3.3 \pm 0.2	2.4 \pm 0.2	2.8 \pm 0.2	3.3 \pm 0.2	2.2 \pm 0.2	2.1 \pm 0.2
	Frecuencia de partícula con tamaño menor a 2 μm (%)	27	32	57	48	36	65	73

Las morfologías descritas corresponden a ER: esferas regulares, EI esferas irregulares, F: fibrilar. Las morfologías menores se muestran entre paréntesis. En esta sección, se estudió la influencia de la temperatura y el

tiempo de envejecimiento sobre las propiedades de estabilidad e hinchamiento de las esferas poliméricas. Después de la hidratación de las esferas poliméricas, se observó un incremento en el tamaño de partícula. Las moléculas de agua se combinan con los grupos hidrofílicos (-CONH₂) a través de puentes de hidrógeno y por lo tanto una capa de hidratación se desarrolla sobre la superficie de las esferas poliméricas produciendo un aumento en el tamaño de la partícula (Figura 6. 9a). Adicionalmente, se observaron diferencias morfológicas y de tamaño de partícula en las esferas poliméricas envejecidas a 25 y 70 °C. Las imágenes de STEM muestran que las nanoesferas poliméricas conservan la estructura esférica a una temperatura de envejecimiento de 25 °C hasta por 30 días (Figura 6. 10). Mientras que a 70 °C, se forman agregados y adquieren morfología fibrilar como se muestra en la Figura 6. 9b. Consecuentemente, la combinación de la cinética y los efectos termodinámicos promueven los cambios morfológicos de las esferas poliméricas. El incremento en la temperatura aumenta el movimiento molecular lo que provoca una destrucción en la estructura esférica, se libera la fase interna (el polímero entrecruzado), y subsecuentemente el deterioro de la estabilidad de todo el sistema. De hecho, el tamaño promedio de partícula de las esferas poliméricas decrece con el progreso del tiempo de envejecimiento. La tendencia a la pérdida de estabilidad observada en las esferas poliméricas es consistente con la formación de agregados que adquieren morfología fibrilar. Por otro lado, el uso de los dispositivos de microfluídica es una alternativa interesante ya que estos ofrecen un microambiente homogéneo y controlable para estudiar la estabilidad y el hinchamiento de una microesfera polimérica específica. En resumen, bajo una salinidad de 59 081 mgL⁻¹ y una temperatura de envejecimiento de 70 °C, las microesferas poliméricas conservan la forma esférica en el agua de formación simulada. De todas formas, en la escala nanométrica, el análisis en STEM demuestra la pérdida de la forma esférica y la coalescencia. Los resultados indican que las esferas poliméricas se hincharon. Adicionalmente, las microesferas poliméricas presentan estabilidad y tolerancia a la salinidad.

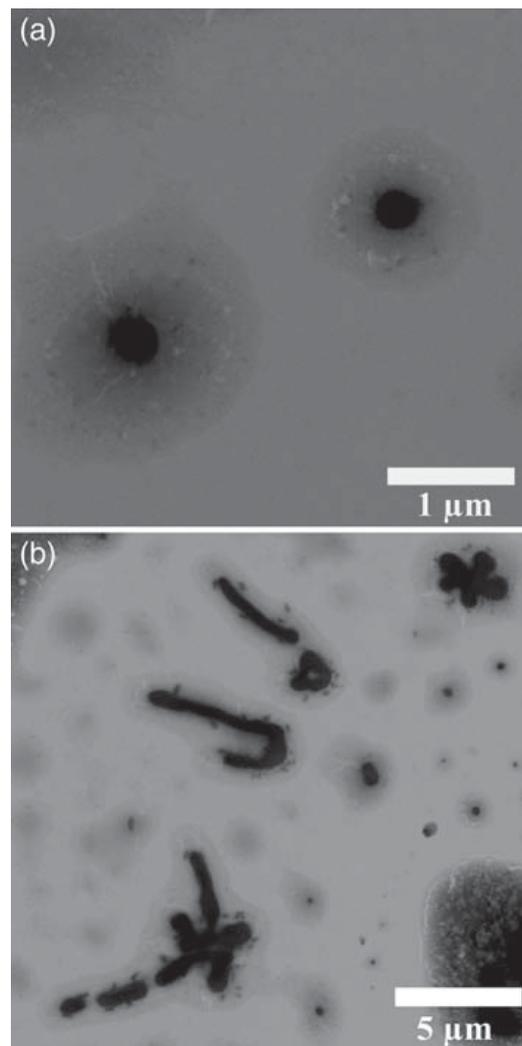


Figura 6. 9 Imágenes de STEM (a) partículas esféricas individuales y (b) estructuras fibrilares y aglomerados. Condiciones de envejecimiento: día 20, 70°C.

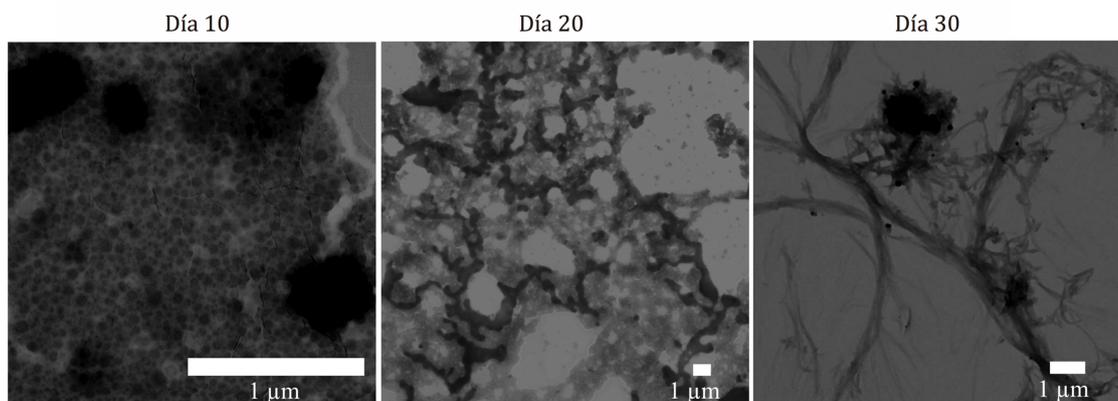


Figura 6. 10 Morfología de las esferas poliméricas. En el día 10, muestran estructura esférica. Mientras que en el día 20 se observa pérdida de la

estructura esférica y se forman agregados. En el día 30 se observa el incremento de estructuras fibrilares.

6.4.4 Influencia de la remoción de la fase oleosa y estabilizador dispersante en las propiedades de estabilidad es las esferas poliméricas en AD.

Los experimentos demuestran que el proceso de cambio de la morfología de las esferas poliméricas puede ser descrito como una absorción inicial de una cantidad de agua para hincharse y finalmente degradarse. La formación de estructuras fibrilares promueve el bloqueo de los canales de alta permeabilidad y las gargantas porales grandes[15]. Sin embargo, la formación de estructuras fibrilares con tamaño superior a los canales de permeabilidad de formación y gargantas porales durante el desplazamiento en el pozo pueden causar el bloqueo del pozo y consecuentemente, se realiza una recuperación de petróleo no efectiva. En este contexto, es necesario garantizar que las esferas poliméricas tengan estabilidad en el reservorio bajo condiciones severas. La literatura reporta que la pérdida de estabilidad de las esferas poliméricas está influenciada por aspectos como el contenido de estabilizador[23] y la relación entre los componentes del sistema polimérico[18]. Por esta razón, el propósito de esta sección es investigar el efecto de la remoción de la fase oleosa y los estabilizadores de las esferas poliméricas sobre la estabilidad del sistema. Los resultados se muestran en la Figura 6. 9.

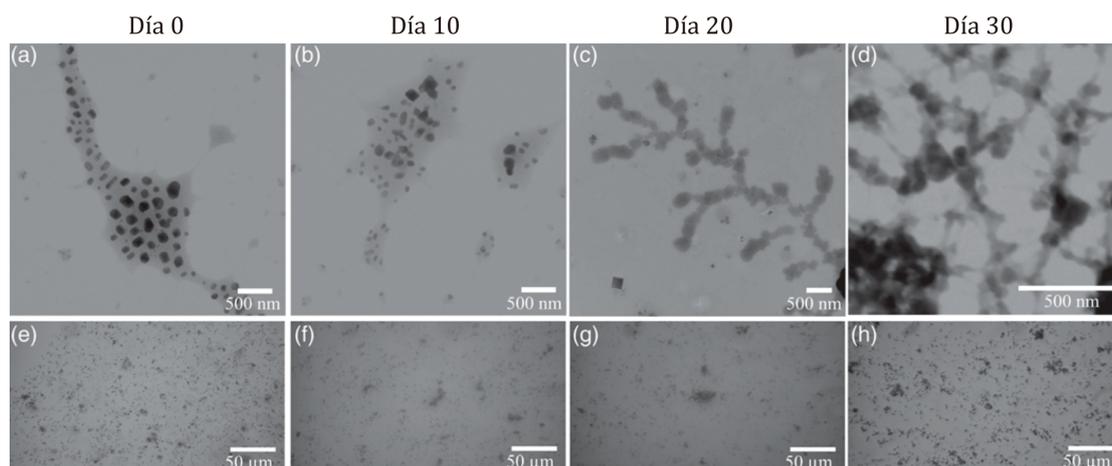


Figura 6. 11 Imágenes representativas de STEM y microscopía óptica de las esferas poliméricas envejecidas a 70 °C (a,e) día 0, (b,f) día 10, (c,g) día 20 y (d,h) día 30.

Las imágenes de STEM y de microscopía óptica mostraron que la remoción de la fase oleosa y del estabilizador dispersante conduce a un cambio considerable de la morfología. Al día 0 y 10, la remoción de ambas fases y estabilizador dispersante condujo a una pérdida dramática de la morfología esférica (Figura 6. 11a-f). En el día 20, se observó la coalescencia de las partículas. Consecuentemente, ocurrió la formación de estructuras fibrilares (Figura 6. 11c, g), este comportamiento se enfatizó el día 30 (Figura 6. 11d-h). Vale la pena mencionar que las estructuras fibrilares son observadas en la AD:70 (esferas poliméricas dispersadas y envejecidas a 70 °C) después de 20 días de envejecimiento. La remoción de la fase oleosa y el estabilizador dispersante provocó la pérdida de la estructura esférica. Este comportamiento está asociado con la coalescencia del polímero que genera las estructuras fibrilares.

Como se observó en la sección anterior, un aumento en el tiempo de envejecimiento promueve la formación de estructuras fibrilares. Pero, las esferas poliméricas sin fase oleosa y estabilizador presentan un grado más alto de deterioro en comparación a las esferas poliméricas con fase oleosa y estabilizador.

Como se evidencia en esta sección, la morfología esférica se pierde totalmente y se promueve la aglomeración del polímero. Además, este comportamiento incrementa con el progreso del tiempo de envejecimiento. Estos resultados subrayan la importancia del sistema polimérico que garantizará una eficiente recuperación mejorada de petróleo.

6.5 Conclusiones

Según los datos de caracterización, las esferas poliméricas muestran habilidad de hinchamiento ya que el tamaño de la partícula puede aumentar desde nanómetros a micrómetros. Adicionalmente, la caracterización evidenció que el aumento de temperatura, la remoción de la fase oleosa y estabilizador dispersante condujeron al deterioro substancial de la estructura de las esferas poliméricas; la tasa de eventos de coalescencia aumenta, causando una formación progresiva de estructuras fibrilares. Además, el dispositivo de microfluídica permitió el monitoreo del hinchamiento y las propiedades de estabilidad de una esfera polimérica específica. Este estudio estuvo dirigido a extender el conocimiento de la forma en que las nano/microesferas poliméricas se comportan dentro de un escenario al que pueden estar expuestas. Los datos provistos en este estudio ayudarán en la evaluación para la aplicación adecuada en cuanto a un corte de agua eficaz con respecto a las condiciones del reservorio.

6.6 Referencias

1. Campos, E., et al., *Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications*. European Polymer Journal, 2013. **49**(8): p. 2005-2021.
2. Wandrey, C.B., A.; Hardings, S.; Zuidam, N.J.; Nedovic, V., *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, ed. L. Springer Science + Business Media. 2010, New York.
3. Dewettinck, K. and A. Huyghebaert, *Fluidized bed coating in food technology*. Trends in Food Science & Technology, 1999. **10**(4): p. 163-168.
4. Anal, A.K.S., H., *Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery*. Trends in Food Science & Technology, 2007. **18**: p. 240.
5. Desai, K.G.H. and H. Jin Park, *Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients*. Drying Technology, 2005. **23**(7): p. 1361-1394.
6. Ahmad, Z., et al., *Polymeric micelles as drug delivery vehicles*. RSC Advances, 2014. **4**(33): p. 17028-17038.
7. Yu, Z., et al., *Synthesis and properties of amphiprotic polyacrylamide microspheres as water shutoff and profile control*. Journal of Applied Polymer Science, 2016. **133**(17).
8. Madaan, K., et al., *Dendrimers in drug delivery and targeting: Drug-dendrimer interactions and toxicity issues*. Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences, 2014. **6**(3): p. 139-150.
9. Beloqui, A., et al., *Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2016. **12**(1): p. 143-161.
10. Pessi, J., et al., *Microfluidics-assisted engineering of polymeric microcapsules with high encapsulation efficiency for protein drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2014. **472**(1): p. 82-87.

11. Arifin, D.Y., L.Y. Lee, and C.-H. Wang, *Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006. **58**(12): p. 1274-1325.
12. Ashrafi, H. and A. Azadi, *Chitosan-based hydrogel nanoparticle amazing behaviors during transmission electron microscopy*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016. **84**: p. 31-34.
13. Hamidi, M., et al., *Encapsulation of Valproate-Loaded Hydrogel Nanoparticles in Intact Human Erythrocytes: A Novel Nano-cell Composite for Drug Delivery*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011. **100**(5): p. 1702-1711.
14. Chu, Z., C.A. Dreiss, and Y. Feng, *Smart wormlike micelles*. *Chemical Society Reviews*, 2013. **42**(17): p. 7174-7203.
15. Tian, Q.Y., et al., *Research and Application of Nano Polymer Microspheres Diversion Technique of Deep Fluid*, in *SPE International Oilfield Nanotechnology Conference and Exhibition*. 2012, Society of Petroleum Engineers: Noordwijk, The Netherlands. p. 6.
16. Yang, H., et al., *Stability, rheological property and oil-displacement mechanism of a dispersed low-elastic microsphere system for enhanced oil recovery*. *RSC Advances*, 2017. **7**(14): p. 8118-8130.
17. Yao, C., et al., *Enhanced Oil Recovery Using Micron-Size Polyacrylamide Elastic Microspheres: Underlying Mechanisms and Displacement Experiments*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2015. **54**(43): p. 10925-10934.
18. Yu, X., et al., *Degradable cross-linked polymeric microsphere for enhanced oil recovery applications*. *RSC Advances*, 2015. **5**(77): p. 62752-62762.
19. Zhang, P., et al., *Preparation, swelling properties, and displacement performance of functional amphiphilic microspheres*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2015. **132**(10).
20. Xiangnan, Y.C., Y.; Diyu, Z.; Rui, X.; Ji, Z.; Cahoyue, L.; Xuenan, Z., *Feasibility Study on the Microspheres for Deep Profile Control Technology in High Permeability of High Temperature and High Salinity Reservoirs*. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 2016. **7**(5): p. 1.

21. Yao, C., et al., *Effect of Ionic Strength on the Transport and Retention of Polyacrylamide Microspheres in Reservoir Water Shutoff Treatment*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2017. **56**(28): p. 8158-8168.
22. Yao, C., et al., *Pore-Scale Investigation of Micron-Size Polyacrylamide Elastic Microspheres (MPEMs) Transport and Retention in Saturated Porous Media*. Environmental Science & Technology, 2014. **48**(9): p. 5329-5335.
23. Yao, C., et al., *Controllable preparation, rheology, and plugging property of micron-grade polyacrylamide microspheres as a novel profile control and flooding agent*. Journal of Applied Polymer Science, 2013. **130**(2): p. 1124-1130.
24. Li, J., et al., *Investigation on the Adaptability of the Polymer Microspheres for Fluid Flow Diversion in Porous Media*. Journal of Dispersion Science and Technology, 2014. **35**(1): p. 120-129.
25. Yao, C.L., G.; Li, L.; Gao, X., *Selectivity of Pore-Scale Elastic Microspheres as a Novel Profile Control and Oil Displacement Agent*. Energy & Fuels, 2012. **26**: p. 5092-5101.
26. Hu, M.G., J.; Yu, Y.; Cao, L.; Xu, Y., *Research Advances of Microencapsulation and Its Prospects in the Petroleum Industry*. Materials (Basel), 2017. **10**(4): p. 369.
27. Belgorosky, D., et al., *Cover Image, Volume 233, Number 9, September 2018*. Journal of Cellular Physiology, 2018. **233**(9): p. i-i.
28. KLayout. *High Performance Layout Viewer and Editor*. 2018 2019-09-10 [cited 2018; Available from: <http://www.klayout.de/index.php>
29. Guise, O., C. Strom, and N. Preschilla, *STEM-in-SEM method for morphology analysis of polymer systems*. Polymer, 2011. **52**(5): p. 1278-1285.
30. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nature methods, 2012. **9**(7): p. 676-682.

Capítulo 7

Conclusiones

En este trabajo de tesis se han explorado las propiedades del fotopolímero Flexcel que se utiliza comunmente en la industria gráfica. Alternativamente, se desarrolló una metodología para su aplicación en la fabricación de dispositivos de microfluídica. La versatilidad del fotopolímero posibilitó la fabricación de moldes en relieve y profundidad en una misma lámina de fotopolímero. Esta característica permitió la generación de microgotas y también la fabricación de dispositivos en multi-nivel que han ofrecido la estrategia para investigar la proliferación de células en suspensión.

Los resultados de los experimentos descritos en el capítulo 2 demostraron que el molde elaborado a partir del fotopolímero, transfiere fielmente el diseño de los microcanales a la réplica de PDMS. Además, consigue un tamaño mínimo de estructura de 25 μm y alto de estructuras en un rango comprendido entre 53 a 1500 μm . Se comprobó la estabilidad y durabilidad del molde. En esta investigación se determinó que existe una dependencia directa entre el tiempo de exposición a luz UVA y la rugosidad de la superficie que se atribuye a cambios en el grado de entrecruzamiento el material. Por otro lado, una prolongada exposición a la radiación UVA provoca una disminución en la altura del molde.

El fotopolímero Flexcel constituye una alternativa de menor costo que la resina SU-8 sobre oblea de silicio que se utiliza tradicionalmente. Este fotopolímero es ampliamente utilizado por la industria gráfica por lo que está disponible a nivel mundial. Consecuentemente, esta tecnología contribuye positivamente a la evolución en el campo de la microfluídica ya que posibilita a los laboratorios de países en vías de desarrollo para que pueden investigar en microfluídica sin necesidad de un cuarto limpio (cleanroom).

Resulta pertinente mencionar que los resultados del capítulo 2 fueron publicados en la revista científica indexada Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics[1, 2].

Los resultados del capítulo 3 demostraron que la variación tanto del tiempo de exposición a la luz UVA sobre el lado reverso del fotopolímero como del ancho del canal permiten controlar el espesor de las estructuras del molde. Consecuentemente, esta propiedad representa una herramienta poderosa para la obtención de moldes con amplia variedad de dimensiones y topologías en un área grande (1270 x 2062 mm²) alcanzando un tamaño mínimo de estructura de 10 µm y una altura de estructuras comprendida en el rango de 53 a 1500 µm. Esta investigación ha sido publicada recientemente en la revista RSC Advances[2].

El capítulo 4 estableció las condiciones óptimas para la adhesión y crecimiento celulares. Estas observaciones fueron publicadas en la revista Microelectronic Engineering [3]. Además, demostró la factibilidad de la utilización de los dispositivos de microfluídica para su aplicación en la producción de anticuerpos monoclonales. Las células adherentes fueron cultivadas exitosamente por dos meses. El microambiente al que las células adherentes estuvieron expuestas favoreció su desarrollo ya que se dosificó el medio de cultivo en ciclos a flujo constante lo cual permitió que los factores secretados por las células tengan un tiempo de residencia apropiado y que los productos del metabolismo sean removidos. Las células cultivadas en los dispositivos microfluídicos consiguieron productividades de 5.89 y 7.31 veces superiores a las obtenidas en condiciones *in vitro* en botellas de cultivo de cultivos celulares adherentes. Estos resultados fueron publicados en la revista Integrative Biology [4].

En el capítulo 5 se evaluaron diferentes arquitecturas de microcanales y se encontró el diseño que refleja la saturación residual de aceite deseada para los estudios de recuperación mejorada de petróleo a microescala. Este

modelo está provisto de dos zonas con diferentes permeabilidades que atrapan los ganglios de aceite desprendidos. Cabe recalcar que los resultados de esta investigación han sido publicados en la revista internacional *Matéria* [5] y la tecnología desarrollada ha servido luego para realizar otras publicaciones por el grupo de trabajo [7].

Los ensayos realizados con las técnicas de microscopía electrónica, microscopía de fuerza atómica, perfilometría y microscopía óptica explicados en el capítulo 6 indicaron el efecto del tratamiento térmico y del tiempo de envejecimiento sobre las propiedades de estabilidad e hinchamiento de las esferas poliméricas que se utilizan en la recuperación mejorada de petróleo como agente de bloqueo de las zonas de alta permeabilidad. Se determinó que el aumento de temperatura, la remoción de la fase oleosa y estabilizador dispersante causan un deterioro de la estructura de las esferas poliméricas. Esta investigación se encuentra publicada en la revista *Journal of Applied Polymer Science* [8]. Además, se generó un modelo para investigar sobre recuperación asistida de petróleo que fue transferido a empresas como NALCO, Inlab e YTEC.

Como conclusiones, se considera que este trabajo de tesis ha tenido un alto contenido interdisciplinario. Se han logrado desarrollar tecnologías de fabricación que han demostrado ser de gran utilidad en el campo de la microfluídica, no solo por la amplia variedad de aplicaciones, sino también por los bajos costos y numerosas ventajas previamente mencionadas. Los experimentos realizados han dado como resultado numerosas publicaciones y han proporcionado las herramientas para realizar nuevos trabajos, de los cuales se originaron otros 7 artículos, los cuales están próximos a enviar para evaluación. Por todo esto, se considera que este trabajo de tesis ha finalizado correctamente, alcanzando ampliamente los objetivos planteados a su inicio.

7.1 Referencias

1. Bourguignon, N., Attallah, C., Karp, P., Booth, R., Peñaherrera, A., Payés, C., Pérez, M., Helguera, G., Lerner, B., *Production of monoclonal antibodies in microfluidic devices*. Integrative Biology, 2018. **10**(3): p. 136-144.
2. Bourguignon, N., Olmos, C. M., Sierra-Rodero, M., Peñaherrera, A., Rosero, G., Pineda, P., . . . Lerner, B. (2018). Accessible and Cost-Effective Method of PDMS Microdevices Fabrication Using a Reusable Photopolymer Mold. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, *56*(21), 1433-1442. doi: 10.1002/polb.24726
3. Olmos, C., Peñaherrera, A., Rosero, G., Vizuite, K., Ruarte, D., Follo, M., Vaca, A., Arroyo, C., Debut, A., Cumbal, L., Pérez, M., Lerner, B., Mertelsmann, R. (2020). Cost-effective fabrication of photopolymer molds with multi-level microstructures for PDMS microfluidic device manufacture. *RSC Advances*, *10*, 4071-4079.
4. Olmos, C. M., Vaca, A., Rosero, G., Peñaherrera, A., Perez, C., de Sá Carneiro, I., . . . Lerner, B. (2019). Epoxy resin mold and PDMS microfluidic devices through photopolymer flexographic printing plate. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *288*, 742-748. doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.03.062>
5. Peñaherrera, A., Payés, C., Sierra-Rodero, M., Vega, M., Rosero, G., Lerner, B., . . . Pérez, M. S. (2016). Evaluation of cell culture in microfluidic chips for application in monoclonal antibody production. *Microelectronic Engineering*, *158*, 126-129. doi: <http://doi.org/10.1016/j.mee.2016.03.059>
6. Rosero, G., Olmos, C. M., Peñaherrera, A., Vaca, A., Vizuite, K., Debut, A., . . . Lerner, B. (2019). Influence of thermal treatment and aging time on the stability and swelling properties of nano/micron-sized polymeric spheres for improved oil recovery application. *Journal of Applied Polymer Science*, *136*(41), 48030. doi: 10.1002/app.48030

7. Betancur, S., Olmos, C., Pérez, M., Lerner, B., Franco, C., Riazi, M., Gallego, J., Carrasco-Marín, F., Cortés, F. (2020) *A microfluidic study to investigate the effect of magnetic iron core-carbon shell nanoparticles on displacement mechanisms of crude oil for chemical enhanced oil recovery*. Journal of Petroleum Science and Engineering. 184, 106589
8. Rosero, G., Peñaherrera, A., Olmos, C., Boschan, A., Granel, P., Golmar, F., Perez, M. (2018). Design and analysis of different models of microfluidic devices evaluated in Enhanced Oil Recovery (EOR) assays. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 23.