

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del grado Académico de

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DESARROLLO DE MÉTODOS MICROFLUÍDICOS PARA
LA GENERACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
FUNCIONALIZADAS PARA VEHICULIZAR ACTIVOS EN
PRODUCTOS FARMACÉUTICOS Y SUPLEMENTOS
NUTRICIONALES**

Autor:

Lic. Florencia MINETTI

Director: **Dr. Claudio L. A. BERLI**

Co-Director: **Dra. María Laura OLIVARES**

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC) CONICET-UNL

-2023-

AGRADECIMIENTOS

A mi director Claudio Berli y co-directora María Laura Olivares por su acompañamiento y guía durante estos años, por haberme orientado en el camino de la ciencia y la investigación, contagiándome siempre su entusiasmo, explicando con dedicación una y mil veces si era necesario generando un ambiente de calidez y respeto, y por ofrecer su ayuda incluso en aspectos personales.

Al Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química, al grupo de microfluídica y de Ingeniería de alimentos y biotecnología, a los investigadores y personal de apoyo por estar siempre al servicio y brindarme el espacio y los recursos para la realización del desarrollo experimental de la presente tesis.

Al grupo santafesino de microfluídica por las reuniones de intercambio de conocimiento, los congresos compartidos y por buscar la forma de trabajar en equipo pese a la diversidad de disciplinas y líneas de investigación que se abordan con la microfluídica.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por la formación de posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET) por el otorgamiento de la Beca Doctoral

A Alcides Nicastro de Lipomize SRL por el provechoso intercambio de información, por facilitarme la obtención del bioactivo y abrir sus puertas para recibirme en su laboratorio más de una vez.

Al Dr. Luciano Mengatto por el asesoramiento en los ensayos de liberación y la calidez en su trato siempre.

A los miembros del jurado de la presente tesis, por su tiempo y dedicación para evaluar el manuscrito y realizar aportes.

A mis compañeros de oficina y laboratorio por el tiempo compartido, las risas, la ayuda brindada, su buena predisposición y por los momentos laborales y extralaborales compartidos.

A mis colegas y amigas de la cátedra de nutrición en situaciones patológicas de la FBCB por brindarme el apoyo y flexibilidad cuando los tiempos se me complicaban.

A mis padres Victor y Norma, por alentarme a seguir creciendo e inculcarme los principios de trabajo, responsabilidad y esfuerzo que requieren cumplir un objetivo en la vida.

A mi hermana Virginia por el apoyo incondicional en todos los aspectos de la vida desde siempre, tan importante para mí.

A mis amigos y amigas de la vida que aunque no entendían del todo lo que les contaba se entusiasmaban, me alentaban y se interesaban tanto como yo.

¡Eternamente agradecida a todos!

Aportes Científico-Tecnológicos

- A Giorello, F Minetti, A Nicastro, CLA Berli (2020). The effect of gravity on microfluidic flow focusing. *Sensors and Actuators: B. Chemical* (307):27595. doi:<https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127595>
- F Minetti, A Giorello, ML Olivares, CLA Berli (2020). Exact solution of the hydrodynamic focusing driven by hydrostatic pressure. *Microfluidics and Nanofluidics* (24):15. doi:<https://doi.org/10.1007/s10404-020-2322-y>
- F Minetti, LN Mengatto, ML Olivares, CLA Berli (2022). Generation of curcumin-loaded albumin nanoparticles by using off-the-shelf microfluidics driven by gravity. *Food Research International*, 111984. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111984>

INDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	11
I. Introducción	13
1.1. Tecnologías de encapsulación y aplicaciones	14
1.2. Componentes principales de los sistemas de encapsulación	15
1.2.1. Biopolímeros utilizados para la producción de nanopartículas	15
1.2.2. Compuestos Bioactivos	17
1.3. Tipo de sistemas para nanoencapsulación	18
1.3.1. Sistemas basados en lípidos	19
1.3.2. Sistemas basados en proteínas y polisacáridos	20
1.4. Métodos de generación de nanopartículas	20
1.5. Microfluídica	27
1.5.1. Introducción	27
1.5.2. Fundamentos	28
1.5.3. Técnicas de fabricación de los dispositivos	30
1.5.4. Sistemas de bombeo	33
II. Objetivos	34
II.1. Objetivo general	35
II.2. Objetivo específico	35
Capítulo 1: Difusión en coflujos microfluídicos	36
1.1. Introducción	37
1.1.1. Mezcla difusiva en la microescala	37
1.2. Objetivos	42
1.3. Materiales y métodos	42
1.3.1. Fabricación de los dispositivos	42
1.3.2. Soluciones de trabajo	44
1.3.3. Bombeo de los líquidos	44
1.3.4. Análisis de difusión transversal	45
1.3.5. Síntesis de cristales	46
1.3.6. Desarrollo de enfoque hidrodinámico	46
1.4. Resultados y discusión	46
1.4.1. Análisis de coflujo en chip de juntura en Y	46
1.4.2. Síntesis de cristales	51
1.4.3. Enfoque hidrodinámico	51
1.5. Conclusiones parciales	52
Capítulo 2: Efecto de la gravedad sobre el enfoque hidrodinámico	54
2.1. Introducción	55
2.2. Objetivos	57
2.3. Desarrollo experimental	57
2.3.1. Materiales	57

2.3.2.	Fabricación del dispositivo microfluídico	57
2.3.3.	Fluidos de trabajo	58
2.3.4.	Configuración experimental	58
2.4.	Resultados y discusión	59
2.4.1.	Planteo del problema	59
2.4.2.	Modelo teórico	62
2.4.3.	Predicciones del modelo	65
2.4.4.	Comparación de la predicción del modelo con los datos experimentales	68
2.4.5.	Consejos de diseño para experimentos de enfoque de flujo	70
2.5.	Conclusiones parciales	71
Capítulo 3: Desarrollo de un sistema de enfoque hidrodinámico controlado por presión hidrostática.		72
3.1.	Introducción	73
3.2.	Objetivos	73
3.3.	Desarrollo del modelo matemático	74
3.3.1.	Caudales en función de la altura de los fluidos	74
3.3.2.	Ancho de enfoque en función de la altura de los fluidos	77
3.4.	Comprobación experimental del modelo matemático	80
3.4.1.	Materiales	80
3.4.2.	Fabricación de dispositivos microfluídicos	80
3.4.3.	Sistema de presión hidrostática	81
3.4.4.	Medición del ancho de enfoque hidrodinámico	82
3.5.	Resultados y discusión	82
3.5.1.	Estabilidad del coflujo	82
3.5.2.	Caudales en función de la altura de los fluidos	83
3.5.3.	Ancho de enfoque en función de la altura de los fluidos	87
3.5.4.	Cuantificación de los efectos dependientes del tiempo sobre los caudales	90
3.5.5.	Ejemplo de aplicación: Mezcla difusiva y reacción de color	92
3.6.	Conclusiones parciales	94
Capítulo 4: Generación microfluídica de nanopartículas de albúmina cargadas con curcumina		96
4.1.	Introducción	97
4.1.1.	α -lactoalbúmina	99
4.1.2.	Curcumina	101
4.2.	Objetivos	102
4.3.	Fundamentos de la técnica microfluídica	103
4.3.1.	Tiempo de mezcla en el flujo coaxial	103
4.3.2.	Regímenes de flujo para nanoprecipitación	105
4.3.3.	Caudales en flujo impulsado por gravedad	106
4.4.	Materiales y métodos	107
4.4.1.	Químicos y materiales	107
4.4.2.	Dispositivo microfluídico empleado	107
4.4.3.	Preparación de las soluciones	108
4.4.4.	Preparación de las NPs	108

4.4.5.	Caracterización del tamaño y la forma de las NPs	109
4.4.5.1.	Dispersión de luz dinámica (DLS)	109
4.4.5.2.	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	109
4.4.5.3.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	110
4.4.6.	Caracterización de la estructura de nanopartículas	110
4.4.7.	Eficiencia de atrapamiento de CCM (EE)	110
4.4.8.	Rendimiento de NPs (RNPs)	111
4.4.9.	Liberación de CCM <i>in vitro</i>	111
4.4.10.	Actividad antioxidante (AAO)	111
4.4.11.	Análisis estadístico	113
4.5.	Resultados y discusión	113
4.5.1.	Generación microfluídica de NPs	113
4.5.2.	Condiciones críticas de flujo para la generación de NPs	115
4.5.3.	Condiciones críticas de reactivos para la generación de NPs	116
4.5.4.	Morfología de las NPs generadas	117
4.5.5.	Eficiencia de atrapamiento de CCM y rendimiento de NPs	119
4.5.6.	Análisis espectroscópico de la estructura de las NPs	120
4.5.7.	Pruebas de liberación de CCM <i>in vitro</i>	122
4.5.8.	Actividad antioxidante (AAO)	123
4.6.	Conclusiones parciales	125
Conclusión		127
Apéndices		130
A.1.	Curva de calibrado para cuantificación de CCM	131
A.2.	Curva de calibrado para cuantificación de α -LA	132
A.3.	Curva de calibrado para TEAC	133
Bibliografía		134

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

SÍMBOLOS

Símbolo	Definición
v	Velocidad promedio de un flujo
l	Longitud del canal de reacción en el dispositivo microfluídico
D	Coefficiente de difusión
Re	Número de Reynolds
Pe	Número de Péclet
ρ	Densidad
μ	Viscosidad
pH	-Logaritmo de la concentración de iones de hidrógeno
X_D	Distancia media recorrida de una molécula por difusión
t	Tiempo
k_B	Constante de Boltzmann
T	Temperatura
r_p	Radio de una partícula
C_0	Concentración inicial de moléculas
$C_{(x,t)}$	Concentración de moléculas a una distancia x transcurrido un tiempo t
erf	Función error
∂	Derivada parcial
w	Ancho de un canal rectangular
d	Espesor/diámetro de un canal
w_s	Ancho de la corriente enfocada
h	Altura de la columna de líquido
Q	Caudal
q	Caudal proporcionado por cada columna de líquido
I	Intensidad de color
A	Área transversal del canal
g	Aceleración de la gravedad
q_G	Caudal gravitacional
R	Resistencia hidrodinámica
P	Presión
r	Radio de la corriente enfocada en el flujo coaxial
r_0	Radio de un microcanal cilíndrico
L	Longitud del reóstato en el sistema de bombeo por gravedad
t_F	Tiempo de flujo característico
l_{mix}	Longitud de mezcla
E_{ABTS}	Eliminación del radical ABTS

ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
PMMA	Poli(metacrilato de metilo)
FRR	<i>Flow rate ratio</i>
OCA	Lámina adhesiva ópticamente transparente
NPs	Nanopartículas
CCM	Curcumina
α -LA	Alfa lactoalbúmina
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
SEM	Microscopía electrónica de barrido
DLS	Dispersión de luz dinámica
FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Furrier
EE	Eficiencia de atrapamiento.
RNPs	Rendimiento de nanopartículas
PBS	Solución de <i>buffer</i> fosfato
AAO	Actividad antioxidante
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente a Trolox

RESUMEN

Las formulaciones de nanopartículas (NPs) con propiedades funcionales y fisicoquímicas particulares han despertado un gran interés en el sector alimentario (cuyas aplicaciones son relativamente recientes) y cada vez más en la industria farmacéutica, debido a que posibilitan el transporte y liberación de principios activos, en la búsqueda de una administración adecuada de nutrientes o fármacos específicos. El creciente interés en el desarrollo de alimentos funcionales y terapias dirigidas a sitios específicos, ha motivado el uso de novedosas técnicas para el diseño y preparación de micro y NPs. Los métodos de elaboración convencionales presentan grandes desafíos con respecto al control y reproducibilidad del proceso. La técnica de nanoprecipitación se ha utilizado ampliamente para la preparación de NPs poliméricas destinadas a varias aplicaciones biomédicas, agrícolas, alimentarias y cosméticas. Tradicionalmente, esta técnica utiliza el goteo de un solvente orgánico en una solución acuosa con el polímero encapsulante bajo agitación. Debido a que la nucleación comienza cuando los componentes aún no están distribuidos de manera homogénea, se obtiene una distribución amplia de tamaño de NPs y gran variabilidad del producto final. Como alternativa, la tecnología microfluídica permite formar partículas homogéneas, debido a la capacidad de controlar los parámetros críticos del proceso de una manera más simple y directa que en los métodos tradicionales. Debido a la naturaleza continua del proceso y a las condiciones de flujo controlado, la eficacia de la nanoprecipitación mejora drásticamente. Al no requerir energía adicional, no se desarrollan fluctuaciones de temperatura durante el proceso, lo cual podría alterar a ciertos bioactivos sensibles a la presión y temperatura. En particular, la técnica microfluídica que permite el autoensamblaje y nanoprecipitación controlada es el enfoque hidrodinámico, el cual consiste en el coflujo de dos o más corrientes de líquidos con los precursores de las NPs. Las corrientes laterales enfocan el flujo central en una corriente delgada, lo que permite la rápida difusión de las moléculas a través de la corriente central, desencadenando la generación de NPs.

En este contexto, en la presente Tesis se diseñaron y fabricaron dispositivos de microfluídica dirigidos a la producción de NPs, para vehicular bioactivos en productos farmacéuticos y suplementos nutricionales. Además del diseño de los dispositivos, también se investigó el sistema de bombeo más conveniente para la inyección de los fluidos. El control preciso del ancho de la corriente enfocada es fundamental para aplicar la nanoprecipitación en microfluídica, por lo que tanto la estabilidad del flujo como el manejo preciso de las corrientes son esenciales. Para este propósito, en la presente Tesis se desarrolló una plataforma de bombeo de líquidos utilizando la

presión hidrostática. Un aspecto importante a destacar es que las propiedades fisicoquímicas de los fluidos de trabajo impactan en la presión proporcionada por las columnas hidrostáticas, así como en la formación del patrón del enfoque hidrodinámico. Para ambos fenómenos, se plantearon modelos matemáticos simples que predicen el ancho de la corriente enfocada y el caudal obtenido en función de la altura de la columna de líquido, considerando ciertos parámetros críticos de operación. Se demostró que sólo se puede lograr un patrón de enfoque hidrodinámico uniforme si la posición del flujo en el chip se encuentra alineada con el campo gravitacional, en la misma dirección o en la dirección opuesta, y se cuantificaron los efectos en cada uno de los casos.

Finalmente, con las herramientas desarrolladas, se llevó a cabo la elaboración y caracterización de nanopartículas de α -lactoalbúmina (α -LA) cargadas con curcumina (CCM) como bioactivo. Se utilizó, un dispositivo de flujo coaxial que desarrolla un flujo de tipo núcleo-vaina y una plataforma robusta y de rápida configuración para flujos impulsados por la gravedad. Las NPs obtenidas presentaban un tamaño uniforme, el cual fue medido por dispersión dinámica de luz. Asimismo, fue posible controlar el diámetro de las mismas ajustando los caudales. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido y electrónica de transmisión mostraron que las NPs eran esféricas y presentaban bordes bien definidos. Los resultados de espectroscopía infrarroja sugieren que el mecanismo de unión de α -LA en las NPs es a través de enlaces de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos. Por su parte, los ensayos *in vitro* demostraron que las NPs podían liberar alrededor del 70% de la CCM atrapada. Además se comprobó que la CCM liberada desde las NPs conserva su propiedad funcional antioxidante; se observó que, combinada en NPs con α -LA pretratada térmicamente, el efecto antioxidante fue aún mayor. Se concluye que la metodología microfluídica propuesta es una eficiente vía de elaboración de NPs para la encapsulación de principios activos. A su vez, es posible paralelizar la técnica para multiplicar el rendimiento, lo cual es muy necesario para la elaboración de compuestos a escala industrial.

ABSTRACT

The formulation of nanoparticles (NPs) with particular functional and physicochemical properties has great interest for applications in both the food sector (relatively recent) and increasingly in the pharmaceutical industry, because they enable the transport and release of active ingredients, in search for an adequate administration of specific nutrients or drugs. The growing interest in the development of functional foods and drug therapies directed at specific sites has motivated the use of novel techniques for the design of micro and NPs, considering that conventional production methods present several challenges regarding the control and reproducibility of the process. Nanoprecipitation has been widely used for the preparation of polymeric NPs intended for various biomedical, agricultural, food, and cosmetic applications. Traditionally, the technique is carried out by dripping an organic solvent into an aqueous solution with the encapsulating polymer under agitation. As nucleation starts when the components are not yet homogeneously distributed, the NPs present a broad size distribution and high variability of the final product. As an alternative, microfluidics enables the preparation of homogeneous NPs, since the control of critical process parameters is much more accurate than in traditional methods. In fact, the efficiency of the nanoprecipitation is drastically improved due to the continuous nature of the process and controlled flow conditions. Since it does not require additional energy, temperature fluctuations during the process are avoided, which could alter certain pressure and temperature sensitive bioactives. In particular, the microfluidic technique that allows self-assembly and controlled nanoprecipitation is the hydrodynamic flow focusing, which involves the coflow of two or more liquid streams containing the NPs precursors in solution. The side streams squeeze the central current to a very narrow stream, allowing rapid diffusion of the molecules that trigger NPs generation.

In this context, this Thesis deals with the design and manufacture microfluidic devices aimed at the production of NPs to transport bioactives in pharmaceutical products and nutritional supplements. In addition to the design of the devices, it was also investigated the most suitable pumping system for the injection of the working fluids. Controlling of the width of the focused stream is essential for the implementation of microfluidic nanoprecipitation, therefore both flow stability and precise handling of streams are essential. For this purpose, a platform for controlled hydrodynamic flow focusing driven by hydrostatic pressure was implemented. An important aspect is that the physicochemical properties of the working fluids impact on the pressure provided by the hydrostatic columns, as well as on the hydrodynamic focusing pattern. For both phenomena, simple mathematical models were developed to predict the width of the focused stream as a function of the height of the liquid columns, considering certain

critical operating parameters. It was found that a uniform hydrodynamic flow focusing pattern can be achieved only if the flow position in the chip is aligned with the gravitational field, either in the same or the opposite direction, and the effects in each case were quantified.

Finally, the generation and characterization of curcumin-loaded α -lactalbumin NPs was carried out, through the combination of a coaxial flow device that develops a core-sheath type flow and a robust platform to handle gravity-driven flows. For each predefined fluid dynamic condition, the obtained NPs have uniform size, as measured by dynamic light scattering. Effectively, microfluidic nanoprecipitation allows one to vary the diameter of NPs by adjusting the flow rates. Both scanning and transmission electron microscopy images showed that NPs were spherical and presented well-defined borders. The results of infrared spectroscopy suggest that the binding mechanism of α -lactalbumin inside the NPs is through hydrogen bonds and hydrophobic linkages. In addition, *in vitro* assays demonstrated that the NPs were able to deliver about 70% of the loaded curcumin. In addition, it was verified that the curcumin released from the NPs conserves its antioxidant functional property; it was observed that, in NPs with thermally pretreated α -LA, the antioxidant effect was even greater. It is concluded that the proposed microfluidic methodology is an efficient way of elaboration of NPs for the encapsulation of active ingredients. In addition, it is possible to parallelize the technique to multiply the yield, which is required for large-scale productions.

I. Introducción

I.1. Tecnologías de encapsulación y aplicaciones

Las tecnologías de encapsulación han sido objeto de intenso estudio en los últimos años. Este proceso implica la inclusión de una sustancia (agente activo) dentro de un material que actúa como transportador y protector (Ray et al., 2016). La sustancia encapsulada, puede ser llamada centro, relleno, fase activa, fase interna o carga útil, mientras que la sustancia que encapsula al agente activo se llama capa, membrana, cápsula, material de transporte, fase externa o matriz (Ray et al., 2016). Según el diámetro de las partículas resultantes, se las considera micropartículas cuando su tamaño se encuentra en el rango de 1–1000 μ m o nanopartículas (NPs) cuando su tamaño es menor a 1000nm. Por su parte, la nanotecnología comprende la manipulación de materiales en dimensiones de aproximadamente 1 a 100nm (Weiss et al., 2006). Algunos autores se reservan el término "nanopartículas" para cortes de tamaño específico, por ejemplo para sistemas efectivos de liberación de fármacos o nutraceuticos, no debe exceder los 100 o 200nm (Langer et al., 2003; Rizvi & Saleh, 2018), por lo que el límite superior no está bien definido. El tamaño resultante determina fuertemente sus propiedades funcionales, muchas de las cuales están asociadas con su alta relación superficie/volumen, mejor estabilidad a la sedimentación y agregación, mayor solubilidad y mayores tasas de penetración a través de barreras biológicas (Davidov-Pardo et al., 2015).

Los compuestos a ser encapsulados pueden ser muy variados, incluyendo minerales, colorantes, prebióticos, probióticos, carotenoides, fitoesteroles, péptidos bioactivos, saborizantes, antioxidantes, aceites esenciales, enzimas, drogas e incluso fertilizantes. De esta manera, los activos son protegidos de condiciones desfavorables como la exposición a la luz, oxígeno, humedad, calor u otras condiciones extremas, mejorando su estabilidad y manteniendo la viabilidad. Asimismo, los bioactivos pueden ser liberados en forma controlada en el sitio de interés (Devi et al., 2017).

En la industria farmacéutica, la encapsulación de drogas ha sido utilizada para varias aplicaciones y en la actualidad continúa en plena expansión. Sus principales aplicaciones son evitar la evaporación de sustancias volátiles, proteger sustancias sensibles a la luz y humedad como las vitaminas, para integrar sustancias incompatibles en un mismo sistema, para ocultar olores y sabores desagradable de algunos medicamentos, entre otros usos (Robles-García et al., 2016; Sozer & Kokini, 22009). En cambio, las aplicaciones de estas tecnológicas en la agricultura y en el sector alimentario son relativamente recientes (García et al., 2010).

Respecto a su empleo en la industria de alimentos, puede afirmarse que las aplicaciones se han incrementado ampliamente debido a la conveniente protección

que brinda esta técnica a los materiales encapsulados frente a factores desfavorables a los que están expuestos, otorgándoles mayor estabilidad y durabilidad. De manera que en la formulación de un producto, las sustancias logren resistir a las condiciones de procesamiento, almacenamiento, transporte, comercialización, etc. De este modo, se mejoran o conservan las características organolépticas y el valor nutritivo del alimento. En tal sentido, la encapsulación es una herramienta sumamente útil para diseñar ingredientes que puedan ser utilizados en el desarrollo de alimentos funcionales (Sozer & Kokini, 2009).

Uno de los principales atractivos de la encapsulación mediante el uso de micro y NPs radica en su capacidad de controlar el destino biológico de los nutrientes, nutraceuticos y fármacos después de la administración, para ser liberados en el sitio requerido en la cantidad precisa o con la cinética óptima (Devi et al., 2017).

Existen diferentes factores que afectan negativamente la biodisponibilidad y consecuentemente la eficiencia de un agente bioactivo. Estos factores pueden ser propios de la naturaleza del bioactivo, como es el caso de una baja solubilidad, inherentes al proceso de elaboración del producto, o bien debido a factores posteriores a su administración, por ejemplo una baja permeabilidad en el tracto gastrointestinal o degradación/metabolización de los mismos (Joye & McClements, 2014).

Para lograr las funcionalidades antes mencionadas, en aplicaciones biológicas o biomédicas resulta imperativo asegurar las características fisicoquímicas del sistema encapsulante tales como el tamaño, la polidispersidad y la carga. Por lo tanto, el proceso de fabricación de la partícula debe ser robusto y reproducible. En tal sentido, los dispositivos microfluídicos tienen propiedades únicas que permiten tener un exhaustivo control del proceso de producción (Duncanson et al., 2012; J. Kim et al., 2014; Othman et al., 2015; Pessoa et al., 2017). Por lo tanto, en este trabajo de tesis se propone desarrollar métodos microfluídicos para la producción de NPs de biopolímeros, para vehicular activos en productos farmacéuticos y nutricionales.

I.2. Componentes principales de los sistemas de encapsulación

I.2.1. Biopolímeros utilizados para la producción de nanopartículas

La característica más atractiva de las tecnologías de encapsulación surge de la versatilidad de los agentes activos, materiales poliméricos y la posibilidad de ajustar el tamaño de las partículas para la aplicación requerida. Cuando se diseña un proceso de encapsulación, la selección del material de recubrimiento es un paso crucial. Depende de las propiedades deseadas de la partícula como ser tamaño, carga, características superficiales, permeabilidad y degradabilidad, de las características del bioactivo de interés: su polaridad, solubilidad y estabilidad, y de las condiciones del

medio circundante es decir, pH, fuerza iónica, calidad del disolvente y temperatura. Se puede tratar de un único polímero o pueden mezclarse a fin de mejorar los mecanismos de liberación, la estabilidad o cualquier propiedad para la aplicación específica. Se debe tomar en consideración también el método que se va a emplear para la encapsulación y la economía del proceso y que las características del producto final conserven las propiedades deseadas (Lopretti et al., 2007).

El uso de micro y NPs para fines alimentarios y farmacéuticos implica que deben ser desarrolladas empleando ingredientes considerados seguros (GRAS, *generally recognized as safe*) y utilizar operaciones de procesamiento económicas y seguras. Una de las estrategias más prometedoras es el uso de biopolímeros, los cuales presentan varias ventajas: son biodegradables, biocompatibles, están naturalmente presentes en seres vivos, no son tóxicos, incluso algunos tienen interesantes propiedades mucoadhesivas (Goycoolea et al., 2009; Kurukji et al., 2016).

Uno de los biopolímeros más comunes utilizados son los *polisacáridos*, un grupo heterogéneo de polímeros resultantes de la condensación de monómeros unidos por distintos enlaces glucosídicos (Badui Dergal, 2006). Algunos polisacáridos utilizados para la formación de NPs por microfluídica son el alginato (K. Kim et al., 2015), quitosano (Pessoa et al., 2017), carragenato (Marengo et al., 2021), ácido hialurónico (Bicudo & Santana, 2012), entre otros. Son típicamente baratos, fácilmente disponibles, biocompatibles, tienen baja toxicidad y sus propiedades funcionales como la gelificación pueden ajustarse mediante modificaciones físicas, químicas o enzimáticas (Joye & McClements, 2014).

Los *lípidos* son otro grupo de biopolímeros utilizados para transportar compuestos bioactivos, tienen gran consideración como sistema de administración de fármacos y es una tecnología innovadora en la industria de alimentos. El cuerpo los absorbe naturalmente, lo que facilita el transporte de compuestos bioactivos a través del tracto gastrointestinal. Químicamente, son un grupo de compuestos constituidos por carbono, hidrógeno y oxígeno que integran cadenas hidrocarbonadas alifáticas o aromáticas y pueden contener fósforo y nitrógeno (Badui Dergal, 2006).

Los lípidos utilizados para preparar nanoestructuras incluyen lípidos simples como triacilgliceroles, ácidos grasos, colesterol, lípidos derivados como fosfolípidos, glicolípidos y esfingolípidos y ceras (Sharma & Baldi, 2018). Las propiedades físicas y la estructura molecular de los lípidos afectan la dimensión de las partículas y la estabilidad de las dispersiones durante la formación y el almacenamiento, y afecta la tasa de liberación de los bioactivos. Comúnmente se suelen combinar lípidos para regular ciertas características, por ejemplo, un lípido sólido y un lípido líquido (o aceite) (Nobari Azar et al., 2020).

Las *proteínas* son biopolímeros ampliamente usados que exhiben una diversidad de propiedades funcionales, físico-químicas y biodegradabilidad que las hacen atractivas para numerosas aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Croguennec et al., 2017). Están formadas por cadenas de aminoácidos que se pliegan de determinadas maneras formando una gran variedad de estructuras diferentes (espiral aleatoria o al azar, fibrosa y globular). La estructura y funcionalidad es dependiente no solo de la secuencia de aminoácidos, sino también de su entorno como la temperatura, presión, tipo de solvente, pH y fuerza iónica. Estos factores posibilitan modificaciones de sus propiedades que permiten una mejor interacción de las proteínas entre sí o con otras moléculas de su entorno como compuestos bioactivos, agentes reticulantes o de recubrimiento a través de varios tipos de interacciones covalentes, de Van Der Waals, estéricas, de hidrógeno, hidrofóbicas y/o electrostáticas (Walstra, 2009).

Existe una gran cantidad de proteínas de diferentes orígenes y con propiedades moleculares, fisicoquímicas y funcionales para la generación de NPs. Las proteínas animales que se utilizan ampliamente para la formación de partículas son por ejemplo, caseína, proteína de suero, gelatina, proteínas de huevo. También hay disponibles varias proteínas aisladas de vegetales como de trigo, maíz (gliadina y zeína), de soja y guisantes (Davidov-Pardo et al., 2015).

I.2.2. Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos pueden ser de origen natural (plantas, animales, microorganismos terrestres o acuáticos) o sintéticos, obtenidos mediante procesamiento parcial o total. Estos compuestos tienen la capacidad de interactuar con uno o más componentes del tejido vivo ejerciendo efectos beneficiosos para la salud, entre ellos: antiinflamatorio, antioxidante, hipolipemiente, antihipertensivo y regulador de la expresión de una gran variedad de genes (de Souza Simões et al., 2017; Guaadaoui et al., 2014). Actualmente, existe una gran y creciente cantidad de evidencia científica que demuestra la utilidad de varios compuestos activos, los cuales ofrecen diversos beneficios en diferentes situaciones de salud y enfermedad, entre ellos: antienvjecimiento, prevención de enfermedades cardiovasculares y protección contra enfermedades crónicas como la diabetes mellitus, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas (Martín Ortega & Segura Campos, 2019). Esto ha impulsado el interés de las investigaciones en el desarrollo de métodos novedosos para la elaboración de ingredientes nutricionales y/o alimentos funcionales. La incorporación de compuestos bioactivos por ejemplo, antioxidantes como polifenoles, minerales, vitaminas, fitoesteroles, carotenoides, péptidos, prebióticos, probióticos, ácidos grasos,

en diversas matrices alimentarias y formulaciones farmacológicas mediante técnicas de encapsulación es una tarea desafiante debido a la mala biodisponibilidad, solubilidad y estabilidad de algunos de los compuestos. La encapsulación no solo protege el agente con actividad biológica sino que también reduce su reactividad con factores externos, reduciendo así su tasa de transferencia y controlando el perfil de liberación (Khan et al., 2020).

I.3. Tipo de sistemas para nanoencapsulación

Se han investigado varios sistemas de diferentes morfologías por su potencial para aplicaciones en el campo de la micro y nanoencapsulación (**Figura 1**) (de Souza Simões et al., 2017; Jafari & McClements, 2017). Estas morfologías tienen una influencia directa en la estabilidad y biodisponibilidad de los materiales encapsulados basadas en su disposición de materiales de núcleo y cubierta.

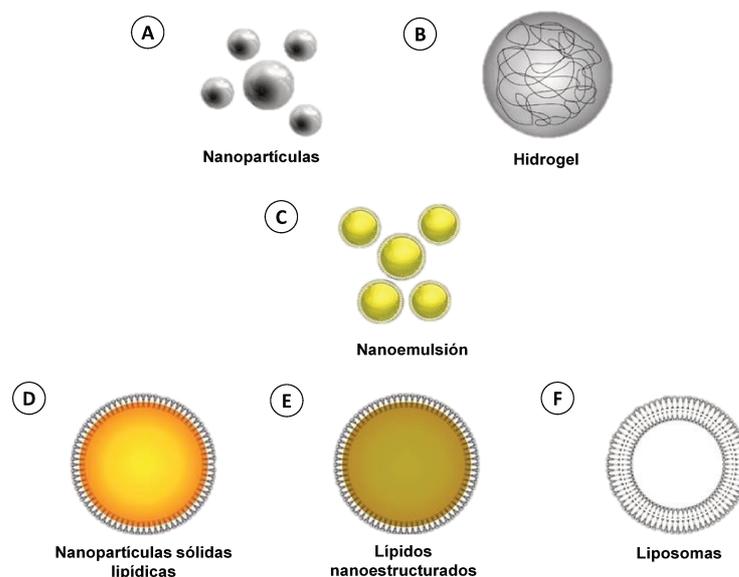


Figura 1. Sistemas de nano-administración que pueden usarse para la vehiculizar compuestos bioactivos (figura modificada de de Souza Simões et al., 2017).

Existe gran variedad de sistemas encapsulantes, que a fines prácticos se podrían categorizar en función del material encapsulante como sistemas basados en lípidos y sistema basados en polímeros como polisacáridos y proteínas (Tamjidi et al., 2013). Los principales sistemas de administración de base biológica desarrollados para tal fin se describen brevemente a continuación:

I.3.1. Sistemas basados en lípidos

En esta categoría se encuentran principalmente los liposomas, las nanoemulsiones y NPs lipídicas sólidas.

Liposomas: Son vesículas esféricas compuestas por una o más bicapas lipídicas, como resultado de la emulsión de lípidos naturales o sintéticos con alto punto de fusión y en combinación con un tensoactivo en un medio acuoso (Nsairat et al., 2022). Tienen naturaleza anfifílica y por tanto, pueden usarse para encapsular tanto ingredientes alimentarios y como fármacos de diferentes polaridades para crear una barrera física y proteger los bioactivos de condiciones externas. Los compuestos polares pueden quedar atrapados en el núcleo acuoso de los liposomas, en cambio los compuestos no polares tendrán más afinidad por las cadenas no polares de los fosfolípidos que forman las bicapas del liposoma (de Souza Simões et al., 2017; Esposito et al., 2021).

Nanoemulsiones: Estos sistemas se caracterizan por ser dispersiones metaestables de un fluido en otro inmiscible formando gotitas de 100nm o menos, de agua en aceite (W/O) o aceite en agua (O/W). La adición de uno o más surfactantes ayuda a evitar la agregación y coalescencia de las gotas en el proceso de preparación y almacenamiento, los emulsionantes o surfactantes se adsorben en la superficie de las gotas del fluido disperso y reducen la tensión interfacial. Dado que la mayoría de las propiedades físicas de estos materiales dependen del tamaño, es necesario controlar su monodispersidad, lo cual mejora a su vez la estabilidad de la emulsión. Los agentes bioactivos pueden ser incluidos en las gotas, ya sea en la región interfacial o dentro de las mismas en la fase continua, resultando prometedores como herramienta de suministro de fármacos, nutracéuticos y otros ingredientes bioactivos alimentarios (Y. Feng & Lee, 2019; H. Liu et al., 2021; Rangan et al., 2016).

Nanopartículas lipídicas sólidas: Representan un sistema compuesto por lípidos que es capaz de cristalizar total o parcialmente a la temperatura final, de aplicación tanto a temperatura ambiente como corporal. Estas partículas están en el rango de tamaño de 50 a 1000 nm (de Souza Simões et al., 2017). El lípido sólido utilizado forma un material de matriz para la encapsulación de bioactivos e incluye mono-, di- o triglicéridos, ácidos grasos y mezclas complejas de glicéridos con los componentes bioactivos como parte de la matriz lipídica. Esta matriz se estabiliza por una mezcla de tensioactivos o polímeros. Las NPs lipídicas sólidas fueron diseñadas para combinar

características de partículas poliméricas, liposomas y emulsiones (García-Pinel et al., 2019; Tamjidi et al., 2013).

I.3.2. Sistemas basados en proteínas y polisacáridos.

Estos sistemas pueden requerir propiedades de diferentes materiales, por lo que se puede realizar combinaciones de diferentes proteínas y/o polisacáridos para aprovechar las características positivas de cada uno y variar la estructura, dimensiones y cinéticas de liberación de los sistemas.

Nanopartículas: Estos sistemas han sido ampliamente estudiados para la vehiculización y liberación de compuestos bioactivos. Tienen la capacidad de dispersar o solubilizar el bioactivo dentro de su matriz y por tal motivo no es posible distinguir una estructura de núcleo y matriz. Su generación no requiere metodologías complejas y suelen mejorar significativamente la estabilidad y solubilidad de los compuestos activos, como así también la entrega controlada de los mismos por diferentes mecanismos y estímulos tales como cambios de temperatura, pH, fuerza iónica, etc. (de Souza Simões et al., 2017; Joye et al., 2014).

Hidrogeles nanométricos (nanogel): El hidrogel es una red tridimensional de polímeros reticulados física o químicamente, formando interacciones covalentes o no covalentes (Soto & Oliva, 2012). Esta estructura tiene la capacidad de hincharse varias veces su tamaño inicial en presencia de agua. Los hidrogeles poseen poros entre las redes donde se pueden ubicar las moléculas de interés protegiéndolas del medio exterior y así evitar su degradación (Joye et al., 2014). Estos sistemas responden a cambios en el pH, fuerza iónica y temperatura, por lo que tienen gran potencial para la administración de Bioactivos (de Souza Simões et al., 2017; Kabanov & Vinogradov, 2009).

I.4. Métodos de generación de nanopartículas

La elección de la metodología para lograr la encapsulación está determinada por los costos, el tamaño y tipo de estructura de partícula deseada, lo cual está íntimamente relacionado a su funcionalidad, al mecanismo de liberación del principio activo a encapsular y a las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante. Es adecuado además tener presente que, el producto logrado debe ser comercialmente viable, lograrse con una producción fácil de escalar y utilizar componentes autorizados (Rodríguez et al., 2016).

Actualmente las industrias farmacéutica y alimentaria utilizan una amplia variedad de técnicas de encapsulación. Los métodos de generación de partículas se agrupan en dos categorías, el abordaje “de arriba hacia abajo” y el “de abajo hacia arriba”, los cuales son traducciones de *top-down* y *bottom-up*, respectivamente. Esta clasificación está basada en el proceso fisicoquímico involucrado, más precisamente en el camino para llegar al tamaño buscado. La **Figura 2** presenta diferentes técnicas empleadas (Q. Feng et al., 2016; Joye & McClements, 2014).

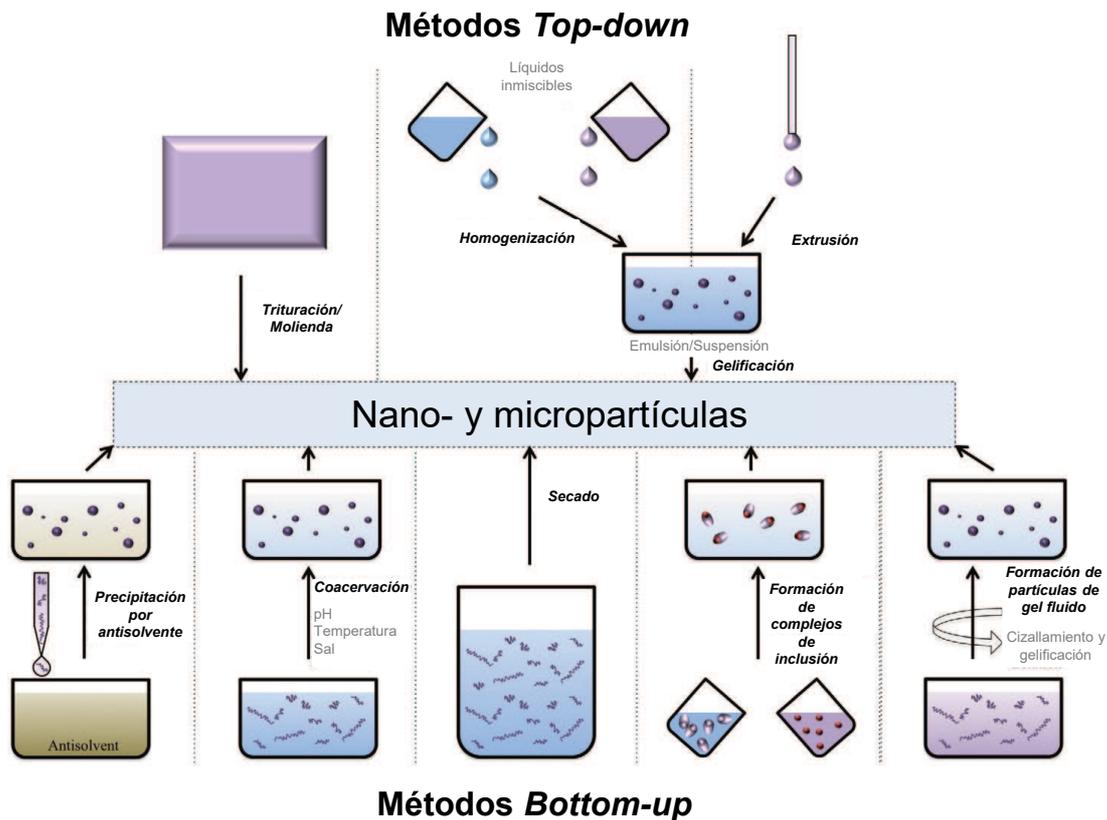


Figura 2. Representación esquemática de diferentes métodos *bottom-up* y *top-down* usadas en la producción de nano y micropartículas (figura modificada de Joye & McClements, 2014).

Método Top-down

El método de *top-down* implica la reducción de tamaño de partículas grandes, utilizando la fuerza mecánica. Incluye muchos procedimientos tales como molienda en seco o en molinos coloidales, homogeneización a alta presión, microfluidización, emulsificación por ultrasonido o extrusión (Gibbs et al., 1999). Por lo general, se basan en procesos que usan las colisiones bajo cizalla y compresión para disgregar grandes entidades en agregados más pequeños (Acosta, 2009).

Estos métodos son fáciles de extender a escala industrial y requieren un uso mínimo de aditivos químicos, permitiendo cumplir sin mayores complicaciones con las regulaciones impuestas sobre las formulaciones para uso humano. Sin embargo, el

enfoque *top-down* presenta algunas limitaciones, como el alto costo de los equipos, el bajo rendimiento, la dificultad para controlar las propiedades de superficie, la polidispersidad y el tamaño de partículas, la reagregación de las partículas y la necesidad de condiciones operativas complejas (como temperaturas extremas y gran cantidad de energía o presión para lograr un tamaño a escala nano). Como consecuencia, los costos de producción suelen ser elevados. Además, ciertos bioactivos valiosos y sensibles, al ser sometidos a condiciones de alta presión y estrés mecánico pueden sufrir degradación (Joye & McClements, 2014; Shrimal et al., 2019).

Método *Bottom-up*

El método *bottom-up* es otro enfoque importante que consiste en la elaboración de partículas mediante interacciones específicas de átomos, entidades moleculares o grupos funcionales del compuesto encapsulante inducidas por cambios en las condiciones del medio como por ejemplo, el pH, la fuerza iónica, la temperatura o la concentración. Entre los métodos ascendentes típicos se pueden citar al autoensamblaje, la precipitación por antisolvente y la síntesis química *in situ*. Este enfoque generalmente se considera mucho más prometedor, debido al mayor nivel de control que ofrece, incluso brinda la posibilidad para adaptar la estructura y las propiedades de las partículas durante su elaboración, por ejemplo, funcionalizando la superficie. Además, el riesgo de contaminación de la muestra a menudo se reduce significativamente (Q. Feng et al., 2016; Pessoa et al., 2017).

Autoensamblaje

El autoensamblaje es la asociación espontánea de un conjunto de moléculas en una o más estructuras supramoleculares, impulsadas por múltiples interacciones específicas (Grzelczak et al., 2010). Estas interacciones moleculares son no covalentes y cinéticamente lábiles, incluyen enlaces puente hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y a menudo interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas. El autoensamblaje se asocia típicamente con el equilibrio termodinámico, comprende la organización espontánea de macromoléculas desde un estado desordenado a un estado altamente organizado. Estas estructuras ordenadas se encuentran en un estado de equilibrio termodinámico que depende de las condiciones del micro-ambiente fisicoquímico, teniendo cada polímero condiciones específicas para el autoensamblaje. Estas propiedades termodinámicas se utilizan para construir estructuras supramoleculares, microestructuras y estructuras jerárquicas superiores para producir materiales funcionales. Desde el punto de vista químico, esto implica modificaciones de algunas condiciones para controlar las interacciones, como la

temperatura, la luz, la radiación electromagnética, el pH, la polaridad del disolvente o la actividad redox (Grzelczak et al., 2010; Robles-García et al., 2016).

Un ejemplo claro de autoensamblaje es lo que ocurre con algunos lípidos, como los monoglicéridos y los fosfolípidos, los cuales son moléculas anfifílicas que muestran fenómenos de autoensamblaje cuando se mezclan con agua por encima de una concentración crítica (Leser et al., 2006). Pueden formar estructuras vesiculares cerradas y continuas, compuestas principalmente por bicapas de fosfolípidos en un ambiente acuoso y pueden utilizarse en el entrapamiento, suministro y liberación de activos en la industria de alimentos (Mozafari et al., 2008), farmacéutica (Kalam et al., 2020) y cosmética (Moussaoui et al., 2002).

Coacervación

Los coacervados se encuentran entre los principales sistemas de biopolímeros que se han utilizado en las últimas décadas para la encapsulación de numerosos ingredientes activos (Chapeau et al., 2017; Shahgholian & Rajabzadeh, 2016). Bajo la denominación de coacervación se agrupa una serie de técnicas de micro y nano encapsulación que se basan en la inducción, por algún procedimiento, de la desolvatación de un polímero, que a continuación, forma un complejo biopolimérico con el compuesto que se quiere encapsular (Lopretti et al., 2007). Cuando la alteración del medio es leve existe cierta interacción entre las moléculas formando complejos solubles que dan cierta turbidez a la solución. Cuando las condiciones se alteran aún más, estos complejos solubles comienzan a asociarse entre sí y forman complejos insolubles lo que provoca una separación de fases macroscópica, una fase densa rica en polímero (fase de coacervado) y una fase muy diluida rica en disolvente (Davidov-Pardo et al., 2015; Timilsena et al., 2019). Entre los procedimientos inductores de la coacervación se pueden citar: cambio de la temperatura, modificación del pH, adición de un “no solvente” o una sal, entre otros (Priftis & Tirrell, 2012).

Existen dos tipos de coacervación: la coacervación simple y la compleja. En la coacervación simple se utiliza un único polímero y el coacervado se logra cambiando las condiciones del medio para causar la deshidratación de las macromoléculas (Timilsena et al., 2019). La coacervación compleja es el proceso que tiene lugar de forma espontánea cuando en un medio acuoso se mezclan dos o más polímeros que presentan cargas opuestas (policación y polianión). Como consecuencia de la atracción electrostática entre los macroiones se producen los coacervados. Además de las interacciones electrostáticas, otras interacciones débiles intervienen en la formación del coacervado, especialmente enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Turgeon et al., 2007). Existen diversos parámetros que condicionan el

tipo de coacervado resultante, como el pH inicial de las soluciones, la proporción del/los polímeros, la concentración total de biopolímero, la conformación molecular y flexibilidad, entre otros (Moschakis & Biliaderis, 2017; Schmitt & Turgeon, 2011).

Precipitación por antidisolvente

La precipitación por antidisolvente, denominada también como desolvatación, o desplazamiento del disolvente es, en esencia, una técnica de coacervación. El término “coacervación” en la industria alimentaria se emplea comúnmente para referirse a coloides hidrofílicos que precipitan por interacción entre dos polímeros con carga opuesta bajo condiciones fisicoquímicas específicas (Joye & McClements, 2013). Esta tecnología se basa en la preparación de partículas a través del intercambio de solventes, donde uno de ellos actúa como “antidisolvente”. Involucra la mezcla de dos fluidos miscibles: un solvente orgánico miscible en agua y un solvente acuoso. Los polímeros se disuelven en el solvente afín, y tras la difusión y mezcla de ambos solventes, se genera un cambio en su solubilidad dando lugar a la formación espontánea de partículas coloidales (Tao et al., 2019).

El mecanismo de producción de partículas por el proceso de precipitación antidisolvente involucra una serie de etapas: primero hay generación de sobresaturación que se continúa con la nucleación y crecimiento; y finalmente la agregación (Joye & McClements, 2013; Lepeltier et al., 2014). Este proceso se esquematiza en la **Figura 3**. La sobresaturación ocurre cuando la solución contiene más solutos que los que puede disolver, este fenómeno se consigue al adicionar un no-solvente, el cual disminuye la calidad del solvente en el que se disuelve el biopolímero y/o el bioactivo (Joye & McClements, 2013). El estado de sobresaturación induce el comienzo de la nucleación por precipitación de los solutos para ganar estabilidad termodinámica. Los núcleos comienzan a formarse una vez que se alcanza la concentración crítica de nucleación, esto da como resultado, la disminución de la concentración de solutos. El crecimiento de los núcleos ya formados ocurre primero por condensación de moléculas de soluto libres en la solución circundante, en la superficie de los núcleos y luego por agregación de dos o más núcleos entre sí. (Martínez Rivas et al., 2017; Saad & Prud'Homme, 2016).

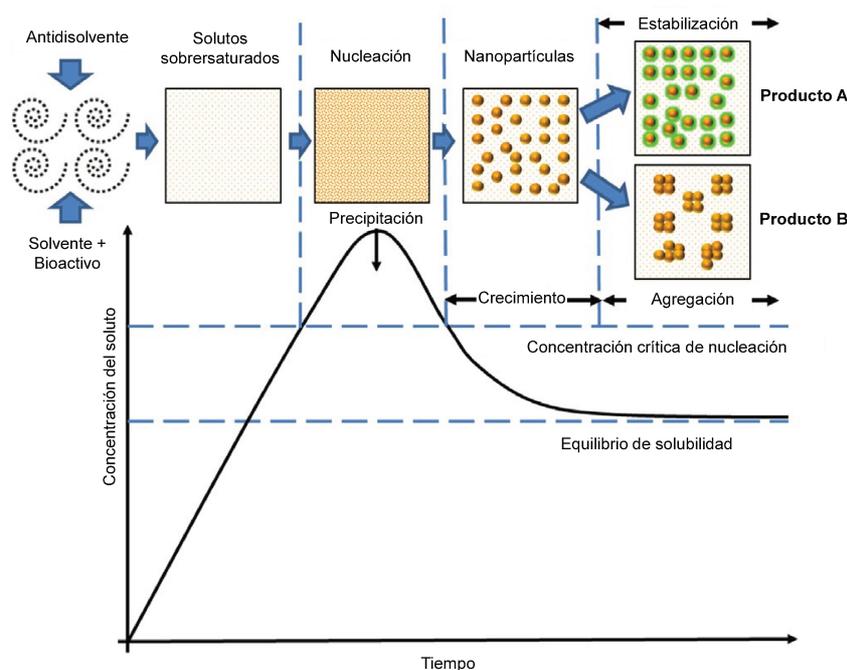


Figura 3. Diagrama esquemático del proceso de formación de NPs por precipitación por adición de un antidisolvente (figura modificada de Tao et al., 2019).

La nucleación y el crecimiento ocurren prácticamente en simultáneo durante la formación de NPs y ambos compiten por consumir los solutos sobresaturados. Por tal motivo, para obtener partículas de tamaño más pequeño y homogéneo (producto A de la **Figura 3**) se requiere una mezcla completa y rápida, en el orden de milisegundos, para alcanzar una sobresaturación homogénea de los solutos y la formación de un gran número de núcleos pequeños con poco crecimiento. Esto es de suma importancia ya que determina las propiedades finales de las partículas, como el tamaño, la morfología y la composición (Chow et al., 2015; Lince et al., 2008; Saad & Prud'Homme, 2016). Si esto no ocurre, se forman pocos núcleos estables y la agregación no se detiene, los núcleos pueden seguir creciendo de manera descontrolada lo que lleva a la formación de partículas de gran tamaño y heterogéneas (producto B de la **Figura 3**).

Después de que se forman las partículas, es importante que haya una repulsión suficientemente fuerte entre ellas para evitar que se agreguen. La coagulación de partículas tenderá a ocurrir cuando las interacciones atractivas (como van de Waals o la atracción hidrofóbica) dominen por sobre las interacciones repulsivas (como la repulsión estérica o electrostática). Las partículas se pueden estabilizar para evitar la agregación mediante la inclusión de agentes estabilizadores en el proceso de producción, estos actúan al adsorberse en la superficie de las NPs e imparten estabilidad al introducir interacciones repulsivas, de tipo estérica o electrostática (Chan & Kwok, 2011).

La precipitación antisolvente es una tecnología atractiva ya que no se necesitan equipos especializados y condiciones de operación complejas, los costos asociados son razonablemente bajos, la técnica se puede ampliar fácilmente y el riesgo de contaminación de la muestra es menor (Joye & McClements, 2013). Los dispositivos microfluídicos permiten realizar mezclas rápidas y en forma controlada, dando lugar así a la formación de partículas más pequeñas con una distribución de tamaño más estrecha (Miladi et al., 2016). Además, algunos estudios informaron la exitosa encapsulación de fármacos hidrófobos en NPs de polímeros utilizando esta técnica, incluso ya se comercializan algunos sistemas de administración de fármacos basados en nanotecnología (Martínez Rivas et al., 2017; Tarhini et al., 2018).

Ventajas de la microfluídica

En los métodos actuales de síntesis de partículas en el rango de tamaño micro y nano aún persisten desafíos importantes con respecto al control y reproducibilidad del proceso, debido a la rapidez de los fenómenos involucrados y las complejas interacciones que se dan en simultáneo. Por ejemplo, en la nanoprecipitación que comúnmente se realiza por goteo de un solvente orgánico en una solución acuosa en agitación que contiene el polímero encapsulante, la nucleación es más rápida en comparación con la mezcla y comienza cuando los componentes aún no están distribuidos de manera homogénea, lo que da como resultado distribuciones amplias de tamaño y gran variabilidad del producto final lote a lote (Valencia et al., 2013). Ante esta situación, para aplicaciones farmacéuticas, donde es fundamental distribuciones de tamaño de partícula estrechas, se debe atravesar por una etapa adicional de selección tamaño de partícula que conduce a bajos rendimientos de partículas y pérdida de una gran parte del compuesto bioactivo utilizado en la producción.

Como alternativa, la microfluídica (ver sección siguiente) ofrece una tecnología con el potencial de formar partículas homogéneas y controlar los parámetros críticos del proceso de una manera que es más difícil de lograr en los métodos tradicionales (Miladi et al., 2016; Valencia et al., 2013). Debido a la naturaleza continua del proceso y a las condiciones de flujo controlado, la eficacia de la reacción mejora drásticamente debido a su mayor tasa de transferencia de masa y calor. Como herramienta de emulsificación, utilizando microfluídica no se requiere una entrada de energía adicional a diferencia de una homogeneización de alta presión o de alto cizallamiento (Carugo et al., 2016). Por lo tanto, el proceso no desarrolla fluctuaciones de temperatura durante el proceso, lo cual podría alterar a ciertos bioactivos sensibles a la presión y temperatura, a su vez, el tamaño y las estructuras internas formadas pueden controlarse con precisión ajustando los caudales (Y. Feng & Lee, 2019).

I.5. Microfluídica

I.5.1. Introducción

La microfluídica involucra la ciencia y la tecnología de la manipulación de fluidos en dispositivos artificiales, donde los canales microfabricados, válvulas y orificios tienen dimensiones inferiores al milímetro, y los volúmenes involucrados se encuentran en el rango de los microlitros a los nanolitros (Whitesides, 2006). Frente a las tecnologías convencionales la microfluídica ofrece numerosas ventajas como por ejemplo, la capacidad de utilizar pequeños volúmenes de muestras y reactivos, y realizar procesos físicos y químicos a bajo costo y en corto tiempo. Los dispositivos de microfluídica tienen propiedades únicas que permiten tener un exhaustivo control de los procesos. Las reducidas dimensiones de los canales (de sección transversal en el rango de 20 a 200 μm) con determinado diseño geométrico permite generar sistemas donde se hacen confluír soluciones miscibles o inmiscibles, que contienen biopolímeros, bioactivos y/o agentes entrecruzantes con una relación de masas controlada. Esto consigue crear un ambiente donde la difusión, el mezclado y las cinéticas de reacción pueden manipularse eficientemente, lo cual es muy útil para la síntesis altamente controlada y reproducible de micro y NPs (Marre & Jensen, 2010; Pessoa et al., 2017; Weibel & Whitesides, 2006). De esta forma, es posible controlar las concentraciones de moléculas en el espacio y en el tiempo, con rendimientos más altos que los que se pueden lograr por métodos convencionales.

Un propósito interesante de la mayoría de estos dispositivos microfluídicos (chips) consiste en lograr sistemas integrados que puedan realizar procesos de múltiples etapas, combinando reacciones, análisis y purificación en un mismo chip (Marre & Jensen, 2010; Tabeling, 2005; C. Zhao et al., 2011). De aquí surge el término de los denominados Lab-On-Chip (LOC, laboratorios en chip), los cuales se utilizan para, para síntesis de sustancias (Kang et al., 2019), detección de agentes contaminantes (Lafleur et al., 2012), polimerización (Park et al., 2010), análisis de ADN (Lagally et al., 2001), administración de fármacos (Valencia et al., 2013), entre otros.

Por lo tanto, el empleo de la microfluídica en la síntesis de micro y nanomateriales resulta beneficioso por varios motivos. En primer lugar, esta tecnología permite controlar con mayor precisión la composición y tiempos de reacción, lo cual posibilita obtener sistemas de partículas monodispersas y de tamaños bien controlados, dos características altamente deseables en la preparación de nano-transportadores. Además, los sistemas microfluídicos generalmente funcionan en flujo continuo, esta característica permite escalar la producción y mantener en el tiempo la misma calidad

del producto, siendo ésta una condición muy importante, por ejemplo, para la industria farmacéutica que requiere gran precisión y reproducibilidad en el producto final.

I.5.2. Fundamentos

Comprender la dinámica de fluidos en los dispositivos microfluídicos es uno de los requisitos previos para desarrollar un sistema de preparación de NPs. En un dispositivo de microfluídica, la confluencia de líquidos provenientes de diferentes canales es una de las operaciones más comunes, la cual tiene diversas aplicaciones (Calado et al., 2016; Q. Feng et al., 2016). La formación de coflujos en microfluídica tiene dos resultados generales, dependiendo de la tensión interfacial de los fluidos empleados: corrientes adyacentes de líquidos similares conducen a la mezcla gradual por interdifusión, mientras que corrientes adyacentes de líquidos inmiscibles producen inestabilidades que llevan a la generación de microgotas de un líquido dentro de otro. El primer efecto es el que se utiliza para la generación microfluídica de NPs.

La mezcla de fluidos miscibles en un dispositivo microfluídico normalmente permite reacciones químicas entre reactivos presentes en los fluidos que confluyen a un mismo canal. Por lo tanto, una optimización de la eficacia de la mezcla se vuelve esencial para mejorar el rendimiento de un dispositivo microfluídico diseñado para la síntesis de compuestos o elaboración de partículas (Soleymani et al., 2008). Los estudios experimentales y de simulación muestran que los patrones de diseño de los vórtices, la geometría de chips, los ángulos de mezcla, el control preciso de las tasas de flujo y la caída de presión también tienen impacto en la eficacia de la mezcla (Y. Feng & Lee, 2019).

En términos fluido dinámicos, las principales fuerzas que operan sobre los fluidos e influyen en su comportamiento son las fuerzas inerciales, viscosas e interfaciales. La importancia relativa de estas fuerzas se mide con números adimensionales como el de Reynolds (Re), capilar (Ca) y Weber (We), los cuales caracterizan los patrones de flujo en el interior de los microcanales (Y. Feng & Lee, 2019; Oliveira et al., 2016).

El número de Reynolds es el más importante entre los parámetros adimensionales que indican el comportamiento de los fluidos. Este número expresa la relación entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Re = \frac{\rho v L}{\mu} \quad (\text{Ecuación I.1})$$

donde ρ es la densidad del fluido [kg/m^3], v [m/s] es la velocidad promedio del fluido, L [m] es la longitud (ancho/diámetro) característico, dependiendo de la geometría de la sección transversal del canal y μ [$\text{Pa}\cdot\text{s}$] la viscosidad (Bragheri et al., 2020). Para Re

< 2000 el flujo es laminar; para $Re > 3000$ el flujo es turbulento, mientras que para Re 2000-3000 el flujo cae en un régimen intermedio. El número de Reynolds en microfluídica es bajo, del orden de la unidad o menos, el numerador suele ser muy pequeño debido al pequeño tamaño de los microcanales, lo que indica que las fuerzas de inercia son irrelevantes con respecto a las viscosas. El flujo laminar es altamente ordenado, donde las partículas de fluido no se entrecruzan, viajando en líneas de flujo paralelas entre sí. Las moléculas de un fluido penetran en otro adyacente solo por medio de la difusión molecular, que es un proceso relativamente lento. La velocidad de mezcla se puede aumentar induciendo advección caótica. Este último indica procesos de mezcla con flujos que conducen a la reducción de la longitud característica sobre la cual debe actuar la difusión, pero ocurre sólo si se diseña específicamente las geometrías microfluídicas para tal fin (Beebe et al., 2002; Kirby, 2010). Por el contrario, en los fluidos en la macroescala, donde el número de Reynolds asume valores mucho mayores, se establece un régimen de flujo turbulento, el líquido se comporta de forma caótica y las partículas en el fluido se entrecruzan de forma aleatoria unas con otras formando pequeños remolinos. La importancia del número de Reynolds radica en la ventaja de poder escalar el modelo bajo estudio y que las características dinámicas del flujo resultante sean válidas siempre que el Re sea el mismo. Esta propiedad de semejanza dinámica debe ir acompañada de la correspondiente semejanza geométrica.

En microfluídica, donde los flujos se caracterizan por ser laminares, la difusión molecular cumple un papel central en la mezcla de sustancias. Como se mencionó antes, cuando el flujo es laminar las corrientes de fluido van en paralelo, independientemente unas de otras, sin embargo existe interdifusión molecular a través de corrientes adyacentes de dos o más líquidos, lo cual permite que los reactivos de cada flujo puedan encontrarse para reaccionar, o bien que un fluido desmejore la calidad solvente del otro, favoreciendo así un proceso de precipitación (Beebe et al., 2002). La difusión es un proceso irreversible por el cual un grupo concentrado de partículas se distribuye de manera uniforme en un medio, lo cual se produce siguiendo un gradiente de concentración. La materia fluye desde una parte del sistema de mayor concentración a otra de menor concentración, como resultados de movimientos aleatorios tendiendo a producir la homogeneización de la concentración en todo el volumen. Esto permite generar gradientes de concentración estables en tiempos cortos en los microdispositivos, a partir del aporte continuado de medios con diferentes concentraciones que actúan alimentando esa diferencia de concentración. Los esquemas de mezcla a microescala deben encontrar formas de maximizar las

interfaces entre las soluciones para permitir que la difusión actúe rápidamente (Beebe et al., 2002).

El número de Péclet (Pe) define la relación entre la tasa de advección de una cantidad física por el flujo y la tasa de difusión de la misma cantidad impulsada por un gradiente apropiado, es decir, representa la velocidad relativa de la convección sobre la difusión, y se expresa de la siguiente manera:

$$Pe = \frac{\nu L}{D} \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

Donde ν [m/s] es la velocidad promedio del flujo y L [m] es el ancho de la sección transversal del microcanal y D [cm²/s] es el coeficiente de difusión de la partícula o molécula considerada. Pe está en el rango de $\sim 10^2 - 10^3$. Un número de Péclet grande ($Pe \gg 1$) indica dominio de transferencia de masa convectiva y poca difusión a lo largo del canal. Un número de Pe pequeño indica predominio de la difusión. Por lo tanto, usando el Re , podemos calcular si los dispositivos tienen flujo laminar o turbulento y usando el Pe , podemos determinar si domina la transferencia de masa por convección o la difusión. Para sistemas microfluídicos donde la difusión es el proceso de transferencia de masa dominante, la tasa de flujo no debe perturbar la región de mezcla.

1.5.3. Técnicas de fabricación de los dispositivos

Desde el punto de vista constructivo, un dispositivo de microfluídica para la preparación de NPs consta de una o más zonas de entradas de fluido, zonas de mezclado y finalmente uno o más canales de salida de fluidos. El diseño de los microcanales, como así también los materiales y las técnicas de fabricación, influye en el patrón de flujo, determinando los fenómenos físicos y químicos que ocurren dentro. Para uso biológico, las características y propiedades de los materiales utilizados en términos de biocompatibilidad y no toxicidad, son aspectos muy relevantes. Además la transparencia óptica de los dispositivos es altamente deseable para monitorear el funcionamiento.

Los dispositivos de microfluídica se pueden fabricar mediante varios métodos utilizando una amplia gama de materiales, como silicio, vidrio, plásticos, metales y otros materiales. Existen diferentes técnicas para fabricarlos, cada una con sus ventajas y desventajas (Beebe et al., 2002). Generalmente las técnicas son específicas de los materiales empleados, la cantidad de componentes que tenga el circuito microfluídico, del equipamiento disponible, del número de chips a fabricar y

esto a su vez, depende de su aplicación (Bragheri et al., 2020). Dentro de las técnicas de fabricación se incluyen:

- **Micromecanizado:**

El micromecanizado es una técnica ampliamente utilizada sobre silicio y vidrio aunque también se puede usar para dispositivos basados en polímeros. El silicio se usa frecuentemente en sistemas microelectromecánicos y la microfluídica tomó la técnica para aplicarla en las primeras técnicas de fabricación (Niculescu et al., 2021). El micromecanizado, engloba a una variedad de procesos cuyo objetivo principal es la obtención de la geometría deseada a través de la remoción de material. Cada uno de estos procesos genera una geometría particular, pero cuando se emplean de manera conjunta es posible obtener productos de formas más complejas. Aunque esta técnica se usa ampliamente y ofrece alta precisión, los métodos de fabricación son complejos, requieren mucho tiempo y son costosos, ya que se requiere el uso de equipos especializados (Faustino et al., 2016).

Como alternativa al vidrio y al silicio, los polímeros comenzaron a utilizarse para la fabricación de dispositivos de microfluídica, debido a su bajo costo, amplia gama de propiedades mecánicas y químicas, flexibilidad y fácil procesamiento. Los polímeros más usados para sistemas microfluídicos son poli(dimetilsiloxano) (PDMS), poli(metacrilato de metilo) (PMMA), polietileno de alta densidad (HDPE), polietileno de baja densidad (LDPE), poliamida 6 y SU-8 (Becker & Gärtner, 2000; Niculescu et al., 2021). Dentro de las técnicas de microfabricación encontramos:

Microfresado: El microfresado es una técnica que utiliza un sistema de movimiento controlado numéricamente por computadora (CNC) de alta precisión, un husillo de alta velocidad con velocidad de rotación y microfresadoras sin necesidad de instalaciones de salas limpias (Faustino et al., 2016). Actualmente, el microfresado es una técnica muy utilizada para fabricar prototipos en PMMA. El método es simple, efectivo, preciso y económico, siendo adecuado para crear estructuras 3D complejas (Niculescu et al., 2021).

Ablación con láser: Para disminuir el tamaño del canal se reemplaza la fresa por un láser, donde la resolución mínima depende, entre otras cosas, del ancho del haz. Esta técnica se basa en el efecto de degradación térmica producida por un láser que graba la superficie del material deseado. La ablación se produce por encima de un cierto umbral de fluencia, que depende de la composición del material, la longitud de onda y la duración del pulso (Suriano et al., 2011). Si bien los láseres son costosos, cuando se comparan con los altos costos asociados con las instalaciones de salas limpias,

resulta una alternativa viable a la litografía blanda. Un inconveniente importante es la dificultad de controlar la geometría de la sección transversal deseada de los microcanales. La geometría más común producida por esta técnica es una sección transversal trapezoidal (Faustino et al., 2016).

- **Fotolitografía**

Consiste en iluminar con luz UV a través de una máscara un sustrato con resina fotosensible de tal manera que el patrón de la máscara es copiado en la resina. La principal ventaja de la fotolitografía es la posibilidad de fabricar numerosos dispositivos sobre un mismo sustrato simultáneamente y con detalle nanométrico. Para preservar la integridad de los dispositivos, la fabricación se realiza en laboratorios de ambiente controlados denominados salas limpias, donde se disminuye sensiblemente la cantidad de partículas de polvo en el aire (Faustino et al., 2016). Los procesos de fotolitografía necesitan equipos especiales para la alineación de máscaras e iluminación UV y la manipulación de ácidos y solventes para realizar los ataques selectivos sobre sustratos.

- **Litografía blanda:**

La litografía blanda es la técnica empleada más común por ser rápida, menos costosa y más adecuada para aplicaciones biológicas que el micromecanizado de vidrio o silicio. Se basa en la impresión y el moldeo de réplicas utilizando materiales elastoméricos (mecánicamente blandos), sellos o moldes con los patrones de interés, para la fabricación de los dispositivos de microfluídica (Beebe et al., 2002). La fabricación por esta técnica involucra una serie de pasos principales: diseño del patrón, fabricación de la máscara o molde maestro, fabricación de la pieza de PDMS y fabricación de micro y nanoestructuras con el sello mediante impresión, moldeo y estampado y finalmente el encapsulado con un sustrato de vidrio (P. Kim et al., 2008). Para cualquier proceso de fabricación seleccionado, el desarrollo de dispositivos de microfluídica requiere de continuas iteraciones de los procesos de diseño, fabricación y validación hasta el desarrollo de un prototipo final cumpla con todos los criterios a considerar tanto fluídicos como su funcionalidad.

Además del diseño y fabricación del dispositivo en sí mismo, para emplear la microfluídica como herramienta debemos considerar otros componentes como los conectores. Estos tienen la función de acoplar el sistema microfluídico y el mundo exterior o dos sistemas microfluídicos. Es deseable que la conexión se realice de forma sencilla, estandarizada, sin fugas. Es un problema recurrente en el desarrollo y la adopción de dispositivos microfluídicos y uno de los principales desafíos establecer

interfaces directas debido a las incompatibilidades dimensionales (Jiang & Korivi, 2013). Un conector ideal debería ser relativamente robusto, eliminar cualquier fuga de fluidos, reducir los volúmenes muertos en las condiciones de uso previstas y permitir el montaje dentro de un tiempo de configuración práctico (Jiang & Korivi, 2013). Existen conexiones permanentes selladas con epoxi y también conexiones reversibles que incluyen conexiones de tipo ajuste a rosca o a presión, que implican la colocación de un elemento más grande en un hueco más pequeño.

I.5.4. Sistemas de bombeo

Son elementos que impulsan y controlan los fluidos que ingresan al dispositivo. Los sistemas de bombeo incorporan muchos principios físicos diferentes y se pueden dividir en dos grandes grupos en función de la forma en que crean flujo: sistemas pasivos o no mecánicos y sistemas activos o mecánicos (Beebe et al., 2002). Los métodos de control de flujo pasivo se basan en crear el flujo controlando la estructura de microcanales o efectos naturales; estos pueden ser inducidos por gravedad, acción capilar, ósmosis o tensión superficial. Los sistemas activos, se basan en bombas de jeringa automáticas, bombas de vacío, por presión positiva, peristáltica por presión neumática, por fuerzas centrífugas, térmicas e interacciones electrocinéticas y magnética (Iakovlev et al., 2022). Los diferentes métodos pueden presentar patrones de flujo continuo, dinámico o pulsátil, lo cual ofrece ciertas ventajas y limitaciones según las aplicaciones (Byun et al., 2014). Otra forma útil de caracterizar los sistemas de bombeo es a partir de la variable de control; es decir, el fluido puede ser impulsado a caudal controlado, y las diferencias de presión desarrolladas en el dispositivo dependen de la resistencia hidrodinámica del mismo, o bien a presión controlada, y caudal resultante en el dispositivo depende de su resistencia hidrodinámica. Luego en el Capítulo 3 se estudian estos conceptos en detalle, para el diseño de un sistema bombeo autónomo basado en el uso de la gravedad.

II. Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Desarrollar componentes de alto valor agregado mediante dispositivos microfluídicos.

2.2. Objetivo específico

Diseñar y fabricar dispositivos de microfluídica específicamente dirigidos a la producción de nanopartículas de biopolímeros, para vehicular activos en productos farmacéuticos y suplementos nutricionales.

Capítulo 1

Difusión en coflujos microfluídicos

1.1. Introducción

La mezcla de fluidos es un paso obligatorio en aplicaciones que involucran reacciones químicas y biológicas, principalmente en las formulaciones farmacológicas. En flujos de muy bajo número de Reynolds, el mecanismo predominante es la difusión molecular, la cual es relativamente lenta si las distancias características son mayores a 1mm. Las reducidas dimensiones de los canales en los sistemas microfluídicos permiten mezclas minimizando tiempo y energía, lo cual es ventajoso para una amplia gama de aplicaciones en campos como la industria química, alimentaria, farmacéutica, química analítica, análisis bioquímico y síntesis de alto rendimiento (Karniadakis et al., 2006; Kutter & Klank, 2003).

1.1.1. Mezcla difusiva en la microescala

Como se mencionó anteriormente, en los dispositivos microfluídicos se da un efecto hidrodinámico particular, las fuerzas viscosas dominan por sobre las inerciales, por lo que el flujo es laminar y en consecuencia la mezcla se genera por procesos de difusión más que por advección (Karniadakis et al., 2006). El transporte difusivo es causado por el movimiento aleatorio de las moléculas, también llamado movimiento Browniano, donde cada molécula se mueve en una determinada dirección durante un cierto tiempo hasta que choca con otra molécula, con lo cual cambia de dirección. La distancia (x_D) recorrida por las moléculas en un fluido debido a la difusión se caracteriza por la relación de Einstein-Smoluchowski (Kutter & Klank, 2003; Probstein, 2005):

$$x_D = \sqrt{2Dt} \quad (\text{Ecuación 1.1})$$

donde t es el tiempo transcurrido y D es el coeficiente de difusión característico de la molécula en estudio. De esta relación se establece que la distancia recorrida por la molécula es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo. Esto se debe al hecho de que las moléculas se mueven al azar. Esta ecuación nos permite estimar el tiempo que tarda una molécula en atravesar el ancho de una determinada corriente, cuando se establece el coflujo de líquidos mediante intersecciones en T o en Y. Esto significa que, en la difusión, el ancho del canal tiene una gran influencia en la mezcla de líquidos. El coeficiente de difusión (D) representa la facilidad con que cada soluto en particular se mueve en un disolvente determinado y en condiciones establecidas. Depende tanto de la naturaleza de la partícula que se difunde como del solvente donde difunde. Cuanto más grande es este coeficiente, significa un movimiento más rápido, y cuanto más grande es una molécula, menor es su coeficiente de difusión.

Para soluciones diluidas, D se establece por la siguiente ecuación, suponiendo que la partícula es esférica:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\mu r_p} \quad (\text{Ecuación 1.2})$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, μ es la viscosidad del fluido y r_p es el radio de la partícula (Karniadakis et al., 2006; Probstein, 2005).

El efecto general del movimiento Browniano de las moléculas se puede describir como cambios temporales y espaciales en la concentración. Estos cambios se describen por las leyes de Fick, que predicen la concentración de un agente para un determinado tiempo y posición. Las moléculas viajan desde áreas de alta concentración de moléculas a áreas de baja concentración. La ecuación que describe la evolución en el tiempo y en el espacio de la concentración C , para una dimensión está dada por (Kirby, 2010; Tabeling, 2005):

$$\frac{\partial C_{(t,x)}}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_{(x,t)}}{\partial x^2} \quad (\text{Ecuación 1.3})$$

donde el coeficiente de difusión, D , se considera constante. La solución de esta ecuación depende fuertemente de las condiciones iniciales y de borde. En particular, nos interesa aquí considerar las siguientes $C_{(t_0; x \leq 0)} = C_0$; $C_{(t_0; x \geq 0)} = 0$ y $C_{(t; x \rightarrow -\infty)} = C_0$; $C_{(t; x \rightarrow \infty)} = 0$, las cuales representan la frontera inicial en el encuentro de dos corrientes en coflujo, como muestra la **Figura 4**: una solución con concentración C_0 y otra con solvente puro. En este caso, de la solución de la Ecuación 1.3 resulta

$$C_{(t,x)} = \frac{1}{2} C_0 \left[1 - \operatorname{erf} \left(\frac{x}{\sqrt{4Dt}} \right) \right] \quad (\text{Ecuación 1.4})$$

donde el tiempo inicial es $t_0 = 0$, y $x_0 = 0$. La función $\operatorname{erf}(x)$ es la función error, definida como:

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-r^2} dr \quad (\text{Ecuación 1.5})$$

En microfluídica, los fenómenos de difusión pasiva se analizan principalmente en canales planos de juntura en forma de T o Y, que constan de dos entradas y una salida. La sección transversal de los canales es rectangular, con muy alta relación de aspecto entre el ancho (w , dirección x) y la altura (d , dirección z). La mezcla se

produce en la superficie de contacto entre los dos fluidos de entrada, los cuales fluyen en la dirección y , como muestra la **Figura 4**. El fluido de la izquierda contiene partículas dispersas en pequeña concentración. Los fluidos se introducen a través de canales individuales que se fusionan en un canal común de longitud l , mucho mayor a su ancho, se produce una difusión transversal al flujo corriente abajo, donde la distribución de las moléculas varía con el tiempo desde que la solución ingresa al canal común (Broboana et al., 2011). El gradiente de concentración es muy pronunciado inmediatamente después de que los dos líquidos se encuentran y luego el borde nítido entre las soluciones se desvanece a medida de avanza en la dirección y , como se esquematiza en la **Figura 4**.

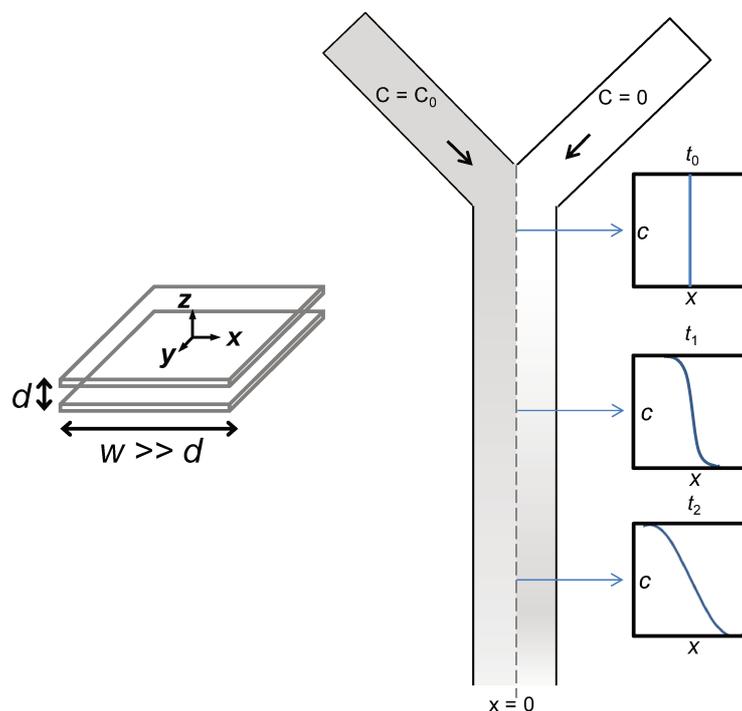


Figura 4. Esquema de difusión en sistemas en coflujo de juntura en Y. La imagen de la izquierda ilustra la relación de aspecto del microcanal. Las imágenes de la derecha muestran la evolución del perfil de concentración (Ecuación 1.4) a lo largo del flujo.

Dependencia del tiempo

El transporte difusivo ocurre desde un área de alta concentración que limita directamente con un área de concentración muy baja, la cual es cero cuando las corrientes se encuentran. Este fenómeno requiere un cierto tiempo para que las moléculas recorran una longitud determinada. En el sistema que se muestra en la **Figura 4** si bien existe transporte convectivo, este es normal a los gradientes y no afecta el proceso de difusión transversal.

Se debe considerar que, durante el tiempo en el que se igualan las diferencias de concentración entre dos regiones, que se calcula aproximadamente por $t \approx w^2/D$, la distancia que recorre una partícula que viaja en y a la velocidad v es $L = vt$. Esto permite estimar el largo del canal necesario para obtener una mezcla completa por difusión, el cual resulta $L = vw^2/D$. Si el propósito es optimizar la mezcla, el diseño del dispositivo es crucial, donde la mitad del ancho del canal corresponde a la mayor distancia de difusión. La velocidad de flujo y longitud del canal, determinan el tiempo de mezcla. Resulta ventajoso en términos de ahorro de tiempo de operación y dimensiones del chip, lograr una mezcla rápida maximizando el área interfacial entre los fluidos (Kirby, 2010).

Coflujo en dispositivos de juntura en X

La mezcla difusiva es uno de los desafíos en los dispositivos microfluídicos, dado que, como vimos anteriormente, suele ser un proceso lento. Una de las estrategias para mejorar la mezcla es generar estructuras de flujo que acorten las escalas de longitud de difusión, como por ejemplo, dividir los flujos en corrientes más delgadas y plegar y volver a laminar estos flujos una y otra vez, minimizando así nuevamente las distancias de difusión (Kutter & Klank, 2003).

Un diseño ampliamente utilizado es el enfoque hidrodinámico (**Figura 5**) ya que ha demostrado ser una técnica microfluídica útil para sistemas que requieren condiciones de mezcla rápida. Consiste en tres canales de entrada que se fusionan en un único canal y luego, según el objetivo de su aplicación, este canal puede dividirse nuevamente en dos o más canales o ser un único canal de salida. La solución de interés generalmente ingresa por el canal central, y dos soluciones laterales adelgazan la corriente central, lo que permite la rápida difusión de las moléculas a través de esta corriente enfocada.

El control de la posición de la corriente central, el ancho y el tiempo de contacto entre las corrientes, se logra ajustando los caudales volumétricos relativos y absolutos de las tres entradas.

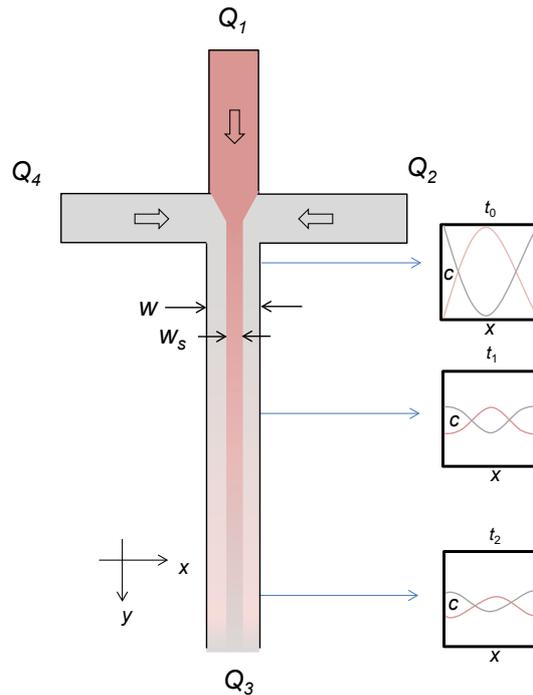


Figura 5. Esquema de difusión en sistemas en coflujo de juntura en X utilizando el enfoque hidrodinámico. Las imágenes de la derecha muestran la evolución del perfil de concentración de cada corriente a lo largo del flujo.

Existen métodos de diferentes niveles de complejidad para el análisis y predicción del comportamiento del flujo enfocado hidrodinámicamente. Para fluidos de igual densidad y viscosidad, impulsados por bombas de caudal controlado, la predicción del ancho de la corriente central es particularmente sencilla si las tasas de flujo volumétrico (caudal Q) de las corrientes de entrada son fijas. En este caso, el ancho de la corriente enfocada se aproxima mediante la siguiente relación:

$$\frac{w_s}{w} \approx \frac{1}{\left(1 + \frac{2Q_{2,4}}{Q_1}\right)} \quad \text{(Ecuación 1.6)}$$

Donde w_s es el ancho de la corriente enfocada, $Q_{2,4}$ es el caudal de las corrientes laterales, y Q_1 es el de la corriente central. La relación entre los caudales laterales y central, FRR (*Flow rate ratio*) = $Q_{2,4}/Q_1$ es la que regula el ancho de la corriente enfocada. Considerando que la mezcla efectiva ocurre cuando las moléculas difunden a través del ancho de la corriente enfocada, se puede escribir:

$$w_s = (2Dt)^{1/2} \quad \text{(Ecuación 1.7)}$$

Luego, combinando las Ecuaciones 1.6 y 1.7, el tiempo de mezcla en estas configuraciones se estima de la siguiente manera:

$$t_D \approx \frac{w^2}{[2D(1 + 2Q_{2,4}/Q_1)^2]} \quad (\text{Ecuación 1.8})$$

La Ecuación 1.8 indica que, si el ancho de la corriente enfocada se reduce a unos pocos micrones, el tiempo de mezcla es de milisegundos, lo cual es altamente deseado para los procesos de nanoprecipitación. En efecto, se han generado diferentes nanopartículas utilizando el enfoque hidrodinámico, donde las mayores ventajas que aporta la microfluídica son el control del tamaño (a partir del FRR) y la monodispersidad (Jeon et al., 2017; Karnik et al., 2008; Majedi et al., 2013; Pessoa et al., 2017).

1.2. Objetivos

Los objetivos específicos de este capítulo son los siguientes:

- Generar corrientes en coflujo y evidenciar el fenómeno de difusión
- Analizar la difusión transversal a lo largo del canal.
- Observar los efectos que produce el cambio de caudales en el patrón de mezcla en chip de junta en Y y enfoque hidrodinámico.
- Evidenciar la formación de estructuras mediante difusión molecular, a través de la síntesis de cristales de carbonato de calcio.

1.3. Materiales y métodos

1.3.1. Fabricación de los dispositivos

Chip de junta en Y

Para la fabricación de este dispositivo se utilizó una placa de acrílico transparente con dos perforaciones de entrada y una de salida, una placa de vidrio (porta objeto de microscopía) y cinta adhesiva doble contacto acrílica transparente, de 0,25mm de espesor y 25mm de ancho, resistente a la luz UV y solventes. Las dimensiones de los canales de sección rectangular fueron 4mm de ancho, 0,25mm de alto (correspondiente al espesor de la cinta) y 50mm de longitud. Primero se aplicó cuidadosamente la cinta en la placa de vidrio desde un extremo al otro de la placa, aplicando presión para reducir el aire atrapado, luego se cortó el canal con el diseño deseado utilizando un bisturí, se retiró el sobrante de cinta para liberar el canal y se colocó la placa de acrílico sin adherir. El chip semi-ensamblado se llevó a estufa a 70°C por 5min con pinzas para ejercer presión y favorecer la adherencia de la cinta al vidrio. A continuación se retiró la protección de la otra cara adhesiva y se pegó a la

placa de acrílico para terminar de cerrar los canales con las perforaciones de entrada y salida alineadas. Nuevamente se aplicó calor en las mismas condiciones para terminar con el proceso, quedando así un dispositivo tipo “*sandwich*”. Una vez completo el pegado del dispositivo se colocaron puertos de entrada y salida para las mangueras, se utilizó pegamento de cianoacrilato. La **Figura 6** muestra un esquema de ensamblaje del chip.

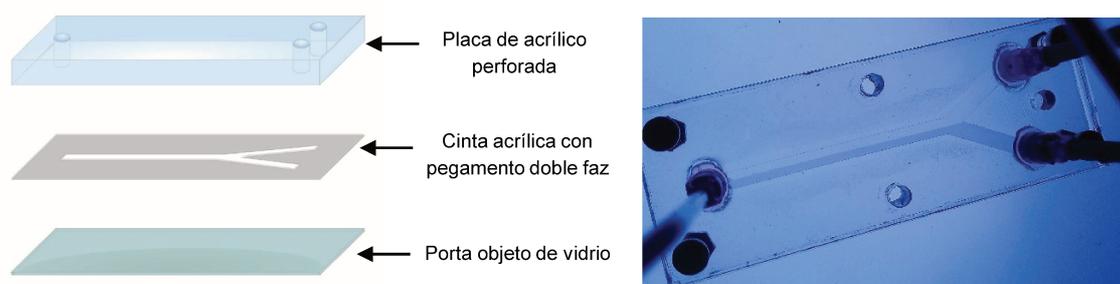


Figura 6. Panel izquierdo: esquema de ensamblaje del dispositivo de junta en Y. Panel derecho: foto del dispositivo armado y conectado a las fuentes de flujo

Chip para enfoque de flujo hidrodinámico

Este dispositivo se fabricó de manera similar al de junta en Y, mediante ablación con láser en PMMA y unión a baja temperatura con lámina adhesiva ópticamente transparente (OCA) de doble cara, como se describe en la literatura (Z. Liu et al., 2017). Este dispositivo híbrido consistió en una estructura tipo *sandwich* con placas superiores e inferiores de PMMA y una capa intermedia de OCA modelada con los microcanales. Las placas de PMMA de 4mm de grosor se micromecanizaron en una plataforma láser de CO₂ (Lasers Cuyana, Mendoza, Argentina) para obtener placas rectangulares de 30 × 80mm. En una de las placas, se hicieron agujeros para los conectores mediante perforación mecánica. Se utilizaron tubos de cobre niquelado de 1,8mm de diámetro externo como conectores en las entradas y salida del chip. La capa intermedia que contenía los microcanales era, a su vez, un *sandwich* de dos cintas OCA (50µm de espesor cada una) interconectadas por una lámina transparente (75µm de espesor). La profundidad final de los microcanales se midió utilizando un micrómetro de disco electrónico (Schwyz, Suiza), dando como resultado $d = 175 \pm 3 \mu\text{m}$. El diseño de los canales se realizó en un procesador de imágenes, donde se definen las dimensiones, y el archivo se utilizó para calar los canales en un *plotter* de corte de escritorio (Foison Icutter V24, Brasil) (Islam et al., 2015). Para el armado del chip se limpiaron con alcohol las superficies previamente, se retiró una de las láminas que cubre la cara adhesiva y se comenzó el pegado de un extremo al otro de una de las placas, procurando retirar el aire que pudiera quedar atrapado, luego se retira la

segunda lámina de protección y se le coloca de manera alineada la otra capa acrílica. A todo el chip armado se le aplicó presión con ayuda de unas pinzas y se llevó así a un horno (Yamato, Model ADP310C, Santa Clara, USA) a 45°C por 30 minutos para terminar el sellado. La **Figura 7** muestra un esquema de estructura del chip.

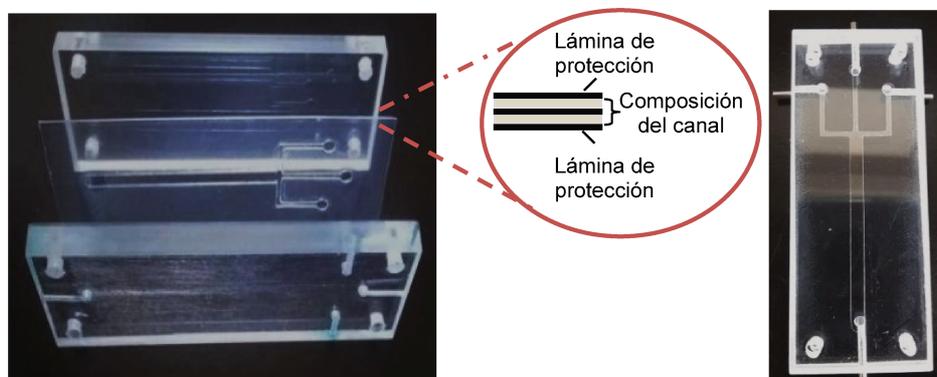


Figura 7. Panel izquierdo: foto de los componentes antes del ensamblaje del dispositivo de junta en cruz; el zoom del medio muestra la composición de la lámina que define los canales. Panel derecho: foto del dispositivo armado, listo para usar.

1.3.2. Soluciones de trabajo

Los experimentos se realizaron con soluciones acuosas coloreadas y agua destilada. Se utilizaron colorantes alimentarios en polvo: azul brillante C-DIA S.R.L (Buenos Aires, Argentina) y amarillo tartrazina Sensient food colors (Hoffman Estates, Estados Unidos). El polvo colorante se disolvió en agua destilada utilizando un agitador magnético IKA C-MAG HS7 (IKA Labortechnik, Brasilia, Brasil). La concentración de colorante fue de 4g/L, la cual permitió obtener un color intenso y uniforme que permitiera una mejor visualización del coflujo dentro del canal. Para la generación de cristales se prepararon dos soluciones acuosas, una de cloruro de calcio 25mmol/L (CaCl_2) y otra de bicarbonato de sodio 100mmol/L (NaHCO_3). Se pesaron las cantidades necesarias y se disolvieron en agua ultrapura bajo agitación magnética.

1.3.3. Bombeo de los líquidos

Para la inyección de líquido en los canales se utilizaron bombas universales de infusión a jeringas Apema serie PC11U (Buenos Aires, Argentina) las cuales permiten controlar el caudal volumétrico con precisión en un rango desde 0,01 hasta 99,9mL/h. Previamente se debe configurar correctamente la bomba introduciendo datos como la longitud de la jeringa a utilizar, el volumen y el caudal que se quiere inyectar en unidades de mL/h. Se utilizaron jeringas plásticas de 10mL cargadas con las soluciones. Las jeringas se conectan a las entradas de los canales mediante

mangueras de silicona y a la salida del canal se conectó una manguera a un recipiente contenedor.

1.3.4. Análisis de difusión transversal

La difusión transversal de las partículas se cuantificó mediante mediciones ópticas a lo largo del coflujo. Para el análisis de difusión transversal se utilizó el chip de juntura en Y donde se marcaron líneas a 0mm, que corresponde al inicio del coflujo en la intersección de los canales, a los 10, 20, 30 y 40mm, ésta última marca corresponde a las cercanías de la salida del canal principal. Las mediciones se tomaron siempre en estas posiciones. En este trabajo sólo se empleó el colorante azul y agua destilada. Se analizaron los caudales: 0,1, 0,5, 1, 2, 3 y 4mL/h, siempre iguales para ambos fluidos. Al comienzo de las experiencias y con cada cambio de flujo se necesitó un cierto tiempo hasta que el flujo estuviera totalmente desarrollado y el sistema estabilizado. Cuando se alcanzó la situación en que la distribución del colorante no cambiaba con el tiempo se tomaron imágenes del canal en las cinco posiciones mencionadas. El coflujo en los canales se registró con un microscopio digital USB de 5Mpx (Origen China). El dispositivo fue montado sobre un soporte universal para una mejor iluminación y captura de las imágenes. En la parte superior, el microscopio se sujetó con otro soporte ubicado en posición vertical por sobre el dispositivo. Se analizaron las imágenes para los distintos caudales y secciones del canal, se obtuvieron perfiles de intensidad de color analizando todo el ancho del canal (dirección x).

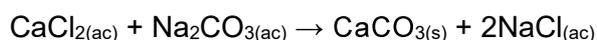
Para el procesamiento de las imágenes se utilizó la herramienta de análisis y edición ImageJ© *software* (National Institutes of Health, USA) y se obtuvieron perfiles de intensidad de color, valores altos corresponden a tonos claros en la imagen y valores bajos a tonos oscuros. El programa brinda datos numéricos que fueron procesados con el complemento *Solver* de Microsoft Excel 2010, con el algoritmo *Evolutionary*, el que permite obtener mínimos totales de las funciones evaluadas. Se analizaron los datos experimentales de intensidad de color (lo cual se corresponde con cambios en la concentración de colorante), en función de la posición (ancho del canal). Los datos experimentales tomados a distintas posiciones del canal se relacionan con el tiempo de difusión. Para las regresiones se utilizó la Ecuación 1.9, expresión equivalente a la Ecuación 1.4, suponiendo que se mantiene una proporcionalidad directa entre intensidad de luz y concentración:

$$I = a + b \operatorname{erf}\left(\frac{x - c}{w}\right) \quad (\text{Ecuación 1.9})$$

Con esta hipótesis, I es la intensidad de color, a es la intensidad de color mínima (I_{min}) y $b = I_{max} - I_{min}$ (siendo I_{max} la intensidad de color máxima), c representa el punto de inflexión en la curva de intensidad de color y $W = 2\sqrt{Dt}$.

1.3.5. Síntesis de cristales

Se utilizó el chip de juntura en Y antes descrito. Las soluciones toman contacto en el canal común de salida donde comienza el fenómeno de difusión molecular generando cristales de carbonato de calcio mediante la siguiente reacción química (Chia et al., 2011):



Los caudales utilizados fueron los siguientes, 0,5, 1 y 5mL/h, siempre iguales para ambos fluidos, comenzando a trabajar desde el flujo más alto al más bajo. Mediante la utilización de un microscopio digital USB de 5Mpx (Origen China) se tomaron imágenes en las cercanías de la salida del canal una vez transcurridos 5 minutos desde el inicio de cada ensayo.

1.3.6. Desarrollo de enfoque hidrodinámico

Se utilizó el dispositivo con configuración en X, por el canal central se hizo circular la corriente coloreada en amarillo y por los canales laterales la solución de color azul. Para analizar el enfoque hidrodinámico y su efecto en la difusión se estableció un mismo caudal total y se fueron variando las relaciones de caudales (FRR) y luego para un FRR fijo, el caudal total se fue variando. Al comienzo de las experiencias y con cada cambio de flujo se esperó un cierto tiempo hasta que el flujo estuvo totalmente desarrollado. Cuando se alcanzó un patrón de flujo estable y una distribución de colorante homogénea en el tiempo se tomaron imágenes con un microscopio digital USB de 5Mpx (Origen China) y/o cámara digital de alta resolución (Nikon Coolpix B700).

1.4. Resultados y discusión

1.4.1. Análisis de coflujo en chip de juntura en Y

La experiencia consistió en la inyección de dos líquidos de similar densidad y viscosidad, pero uno de ellos con colorante azul, observando el comportamiento del sistema a diferentes caudales, comprendidos entre 0,1 y 4mL/h. Se analizó la difusión transversal en diferentes partes del canal principal. En el análisis se detectaron las posiciones de los bordes laterales del canal con el fin de alinear todos los perfiles de

intensidad. Esto fue necesario debido a variaciones en la ubicación del microscopio durante el experimento.

A simple vista se observaron perfectamente las corrientes paralelas. A caudales bajos se pudo diferenciar una mayor difusión y mezcla en la interfaz liquido-liquido, siendo mayor al aproximarse a la salida del canal (**Figura 8a**). Este fenómeno se evidenció como un cambio colorimétrico en la interfaz (franja de color celeste como resultado de la atenuación del color azul intenso producto de la difusión). En cambio, a caudales más altos se observó una interfaz bien definida y de espesor despreciable (**Figura 8b**).

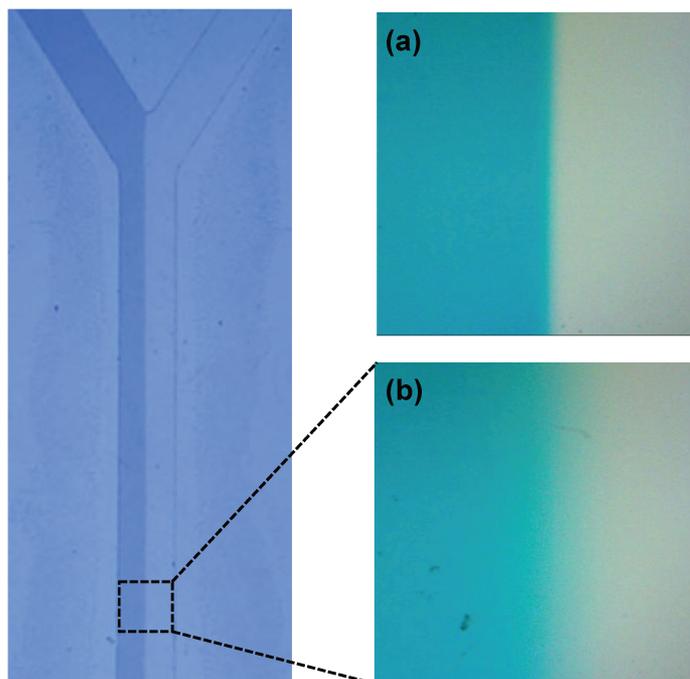


Figura 8. Panel izquierdo: imagen del coflujo en configuración en Y tomada con una cámara digital. Panel derecho: imágenes tomadas con el microscopio en la sección final del canal (a) 4mL/h (b) 0,1mL/h.

En la **Figura 9** se presentan los resultados experimentales de intensidad de color en función de la posición x para los distintos caudales evaluados. Se observó que los perfiles de intensidad de color son muy similares para los caudales 2, 3 y 4mL/h en las diferentes secciones del canal, mientras que en los perfiles de intensidad de color correspondientes al caudal de 1mL/h comienza a notarse una línea de menor pendiente (curva más aplanada) entre los valores máximos y mínimos de intensidad en las posiciones más alejadas (30mm y 40mm). Finalmente los perfiles de intensidad de color correspondientes a los caudales 0,5 y 0,1mL/h son notablemente más suaves debido a la presencia de valores intermedios de intensidad entre el máximo y el mínimo en todas las secciones del canal evaluadas, como producto de un mayor tiempo de difusión. Estos mismos resultados experimentales se presentan en la

Figura 10 comparando cómo varían los perfiles de difusión a medida que cambia el caudal en cada una de las posiciones y a lo largo del canal. Se observa un cambio notable en los perfiles de difusión para el caudal de 0,1mL/h, el cual permite una mayor difusión desde el inicio del coflujo.

La **Figura 11** muestra curvas típicas de intensidad de color en función de la distancia x transversal al canal. Los símbolos son resultados experimentales y las líneas representan la Ecuación 1.9.

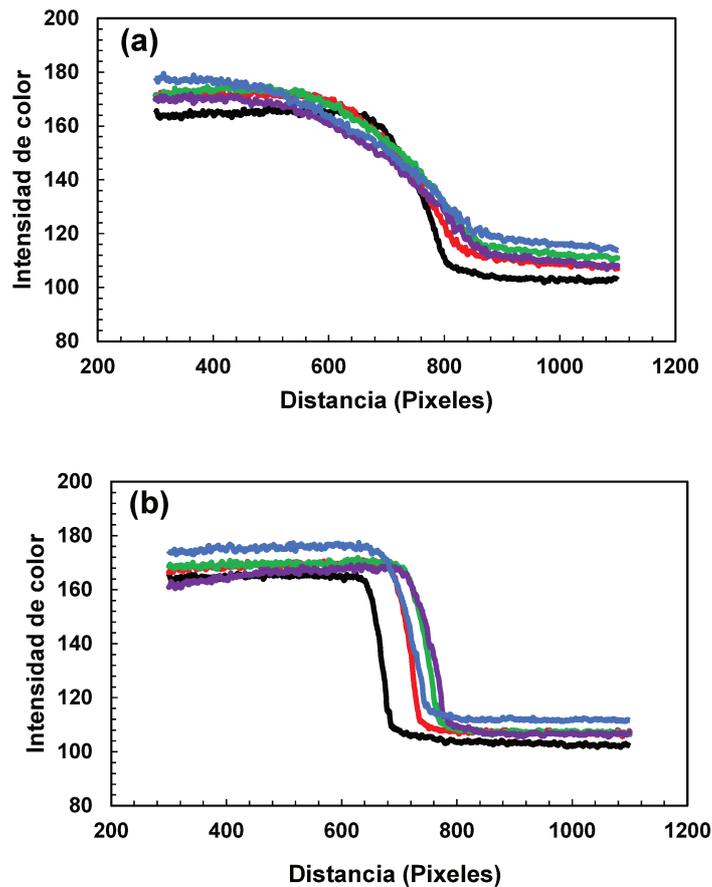


Figura 9. Intensidad de color en función de la posición x transversal al canal (escala: 800 píxeles = 4mm) a diferentes caudales. (a) 0,1mL/h, (b) 4mL/h. Posiciones y a lo largo del canal: — 0mm, — 10mm, — 20mm, — 30mm, — 40mm.

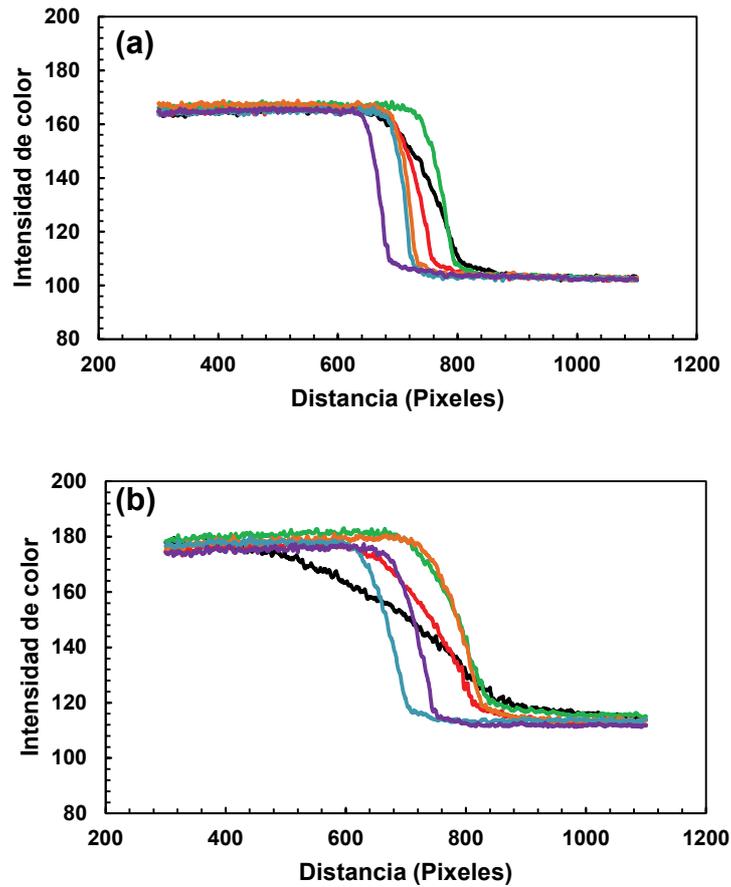


Figura 10. Resultados experimentales de intensidad de color en cada una de las posiciones y a lo largo del canal en función de la posición x transversal al canal (escala: 800 píxeles = 4 mm). (a) 0mm, (b) 40mm. Caudales evaluados: — 0,1mL/h, — 0,5mL/h, — 1mL/h, — 2mL/h, — 3mL/h, — 4mL/h.

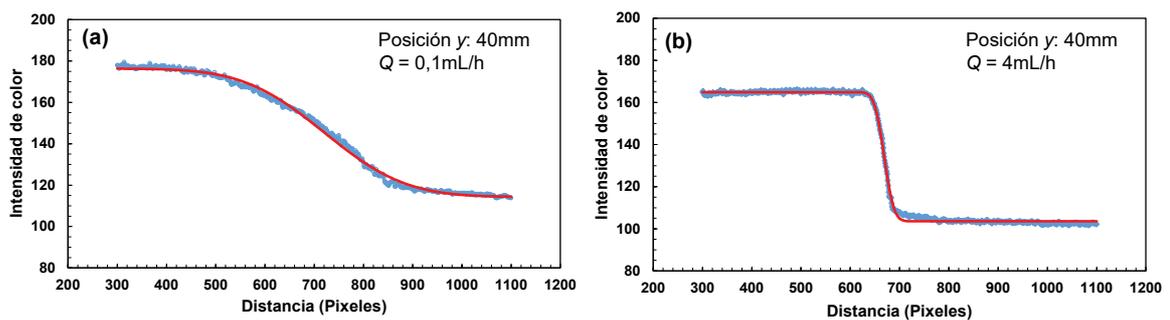


Figura 11. Curvas típicas de intensidad de color en función de la posición x transversal al canal (escala: 800 píxeles = 4 mm). Los símbolos (•) son resultados experimentales y las líneas rojas representan la Ecuación 1.9, en posición y de 40mm para el caudal (a) 0,1mL/h y (b) 4mL/h.

Se observa que en todos los casos analizados se obtuvo un buen acuerdo entre los datos experimentales y el modelo utilizado. La magnitud $w = 2\sqrt{Dt}$ aumenta a medida que aumenta la distancia y a lo largo del canal, para todos los caudales analizados. Este comportamiento es el esperado dado que el tiempo de difusión t se relaciona con la distancia y al inicio del coflujo de la siguiente manera:

$$w = 2\sqrt{DyA/Q} \quad (\text{Ecuación 1.10})$$

Esto se debe a que $t = y/v = yA/Q$, donde v es la velocidad promedio del fluido y A es el área transversal del canal. Finalmente, en la **Figura 12** se presentan los valores del ancho de la zona de difusión w en función de la posición y a lo largo del canal, la cual equivale a diferentes tiempos de difusión. Es interesante notar que la relación w vs y es prácticamente lineal en todos los casos, tal como predice la Ecuación 1.10. Una vez más, los resultados del análisis presentan un buen acuerdo con el modelo utilizado para identificar los parámetros que controlan el proceso de mezcla por difusión.

En síntesis, a través de estas experiencias y análisis se pudieron comprobar dos cuestiones influyentes. Por una parte, independientemente del caudal, a mayor distancia recorrida se produce mayor difusión. Por otra parte, para una dada posición y , se observó que a mayor caudal la eficiencia de mezclado disminuye.

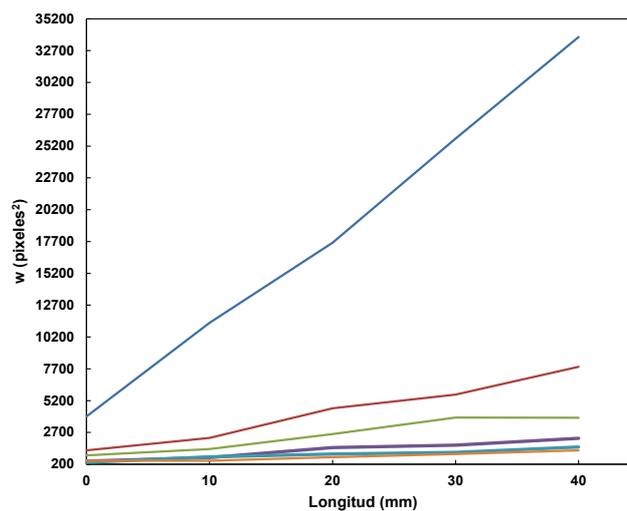


Figura 12. Ancho característico de la zona de difusión (w) obtenidos a partir del ajuste de los datos experimentales, en función de la posición y a lo largo del canal, para todos los caudales evaluados — 0,1 mL/h, — 0,5 mL/h, — 1 mL/h, — 2 mL/h, — 3 mL/h, — 4 mL/h.

1.4.2. Síntesis de cristales

La experiencia consistió en la inyección a caudales controlados de dos soluciones con los reactivos necesarios para sintetizar cristales de carbonato de calcio en un dispositivo microfluídico de junta en Y, y se observó el comportamiento del sistema a diferentes caudales evaluados. A simple vista se pudo notar una suave línea gris en la zona de interdifusión de los reactivos, debido a la formación y precipitación de cristales en la interfaz líquido-líquido, siendo más pronunciada en las proximidades de la salida del canal. Al microscopio se pudieron observar pequeñas partículas de cristales y cómo en el menor caudal evaluado aumentaba la densidad de cristales en la zona de difusión. En la **Figura 13** se presentan las imágenes tomadas durante el ensayo. Efectivamente, el menor caudal permite un mayor tiempo de interdifusión y por lo tanto un mayor rendimiento de nucleación y posterior precipitación.

Vale la pena mencionar que el experimento reproduce resultados publicados con anterioridad en dispositivos similares (Chia et al., 2011). Aquí el objetivo es analizar como el control de la difusión determina la eficiencia de la reacción química, lo cual es básico para los desarrollos de los capítulos siguientes en esta Tesis.

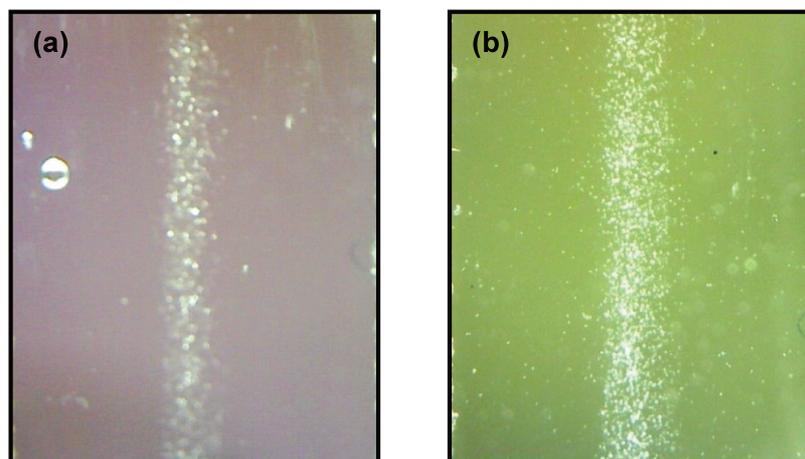


Figura 13. Imágenes de los cristales de carbonato de calcio formados a distintos caudales. (a) 5mL/h y (b) 0,5mL/h.

1.4.3. Enfoque hidrodinámico

En las imágenes de la **Figura 14** se muestra el desarrollo del enfoque hidrodinámico en el dispositivo en X. Se puede notar claramente que manteniendo la misma relación de caudales (FRR) pero modificando el caudal total (Q total) se puede controlar la rapidez de la mezcla. Dado que la difusión molecular es mayor en el menor Q total evaluado, es posible observar la zona de color verde en la interface producto de la mezcla de los colorantes en las cercanías del inicio del coflujo (**Figura 14a**). Por el

contrario, manteniendo un mismo Q total y modificando el FRR se puede regular el ancho del enfoque (**Figura 14b**) y de este modo la distancia de difusión de las especies y la reacción involucrada. Al aumentar el FRR el ancho del enfoque w_s se hace más delgado, tal como indica la Ecuación 1.6. Asimismo, se observa experimentalmente la predicción de la Ecuación 1.8, la cual indica que el tiempo de difusión se reduce a medida que disminuye el ancho de la corriente enfocada. Esta técnica ofrece una estrategia atractiva para hacer nucleaciones uniformes para diferentes aplicaciones, principalmente para la implementación de la nanoprecipitación y autoensamblaje (Baby et al., 2017).

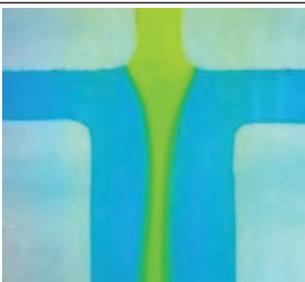
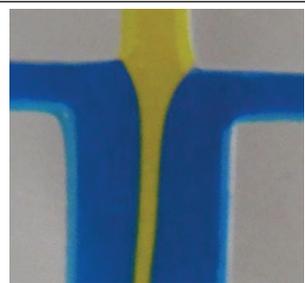
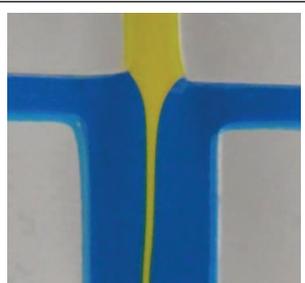
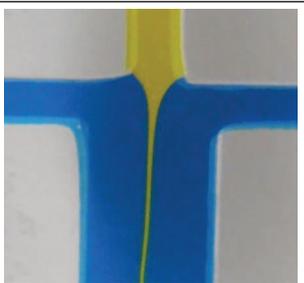
Q total (mL/h)	0,03	0,3	1,5
FRR	2	2	2
(a)			
Q total (mL/h)	15	15	15
FRR	4	8	16
(b)			

Figura 14. Imágenes del enfoque hidrodinámico, (a) tomadas con un microscopio digital USB y (b) con cámara digital de alta resolución.

1.5. Conclusiones parciales

Se construyeron dispositivos de microfluídica que permiten generar coflujos en diferentes configuraciones de canales. Fue posible verificar, a través del uso de soluciones coloreadas, análisis de imagen y síntesis de cristales, (i) que se produce difusión molecular en la interfaz de dos soluciones miscibles diferentes en toda la longitud del canal principal de salida y (ii) que la zona de difusión es altamente dependiente del caudal total aplicado y de la relación de caudales entre las corrientes. Se demostró que es posible controlar las reacciones como la cristalización,

manipulando las velocidades de los fluidos involucrados. Por otra parte, se concluye que la geometría en Y simple no es ideal para lograr una mezcla rápida completa, mientras que el enfoque hidrodinámico permite disminuir el ancho de difusión en la corriente central, y por lo tanto el tiempo de mezcla, tanto como se desee, siendo el ancho del canal el factor limitante.

Capítulo 2

Efecto de la gravedad sobre el enfoque hidrodinámico.

2.1. Introducción

Como se describió antes (Sección 1.4), la precipitación se ha utilizado ampliamente para la preparación de NPs poliméricas destinadas a varias aplicaciones biomédicas, agrícolas, alimentarias y cosméticas. La técnica de nanoprecipitación se basa en la reducción de la capacidad de un solvente de mantener en solución los precursores de las NPs. Esta reducción ocurre por la mezcla con otro solvente en el cual los precursores no son solubles dando lugar a la nucleación y posterior agregación de los precursores que termina en la formación de NPs. El solvente y no solvente son generalmente fases orgánicas y acuosas. Las fases orgánicas más utilizadas son etanol, acetona, hexano, cloruro de metileno o dioxano, aunque algunos solventes orgánicos no están permitidos para usos biomédicos. La fase acuosa más común es el agua (Martínez Rivas et al., 2017).

Se pueden modificar diferentes parámetros durante el proceso de nanoprecipitación para obtener una formulación con las características deseables en términos de tamaño, estabilidad de almacenamiento, encapsulación del bioactivo y cargas electrostáticas. Por ejemplo, la manera en que ocurre la sobresaturación afecta las propiedades finales de las NPs, una baja sobresaturación forma pocos núcleos estables, mientras que la alta sobresaturación produce una gran cantidad de núcleos muy pequeños (Miladi et al., 2014). Para lograr partículas monodispersas de reducido tamaño se requiere una nucleación casi instantánea, esto se lograría alcanzando tiempos de mezcla de las fases del orden de milisegundos, para así garantizar una sobresaturación uniforme junto a la difusión molecular asociada de los componentes (Lince et al., 2008). El proceso de mezcla (esquemático en la **Figura 3** de la Sección 1.4.), debe ser extremadamente rápido en comparación con la velocidad de nucleación de las NPs.

Cuando se realiza la nanoprecipitación por el método convencional (**Figura 15a**), mediante la adición gota a gota del no solvente en la solución polimérica, se induce un cambio continuo en la composición de la mezcla de soluto/solvente/no solvente y esto causa una sobresaturación local por lo que la nucleación y el crecimiento de partículas pueden iniciarse en la zona donde cae la gota antes de que pueda ocurrir la mezcla completa (Lepeltier et al., 2014). Por lo tanto, se investigan diferentes metodologías para lograr un mejor control de la mezcla de las fases. En tal sentido, la microfluídica permite la implementación de un proceso de nanoprecipitación controlado por medio del enfoque hidrodinámico presentado en el capítulo anterior (Secciones 1.1.1 y 1.4.3) e ilustrado en la **Figura 15b**. La técnica permite generar en la microescala el autoensamblaje y nanoprecipitación (Martínez Rivas et al., 2017), los cuales requieren

que el tiempo de mezcla sea del orden de milisegundos. Cuando el ancho de la corriente enfocada (w_s) es micrométrico, la interdifusión a través de la interfaz entre las corrientes permite una rápida mezcla y el consiguiente desplazamiento del disolvente, que desencadena la nucleación de precursores y el crecimiento de NPs (Baby et al., 2017).

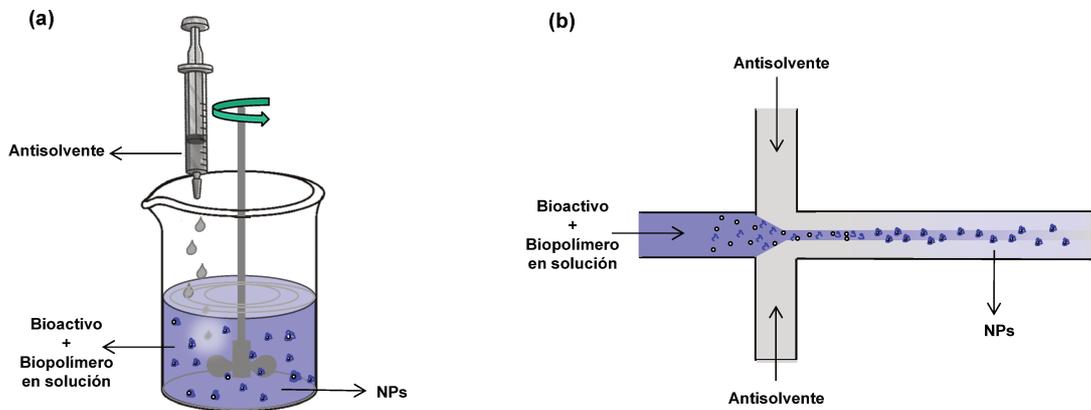


Figura 15. Representación esquemática de las técnicas de nanoprecipitación: (a) Método convencional por goteo. (b) Enfoque hidrodinámico en un chip de microfluídica.

El enfoque hidrodinámico es una importante técnica en el área de la microfluídica. Para aprovechar sus beneficios es crucial lograr un control sobre los parámetros involucrados, a los efectos de predecir con precisión el ancho de la corriente enfocada (Tripathi et al., 2014). Los modelos analíticos disponibles describen con claridad el ancho de enfoque en función de los caudales impuestos (Knight et al., 1998; Wu & Nguyen, 2005), pero están limitados a fluidos de igual densidad, a pesar de que varias aplicaciones emplean líquidos con diferentes propiedades.

El efecto del contraste de densidades en el enfoque de flujo depende en gran medida de la orientación del chip en relación con el campo gravitacional. Si el canal de enfoque es transversal a la gravedad, el patrón de enfoque del flujo se ve seriamente perturbado, debido a que las corrientes intercambian sus posiciones de acuerdo con la densidad relativa de los fluidos. Curiosamente, este efecto ha sido explotado para regular la relación de mezcla en microcanales en forma de H (Norouzi et al., 2016). Si el canal de enfoque está orientado verticalmente, el patrón de enfoque de flujo se mantiene, pero difiere del enfoque que se desarrolla cuando los fluidos son de igual densidad y la magnitud de este efecto depende del contraste de densidades de los fluidos, así como del caudal de las corrientes laterales y de la relación de caudales de la corriente enfocada y laterales. Este efecto se ha observado previamente a partir de simulaciones numéricas (Hajian & Hardt, 2015). Sin embargo, una relación entre el ancho de la corriente enfocada y los caudales para fluidos de diferentes densidades aún no se ha informado en la literatura, según nuestro conocimiento.

2.2. Objetivos

Los objetivos específicos de este capítulo son los siguientes:

- Predecir cuantitativamente el ancho de enfoque considerando el contraste de densidad entre los líquidos en un dispositivo con microcanales rectangulares.
- Verificar las predicciones teóricas con datos experimentales en una amplia gama de condiciones de operación.

2.3. Desarrollo experimental

2.3.1. Materiales

Se utilizó etanol (C_2H_6O ; 99,5%) y el cloruro de sodio (NaCl; grado analítico) marca Cicarelli (San Lorenzo, Argentina). El colorante sintético azul brillante fue de Sensient Food Colors Latin America (Lerma de Villada, México). El agua destilada fue obtenida en nuestros laboratorios. Las capas de polimetilmetacrilato (PMMA) se adquirieron en Acrimev (Santa Fe, Argentina). Se utilizó un adhesivo ópticamente transparente de doble cara (OCA), producto 3M™ 8146-2, fue de Thorlabs (EE.UU.). Se compraron jeringas (60mL para usos médicos), accesorios (tubos de cobre niquelado de 1,8mm de diámetro externo) y tubos (Teflón ID 1,5mm e ID 0,35mm) en el mercado local.

2.3.2. Fabricación del dispositivo microfluídico

Los dispositivos de microfluídica se fabricaron como se describe en la Sección 1.3.1 del Capítulo 1. La **Figura 16** esquematiza el dispositivo híbrido de estructura tipo *sandwich* con espesor del canal $d = 175\mu\text{m}$, ancho del canal de salida $w = 3\text{mm}$ y ancho de los canales de entrada de 1mm. La longitud del canal de enfoque fue de 43mm. La relación de aspecto del canal principal fue $w/d \approx 17$.

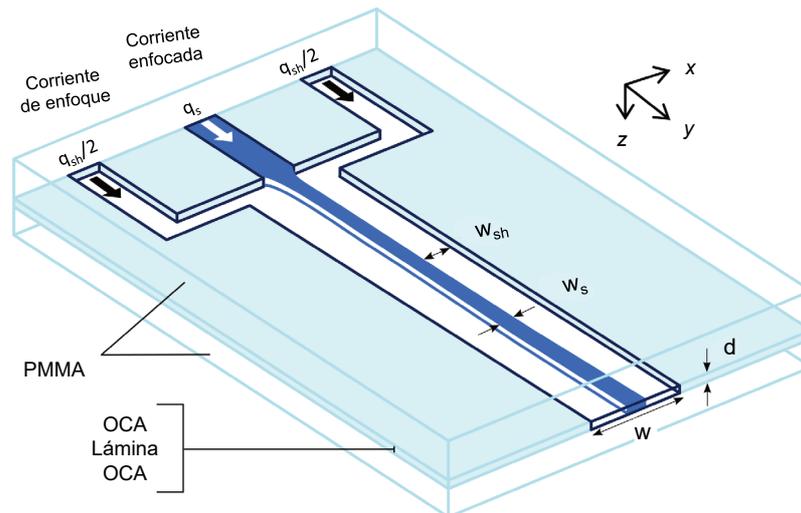


Figura 16. Representación esquemática del dispositivo híbrido multicapa, enfatizando la región de la intersección de microcanales. La corriente del fluido de muestra (densidad ρ_s , viscosidad μ_s) se inyecta al caudal q_s . Las corrientes de fluido de la cubierta (densidad ρ_{sh} , viscosidad μ_{sh}) se inyectan simétricamente al caudal $q_s/2$. Las dimensiones geométricas son las siguientes: w_s es el ancho de la corriente enfocada, w_{sh} es el ancho de los flujos de enfoque, w es el ancho del microcanal y d es la profundidad del microcanal (dibujo fuera de escala) (figura modificada de Giorello et al., 2020).

2.3.3. Fluidos de trabajo

El fluido de las corrientes laterales fue agua destilada ($\rho = 998\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$, $\mu = 1\text{mPas}$) en todos los experimentos. Los fluidos de la corriente enfocada fueron etanol ($\rho = 789\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$, $\mu = 1,18\text{mPas}$) (Lide et al., 2004), solución acuosa de NaCl, 20% m/v ($\rho = 1148\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$, $\mu = 1,40\text{mPas}$) (Kestin et al., 1981) o agua destilada. El último se usó como referencia, porque no se esperan efectos de gravedad cuando todos los líquidos involucrados son de igual característica. Todos los parámetros fisicoquímicos de los fluidos corresponden a 20°C y a la presión normal, condiciones en las que se realizaron los experimentos. Se añadió un colorante azul al fluido de la corriente enfocada para el contraste de la imagen.

2.3.4. Configuración experimental

Para bombear los líquidos se utilizó un sistema controlado por presión hidrostática, como se sugiere para operaciones que requieren flujos altamente estables (Groisman et al., 2003). En el siguiente capítulo se detallará el desarrollo de un modelo matemático y el diseño de un sistema de bombeo accionado por gravedad para predecir con precisión el ancho de enfoque en función de las alturas de columna hidrostática. Brevemente, los líquidos de trabajo se colocaron en jeringas de plástico que se utilizaron como depósitos. Se fijaron a un soporte deslizante en rieles verticales montados con reglas precisas. El gran tamaño de la jeringa evita la variación de nivel

durante las corridas experimentales. Las salidas de las jeringas se conectaron a tubos largos de teflón, cuyas resistencias hidrodinámicas son mucho más grandes que las del chip microfluídico. Se lograron relaciones precisas entre la altura hidrostática (h) y el caudal (q) proporcionado por cada columna de líquido. Para una h dada, q se calculó después de medir en una balanza de laboratorio el fluido recogido durante un intervalo de tiempo definido. Los resultados fueron: $q = 0,139h - 0,083$ para agua, $q = 0,0985h - 0,293$ para etanol, y $q = 0,111h - 0,135$ para la solución salina, con q en mL/h y h en cm. Estas curvas de calibración permitieron cálculos precisos del caudal para diferentes niveles de las columnas hidrostáticas. Las entradas de chips se conectaron a los brazos respectivos de las columnas de fluido. Se verificó que el caudal total en la salida del chip coincidía con la suma de los caudales de cada brazo, con un error inferior al 6%. También se verificó que, para un caudal dado, se logra el mismo ancho de enfoque utilizando bombas de jeringa para conducir los fluidos. Durante las corridas experimentales, se tomaron imágenes de los patrones de enfoque de flujo desde una vista superior de los microcanales (planos xy en la **Figura 16**) utilizando una cámara digital de alta resolución (Nikon Coolpix B700). El ancho de enfoque w_s se determinó en las imágenes grabadas utilizando el software ImageJ® (National Institutes of Health, EE.UU.). Para minimizar el efecto de la interdifusión, se tomaron imágenes cerca de la intersección de los microcanales, inmediatamente después de que el patrón de flujo se desarrollara por completo. Para cada muestra, se realizaron diez mediciones de w_s en las imágenes grabadas, luego se calculó el valor promedio y la desviación estándar.

2.4. Resultados y discusión

2.4.1. Planteo del problema

En esta sección se ilustra la acción de la gravedad sobre el desarrollo del flujo de enfoque hidrodinámico (**Figura 17**), mediante el uso de un conjunto de experimentos diseñados para este propósito. Además, se presenta brevemente el modelo analítico disponible para comprender mejor el problema planteado. Como se describe en la sección anterior, los chips fabricados tienen microcanales rectangulares con una profundidad mucho menor que el ancho. El enfoque del flujo se logra en una intersección transversal, donde la corriente central está confinada por dos flujos laterales (**Figura 16**). El canal central se alimenta con el fluido de muestra (densidad ρ_s , viscosidad μ_s) a la velocidad de flujo q_s , y los canales laterales se alimentan con el fluido de enfoque (densidad ρ_{sh} , viscosidad μ_{sh}) a la velocidad de flujo $q_{sh}/2$. Para fluidos de igual densidad ($\rho_s = \rho_{sh}$) que fluyen en el régimen laminar, el ancho relativo

de la corriente enfocada obedece a la siguiente expresión (Larsen & Shapley, 2007; Wu & Nguyen, 2005),

$$\frac{w_s}{w} = \frac{1}{1 + \frac{q_{sh}}{q_s} \frac{\mu_{sh}}{\mu_s}} \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

donde la relación de caudales q_{sh}/q_s es el parámetro operativo crítico.

También se han informado estudios sobre la influencia de la relación de viscosidades con aplicaciones interesantes (Cubaud & Mason, 2008; Nguyen et al., 2008). En particular, si $\mu_s = \mu_{sh}$, la Ecuación 2.1 se simplifica a la expresión propuesta para fluidos con propiedades iguales (G. Lee et al., 2006; Stiles et al., 2005), que se emplea comúnmente para controlar el ancho de enfoque (luego el tiempo de mezcla en nanoprecipitación) al controlar la relación q_{sh}/q_s (Karnik et al., 2008; Leung & Shen, 2018; Tresset et al., 2013).

La **Figura 17** muestra una serie de experimentos que se realizaron con la relación fija $q_{sh}/q_s = 2$ mientras se explora diferentes orientaciones del chip en relación con la aceleración de la gravedad (g). En todos los casos, el sistema de referencia está montado en el chip, y el eje “y” coincide con la velocidad del fluido en el canal de enfoque. El líquido de las corrientes laterales siempre fue agua. Los fluidos de la corriente central fueron etanol (menos denso que el agua) o la solución salina acuosa (más densa que el agua). Como referencia, una corriente de agua coloreada también fue enfocada por corrientes de agua, que conducen a $w_s/w = 1/3$ independientemente de la orientación del chip, de acuerdo con la predicción de la Ecuación 2.1.

Cuando la dirección del flujo coincidió con la aceleración de la gravedad (**Figura 17a**), el ancho de la corriente enfocada de etanol fue sustancialmente más ancho que el del agua a la misma relación de caudal, mientras que el ancho de la solución salina resultó más estrecho que el del agua. Cuando la dirección del flujo fue opuesta a la aceleración de la gravedad (**Figura 17b**), la corriente enfocada de etanol resultó más estrecha que la del agua, mientras que el ancho de la solución salina fue más ancho que el del agua. Para fluidos con distintas densidades, la gravedad induce velocidades diferentes en cada flujo (Hajian & Hardt, 2015), lo que resulta en una variación del ancho de enfoque en relación con el caso de fluidos con igual densidad. Vale la pena señalar que, aunque el ancho de enfoque del etanol y la solución de sal se apartaron de la predicción de la Ecuación 2.1, el flujo vertical conservó el patrón constante de tres capas paralelas.

En contraposición, cuando el flujo fue transversal a la gravedad, con el plano xy del chip orientado verticalmente, el patrón de tres capas fue inmediatamente perturbado (**Figura 17c**), dado que los fluidos cambian de posición debido a la flotación/hundimiento del fluido menos denso/más denso. En el caso del etanol, la corriente azul gradualmente se dirigió hacia la región superior del microcanal, mientras que el agua se desplazó hacia el fondo. Lo contrario sucedió en el caso de la solución salina: la corriente enfocada se hundió hacia la parte inferior del microcanal. Como se esperaba, el patrón de enfoque de flujo permaneció sin perturbaciones cuando se usó agua como fluido de muestra (**Figura 17c**).

El flujo transversal a la gravedad admite otra configuración: el plano xy del chip ubicado horizontalmente (**Figura 17d**). En este caso, el fluido menos denso se expandió a lo largo de la parte superior del canal, sobre la corriente de agua, que, a su vez, se acomodó en el fondo del canal. En consecuencia, el patrón inicial de tres capas paralelas se convirtió gradualmente en un dominio de dos capas superpuestas. Durante el proceso, la corriente enfocada adoptó una forma de sección transversal triangular, que se manifestó como un ensanchamiento aparente de la corriente coloreada (**Figura 17d**). Se observaron las mismas características en el caso de la solución salina, donde la corriente más densa se expandió en el fondo del canal. Además, en esta configuración, cuando se usó agua como muestra, el patrón de enfoque de flujo permaneció intacto (**Figura 17d**).

Es evidente que la gravedad juega un papel notable cuando los fluidos de trabajo tienen diferentes densidades, incluso en el flujo confinado del microcanal. Las orientaciones mostradas en las **Figuras 17c** y **d** pueden ser perjudiciales para el logro de un enfoque de flujo uniforme; sin embargo, se pueden inferir ideas para nuevas aplicaciones a partir de estos flujos estratificados. Por ejemplo, el control basado en la orientación de la mezcla (Norouzi et al., 2016), el flujo de revestimiento vertical para inmunoensayos basados en difusión (Kurmashhev et al., 2019) y el fraccionamiento de micro y NPs en coflujos (Salafi et al., 2017); todos ellos con grandes potenciales en los campos de sensores y actuadores. Por otro lado, las orientaciones que se muestran en las **Figura 17a** y **b** son adecuadas para lograr corrientes enfocadas uniformes y estrechas, como las requeridas para la nanoprecipitación microfluídica (Karnik et al., 2008; Leung & Shen, 2018; Ni et al., 2017; Thiele et al., 2010; Tresset et al., 2013).

Sin embargo, el ancho de la corriente enfocada no puede describirse mediante los modelos analíticos disponibles, que solo consideran fluidos de igual densidad. En lo que sigue derivamos una ecuación para predecir cuantitativamente el ancho de enfoque de fluidos con densidades diferentes.

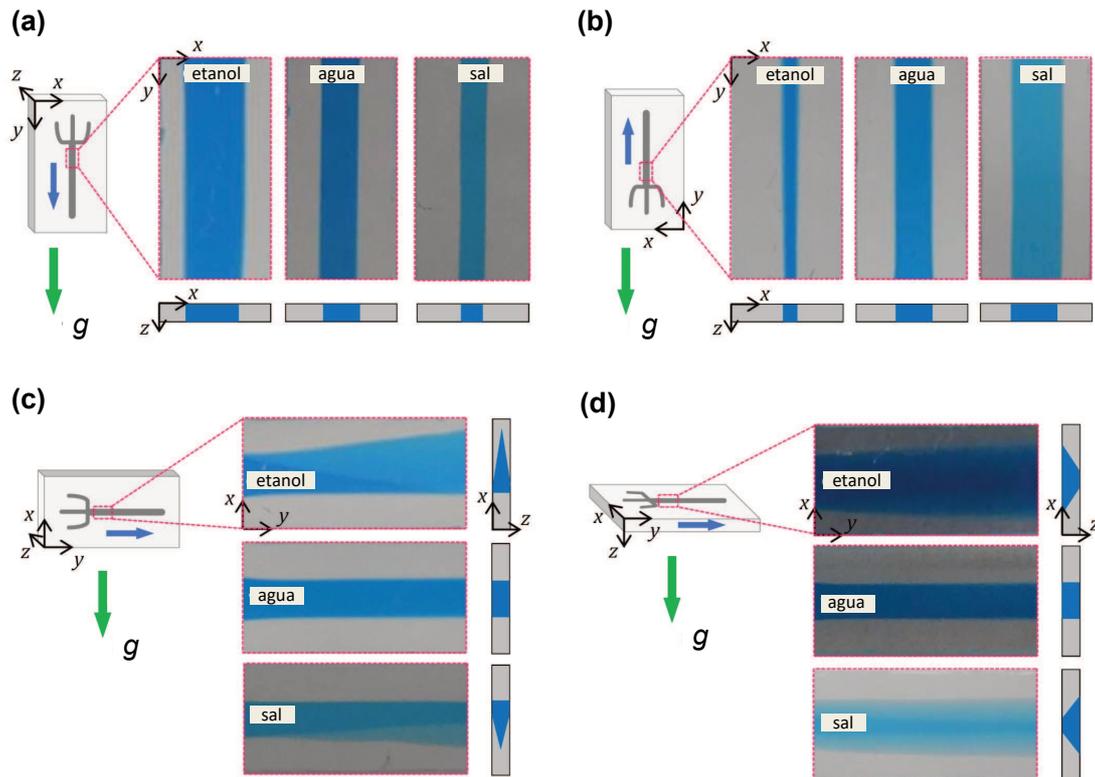


Figura 17. Imágenes de flujo enfocado en el microcanal para diferentes orientaciones del campo de flujo (flechas azules) en relación con el campo gravitacional (flechas verdes). En todos los ejemplos, el fluido de las corrientes de enfoque era agua (transparente), mientras que el fluido de la muestra (azul) era alternativamente etanol, solución salina o agua. (a) Flujo enfocado en la dirección de la gravedad (flujo hacia abajo). (b) Flujo enfocado en la dirección opuesta de la gravedad (flujo ascendente). (c) Enfoque de flujo transversal a la gravedad, con el chip en un plano vertical. (d) Enfoque de flujo transversal a la gravedad, con el chip en el plano horizontal (figura modificada de Giorello et al., 2020).

2.4.2. Modelo teórico

Se aplicó un modelo simplificado para investigar el enfoque del flujo en microcanales rectangulares que están alineados con el campo gravitatorio, con el flujo hacia arriba o hacia abajo. Se supone que el flujo es estacionario, perfectamente laminar (números de Reynolds relativamente bajos; $(Re = \rho_{sh} q_{sh} / \mu_{sh} w)$, y libre de inestabilidades hidrodinámicas (más adelante se brindan más discusiones sobre este aspecto). El dominio de análisis comprende el flujo en el canal de enfoque, una vez que el patrón de enfoque se desarrolla completamente después de la intersección transversal. Además, para el sistema aquí considerado, la relación de aspecto del microcanal fue $d/w \ll 1$. Bajo estas condiciones, se satisface un flujo Hele-Shaw unidireccional (White & Majdalani, 2006), con la velocidad del fluido en la dirección y (**Figura 17**). Las corrientes laterales y la corriente enfocada se pueden considerar como flujos paralelos separados por paredes virtuales (interface de agua-muestra-agua), que se supone que

son planas, con una tensión interfacial insignificante y no perturbadas apreciablemente por la interdifusión en el área de análisis. Por lo tanto, la conservación de materia en cada corriente impone que $q_s = \langle v_s \rangle w_s d$ y $q_{sh} = \langle v_{sh} \rangle 2w_{sh} d$, donde $\langle v_s \rangle$ y $\langle v_{sh} \rangle$ son las respectivas velocidades promedio del fluido (Bruus, 2007; White & Majdalani, 2006). Teniendo en cuenta que $w_s + 2w_{sh} = w$, el cociente de estos caudales da como resultado,

$$\frac{w_s}{w} = \frac{1}{1 + \frac{q_{sh} \langle v_s \rangle}{q_s \langle v_{sh} \rangle}} \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

Las velocidades de fluido promediadas se calculan independientemente sobre el área de la sección transversal de cada corriente, para una caída de presión dada a lo largo del canal de enfoque. Para fluidos de igual densidad, el cálculo resulta,

$$\frac{\langle v_s \rangle}{\langle v_{sh} \rangle} = \frac{\mu_{sh}}{\mu_s} \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

Introduciendo esta relación de velocidad en la Ecuación 2.2 conduce a la Ecuación 2.1 (Larsen & Shapley, 2007; Tripathi et al., 2014; Wu & Nguyen, 2005).

En este análisis, para tener en cuenta el contraste de densidad de los fluidos, consideramos la presión generalizada que incluye tanto la presión aplicada (p) como la contribución de las fuerzas gravitatorias a lo largo de la trayectoria del flujo (ρgy) (Bruus, 2007; White & Majdalani, 2006). Por lo tanto, para el flujo alineado con la gravedad, la velocidad promedio de la sección transversal de cada corriente resulta ahora,

$$\langle v_s \rangle = -\frac{d^2}{12\mu_s} \left(\frac{\partial p}{\partial y} + \rho_s g \right) \quad (\text{Ecuación 2.4a})$$

$$\langle v_{sh} \rangle = -\frac{d^2}{12\mu_{sh}} \left(\frac{\partial p}{\partial y} + \rho_{sh} g \right) \quad (\text{Ecuación 2.4b})$$

Una consideración clave aquí es que la presión diferencial que surge entre las corrientes de diferentes densidades se compensa mediante un ajuste de la resistencia hidrodinámica de cada corriente, lo que conduce a una variación de los anchos de la corriente, de modo que las caídas de presión se vuelven uniformes a través del plano xz (**Figura 17**). Las variaciones de w_s y w_{sh} están acopladas, ya que la restricción

$w_s + 2w_{sh} = w$ debe cumplirse. Bajo estos supuestos, las Ecuaciones 2.4a y 2.4b pueden integrarse entre posiciones arbitrarias a lo largo de la dirección del flujo, y el cociente de las velocidades promedio de los fluidos ahora resulta,

$$\frac{\langle v_s \rangle}{\langle v_{sh} \rangle} = \frac{\mu_{sh}}{\mu_s} \mp \frac{(\rho_{sh} - \rho_s) g d^2}{\langle v_{sh} \rangle 12 \mu_s} \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

La Ecuación 2.5 tiene un término adicional en relación con la Ecuación 2.3. El signo menos corresponde al flujo hacia abajo (**Figura 17a**) y el signo más corresponde al flujo hacia arriba (**Figura 17b**). En ambos casos, la acción de la gravedad aumenta la velocidad diferencial entre las corrientes de flujo. También se observa que el término gravitacional es inversamente proporcional a la velocidad promedio del fluido de enfoque, es decir, el efecto de la gravedad aumenta cuando Re disminuye (los valores prácticos se dan en la siguiente sección).

La conservación de masa todavía impone que $q_s = \langle v_s \rangle w_s d$ y $q_{sh} = \langle v_{sh} \rangle 2w_{sh} d$. Por lo tanto, introduciendo la Ecuación 2.5 en la Ecuación 2.2 se obtiene la siguiente expresión para el ancho de enfoque relativo,

$$\frac{w_s}{w} = \frac{1}{1 + \frac{q_{sh} \mu_{sh}}{q_s \mu_s} \left[1 \mp \frac{(\rho_{sh} - \rho_s) q_G}{\rho_{sh} q_{sh}} \left(1 - \frac{w_s}{w} \right) \right]} \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

que se escribe como una ecuación implícita para facilitar la comparación con la Ecuación 2.1. El efecto de la gravedad resulta condensado en el segundo término entre los corchetes de la Ecuación 2.6. En primer lugar, el ancho de enfoque depende de la diferencia de densidad entre los fluidos $(\rho_{sh} - \rho_s)$. Consistentemente, todo el término se anula para fluidos de densidad equivalente y se recupera la Ecuación 2.1. En segundo lugar, el ancho de enfoque depende del caudal absoluto q_{sh} (o equivalentemente, del Re), aparte de la relación q_{sh}/q_s . En tercer lugar, aparece un nuevo parámetro del sistema,

$$q_G = \frac{\rho_{sh} g d^3 w}{12 \mu_{sh}} \quad (\text{Ecuación 2.7})$$

que se define como el caudal gravitacional. Este parámetro representa la velocidad de flujo en el canal de enfoque debido al peso de su propio líquido (lleno con el fluido de

las corrientes laterales y alineado con la gravedad). En la Ecuación 2.6, q_G equilibra la influencia de la gravedad en relación con el q_{sh} aplicado.

Finalmente, para escribir una expresión explícita de w_s/w , la Ecuación 2.6 se reorganiza como una ecuación cuadrática y luego se resuelve de la siguiente manera,

$$\frac{w_s}{w} = \frac{-[1 + \alpha(1 \mp \beta)] + \{[1 + \alpha(1 \mp \beta)]^2 \pm 4\alpha\beta\}^{1/2}}{\pm 4\alpha\beta} \quad (\text{Ecuación 2.8})$$

donde $\alpha = q_{sh}\mu_{sh}/(q_s\mu_s)$ y $\beta = (\rho_{sh} - \rho_s)q_G/(\rho_{sh}q_{sh})$. Las predicciones de la Ecuación 2.8 se analizan a continuación, para describir mejor la influencia de los parámetros de control, y luego se comparan con los datos experimentales.

2.4.3. Predicciones del modelo

En primer lugar, vale la pena resaltar que el ancho de enfoque relativo de los fluidos con densidades diferentes, según la Ecuación 2.8, depende de cuatro relaciones adimensionales, que se pueden resumir en la siguiente forma funcional,

$$\frac{w_s}{w} = f\left(\frac{q_{sh}}{q_s}, \frac{\mu_{sh}}{\mu_s}, \frac{\rho_{sh}}{\rho_s}, \frac{q_G}{q_{sh}}\right) \quad (\text{Ecuación 2.9})$$

Como una contribución novedosa en relación con trabajos anteriores (Knight et al, 1998; Cubaud & Mason, 2008; Larsen & Shapley, 2007; G. Lee et al., 2001, 2006; Nguyen et al., 2008; Tripathi et al., 2014; Wu & Nguyen, 2005), este modelado introduce la influencia de ρ_{sh}/ρ_s y q_G/q_{sh} . Precisamente, como los efectos de las relaciones q_{sh}/q_s y μ_{sh}/μ_s ya son bien conocidos, en lo que sigue discutimos la influencia de ρ_{sh}/ρ_s (**Figura 18**) y q_G/q_{sh} (**Figura 19**). En consecuencia, usamos $q_{sh}\mu_{sh}/(q_s\mu_s)$ como la abscisa en las gráficas, para discriminar claramente los efectos del contraste de densidad de fluidos.

La **Figura 18a** muestra la predicción de la Ecuación 2.8 para diferentes valores de ρ_s/ρ_{sh} , para la configuración ilustrada en la **Figura 17a**. La variación del ancho de enfoque con la densidad del fluido de la muestra es notablemente descripta por el modelo: cuando el flujo se alinea con la gravedad, el ancho de la corriente central se amplía para $\rho_s/\rho_{sh} < 1$ (etanol) y se estrecha para $\rho_s/\rho_{sh} > 1$ (solución salina). La **Figura 18b** muestra la predicción de la Ecuación 2.8 para la configuración experimental ilustrada en la **Figura 17b**. El modelo predice nuevamente la tendencia experimental: ahora el ancho de la corriente central se estrecha para fluidos menos

densos y se amplía para fluidos más densos. Las **Figuras 18a** y **b** muestran la simetría involucrada en el modelo con respecto a la acción de la gravedad: en la Ecuación 2.8, invertir la orientación del chip para un par dado de fluidos, es equivalente a cambiar la configuración de estos fluidos (fluido lateral a fluido enfocado y viceversa) mientras se mantiene la orientación del chip.

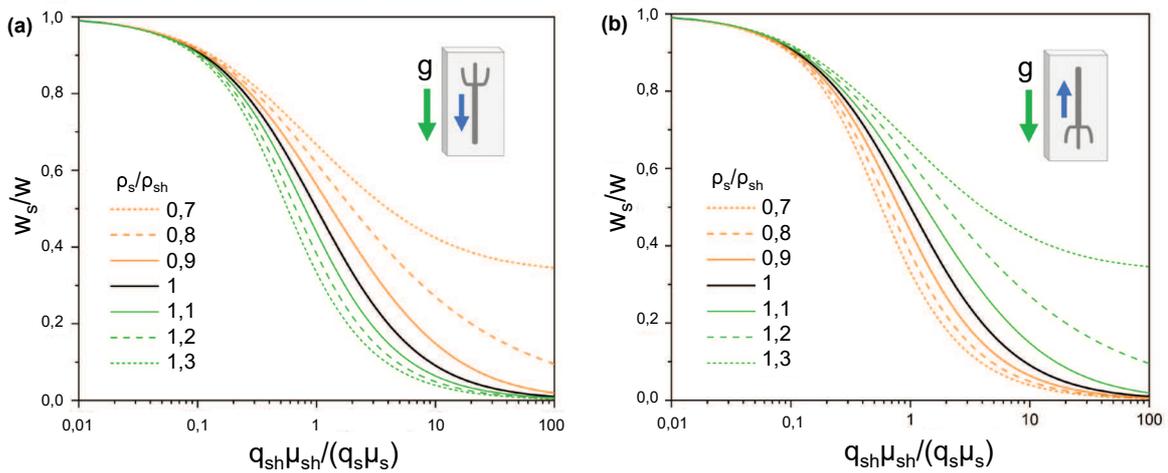


Figura 18. Ancho relativo de la corriente enfocada en función de la relación de velocidad de flujo, de acuerdo con la Ecuación 2.8, para diferentes relaciones de densidad de fluido, a $q_G/q_{sh} = 5$ fijo (esta relación corresponde a $Re \approx 0,9$ para los chips utilizados en los experimentos de la **Figura 17**). (a) Flujo enfocado en la dirección de la gravedad (hacia abajo). (b) Flujo enfocado en la dirección opuesta de la gravedad (hacia arriba) (figura modificada de Giorello et al., 2020).

La **Figura 19** muestra la predicción de la Ecuación 2.8 para diferentes valores de q_G/q_{sh} , para la relación $q_G/q_{sh} = 0,8$, que representa el enfoque del etanol por el agua. Se muestran ambas orientaciones: flujo hacia arriba, donde se estrecha el ancho de enfoque, y flujo hacia abajo, donde se amplía el ancho de enfoque. Dos aspectos son importantes para comentar en este gráfico. En primer lugar, el hecho de que el ancho de enfoque depende del caudal absoluto q_{sh} , o del Re . La importancia relativa de q_{sh} está equilibrada por la velocidad de flujo gravitacional q_G , que es una constante para un microcanal dado y un fluido de trabajo (ver Ecuación 2.7). En el límite de caudales de las corrientes laterales muy grandes ($q_G/q_{sh} \ll 1$), el efecto de la gravedad es insignificante y el ancho de enfoque se aproxima a la predicción de la Ecuación 2.1 (línea negra en la **Figura 19**). En particular, $q_G/q_{sh} = 0,01$ corresponde a $Re \approx 440$ para los chips microfluídicos utilizados en nuestros experimentos, lo que significa que se requieren caudales de Re relativamente altos para minimizar el efecto de la gravedad, los flujos de Hele-Shaw son todavía laminares a estos Re (White &

Majdalani, 2006). Por otro lado, para caudales laterales muy bajos ($q_G/q_{sh} \gg 1$), el efecto de la gravedad aumenta notablemente, es decir, se produce un ensanchamiento y un estrechamiento extremos. Por ejemplo, para el chip utilizado en la **Figura 17**, la relación $q_G/q_{sh} = 20$ es equivalente a $Re \approx 0,2$. Por lo tanto, es evidente en la **Figura 19** que, cuantos más bajos son los Re , mayores son las consecuencias del contraste de densidad, lo cual debe ser tenido muy en cuenta en el enfoque hidrodinámico.

El segundo aspecto a destacar en la **Figura 19** es que, para el flujo descendente, el w_s/w predicho alcanza un valor asintótico para grandes valores de q_{sh}/q_s . Este comportamiento se manifiesta claramente para $q_G/q_{sh} = 20$ en la **Figura 19**, donde la relación w_s/w es de 0,75. La asíntota surge cuando β se hace mayor que 1 en la Ecuación 2.8. En la práctica, la asíntota significa que la corriente central no puede enfocarse más allá de un cierto límite, que se impone por la fuerza gravitacional en la corriente central: flotación en el caso del etanol y hundimiento en el caso de la solución salina.

El presente modelo es estrictamente válido para flujos verticales; sin embargo, uno puede considerar los efectos potenciales de los ángulos de orientación intermedios. Incluyendo en el modelo $g_y = g \sin \theta$ en lugar de g , donde θ es el ángulo entre la dirección del flujo y el campo gravitacional, la magnitud del término de gravedad (Ecuación 2.5) se convierte en una función del ángulo de inclinación del dispositivo: el efecto es máximo para $\theta = 90^\circ$ (**Figura 17a y b**) y nulo para $\theta = 0^\circ$. Por lo tanto, para ángulos inferiores a 90° , uno puede esperar una influencia menor de la gravedad en el ancho de enfoque; sin embargo, el intercambio de flujos se desarrollará progresivamente, lo que conducirá a una distorsión gradual del patrón de enfoque (**Figura 17c y d**). Por estas razones, y para lograr un modelo simple pero efectivo de enfoque de flujo, restringimos nuestro estudio a flujos perfectamente alineados con la gravedad, ya sea hacia abajo o hacia arriba. Sin embargo, vale la pena señalar que se pueden producir una gran variedad de patrones de flujo complejos inclinando el dispositivo a valores intermedios de θ y/o girando el plano xy .

Por otro lado, independientemente de la gravedad, las diferencias de viscosidad muy grandes ($\mu_{sh} - \mu_s$) pueden conducir a la inestabilidad de la interfaz en fluidos miscibles (Cubaud & Mason, 2008). Vale la pena anticipar que esta inestabilidad no se observó en nuestros experimentos, ya que los fluidos de trabajo tenían viscosidades dentro del mismo orden de magnitud (Sección 2.3.3).

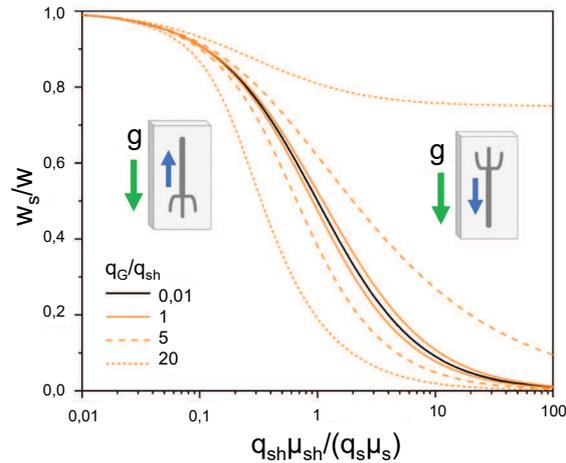


Figura 19. Ancho relativo de la corriente enfocada en función de la relación de caudal, de acuerdo con la Ecuación 2.8, para diferentes valores de q_G/q_{sh} a $\rho_s/\rho_{sh} = 0,8$ fijo. Las curvas de la izquierda corresponden al flujo hacia arriba y las curvas de la derecha corresponden al flujo hacia abajo, como lo indican las imágenes insertadas. Para un dispositivo de enfoque de flujo dado, q_G/q_{sh} pequeño implica Re grande, y viceversa (figura modificada de Giorello et al., 2020).

2.4.4. Comparación de la predicción del modelo con los datos experimentales.

Los experimentos se llevaron a cabo con el dispositivo microfluídico y los fluidos de trabajo descritos anteriormente. El ancho de enfoque relativo w_s/w se obtuvo del análisis de imagen de los patrones de enfoque de flujo registrado para cada condición operativa. La relación de caudales q_{sh}/q_s se obtuvo de la altura de las columnas hidrostáticas empleadas para el bombeo, como se describe en la sección experimental. La relación μ_{sh}/μ_s utilizada para trazar datos para cada par de fluidos se calculó a partir de los valores también informados en la sección experimental. Para cada corrida experimental, los datos se obtuvieron a un q_{sh} arbitrario pero fijo, mientras que se obtuvieron diferentes proporciones q_{sh}/q_s al reducir la altura de la columna hidrostática del fluido de muestra, es decir, disminuyendo q_s . La **Figura 20a** presenta los resultados obtenidos con el chip orientado hacia abajo, donde $q_{sh} = 6,9$ mL/h para enfocar etanol y $q_{sh} = 2,7$ mL/h para enfocar la solución salina. La **Figura 20b** presenta los resultados obtenidos con el chip orientado hacia arriba, donde $q_{sh} = 6,6$ mL/h para etanol y $q_{sh} = 2,7$ mL/h para la solución salina. En todos estos experimentos, los caudales utilizados corresponden a Re en el rango de 0,1 a 0,7. Todos los parámetros necesarios para la implementación de la Ecuación 2.8 son conocidos *a priori*. Sin embargo, dejamos el flujo gravitacional q_G como parámetro libre para ajustar adecuadamente las curvas del modelo a los datos medidos. Cuando el

chip está orientado en la dirección de la gravedad (**Figura 20a**), se encuentra fácilmente que $q_G = 39$ mL/h conduce a una representación adecuada de todo el conjunto de datos (solución de etanol y sal). En la orientación opuesta (**Figura 20b**), se obtiene una descripción adecuada del modelo para $q_G = 25$ mL/h, tanto para etanol como para solución salina. Estos valores son bastante razonables teniendo en cuenta que, para el chip y el fluido de las corrientes laterales utilizado, la Ecuación 2.7 predice $q_G = 47$ mL/h. Por supuesto, se esperan valores más bajos de q_G en la práctica, porque la relación de aspecto w/d no fue lo suficientemente grande como para lograr un microcanal rectangular ideal ($w/d \approx 17$ en el dispositivo fabricado). Sin embargo, existe una diferencia inesperada entre los valores de q_G para cada orientación del chip. La diferencia se verificó haciendo los mismos experimentos con bombas de jeringa, que imponen caudales controlados q_s y q_{sh} . Este resultado sugiere que el modelo simplificado aquí presentado podría estar descuidando alguna característica adicional que cobra relevancia bajo la acción de la gravedad, un aspecto que motiva futuras investigaciones. Por otro lado, vale la pena señalar que el modelo predice satisfactoriamente las tendencias cualitativas para diferentes fluidos, y que la predicción cuantitativa correcta depende de un único parámetro (q_G). Se puede observar además que una formulación completa del problema de enfoque haría imposible la derivación de una expresión analítica simple que contenga los parámetros críticos del sistema, como la Ecuación 2.8. Este modelo simple, en su forma actual, predice con éxito la dependencia funcional del ancho de enfoque, como se destaca en la Ecuación 2.9.

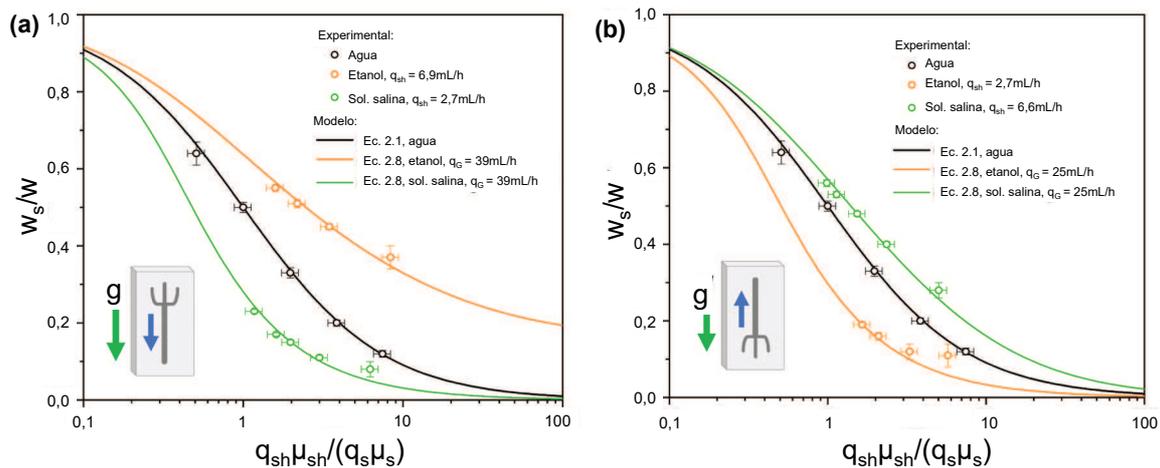


Figura 20. Ancho relativo de la corriente enfocada en función de la relación de caudal, para diferentes fluidos de muestra y orientaciones del chip: (a) Flujo enfocada en la dirección de la gravedad (hacia abajo). (b) Flujo enfocada en la dirección opuesta de la gravedad (hacia arriba). En ambos casos, los símbolos son datos experimentales: el negro representa agua ($\rho_s/\rho_{sh} = 1$); sin efectos de gravedad), el naranja representa etanol ($\rho_s/\rho_{sh} < 1$) y el verde representa solución salina ($\rho_s/\rho_{sh} > 1$). Las barras de error en el eje de ordenadas son la desviación estándar de diez mediciones. Las barras de error en el eje de abscisas son el error estimado para la conversión de presiones hidrostáticas en caudales. Las líneas son la predicción del modelo: Ecuación 2.1 para fluidos de igual densidad y Ecuación 2.8 para fluidos con contraste de densidad (ver texto para valores de parámetros) (figura modificada de Giorello et al., 2020).

2.4.5. Consejos de diseño para experimentos de enfoque de flujo

Con respecto a los resultados experimentales y del modelo, aquí describimos algunas observaciones prácticas para ayudar en el diseño de experimentos de enfoque de flujo que requieren líquidos con diferentes densidades:

- (i) El patrón de enfoque hidrodinámico se ve seriamente perturbado si el campo de flujo está orientado perpendicular al campo gravitacional. Por lo tanto, las orientaciones alineadas con la aceleración de la gravedad son obligatorias para lograr corrientes enfocadas simétricas y uniformes. Para estas configuraciones, el ancho de enfoque se puede predecir con precisión a partir de la Ecuación 2.8
- (ii) Cuando el fluido de la corriente enfocada es más denso que el fluido de las corrientes laterales, el flujo hacia arriba induce un ensanchamiento de la corriente enfocada, mientras que el flujo hacia abajo estrecha la corriente enfocada. Lo contrario sucede cuando el fluido de la corriente enfocada es menos denso que el fluido de las corrientes laterales. Por lo tanto, siempre que normalmente se requieran anchos de enfoque estrechos, el flujo debe orientarse hacia abajo para fluidos centrales más densos que los fluidos laterales, y hacia arriba para fluidos centrales menos densos que los fluidos laterales.

- (iii) Independientemente de la orientación del chip, los efectos antes mencionados se vuelven más significativos a medida que disminuye el caudal de las corrientes laterales. Además, surge un valor límite para el ancho de enfoque si la velocidad de flujo lateral es baja en relación con el caudal gravitacional. Por lo tanto, independientemente de la relación de caudales, se requieren velocidades de flujo relativamente grandes para mitigar la acción de la gravedad en los patrones de enfoque hidrodinámico.

2.5. Conclusiones parciales

A lo largo del capítulo hemos discutido, mediante teoría y experimentos, los efectos de la gravedad en el enfoque hidrodinámico de líquidos con contraste de densidad. Se demostró que solo se puede lograr un patrón de enfoque uniforme si el campo de flujo está alineado con el campo gravitacional, en la misma dirección o en la dirección opuesta. Para estas configuraciones, se obtuvo un modelo matemático simple, que predice cuantitativamente el ancho de la corriente enfocada en microcanales rectangulares, en términos de los parámetros operativos críticos.

Vale la pena destacar que la influencia de la densidad del fluido en el ancho de la corriente enfocada se informa aquí por primera vez. También se descubrió que el enfoque de fluidos con densidades diferentes depende de manera crucial del caudal absoluto (aparte de la relación de caudales), y que esta variable escala con un parámetro del sistema, que se designó velocidad de flujo gravitacional (Ecuación 2.7). La funcionalidad general del modelo se resume en la Ecuación 2.9, que exhibe la influencia de dos proporciones adicionales, en relación con los modelos disponibles para fluidos de igual densidad (Ecuación 2.1). Efectivamente, la nueva propuesta (Ecuación 2.8) explica la acción de la gravedad y, por lo tanto, captura razonablemente las variaciones del ancho de enfoque para un rango de condiciones de operación.

Las predicciones aquí reportadas son válidas para microcanales rectangulares con una altura muy inferior al ancho. Limitamos el modelado a esta geometría para evitar formulaciones complejas que requerirían simulaciones numéricas, donde el papel de los parámetros críticos no puede identificarse directamente. Como ventaja, el modelo propuesto consiste en expresiones algebraicas simples que incluyen explícitamente los parámetros de control del sistema. Por lo tanto, el modelo resulta una herramienta práctica para el diseño y la optimización de diferentes aplicaciones basadas en el enfoque hidrodinámico, especialmente el autoensamblaje y la nanoprecipitación.

Capítulo 3

Desarrollo de un sistema de enfoque hidrodinámico controlado por presión hidrostática.

3.1. Introducción

El enfoque controlado de una corriente de fluido es una de las operaciones clave en microfluídica y hoy en día se utiliza para varias aplicaciones. Lograr un control preciso del ancho de enfoque desde los parámetros operativos ha sido una preocupación desde el desarrollo de la técnica (Knight et al., 1998; Larsen & Shapley, 2007; G. B. Lee et al., 2001; Stiles et al., 2005; Tripathi et al., 2014). Para aplicar la nanoprecipitación en microfluídica, tanto la estabilidad del flujo como el manejo preciso de las corrientes enfocadas son esenciales. Sin embargo, estos requisitos no pueden cumplirse en su totalidad cuando los fluidos se suministran mediante bombas de jeringa, debido a las inevitables fluctuaciones asociadas al sistema mecánico de accionamiento, principalmente el motor paso a paso y el tornillo de avance (Z. Li et al., 2014; Zeng et al., 2015). En tal sentido, los sistemas impulsados por gravedad son más adecuados cuando se requieren flujos altamente estables y controlados. Además, dada su simplicidad y bajo costo, los sistemas impulsados por gravedad podrían emplearse mucho más en laboratorios de microfluídica y de industria; sin embargo, estas ventajas se ven contrarrestadas por el requisito de configuraciones experimentales meticulosas, ya que es necesario un diseño cuidadoso de toda la red fluídica para asegurar corrientes de flujo constantes y libres de inercia.

En el caso de los sistemas de flujo controlado con bombas automáticas, se sabe bien cómo predecir el ancho de la corriente enfocada, en función de los caudales impuestos mecánicamente. Por ejemplo, en canales rectangulares y para fluidos con propiedades fisicoquímicas iguales, el ancho de enfoque obedece a la Ecuación 2.6 discutida en el capítulo anterior (G. B. Lee et al., 2006; Stiles et al., 2005). Esta relación simple es ampliamente utilizada para estimar el tiempo de mezcla en nanoprecipitación microfluídica usando la Ecuación 2.8 (Karnik et al., 2008; Leung & Shen, 2018; Tresset et al., 2013). En sistemas controlados por presión hidrostática, los caudales en el chip microfluídico resultan de las alturas de las columnas de los líquidos (fase orgánica y acuosa) y la resistencia hidrodinámica de todo el circuito, que a su vez depende tanto de la geometría de los microcanales como de las propiedades de los fluidos.

3.2. Objetivos

Los objetivos específicos de este capítulo son los siguientes:

- Diseñar un sistema de bombeo accionado por gravedad y plantear un modelo matemático para predecir con precisión el ancho de enfoque en función de las alturas de columna hidrostática.
- Validar las predicciones teóricas con datos experimentales, para una amplia gama de condiciones de funcionamiento.

- Comprobar el manejo de las condiciones de flujo para la reacción y mezcla por difusión, como fenómenos fundamentales en la nanoprecipitación microfluídica.

3.3. Desarrollo del modelo matemático

3.3.1. Caudales en función de la altura de los fluidos

En un sistema microfluídico impulsado por presión hidrostática, para la configuración de enfoque hidrodinámico es necesario al menos dos depósitos de fluido colocados a diferentes alturas en relación con la salida del chip, como se representa en la **Figura 21a**. El primer paso en el modelado consiste en describir el caudal alcanzado en cada rama de la red fluídica, en función de las caídas de presión generadas por las alturas de las columnas de líquido. El modelado de circuito equivalente puede usarse para este propósito (Ajdari, 2004; Berli, 2008), siempre que los efectos de inercia sean despreciables. En estas condiciones, el flujo en cada rama de la red puede describirse mediante relaciones de fuerza-flujo: $\Delta P_i = Q_i R_i$, donde ΔP_i son las caídas de presión, Q_i son los caudales volumétricos y R_i son las resistencias hidrodinámicas. Por lo tanto, los componentes eléctricos equivalentes dibujados en el diagrama de la **Figura 21b** son suficientes para representar el problema físico.

La acción de la gravedad en las columnas de líquido produce presiones $P_i = \rho_i g h_i$ en los puertos del chip, donde ρ_i son las densidades de los fluidos, g es la aceleración de la gravedad y h_i son las alturas de los fluidos respectivos. Consistentemente, las caídas de presión en los brazos del chip son $\Delta P_i = P_i - P_c$, donde P_c es la presión (*a priori* desconocida) en la intersección de los microcanales.

Cabe señalar que h_3 es negativa cuando el extremo del tubo de salida está por debajo de la intersección, que se establece como el nivel de referencia (**Figura 21b**). En cualquier caso, se supone que las caídas de presión son constantes, lo que implica que las alturas de los líquidos no deberían cambiar apreciablemente durante el experimento; para lograr esto en la práctica utilizamos depósitos de gran diámetro.

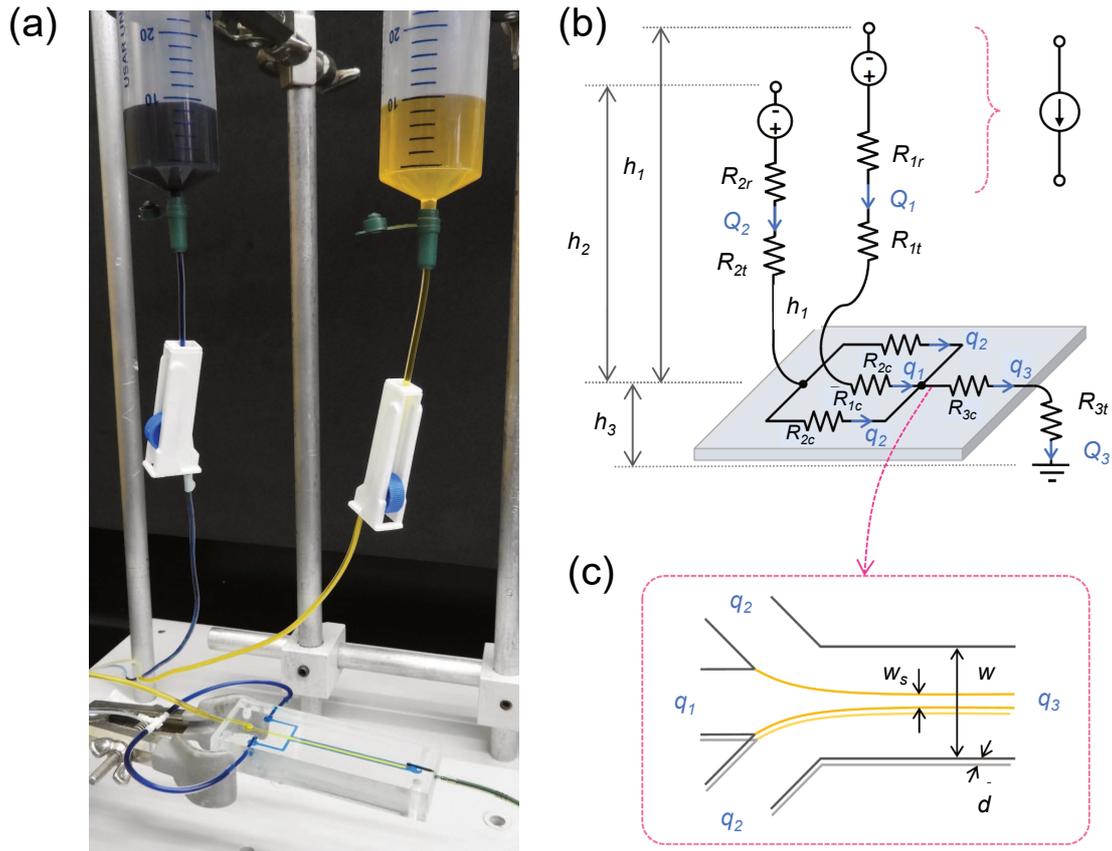


Figura 21. (a) Foto del sistema de infusión por gravedad conectado al chip. (b) Circuito eléctrico equivalente: las alturas de fluido h_i representan los voltajes, los caudales Q_i representan las corrientes y las resistencias hidrodinámicas R_i son las resistencias. Los caudales con la letra q_i representan los del chip. (c) Dibujo de la intersección de microcanales donde tiene lugar el enfoque hidrodinámico. También en este esquema, d es la profundidad del canal, w_s es el ancho de la corriente enfocada y w es el ancho del canal principal (figura modificada de Minetti et al., 2020).

Las resistencias hidrodinámicas de los brazos principales se componen de la siguiente manera: $R_1 = R_{1r} + R_{1t} + R_{1c}$, $R_2 = R_{2r} + R_{2t} + R_{2c}/2$, y $R_3 = R_{3t} + R_{3c}$, donde los subíndices “r”, “t”, “c”, significan reóstatos, tubos y chip, respectivamente. Los reóstatos son capilares altamente resistentes incluidos específicamente después de cada depósito de fluidos y antes del chip microfluídico, para controlar la resistencia hidrodinámica de la red y asegurar que la dinámica general del fluido sea independiente de la resistencia del chip microfluídico. Esta situación limitante se satisface cuando los reóstatos agregados (R_{ir}) son mucho más grandes que los tubos y las resistencias de la tubería y el chip (R_{it} y R_{ic}). Además, la resistencia del tubo es mucho menor que la de los microcanales del chip; así, en lo que sigue consideramos $R_1 \approx R_{1r}$, $R_2 \approx R_{2r}$ y $R_3 \approx R_{3c}$.

La conservación de materia en la intersección de los microcanales en el chip resulta, $\rho_1 q_1 + 2\rho_2 q_2 + \rho_3 q_3 = 0$, donde q_i representa los caudales en cada microcanal. Estos

caudales están relacionados con los de la red fluidica (externa al chip) de la siguiente manera: $Q_1 = q_1$, $Q_2 = 2q_2$ y $Q_3 = q_3$. Teniendo en cuenta que $Q_i = (P_i - P_c)/R_i$, la ecuación de conservación de materia se reescribe de la siguiente manera,

$$\frac{(P_1 - P_c)}{R_1^*} + \frac{(P_2 - P_c)}{R_2^*} + \frac{(P_3 - P_c)}{R_3^*} = 0 \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

Donde $R_i^* = R/\rho_i$. De la Ecuación 3.1, la presión en la intersección de microcanales resulta:

$$P_c = \frac{\sum (P_i/R_i^*)}{\sum 1/R_i^*} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

Por lo tanto, los caudales simultáneos se pueden obtener en función de las alturas de las columnas de fluido (a partir de las presiones $P_i = \rho_i g h_i$), siempre que se conozcan las resistencias hidrodinámicas. Como el interés está en obtener la relación de caudal Q_2/Q_1 en función de la relación de altura del fluido h_2/h_1 , de las expresiones anteriores, el cociente de Q_2 y Q_1 se expresa de la manera siguiente,

$$\frac{Q_2}{Q_1} = \frac{R_1}{R_2} \left[\frac{\rho_2 h_2 (1 + R_3^*/R_1^*) - \rho_1 h_1 R_3^*/R_1^* - \rho_3 h_3}{\rho_1 h_1 (1 + R_3^*/R_2^*) - \rho_2 h_2 R_3^*/R_2^* - \rho_3 h_3} \right] \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

Lo que muestra que la relación entre Q_2/Q_1 y h_2/h_1 no es lineal, y depende tanto de las resistencias hidrodinámicas como de las densidades de los fluidos. Precisamente, en lo que sigue tratamos por separado los casos de fluidos con densidades iguales o diferentes. Para una mayor simplicidad, se considerará $h_3 = 0$ en todos los casos.

Fluidos de iguales características

Si todo el circuito se alimenta con el mismo fluido, entonces $\rho_1 = \rho_2 = \rho_3$ y la Ecuación 3.3 se simplifica a,

$$\frac{Q_2}{Q_1} = \frac{\frac{h_2}{h_1} (R_1 + R_3) - R_3}{(R_2 + R_3) - \frac{h_2}{h_1} R_3} \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

Si se incluyen grandes reóstatos aguas abajo de los depósitos, es decir que $R_1 \gg R_3$ y $R_2 \gg R_3$, entonces R_3 puede despreciarse y la Ecuación 3.4 resulta,

$$\frac{Q_2}{Q_1} = \frac{h_2}{h_1} \frac{R_1}{R_2} \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

Si además, se utilizan tubos capilares con el mismo radio y longitud para construir los reóstatos, entonces $R_1/R_2 = \mu_1/\mu_2$, siendo μ_i la viscosidad igual en ambos fluidos, la Ecuación 3.5 resulta,

$$\frac{Q_2}{Q_1} = \frac{h_2}{h_1} \quad (\text{Ecuación 3.6})$$

Cabe señalar que esta relación trivial entre las proporciones Q_2/Q_1 y h_2/h_1 se satisface solo si (1) los reóstatos incluidos en la red son muy grandes, (2) los reóstatos son iguales, (3) los fluidos tienen la misma densidad, (4) los fluidos tienen la misma viscosidad y (5) no hay presión hidrostática neta en la salida del chip ($h_3 = 0$).

Fluidos de diferentes características

La solución general (Ecuación 3.3) involucra fluidos con diferentes densidades. Si la resistencia del chip R_3 es insignificante en comparación con R_1 y R_2 , y se usan resistencias iguales en ambos brazos del circuito, entonces la Ecuación 3.3 se simplifica a,

$$\frac{Q_2}{Q_1} = \frac{h_2}{h_1} \frac{\mu_1/\rho_1}{\mu_2/\rho_2} \quad (\text{Ecuación 3.7})$$

Por lo tanto, bajo estas condiciones, la relación entre Q_2/Q_1 y h_2/h_1 depende completamente de las propiedades fisicoquímicas de los fluidos. Consistentemente, la Ecuación 3.7 se convierte en la Ecuación 3.6 cuando se usa el mismo fluido en todo el circuito.

3.3.2. Ancho de enfoque en función de la altura de los fluidos

Aquí se consideraron los modelos que describen el ancho del enfoque w_s (**Figura 21c**) en función de la relación Q_2/Q_1 para adaptarlos al sistema de flujo por gravedad, donde la variable operativa es la relación de alturas h_2/h_1 de los fluidos. Se consideran microcanales de sección rectangular cuya profundidad d es mucho menor que el ancho w , esto permite expresiones analíticas simples, siempre que el flujo sea constante y perfectamente laminar. En el diseño de enfoque hidrodinámico, la conservación de la masa define que $2q_2/q_1 = Q_2/Q_1$.

Fluidos con igual densidad

Para fluidos de igual densidad, el ancho relativo de la corriente enfocada está dado por la siguiente expresión (Larsen & Shapley, 2007; Sadeghi 2019; Tripathi et al., 2014; Wu & Nguyen, 2005),

$$\frac{w_s}{w} = \frac{1}{1 + \frac{Q_2 \mu_2}{Q_1 \mu_1}} \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

En particular, para fluidos con viscosidades iguales ($\mu_1 = \mu_2$), la Ecuación 3.8 se transforma en la expresión derivada de las propiedades de fluidos uniformes (G. B. Lee et al., 2006; Stiles et al., 2005), que predicen que el ancho de la corriente enfocada solo depende de la relación de la tasa de flujo. Para flujos impulsados por gravedad, la relación Q_2/Q_1 viene dada por la Ecuación 3.4; introduciendo esta ecuación en la Ecuación 3.8 se obtiene,

$$\frac{w_s}{w} = \frac{1}{1 + \frac{\mu_2 R_1 \left[\frac{h_2}{h_1} \left(1 + \frac{R_3}{R_1} \right) - \frac{R_3}{R_1} \right]}{\mu_1 R_2 \left[\left(1 + \frac{R_3}{R_2} \right) - \frac{h_2}{h_1} \frac{R_3}{R_2} \right]}} \quad (\text{Ecuación 3.9})$$

Esta fórmula describe el ancho de enfoque (relativo al ancho del canal) w_s/w en función de la relación de alturas h_2/h_1 de las columnas hidrostáticas. El ancho de la corriente enfocada ahora depende de las resistencias relativas de la red fluidica. Si se incluyen reóstatos muy grandes e iguales (es decir, $R_1 \gg R_3$, $R_2 \gg R_3$), fluidos con la misma densidad y sin presión hidrostática neta en la salida del chip ($h_3 = 0$), la Ecuación 3.9 se simplifica a,

$$\frac{w_s}{w} = \frac{1}{1 + \frac{h_2}{h_1}} \quad (\text{Ecuación 3.10})$$

Cabe destacar que esta expresión es válida sólo si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones: (1) reóstatos infinitamente grandes en la red fluidica, (2) reóstatos iguales, (3) fluidos con la misma densidad, (4) microcanales rectangulares, de ancho mucho mayor que la altura y (5) sin presión hidrostática neta en la salida del chip. En estas condiciones, la viscosidad de los fluidos no juega ningún papel en el ancho de enfoque.

Fluidos con contraste de densidad y reóstatos muy grandes

Para fluidos con diferentes densidades, el primer aspecto a tener en cuenta es que el enfoque hidrodinámico depende en gran medida de la orientación del chip en relación con la aceleración de la gravedad, como se analizó detalladamente en el Capítulo 2. Cuando el canal de enfoque está alineado con la gravedad (ya sea en la misma dirección o en dirección opuesta), el enfoque hidrodinámico se mantiene, pero el ancho w_s depende de la diferencia de densidades de los fluidos ($\rho_2 - \rho_1$), así como del caudal Q_2 , aparte de la relación Q_2/Q_1 . Para estimar el enfoque hidrodinámico en microcanales orientados en la dirección del campo gravitacional, la Ecuación 2.6 (Capítulo 2) predice:

$$\frac{w_s}{w} = \frac{1}{1 + \frac{Q_2 \mu_2}{Q_1 \mu_1} \left[1 \mp \frac{(\rho_2 - \rho_1) q_G}{\rho_2 Q_2} \left(1 - \frac{w_s}{w} \right) \right]} \quad (\text{Ecuación 3.11})$$

donde $q_G = \rho_2 g d^3 w / 12 \mu_2$ es el caudal gravitacional. El término adicional entre corchetes (en comparación con la Ecuación 3.8) proviene del efecto que ejerce la gravedad sobre la velocidad en cada flujo, que produce variaciones de los anchos de flujo a diferencia de lo que ocurre cuando se trabaja con fluidos de igual densidad. El signo menos de este término corresponde a los flujos hacia abajo, mientras que el signo más corresponde a los flujos hacia arriba.

Para sistemas accionados por gravedad con grandes reóstatos,

$$Q_2/Q_1 = h_2 \rho_2 \mu_1 / (h_1 \rho_1 \mu_2) \quad (\text{Ecuación 3.7}) \quad \text{y} \quad Q_2 = \rho_2 g h_2 / R_2 \quad (\text{Ecuación 3.18}).$$

Introduciendo estas expresiones en la Ecuación 3.11 resulta,

$$\frac{w_s}{w} = \frac{1}{1 + \frac{h_2}{h_1} \left[\frac{\rho_2}{\rho_1} \mp \left(\frac{\rho_2}{\rho_1} - 1 \right) \frac{h_G}{h_2} \left(1 - \frac{w_s}{w} \right) \right]} \quad (\text{Ecuación 3.12})$$

donde $h_G = R_2 d^3 w / 12 \mu_2$ es un parámetro del sistema con unidades de longitud. En comparación con la Ecuación 3.10, el ancho de la corriente enfocada ahora depende de la relación de densidad ρ_2/ρ_1 y la altura absoluta h_2 , aparte de la relación h_2/h_1 . El parámetro h_G mide el efecto de h_2 ; a saber, se requiere que $h_2 \leq h_G$ para percibir los efectos de la gravedad sobre el ancho de enfoque. Para fluidos de igual densidad ($\rho_2/\rho_1 = 1$), la Ecuación 3.12 se simplifica a la Ecuación 3.10. En analogía a la Ecuación 3.10, la Ecuación 3.12 predice que la posible diferencia de viscosidad de los fluidos de trabajo no influye en el enfoque hidrodinámico impulsado por la hidrostática.

La Ecuación 3.12 es implícita para el ancho de enfoque, pero se puede reordenar fácilmente para lograr expresiones más útiles. Primero, h_2/h_1 se puede despejar en función de w_s/w ,

$$\frac{h_2}{h_1} = \frac{1}{\frac{w_s}{w} \left[\frac{\rho_2}{\rho_1} \mp \left(\frac{\rho_2}{\rho_1} - 1 \right) \frac{h_G}{h_2} \right] \pm \left(\frac{w_s}{w} \right)^2 \left[\left(\frac{\rho_2}{\rho_1} - 1 \right) \frac{h_G}{h_2} \right]} \quad (\text{Ecuación 3.13})$$

Entonces, esta ecuación cuadrática se puede resolver para encontrar w_s/w en función de h_2/h_1 ,

$$\frac{w_s}{w} = \frac{-[1 - \alpha(1 \mp \beta)] + \left\{ [1 + \alpha(1 \mp \beta)]^2 \pm 4\alpha\beta \right\}^{1/2}}{\pm 2\alpha\beta} \quad (\text{Ecuación 3.14})$$

donde $\alpha = h_2\rho_2/(h_1\rho_1)$ y $\beta = (\rho_2 - \rho_1)h_G/(h_2\rho_2)$ se utilizan para compacidad. Finalmente, se debe tener en cuenta que estas expresiones son válidas para: (1) reóstatos infinitamente grandes, (2) reóstatos iguales, (3) enfoque de flujo alineado con la gravedad, (4) microcanales rectangulares, de ancho mucho mayor que la altura, y (5) sin presión hidrostática neta en la salida de chip ($h_3 = 0$).

3.4. Comprobación experimental del modelo matemático.

3.4.1. Materiales

Se utilizó azul de bromofenol marca Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) y colorante alimentario azul brillante marca de Sensient Food Colors Latin America (Lerma de Villada, México). El etanol (C_2H_6O ; 99,5%), la acetona (CH_3COCH_3 ; grado analítico) y el cloruro de sodio (NaCl; grado analítico) se adquirieron de Cicarelli (San Lorenzo, Argentina). El agua destilada se obtuvo en las instalaciones del laboratorio. Las láminas de polimetilmetacrilato (PMMA) fueron de Acrimev (Santa Fe, Argentina). Asimismo, se utilizó lámina OCA doble contacto adhesivo, producto 3M™ 8146-2 (Thorlabs, U.S.A). Se compraron láminas de vinilo, jeringas, accesorios y tubos en el mercado local.

3.4.2. Fabricación de dispositivos microfluídicos

Los dispositivos de microfluídica utilizados se fabricaron usando placas de PMMA y unión a baja temperatura con cinta OCA, como describe Z. Liu et al. (2017). Estos dispositivos híbridos consisten en una estructura tipo sándwich con capas superiores e inferiores de PMMA y una capa media de OCA modelada con los microcanales como se describió en la Sección 1.3.1 del Capítulo 1. Se elaboraron dos dispositivos con profundidades de microcanales con diferentes resistencias hidrodinámicas. La profundidad final de los microcanales se midió mediante un micrómetro de disco

electrónico (Schwyz, Suiza). Las dimensiones de los microcanales en cada chip se informan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Dimensiones de los microcanales de enfoque (profundidad d , ancho w , longitud l) y resistencia hidrodinámica ($R_{3c} \approx 12\mu l/wd^3$) para agua a temperatura ambiente

	d (μm)	w (mm)	l (mm)	R_{3c} (Pa.s.m ⁻³)
Chip#1	175 ± 3	3	43	2.86×10^{10}
Chip#2	325 ± 5	1	39	1.21×10^{10}

3.4.3. Sistema de presión hidrostática

Para impulsar los fluidos mediante presión hidrostática se colocaron los líquidos en jeringas de plástico de 60mL (depósitos) que se fijaron a soportes deslizantes en rieles verticales de 80cm montados con reglas precisas, lo que permite el ajuste de las alturas fácilmente. El gran tamaño de la jeringa evita la variación de nivel durante las corridas experimentales. Las salidas de la jeringa se conectaron a un tubo de teflón con un diámetro interno de 350 μm , cuyas resistencias hidrodinámicas son mucho más grandes que las de los dispositivos microfluídicos. Las entradas del chip se conectaron a las columnas de fluido. Se utilizaron llaves de paso para iniciar/interrumpir los flujos (**Figura 22**). Durante los experimentos las magnitudes medidas fueron directamente las alturas de los líquidos h_1 y h_2 .

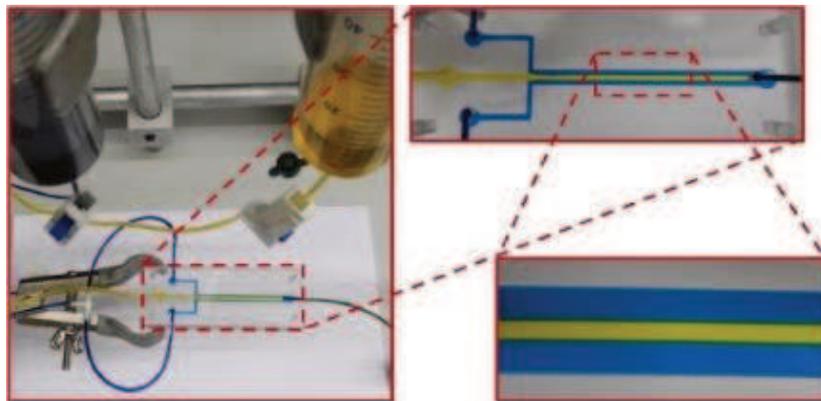


Figura 22. Flujo enfocado en el Chip # 1 usando presión hidrostática, con una imagen ampliada de la región de análisis.

Además de las relaciones antes mencionadas entre Q_2/Q_1 y h_2/h_1 , es posible estimar las alturas absolutas de líquido requeridas para alcanzar caudales deseados. Las caídas de presión en la **Figura 21b** son,

$$\rho_1 g h_1 - \rho_3 g h_3 = \rho_1 Q_1 (R_1^* + R_3^*) + \rho_2 Q_2 R_3^* \quad (\text{Ecuación 3.15})$$

$$\rho_2gh_2 - \rho_3gh_3 = \rho_2Q_2(R_2^* + R_3^*) + \rho_1Q_1R_3^* \quad (\text{Ecuación 3.16})$$

Estas expresiones son útiles para manejar las columnas hidrostáticas en los experimentos, siempre que las propiedades del fluido y las resistencias hidrodinámicas se conozcan previamente. Como se mencionó en la sección anterior, se logra una simplificación práctica al incluir reóstatos muy grandes en relación con la resistencia del chip ($R_1 \gg R_3$, $R_2 \gg R_3$) y la altura cero del fluido en la salida del chip $h_3 = 0$. Para lograr este requisito en la práctica, el extremo del tubo de salida siempre se colocó a la misma altura de la intersección de los microcanales, que se toma como el nivel de referencia independientemente de la orientación del chip. En estas condiciones, las Ecuaciones 3.15 y 3.16 resultan,

$$Q_1 = \frac{\rho_1gh_1}{R_1} \quad (\text{Ecuación 3.17})$$

$$Q_2 = \frac{\rho_2gh_2}{R_2} \quad (\text{Ecuación 3.18})$$

El primer paso consiste en describir el caudal alcanzado en cada rama de la red fluídica. Para esto, se calculó el caudal Q alcanzado en función de las caídas de presión generadas por las alturas de las columnas de líquido, midiendo en una balanza de laboratorio la masa de fluido recolectada durante un intervalo de tiempo definido. El caudal másico se convirtió en caudal volumétrico utilizando las densidades de fluido tabuladas (Lide, 2004) correspondiente a la temperatura del experimento.

3.4.4. Medición del ancho de enfoque hidrodinámico

Las imágenes de las corrientes enfocadas se tomaron desde una vista superior de los microcanales rectangulares utilizando una cámara digital de alta resolución (Nikon Coolpix B700). El ancho de enfoque w_s se determinó en las imágenes grabadas utilizando el software ImageJ© (National Institutes of Health, EE.UU.). Se realizaron al menos diez mediciones de cada ancho de enfoque en las imágenes.

3.5. Resultados y discusión

3.5.1. Estabilidad del coflujo

Para comprobar la estabilidad de las corrientes con el sistema de infusión por gravedad se compararon los resultados con los obtenidos cuando se emplearon las bombas automáticas de jeringa, en las mismas condiciones de caudal y relación de caudales en un mismo dispositivo. Como se observa en la **Figura 23** el ancho del enfoque hidrodinámico se mantiene estable (línea verde) en comparación con las

oscilaciones muy marcadas que se distinguen cuando se utilizan bombas de jeringa (línea azul). Las oscilaciones se deben a perturbaciones cíclicas del caudal debidas al giro del tornillo sin-fin que impulsa cada jeringa. Estas perturbaciones en el flujo son irrelevantes para la mayoría de los usos de jeringa. No obstante, para implementar la nanoprecipitación en coflujo, estas inestabilidades en las corrientes alteran los tiempos de mezcla y difusión de las especies, lo cual afecta el control sobre la reacción de nanoprecipitación y en consecuencia las características finales del producto.

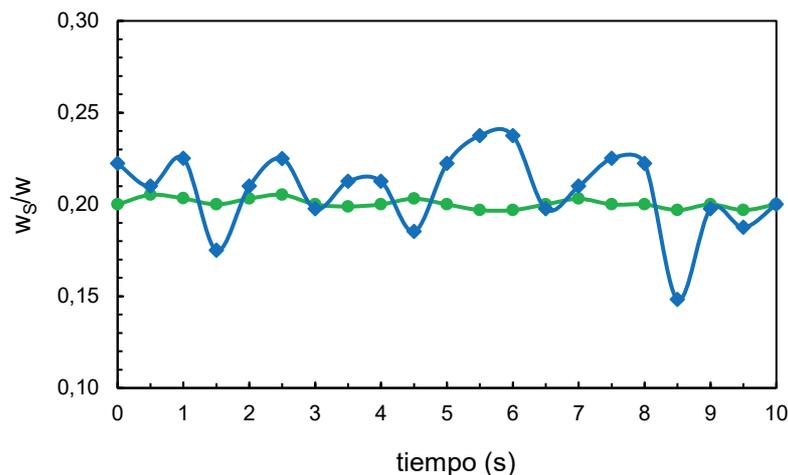


Figura 23. Ancho relativo de la corriente enfocada para flujos impulsados por gravedad (verde) versus flujos impulsados por bombas de jeringa (azul).

3.5.2. Caudales en función de la altura de los fluidos

Fluidos con igual densidad y resistencias hidrodinámicas arbitrarias

Primero, se realizó la validación experimental para probar las relaciones entre la altura hidrostática h y el caudal Q . Se usó una sola columna hidrostática, que solo incluye el reóstato R_1 . La **Figura 24** presenta el caudal a diferentes alturas de columna de fluido, para diferentes valores de R_1 , que corresponden a diferentes longitudes del tubo capilar utilizado como reóstato ($L = 0,3, 0,5$ y 1 m). Las líneas rectas son la predicción del modelo lineal (Ecuación 3.17) con la magnitud de las pendientes ($\rho_1 g/R_1$) indicada en la figura. Estos gráficos sirven como curvas de calibración del caudal producido por las columnas hidrostáticas. De hecho, la relación de las pendientes coincide exactamente con la relación de las longitudes de tubo respectivas. Este es un resultado consistente, considerando que la resistencia hidrodinámica del reóstato es $R_1 = 8, \mu L / \pi r^4$, siendo r el radio del tubo.

Los resultados informados en la **Figura 24** también permiten dilucidar la importancia relativa de la resistencia del chip en todo el circuito. De la magnitud de la pendiente de la curva resulta, $R_1 (L = 1\text{m}) = 2,17 \times 10^{12} \text{Pa}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-3}$. Tomando la magnitud de la

resistencia R_{3c} (**Tabla 1**) como una estimación de R_3 , se encuentra fácilmente que $R_3/R_1 \approx 1.3 \times 10^{-2}$ para el Chip # 1 y $R_3/R_1 \approx 5.6 \times 10^{-3}$ para el Chip # 2. Por lo tanto, la contribución de R_3 a la resistencia general es del orden del 1% o inferior, y uno puede considerar el sistema con $L = 1\text{m}$ como una fuente de caudal ideal, para fines prácticos.

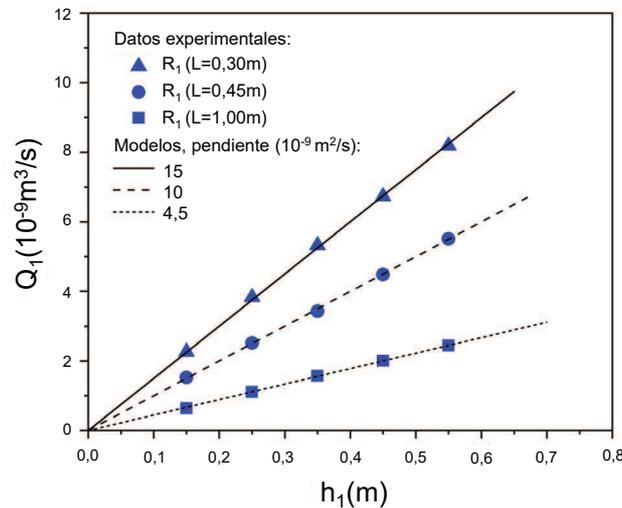


Figura 24. Caudal en función de la altura del fluido, para una columna de fluido con el respectivo reóstato (no conectado al chip). Los símbolos son datos experimentales obtenidos usando agua a temperatura ambiente, para tres reóstatos con diferentes longitudes de tubo. Las líneas son las predicciones de Ecuación 3.17 (figura modificada de Minetti et al., 2020).

Con esta validación experimental, se exploró la dinámica del sistema cuando ambas columnas de líquido están conectadas al chip. En este caso, Q_1 y Q_2 no pueden medirse independientemente, excepto integrando medidores de flujo; sin embargo, se verificó que el caudal total (medido en la salida del chip) coincidía con la suma de los caudales de cada brazo.

En la **Figura 25** la línea recta continua corresponde al caso de reóstatos muy grandes, para valores más bajos de R_1 y R_2 , la relación de caudal muestra valores límites que estrechan la ventana operativa. Estos valores extremos corresponden al mínimo $h_2/h_1 \geq R_3/(R_1 + R_3)$ y al máximo $h_2/h_1 \leq (R_2 + R_3)/R_3$ para lo cual la Ecuación 3.5 diverge. Físicamente, la divergencia significa que el líquido de un brazo de alimentación pasa al otro, en lugar de fluir a través del chip. Además, cuando $R_1 \sim R_2 \sim R_3$ (línea de puntos en la **Figura 25**), pequeñas variaciones de h_2/h_1 producen grandes cambios en Q_2/Q_1 . Esta es la importancia de asegurar que las resistencias de cada rama sean significativamente más grandes que la resistencia del chip.

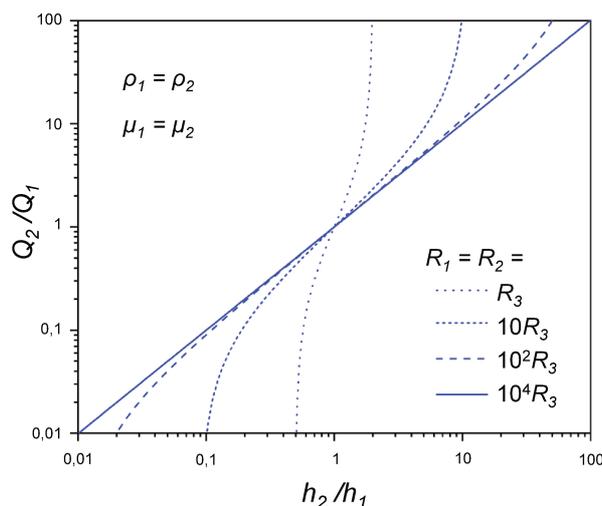


Figura 25. Relación de caudales en función de la relación de alturas de los fluidos, para líquidos de iguales propiedades. Las líneas son la predicción de la Ecuación 3.4 para diferentes magnitudes de los reóstatos añadidos (R_1 y R_2) en relación con la resistencia del chip (R_3) (figura modificada de Minetti et al., 2020).

Fluidos con contraste de densidad, resistencias muy grandes

La **Figura 26** presenta el caudal para diferentes alturas de columna de fluido, cuando se utilizó el reóstato más grande ($L = 1\text{m}$), utilizando agua, acetona o etanol, que son fluidos típicos empleados en nanoprecipitación por intercambio de solvente. Las líneas rectas son la predicción de la Ecuación 3.17. Estas gráficas también sirven como curvas de calibración. De hecho, como $R_1 = 8\mu_1 L / \pi r^4$, la pendiente de cada curva está determinada por la relación ρ_1 / μ_1 del fluido correspondiente. Se obtuvieron resultados razonables comparados con los valores tabulados de densidad y viscosidad disponibles en la literatura (Lide, 2004). Pequeñas variaciones pueden deberse a la falta de control de temperatura ambiente sobre el sistema microfluídico. En cualquier caso, los experimentos aclaran la influencia de las características del fluido en las relaciones entre la altura de la columna y el caudal.

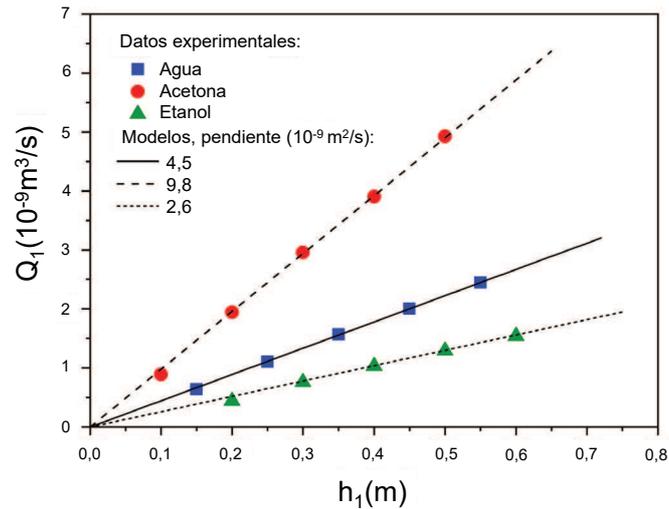


Figura 26. Caudal en función de la relación de altura del fluido, para una sola columna de fluido con el respectivo reóstato (no conectado al chip). Los símbolos son datos experimentales obtenidos usando diferentes fluidos a temperatura ambiente. Las líneas son los ajustes lineales de la Ecuación 3.17 (figura modificada de Minetti et al., 2020).

Después de la validación experimental, analizamos en la **Figura 27** el coflujo de dos fluidos diferentes, de acuerdo con la predicción de la Ecuación 3.6. Como se observa arriba en la **Figura 27**, la interacción entre densidades (que actúan sobre las presiones hidrostáticas) y viscosidades (que actúan sobre las resistencias hidrodinámicas), conduce a pendientes bastante diferentes para la relación lineal Q_2/Q_1 vs h_2/h_1 . Estos efectos se originan en la red fluídica, independientemente de la resistencia del chip; por lo tanto, se espera la respuesta observada en la **Figura 27** para cualquier microdispositivo conectado a las columnas hidrostáticas, siempre que se incluyan reóstatos muy grandes. La **Figura 27** presenta información relevante para la configuración adecuada de los experimentos de enfoque hidrodinámico. Por ejemplo, al fijar $h_2/h_1 = 1$, se obtendrán diferentes relaciones de caudal dependiendo del par de fluidos: $Q_2/Q_1 = 1$ para agua/agua, pero $Q_2/Q_1 < 1$ para acetona/agua y $Q_2/Q_1 > 1$ para etanol/agua.

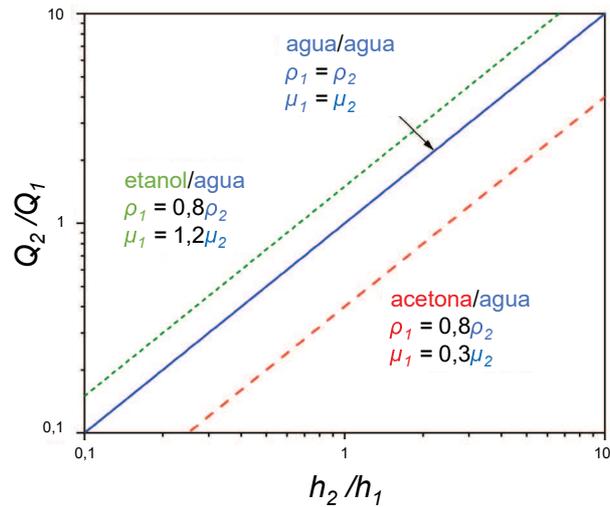


Figura 27. Relación de caudales en función de la relación de las alturas de los fluidos, para un sistema accionado por gravedad con grandes reóstatos. Las líneas son la predicción de la Ecuación 3.6 para fluidos con diferentes propiedades. Los valores de densidad y viscosidad representan los líquidos indicados a temperatura ambiente, según datos tabulados (Lide 2004) (figura modificada de Minetti et al., 2020).

3.5.3. Ancho de enfoque en función de la altura de los fluidos

Fluidos con igual densidad, resistencias hidrodinámicas arbitrarias

Los experimentos se llevaron a cabo con los dispositivos microfluídicos descritos anteriormente. Se usó agua con colorante azul como corriente central para visualizar mejor el flujo y agua pura como corrientes laterales. El ancho de enfoque relativo w_s/w se obtuvo del análisis de imágenes de los patrones de enfoque de flujo registrados. La relación h_2/h_1 se obtuvo directamente de la altura de las columnas hidrostáticas empleadas para el bombeo. La **Figura 28** presenta los resultados experimentales junto con la predicción del modelo (Ecuación 3.9). Todos los parámetros necesarios para la implementación de la Ecuación 3.9 se conocían previamente y no se utilizaron parámetros de ajuste. A partir de la resistencia hidrodinámica R_1 obtenida anteriormente, y usando los valores de R_3 informados en la **Tabla 1**, se tiene $R_1/R_3 \approx 76$ para el Chip#1 y $R_1/R_3 \approx 180$ para el Chip#2. Como es posible observar, existe gran concordancia entre los datos experimentales y las predicciones del modelo en la **Figura 28**.

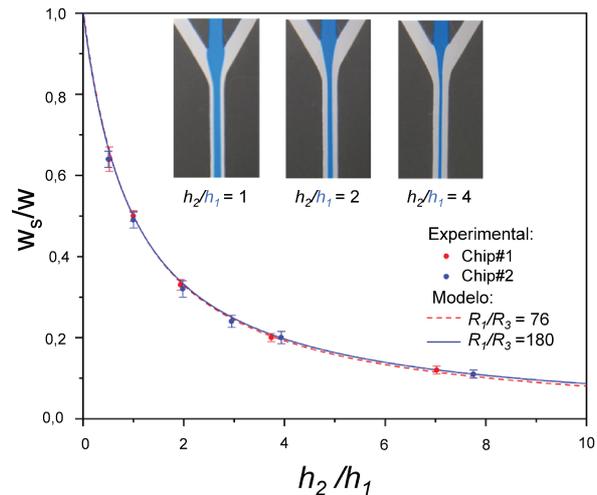


Figura 28. Ancho relativo de la corriente enfocada en función de la relación de alturas de los fluidos. Los símbolos son datos experimentales, donde las barras de error son la desviación estándar de diez mediciones. Las líneas son la predicción de la Ecuación 3.9 para las respectivas resistencias hidrodinámicas de los dispositivos. Las imágenes insertadas son fotos del Chip # 2, que muestran la corriente azul enfocada en relaciones típicas h_2/h_1 (figura modificada de Minetti et al., 2020).

Se puede explorar más a fondo la influencia de las resistencias del circuito en el ancho de enfoque. La **Figura 29** muestra la predicción de la Ecuación 3.9, para diferentes valores relativos de las resistencias R_1 , R_2 y R_3 . La línea completa corresponde al caso de reóstatos muy grandes, lo que se aproxima a la predicción de la Ecuación 3.10.

En el otro extremo, para R_1 y R_2 pequeños, el ancho relativo w_s/w es muy sensible a las variaciones de h_2/h_1 , y la ventana de operación es muy estrecha, de acuerdo con las predicciones de la **Figura 25**. A efectos prácticos, incluir $R_1 \sim R_2 \sim 100R_3$ es suficiente para lograr sistemas impulsados por gravedad que funcionan virtualmente como fuentes ideales de caudal para enfocar el caudal. De hecho, las líneas completa y discontinua prácticamente coinciden, siendo la diferencia menor al 8% para $h_2/h_1 = 10$.

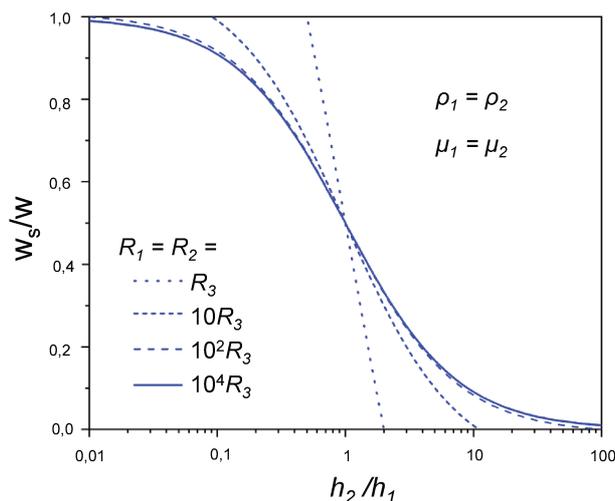


Figura 29. Ancho relativo de la corriente focalizada en función de la relación de alturas de los fluidos, para líquidos de iguales propiedades. Las líneas son la predicción de la Ecuación 3.9 para diferentes magnitudes de los reóstatos agregados (R_1 y R_2) en relación con la resistencia del chip (R_3) (figura modificada de Minetti et al., 2020).

Fluidos con contraste de densidad, resistencias muy grandes

Se analizó la influencia de diferentes fluidos en el patrón de enfoque hidrodinámico. La **Figura 30** presenta datos experimentales del ancho de enfoque para una solución acuosa de NaCl al 20% (m/v), cuya densidad es de $1148 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ (Kestin et al., 1981), y para etanol al 99,5%, cuya densidad es de $789 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ (Lide 2004). El fluido envolvente fue agua destilada, luego $\rho_2 = 998 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Estos valores de densidad corresponden a 20°C , que fue la temperatura ambiente para los experimentos llevados a cabo. En todos los casos, se añadió un colorante azul al líquido central para el contraste de la imagen. En la **Figura 30**, la variación del ancho de enfoque con la densidad del fluido es notable. La corriente central se ensancha para $\rho_2/\rho_1 > 1$ (el caso del etanol enfocado por agua), debido a la fuerza de flotación que actúa sobre el fluido menos denso. Por el contrario, la corriente de muestra se estrecha para $\rho_2/\rho_1 < 1$ (el caso de una solución salina al 20%), a medida que el fluido más denso se hunde y aumenta su velocidad relativa (Giorello et al., 2020).

La predicción de Ecuación 3.14 también se presenta en la **Figura 30**. Al ajustar el modelo a los experimentos, el único parámetro que se permitió variar fue h_G , lo que resultó en $2,7\text{m}$ para el etanol y $3,5\text{m}$ para la solución salina. Estos resultados son muy razonables, teniendo en cuenta que, para el Chip#1 y el reóstato utilizado, el valor teórico es $h_G = 3,27\text{m}$. De hecho, el modelo propuesto describe satisfactoriamente la respuesta global del enfoque hidrodinámico impulsado por la gravedad para fluidos con diferentes densidades.

Además, la información proporcionada por la **Figura 30** es crucial para el manejo adecuado del enfoque hidrodinámico. Por ejemplo, fijar $h_2/h_1 = 4$ conduce a anchos de enfoque muy diferentes dependiendo de la densidad relativa de los fluidos de la muestra y la cubierta. Mientras que $w_s/w \approx 0,2$ para la referencia (agua enfocada por agua), $w_s/w \approx 0,1$ para la solución salina enfocada por agua, y $w_s/w \approx 0,4$ para el etanol enfocado por agua, siempre con el flujo hacia abajo. Curiosamente, estos resultados se pueden invertir si el microcanal de enfoque se orienta con el flujo hacia arriba, como se ilustra en las imágenes insertadas en la **Figura 30**. De hecho, debido a la simetría involucrada en el término entre paréntesis en la Ecuación 3.12, invirtiendo la orientación del chip para un par de fluidos determinados es equivalente a invertir la configuración de estos fluidos para una orientación de chip dada. Un estudio más detallado de la influencia de la gravedad sobre el enfoque hidrodinámico se presenta en el Capítulo 2.

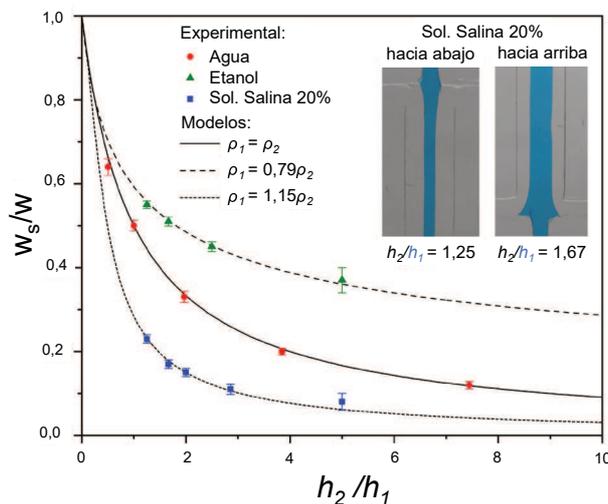


Figura 30. Ancho relativo de la corriente focalizada en función de la relación de alturas de los fluidos, para un sistema accionado por gravedad con grandes reóstatos y fluidos con diferentes densidades. Los símbolos son datos experimentales obtenidos con el Chip#1 alineado con el campo gravitacional (flujo hacia abajo) a h_2 constante = 0,5m. Las barras de error son la desviación estándar de diez mediciones. Las líneas son la predicción de la Ecuación 3.14 para las densidades de fluidos correspondientes. Las imágenes insertadas son fotos del Chip#1 que muestran el flujo enfocado de solución salina en orientaciones opuestas en relación con la gravedad (figura modificada de Minetti et al., 2020).

3.5.4. Cuantificación de los efectos dependientes del tiempo sobre los caudales

El nivel de líquido en las columnas hidrostáticas decrece gradualmente en el tiempo a medida que avanza el experimento. Para reóstatos grandes, cada brazo del circuito satisface $Q_i = \rho_i g h_i / R_i$ (Ecuaciones 3.17, 3.18). Dado a que son reservorios

cilíndricos de radio r_r , el caudal en cada reservorio es $Q_i = \pi r_r^2 dh_i / dt$. Por lo tanto, la altura del fluido disminuye de manera exponencial (Berli & Deiber, 2004):

$$h_i = h_{i,0} \exp(-t/t_{r,i}) \quad (\text{Ecuación 3.19})$$

Donde $h_{i,0}$ es el nivel de fluido establecido en $t = 0$, y $t_{r,i}$ es el tiempo característico de decaimiento de la altura de la columna de líquido,

$$t_{r,i} = \frac{8\mu_i L r_r^2}{\rho_i g r^4} \quad (\text{Ecuación 3.20})$$

Usando $r_r = 20\text{mm}$, $r = 175\mu\text{m}$ y $L = 1\text{m}$, el tiempo estimado por la Ecuación 3.20 es $t_{r,i} \approx 3.10^5\text{s}$, lo que significa que el circuito fluídico puede funcionar a caudal constante durante experimentos de larga duración.

Esto se debe a que el dispositivo funciona en un estado pseudo-estacionario. El régimen se cumple si el parámetro $\lambda_i = \rho_i r_r^2 / \mu_i t_{r,i}$ es mucho menor que 1. Este número adimensional relaciona las fuerzas inerciales y viscosas en cada columna hidrostática, como se describió detalladamente en un trabajo anterior (Berli & Deiber, 2004). Para los parámetros utilizados en nuestros experimentos, el valor es $\lambda_i \approx 10^{-7}$. Además, para los experimentos de enfoque hirodinámico, la variable que realmente importa es la relación h_2/h_1 , que se espera que varíe de la siguiente manera:

$$\frac{h_2}{h_1} = \frac{h_{2,0}}{h_{1,0}} \exp\left[-\frac{t}{t_{r,2}} \left(1 - \frac{\rho_1 \mu_2}{\rho_2 \mu_1}\right)\right] \quad (\text{Ecuación 3.21})$$

siempre que se utilicen depósitos y tubos capilares iguales en ambos brazos del circuito. El primer resultado interesante es que h_2/h_1 no cambia con el tiempo si se usa el mismo fluido en ambos depósitos (fluido enfocado y fluidos laterales). Para diferentes fluidos, h_2/h_1 aumentará o disminuirá con el tiempo, dependiendo de las densidades y viscosidades relativas, que determinan el signo del factor exponencial en la Ecuación 3.21. Sin embargo, $t_{r,i}$ sigue siendo tan grande que el sistema puede operar varias horas sin variaciones apreciables. En realidad, el tiempo para observar una variación del 1% de $h_{2,0}/h_{1,0}$ es $t_{r,2} \ln(0,99)$, que es aproximadamente 1h. Se puede concluir que el flujo impulsado por la gravedad es bastante apropiado para realizar experimentos de enfoque hidrodinámico bien estabilizados.

3.5.5. Ejemplo de aplicación: Mezcla difusiva y reacción de color

En esta sección, se tuvo como objetivo comprobar mediante teoría y experimentos, el manejo adecuado del enfoque hidrodinámico para una reacción que tiene lugar en la interfase de los líquidos donde ocurre interdifusión. Usando la Ecuación 3.10, el tiempo de mezclado característico $t \approx w_s^2/4D$ ahora se puede estimar como,

$$t \approx \frac{w^2}{4D(1+h_2/h_1)^2} \quad (\text{Ecuación 3.22})$$

La validez de esta expresión está restringida por las condiciones de la Ecuación 3.10. Además, se puede predecir la posición aguas abajo en la que se logra la mezcla: la longitud de mezcla l_{mix} . Más precisamente, para la difusión de solutos transversal al flujo, t mide el tiempo en que la concentración de la especie, a la distancia transversal w_s , es de alrededor del 8% de la concentración inicial (Urteaga et al., 2018). Por otro lado, el transporte advectivo desplaza al fluido una distancia l_{mix} en el tiempo de flujo $t_F = l_{mix}/\langle v \rangle$, donde $\langle v \rangle = q_3 w d$ es la velocidad promedio del fluido en el canal de enfoque. Después de igualar estos tiempos característicos y reordenarlos, se puede escribir la siguiente relación para la longitud de mezcla en función de la relación de altura del fluido,

$$\frac{l_{mix}}{w} \approx \frac{Pe_w}{4\left(1+h_2/h_1\right)^2} \quad (\text{Ecuación 3.23})$$

donde $Pe_w = q_3/Dd$ es un número de Péclet para la difusión de especies a lo largo de la distancia transversal w (ancho del canal). Por lo tanto, para un caudal dado, la Ecuación 3.23 indica que la longitud de mezcla disminuye con el cuadrado de la relación de altura del fluido.

Para probar experimentalmente esta predicción, implementamos una reacción cuya velocidad está controlada solo por difusión, por lo que el tiempo (posición) para observar los productos de la reacción es equivalente al tiempo (posición) para observar los reactivos mezclados. Se eligió una reacción que produce cambio de color inducido por el cambio de pH: el azul de bromofenol aparece amarillo por debajo de pH 3 y se vuelve azul por encima de pH 4,6. En el Chip #2, se utilizó como muestra una solución hidroalcohólica (20% v/v) con 0,1% (m/v) de azul de bromofenol a pH 3 y agua a pH 11 como fluido envolvente. Se espera que la corriente central amarilla se vuelva progresivamente azul en las zonas de interdifusión de las corrientes de coflujo, donde se desarrolla un gradiente de pH transversal al flujo. Se exploraron diferentes relaciones h_2/h_1 , manteniendo constante el caudal total, $q_3 = 8 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$. Los

resultados se muestran en la **Figura 31**, donde las imágenes de la vista superior del microcanal de enfoque se escalaron al eje de ordenadas, observando que $l/w = 39$ para Chip#2 (**Tabla 1**).

La predicción de la Ecuación 3.23 también se representa en la **Figura 31**, para $Pe_w = 760$ (línea discontinua) y $Pe_w = 1290$ (línea punteada). Estos valores corresponden al coeficiente de difusión del hidrógeno, $D_H = 9 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (Wraight, 2006), y los iones de hidroxilo, $D_{OH} = 2,5 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (S. Lee & Rasaiah, 2011), respectivamente, en agua a temperatura ambiente. El modelo predice razonablemente bien la distancia a la que cambia el color a lo largo de corriente. Para $h_2/h_1 = 1$, el azul se desarrolla solo en las interfaces, produciendo un patrón de bandas a lo largo de todo el canal de enfoque. De hecho, el microcanal no es lo suficientemente grande para observar la mezcla total antes del puerto de salida, al caudal utilizado. En el otro extremo, para $h_2/h_1 = 5,9$, la corriente de muestra es bastante estrecha y se vuelve completamente azul a distancias relativamente cortas desde el inicio del contacto de las corrientes. Por supuesto, se podría hacer un análisis más detallado de la intensidad de la luz reflejada en las imágenes de la **Figura 31**, de modo que se pudieran explorar en profundidad los perfiles de concentración. Los propósitos en esta sección fueron demostrar, de la manera más simple posible, cómo el modelo propuesto puede emplearse de manera efectiva para diseñar experimentos basados en difusión y reacción, con un dominio de enfoque de flujo bien controlado usando hidrostática.

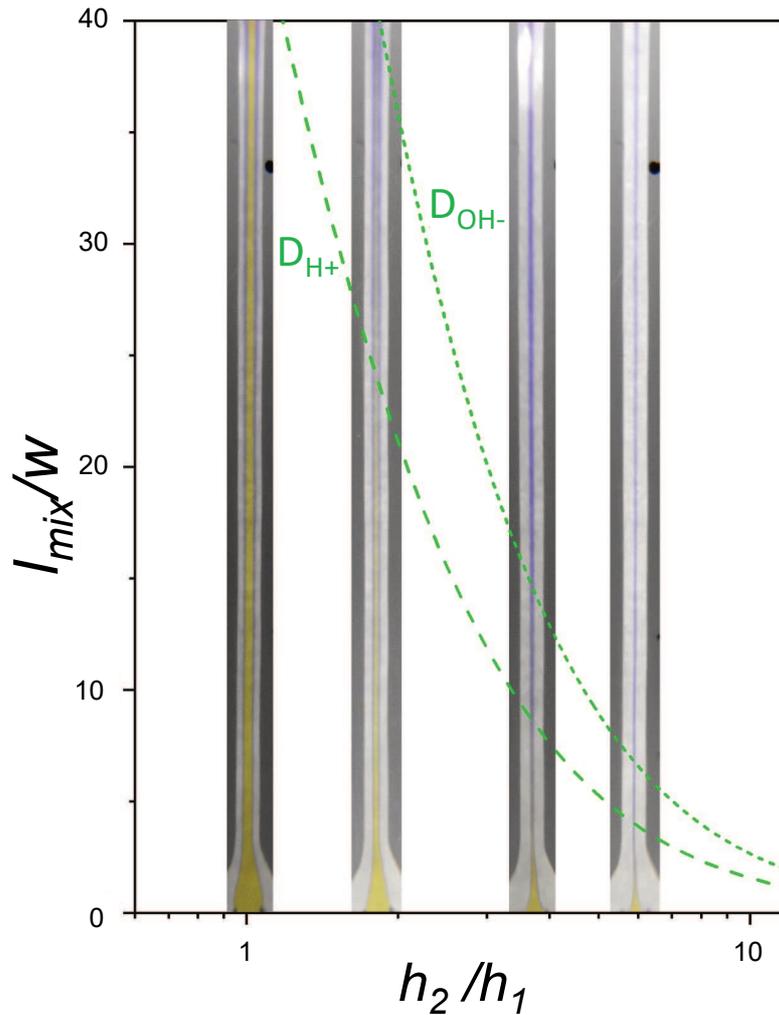


Figura 31. Longitud relativa de mezcla en función de la relación de las alturas de los fluidos. Las imágenes insertadas son fotografías de la reacción de color inducida por el pH a lo largo del flujo enfocado, para $h_2/h_1 = 1, 1.8, 3.7$ y 5.9 . Los experimentos se llevaron a cabo en el Chip#2, donde la relación de aspecto del canal de enfoque es $l/w = 39$, por lo que las imágenes se ajustan a la escala completa del eje de ordenadas. Las curvas son las predicciones de la Ecuación 3.23 considerando la difusión de iones hidrógeno (línea discontinua) e iones hidroxilo (línea punteada), al caudal experimental (figura modificada de Minetti et al., 2020).

3.6. Conclusiones parciales

Se realizó una evaluación rigurosa del flujo en microcanales rectangulares cuyos fluidos fueron bombeados por presión hidrostática. La utilidad técnica de este sistema de bombeo depende de la conversión apropiada de datos crudos en funciones. Esta es precisamente la principal contribución del presente capítulo.

Se ha demostrado que la presión hidrostática produce corrientes más estables que las bombas de jeringa, y que se pueden controlar ajustando las alturas de los líquidos. El modelo matemático de los sistemas acoplados de bombeo y enfoque hidrodinámico,

proporciona ecuaciones analíticas para calcular el ancho de las corrientes enfocada en función de la relación de altura de los fluidos, las cuales fueron validadas con éxito mediante experimentos.

El segundo aspecto a destacar es que el modelo considera fluidos con diferentes densidades y viscosidades, lo que se reportó por primera vez para flujos impulsados por gravedad (Minetti et al., 2020), hasta donde sabemos. Las propiedades fisicoquímicas de los fluidos de trabajo impactan en la presión proporcionada por las columnas hidrostáticas, así como en la formación del patrón del enfoque hidrodinámico. De hecho, se encontró que el enfoque hidrodinámico de líquidos con densidades diferentes depende del contraste de densidades y la altura absoluta del fluido de las corrientes laterales, además de la relación de alturas del fluido. El modelo predice razonablemente estos efectos para una amplia gama de condiciones operativas.

Finalmente, demostramos experimentalmente que los flujos impulsados por la gravedad se pueden manejar adecuadamente para implementar los procesos básicos de nanoprecipitación microfluídica, a saber, la difusión molecular y la reacción transversal a las corrientes de flujo. Además, el modelo propuesto predice efectivamente las longitudes características para la mezcla completa de los reactivos, en función de las alturas relativas de las columnas de fluidos. Por lo tanto, se puede concluir que el modelo presentado aquí proporciona una base racional para el diseño de nuevas aplicaciones de enfoque de flujo impulsadas por la presión hidrostática. Efectivamente, la plataforma se utilizó luego para elaborar nanopartículas de albúmina, lo cual se reporta en el Capítulo 4 de esta Tesis.

Capítulo 4

Generación microfluídica de nanopartículas de albúmina cargadas con curcumina.

4.1. Introducción

Las aplicaciones nanotecnológicas en el sector alimentario son relativamente recientes comparadas con su uso en *delivery* de fármacos. En lo que a productos alimenticios se refiere, el desarrollo de la nanotecnología está involucrado en dos aspectos: envases y alimentos en sí (García et al., 2010; H. Liu et al., 2021; Weiss et al., 2006). La creciente necesidad de producir alimentos funcionales ha motivado el uso de modernas técnicas basadas en micro y nanotecnologías. Una formulación de nanopartículas (NPs) con propiedades funcionales y fisicoquímicas particulares posibilita el transporte y liberación de principios activos, en la búsqueda de una ingesta diaria adecuada de nutrientes específicos y mejoras en la salud (Acosta, 2009; Joye et al., 2014; Weiss et al., 2006). El pequeño tamaño y la alta relación superficie/volumen de las NPs proporcionan tiempos de residencia más largos, mejor permeabilidad y solubilidad del bioactivo, en comparación con las micropartículas (Aniesrani Delfiya et al., 2016; Robles-García et al., 2016). Estos vehículos deben proteger eficazmente a los ingredientes bioactivos contra las condiciones adversas, lo que mejoraría la estabilidad, la solubilidad, la biodisponibilidad y, por lo tanto, la bioactividad de los ingredientes (Aditya et al., 2017; de Souza Simões et al., 2017; Rangan et al., 2016). En medicina resultan de especial interés dado que pueden proteger a la droga de degradación inespecífica, soportar *stress* fisiológico o mejorar la estabilidad biológica de la droga, como así también aumentar la absorción de la misma al mejorar la penetración intracelular y mantenerse en circulación por periodos largos dentro del organismo, mejorando el perfil de distribución en el tejido y la farmacocinética. Es en la matriz de las NPs que el bioactivo se puede encontrar disuelto, atrapado, encapsulado o adsorbido (Elzoghby et al., 2012; Mohanraj & Chen, 2006).

Entre los materiales que se pueden utilizar para el desarrollo de NPs, las proteínas, además de ser un componente nutricional esencial de los alimentos, son una excelente fuente de nanomateriales, ofrecen importantes ventajas en términos de biodegradabilidad, no toxicidad, baja inmunogenicidad, fácil disponibilidad y excelente capacidad de carga de ingredientes activos de diferente naturaleza (Cho & Jones, 2019; Jahanban-Esfahlan et al., 2016). Las NPs hechas a base de proteínas permiten regular su tamaño, el cual puede variar entre los 50 – 300nm (Rahimnejad et al., 2012). Ejemplos de ellas son la gelatina, el colágeno, proteínas de la leche, las albúminas séricas y proteínas aisladas de trigo, maíz, soja y legumbres (Cho & Jones, 2019; Davidov-Pardo et al., 2015).

Particularmente, las proteínas globulares, dentro de las cuales están las albúminas, resultan atractivas para la vehiculización de compuestos bioactivos ya que presentan

la propiedad intrínseca de unir, transportar y/o vehiculizar compuestos bajo la forma de complejos proteína-ligando, una propiedad vinculada con una de sus funciones biológicas (Fach et al., 2016; Fontana et al., 2013). También son capaces de unir ligandos cargados positiva o negativamente mediante interacciones electrostáticas, debido que poseen un alto contenido de aminoácidos con carga (Elzoghby et al., 2012; Loureiro et al., 2016). Otra ventaja que presentan las proteínas es que se encuentran disponibles en diversas fuentes como en la clara de huevo (ovoalbúmina), la leche (lactoalbúminas), suero (albúminas séricas) (Loureiro et al., 2016).

Los métodos convencionales de generación de NPs por precipitación consisten en procesos de producción por lotes que aplican agitación constante, mientras se deja caer o se inyecta una solución de etanol con el bioactivo hidrofóbico en una solución acuosa de la proteína (Fan et al., 2018; Rafiee et al., 2019; Salehiabar et al., 2018). La preparación microfluídica de NPs de albúmina está emergiendo en la literatura. Kazan et al. (2019) informaron sobre la elaboración de NPs de albúmina cargadas con timoquinona mediante el uso de mezcla microfluídica en una unión en T metálica. Hakala et al. (2020) describieron la formación de complejos de albúmina/celastrol en chips microfluídicos de polidimetilsiloxano (PDMS). Sun et al. (2020) presentaron el ensamblaje de NPs de albúmina cargadas con cabazitaxel en un chip microfluídico 2D con un canal de mezcla en forma de espiga. Kovács et al. (2020) informaron el entrampamiento de un ácido quinurénico en albúmina de suero bovino, al implementar la técnica de inyección de flujo en un mezclador de microcanales. S. Zhao et al. (2014) informaron sobre el entrampamiento de paclitaxel en la albúmina sérica humana mediante el uso de un flujo de gas-líquido segmentado en un mezclador Y microfluídico convencional.

Particularmente, la generación de NPs de albúmina cargadas con CCM por precipitación de la solución tiene un enorme interés para la formulación de productos nutricionales avanzados (Aniesrani Delfiya et al., 2016; Yang et al., 2013). Aún no se había informado sobre la elaboración de NPs de albúmina cargadas con CCM mediante métodos microfluídicos hasta la publicación realizada en el marco de esta Tesis (Minetti et al., 2022).

El hecho de que la microfluídica produzca NPs con distribuciones de tamaño estrechas y un control preciso del tamaño de partícula se ha demostrado cuantitativamente en varios trabajos (Baby et al., 2017; Donno et al., 2017; Leung & Shen, 2018). Además, actualmente se están realizando grandes esfuerzos para ampliar el rendimiento de las plataformas microfluídicas para la producción a gran escala de NPs (Giorello et al., 2020). Vale la pena señalar que la microfluídica también implica algunos problemas que pueden dificultar la adopción de la tecnología para la producción a gran escala: la

microfabricación de chips es relativamente costosa, son exigentes para el usuario y principalmente, el proceso de enfoque hidrodinámico tiene un bajo rendimiento. Una estrategia práctica para superar varios de estos problemas es el concepto de la fabricación de dispositivos microfluídicos a partir de componentes que ya existen en el laboratorio, fácilmente accesibles de proveedores o impresos en 3D, y diseñados para ser operados con la mínima instrumentación (Mark et al., 2012). Esta estrategia, que se ha probado con éxito para el enfoque hidrodinámico (Terray & Hart, 2010), la generación de microgotas (P. Wu et al., 2014), la producción de liposomas (Bottaro & Nastruzzi, 2016) y la preparación de cristales (Bandulasena et al., 2019), está aumentando en la actualidad el número de usuarios de la tecnología microfluídica en diferentes campos.

4.1.1. α -Lactalbúmina

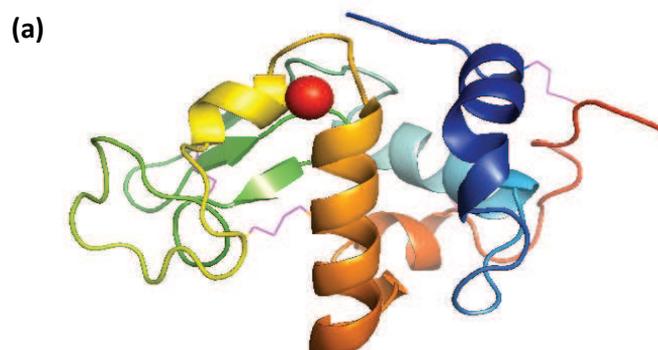
Las proteínas de la leche están divididas en dos grupos: las caseínas, que representan el 80% del total, y las proteínas del suero, con el 20% restante, dentro de las cuales la α -lactoalbúmina (α -LA) representa el 3.5% del total de las proteínas de la leche (Badui Dergal, 2006). La α -LA es uno de los principales constituyentes de las proteínas del suero y su principal actividad biológica es formar parte del sistema enzimático requerido para la síntesis de lactosa, dentro del aparato de Golgi interacciona con la enzima β -1,4-galactosiltransferasa y se forma un complejo que genera la síntesis de lactosa (Báez et al., 2021). Entre sus características, tiene bajo peso molecular (14,2 kDa), está constituida por 123 aminoácidos, tiene alto contenido de triptófano y una secuencia de aminoácidos muy parecida a la lisozima del huevo (62,6% a nivel estructural y 35,8% a nivel de secuencia de aminoácidos), no tiene grupos sulfhidrilo libres sino que forman una estructura globular compacta estabilizada por cuatro enlaces disulfuro provenientes de cistinas (Cis⁶–Cis¹²⁰, Cis⁶¹–Cis⁷⁷, Cis⁷³–Cis⁹¹ y Cis²⁸–Cis¹¹¹) (Stănciu & Râpeanu, 2010). La α -LA tiene la temperatura de desnaturalización más baja (~63°C) de las proteínas del suero, pero este proceso es un 90% reversible con el enfriamiento. Leves cambios irreversibles en la estructura secundaria ocurren cuando se calienta a 70 u 80°C y a pH neutro (McGuffey et al., 2005). Su punto isoeléctrico teórico es de 4,8 y la unión de calcio es necesario para los plegamientos de la forma nativa y la formación de los puentes disulfuro (Arroyo-Maya et al., 2014; Layman et al., 2018).

En condiciones nativas, la estructura terciaria de la α -LA está constituida por dos subdominios: α y β . El α es el dominio más grande, formado por la sección amino- y carboxil-terminal de la cadena polipéptidica (residuos del 1-34 y del 86-123). Consiste en cuatro α -hélices denotadas como A (residuos 5-1), B (23-34), C (86-98) y D (105-

110) y tres hélices cortas (12-16, 101-104 y 115-119). La región más pequeña conformada por el dominio β está formada por una sección central de la cadena polipéptidica (residuos del 35-85) y abarca a tres pequeñas láminas β antiparalelas (residuos 41-44, 47-50 y 55- 56) y a una hélice corta (77-80) además de algunas estructuras irregulares (Delavari et al., 2018; Stănciu & Râpeanu, 2010).

La unión de calcio influye fuertemente en la estabilidad molecular de α -LA y es necesaria para el plegamiento ya que el calcio unido está ligado a los dominios α y β . El ion calcio se coordina con los grupos β -carboxilo de tres residuos de ácido aspártico (Asp⁸², Asp⁸⁷ y Asp⁸⁸), dos oxígenos de carbonilo (Lis⁷⁹ y Asp⁸⁴) y dos moléculas de agua (Stănciu & Râpeanu, 2010).

En la **Figura 32** se observa la estructura de la α -lactalbúmina bovina y la secuencia de aminoácidos.



(b)

1: Glu-Gln-Leu-Tre-Lis-Cis-Glu-Val-Fen-Arg-Glu-Leu-Lis-Asp-Leu-Lis-Gli-Tir-Gli-Gli
 21: Val-Ser-Leu-Pro-Glu-Tri-Val-Cis-Tre-Tre-Fen-His-Tre-Ser-Gli-Tir-Asp-Tre-Gln-Ala
 41: Ile-Val-Gln-Asn-Asn-Asp-Ser-Tre-Glu-Tir-Gli-Leu-Fen-Gln-Ile-Asn-Asn-Lis-Ile-Tri
 61: Cis-Lis-Asp-Asp-Gln-Asn-Pro-His-Ser-Ser-Asn-Ile-Cis-Asn-Ile-Ser-Cis-Asp-Lis-Fen
 81: Leu-Asp-Asp-Asp-Leu-Tre-Asp-Asp-Ile-Met-Cis-Val-Lis-Lis-Ile-Leu-Asp-Lis-Val-Gli
 101: Ile-Asn-Tir-Tri-Leu-Ala-His-Lis-Ala-Leu-Cis-Ser-Glu-Lis-Leu-Asp-Gln-Tri-Leu-Cis
 121: Glu-Lis-Leu

Figura 32. (a) Estructura cristalográfica de la α -LA bovina unida a Ca^{2+} . En el lado izquierdo el dominio α (amarillo/verde) y en lado derecho el dominio β (azul/rojo) el calcio es representado por la esfera roja (b) Secuencia de los 123 aminoácidos. Las cisteínas resaltadas con colores son las que forman las cuatro cistinas (figura modificada de Arroyo-Maya, 2012).

La proteína posee dos centros hidrofóbicos, uno formado por las α -hélices A, B y C y está contenido dentro del dominio α . El otro centro hidrofóbico, conocido como parche hidrofóbico, está formado por las α -hélices C y D y residuos del dominio β (Demarest et al., 1999).

Por lo descrito anteriormente, la α -LA posee numerosas propiedades estructurales y funcionales que podría facilitar su aplicación como agente de entrega de una variedad de compuestos bioactivos. Pueden unirse a iones y/o moléculas hidrofóbicas. Se ha

demostrado que α -LA forma complejos con diferentes compuestos tales como los ácidos grasos, vitaminas, polifenoles y fármacos (Delavari et al., 2015, 2018; Yi et al., 2016).

4.1.2. Curcumina

La curcumina (CCM) es un polifenol natural de bajo peso molecular (368g/mol) extraído de *Curcuma longa*. Se observa como un compuesto cristalino con un color amarillo anaranjado brillante, utilizado tradicionalmente como especia y colorante alimentario, pero también se ha demostrado tener una amplia variedad de efectos farmacológicos, lo cual ha motivado su administración como parte del tratamiento y prevención de diferentes patologías. Diversos estudios han reportado que la CCM tiene actividad contra enfermedades como el cáncer, la diabetes, obesidad, enfermedades autoinmunes, pulmonares, cardiovasculares, neurológicas e infecciones, al comprobarse propiedades antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, antiprotozoaria, antiviral, antibacteriana, entre otras. (Kotha & Luthria, 2019; Sasaki & Kichida, 2012).

Su estructura química presenta tres componentes: dos anillos aromáticos, los cuales presentan grupos o-metoxifenólicos, unidos simétricamente a través de una cadena de siete carbonos conformada por una β -dicetona- $\alpha\beta$ -insaturada (**Figura 33a**) (Lestari & Indrayanto, 2014), además presenta tautomerismo ceto-enólico, dependiendo del medio en el que se encuentre, predomina una forma sobre la otra. En medios alcalinos la forma enol predomina, mientras que en medios ácidos y neutros predomina la forma ceto (**figura 33b**). La forma enólica es la más estable debido a que se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno asistidos por resonancia entre los anillos fenólicos y una densidad de electrones distribuida por toda la molécula en comparación con otras conformaciones (Lestari & Indrayanto, 2014).

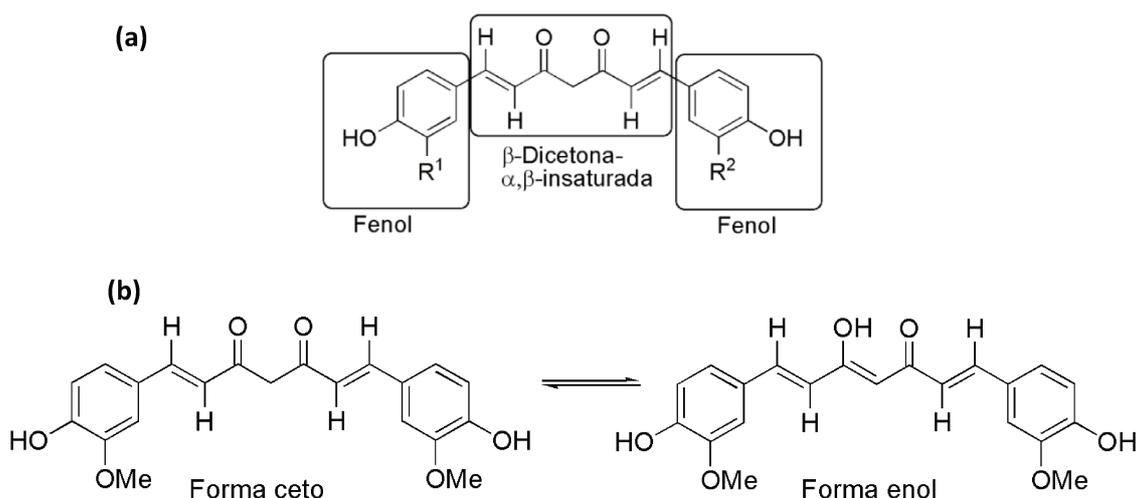


Figura 33. (a) Estructura química de la CCM (b) Estructura química de los tautómeros de la molécula de CCM (figura modificada de González-Albadalejo et al., 2015)

La CCM tiene naturaleza lipofílica, es prácticamente insoluble en agua a temperatura ambiente a pH ácido y neutro. A pH básicos la solubilidad se incrementa pero se degrada rápidamente (Lestari & Indrayanto, 2014). En cambio, es soluble en disolventes orgánicos polares y no polares, así como en disolventes extremadamente ácidos. Se informaron tres valores de pKa para la CCM: 7,75, 8,55 y 9,05, los dos primeros son de los grupos OH fenólicos, y el tercer valor es del protón enólico (Priyadarsini, 2009).

A pesar de sus propiedades beneficiosas para la salud, debido a sus características químicas, la CCM es una molécula poco estable y de rápido metabolismo, lo cual implica que la capacidad para ser absorbida a través de las barreras fisiológicas y las concentraciones plasmáticas sean bajas (Priyadarsini, 2009). Al mismo tiempo, esto impide su inclusión en alimentos y bebidas funcionales; por lo tanto, el entrapamiento de CCM en portadores hidrofílicos es altamente deseable (McClements et al., 2015), y actualmente se están realizando varios intentos de vehiculización (T. Jiang et al., 2020; Luiza Koop et al., 2022). En particular, la unión de CCM a proteínas solubles es una alternativa prometedora para una mejor biodisponibilidad y acción terapéutica, incluso diferentes nanoformulaciones de CCM exhibieron eficacia terapéutica *in vitro* (Bourassa et al., 2010; Chow et al., 2015; L. Jiang & Korivi, 2013; Yu et al., 2017).

4.2. Objetivos

Los objetivos específicos de este capítulo son los siguientes:

- Generar NPs obtenidas por nanoprecipitación en un dispositivo de microfluidica.

- Caracterizar el sistema biopolimérico obtenido en cuanto a su tamaño, forma y estructura.
- Evaluar la eficiencia de entrapamiento del bioactivo, rendimiento del proceso y el perfil de liberación del bioactivo.

Se propuso el uso de un dispositivo “off-the-shelf” para implementar el proceso de nanoprecipitación de una manera simple y económica. Se fabricó un dispositivo microfluídico de canal circular que permite la generación de flujos laminares coaxiales, preparado a partir de agujas dispensadoras, microtubos y conectores en T, formando dos cilindros huecos concéntricos, donde la corriente central de etanol-CCM se enfocó radialmente con una solución acuosa de α -LA. La principal ventaja de este dispositivo fue la resistencia a solventes orgánicos, a diferencia de los dispositivos fabricado anteriormente donde se observó que cuando se trabaja con solventes orgánicos por periodos prolongados en los chips fabricados con cinta OCA, el material comienza a desintegrarse, se alteran los canales y es muy probable que parte del pegamento contamine la muestra. Los fluidos fueron impulsados por la gravedad, lo que, además de la simplicidad y el bajo costo, brinda una mayor estabilidad del flujo y un manejo preciso de las corrientes enfocadas, estos aspectos que se detallaron en el Capítulo 3.

4.3. Fundamentos de la técnica microfluídica

4.3.1. Tiempo de mezcla en el flujo coaxial

Se logró la nanoprecipitación por enfoque microfluídico en capilares cilíndricos. El proceso se muestra esquemáticamente en la **Figura 33**. Dos corrientes de fluidos se ven obligadas a fluir coaxialmente a lo largo del tubo capilar (**Figura 33c**). La corriente de etanol que contiene CCM (líquido interior a caudal Q_1) es comprimida y envuelta por la solución acuosa de α -LA (líquido exterior a caudal Q_2). La interdifusión a través de la interfase núcleo-vaina permite una mezcla rápida y el consiguiente proceso de modificación de disolvente, que desencadena la nucleación de precursores y el crecimiento de NPs.

Si la corriente enfocada es muy estrecha (micrómetros), entonces la mezcla es rápida (milisegundos) y se obtienen NPs monodispersas. Los flujos coaxiales se han investigado a fondo para predecir las condiciones de operación que aseguran una nanoprecipitación homogénea (Hajian & Hardt, 2015; Middha et al., 2019). Es importante centrarse en controlar el radio de la corriente central r (**Figura 33c**).

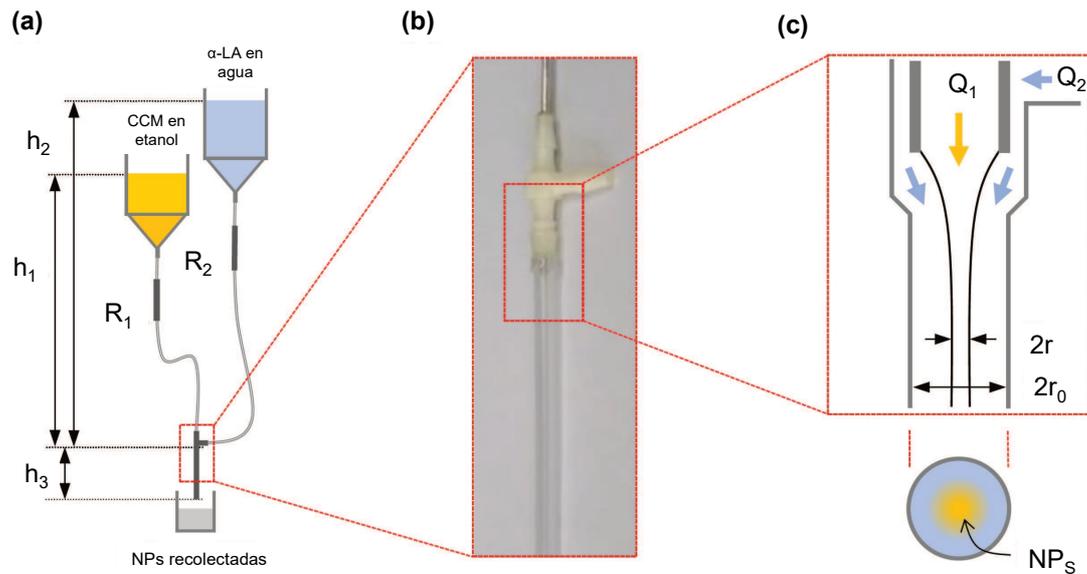


Figura 34. (a) Representación esquemática de la configuración microfluídica; el flujo es impulsado por la presión hidrostática y las velocidades están reguladas por la resistencia hidrodinámica de cada brazo. (b) Fotografía del dispositivo *off-the-shelf* ensamblado en el laboratorio para realizar el enfoque hidrodinámico; consta de una aguja dosificadora, un conector en T y un tubo capilar. (c) Dibujo de los dominios fluidicos: la sección de flujo coaxial es seguida por la sección de coflujo, donde la solución orgánica de CCM (caudal Q_1) es enfocada por la solución acuosa de α -LA (caudal Q_2). El panel inferior (círculo) representa una vista transversal del flujo núcleo- vaina, que muestra la región de interdifusión, donde tiene lugar la nanoprecipitación (figura modificada de Minetti et al., 2022).

De hecho, el tiempo de mezcla se puede considerar como el tiempo de difusión característico,

$$t_D \approx \frac{r^2}{4D} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

donde D es el coeficiente de difusión molecular de un solvente en el otro (Karnik et al., 2008; Leung & Shen, 2018; Tresset et al., 2013). Por lo tanto, tanto el tamaño promedio como la dispersión del tamaño de las NPs dependen del radio de la corriente enfocada.

El dispositivo propuesto permite controlar con precisión r a partir de la relación Q_2/Q_1 . Además, se puede estimar teóricamente la función $r = f(Q_2/Q_1)$, y luego el tiempo de mezclado. Para fluidos de trabajo con diferentes densidades, el enfoque hidrodinámico depende en gran medida de la orientación del chip en relación con la aceleración de la gravedad, como se analizó en el Capítulo 2.

Para capilares cilíndricos, las relaciones teóricas $r = f(Q_2/Q_1)$ están disponibles (Vempati et al., 2007), aunque en formas implícitas que exigen cálculos numéricos. En aras de la simplicidad, aquí consideramos la expresión límite para fluidos con igual densidad y viscosidad; eso es,

$$\left(\frac{r}{r_0}\right)^2 = 1 - \left(\frac{Q_2/Q_1}{1 + Q_2/Q_1}\right)^{1/2} \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

Donde r_0 es el radio interior del cilindro exterior (**Figura 34c**). Por ejemplo, usando capilares con $r_0 = 175 \mu\text{m}$, la corriente enfocada se puede adelgazar de $r = 95 \mu\text{m}$ en $Q_2/Q_1 = 1$ a alrededor de $38 \mu\text{m}$ en $Q_2/Q_1 = 10$. Es importante enfatizar que la Ecuación 4.2 no tiene en cuenta los efectos de la gravedad. En el caso del etanol enfocado por agua, con el flujo hacia abajo, la corriente central es ligeramente más gruesa que la predicción de la Ecuación 4.2, porque la fuerza de flotación que actúa sobre el fluido menos denso disminuye su velocidad relativa y expande la corriente de fluido (Giorello et al., 2020). Lo contrario sucede si el flujo es hacia arriba. Con estas consideraciones en mente, incluimos la Ecuación 4.2 en la Ecuación 4.1 para estimar el tiempo de mezcla como,

$$t_D \approx \frac{r_0^2}{4D} \left[1 - \left(\frac{Q_2/Q_1}{1 + Q_2/Q_1}\right)^{1/2} \right] \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

Utilizando el coeficiente de difusión del agua en etanol, $D = 1,24 \cdot 10^{-9} \text{m}^2/\text{s}$ (Cussler, 1997), y para $r_0 = 175 \mu\text{m}$, se observa fácilmente que t_D puede disminuirse de 1,6 s en $Q_2/Q_1 = 1$ a 250ms en $Q_2/Q_1 = 10$. Tanto el tamaño de las NPs como la dispersión del tamaño disminuyen en esta dirección (Karnik et al., 2008; Leung & Shen, 2018; Tresset et al., 2013). Los valores más grandes de Q_2/Q_1 conducen a cantidades bajas de NPs por unidad de volumen y también pueden desequilibrar las concentraciones relativas de los reactivos. Precisamente, un desafío de la microfluídica para la nanoprecipitación es reducir t_D a milisegundos, mientras mantiene el rendimiento de la reacción en un nivel razonable.

4.3.2. Regímenes de flujo para nanoprecipitación

Para evaluar el régimen de flujo apropiado para la nanoprecipitación, el tiempo de mezcla difusiva debe compararse con el tiempo de flujo característico,

$$t_F = \frac{\pi r_0^2 l}{Q_1 + Q_2} \quad (\text{Ecuación 4.4})$$

que mide el tiempo consumido por el transporte advectivo para desplazar el fluido a lo largo de la longitud capilar l . Luego incluimos el número de Péclet, definido como $Pe = t_D/t_F$, que se escribe de la siguiente manera (después de dividir la Ecuación 4.3 por la Ecuación 4.4),

$$Pe = \frac{Q_1 + Q_2}{4\pi D l} \left[1 - \left(\frac{Q_2/Q_1}{1 + Q_2/Q_1} \right)^{1/2} \right] \quad (\text{Ecuación 4.5})$$

Es interesante observar que el régimen de transferencia de masa depende del radio capilar y está gobernado por las velocidades de flujo de las corrientes del centro y la cubierta. Por lo tanto, para un dispositivo determinado, Q_1 y Q_2 deben ajustarse para satisfacer siempre $Pe < 1$, lo que garantiza un intercambio de disolvente completo antes de la salida del tubo capilar. Además, la Ecuación 4.5 es útil para diseñar el montaje experimental. Por ejemplo, se puede predecir la longitud de mezcla l_{mix} como la posición aguas abajo en la que se logra la difusión transversal en la corriente enfocada, es decir, cuando t_D coincide con t_F . Poniendo $Pe = 1$, $Q_2/Q_1 = 10$ y $Q_1 + Q_2 = 20$ mL/h en la Ecuación 4.5, se obtiene $l_{mix} \approx 2$ cm.

4.3.3. Caudales en flujo impulsado por gravedad

En el sistema de bombeo hidrostático utilizado aquí, los caudales Q_1 y Q_2 resultan de la presión superior y la resistencia hidrodinámica de todo el circuito, que también dependen de las propiedades del fluido. Los depósitos de fluido se pueden colocar a diferentes alturas h (**Figura 34a**) en relación con el inicio del coflujo, que se toma como nivel de referencia. En la práctica, las resistencias hidrodinámicas R_1 y R_2 son muy grandes (en relación con la resistencia del dispositivo) para mejorar la estabilidad del flujo y ampliar el rango operativo del sistema de bombeo, tal como se detalló en el Capítulo 3. Este arreglo de resistencias también desacopla los balances de caída de presión para el circuito, y las ecuaciones se simplifican a,

$$\rho_1 g h_1 - \rho_3 g h_3 = \rho_1 Q_1 R_1 \quad (\text{Ecuación 4.6})$$

$$\rho_2 g h_2 - \rho_3 g h_3 = \rho_2 Q_2 R_2 \quad (\text{Ecuación 4.7})$$

Ecuaciones 4.6 y 4.7 se utilizan para ajustar las alturas de los fluidos para caudales prescritos, siendo ρ_3 la densidad media de la mezcla de fluidos. Por otro lado, dividiendo la Ecuación 4.6 por la Ecuación 4.7 y reordenando, permite predecir la relación Q_2/Q_1 para una configuración dada de alturas de fluido,

$$\frac{Q_2}{Q_1} = \frac{R_1}{R_2} \frac{[\rho_2 h_2 - \rho_3 h_3]}{[\rho_1 h_1 - \rho_3 h_3]} \quad (\text{Ecuación 4.8})$$

Se puede hacer una simplificación adicional colocando el extremo de la tubería de salida a la misma altura del inicio del co-flujo (nivel de referencia, **Figura 34a**). Esta solución práctica hace a $h_3 = 0$ en las Ecuaciones 4.6 y 4.7, y por tanto se obtiene una

relación lineal $Q_2/Q_1 = f(h_2/h_1)$. Finalmente, vale la pena señalar que la relación h_2/h_1 no varía apreciablemente durante las corridas experimentales, como se demostró anteriormente en el Capítulo 3. Otras estrategias, como el llenado de depósitos, también se pueden adaptar fácilmente (Gao et al., 2019; Wang et al., 2018), principalmente para prolongar el proceso de elaboración de NPs.

4.4. Materiales y métodos

4.4.1. Químicos y materiales

BioPURE α -LA (lote de producción JE 025-18-414) fue proporcionado por Davisco Foods International Inc. (Eden Prairie, Minnesota, EE.UU.). La composición suministrada por el fabricante fue: contenido de humedad, 5,0%; proteína, 98,2% (91,3% de esta proteína correspondía a α -LA); grasa, 0%; y ceniza, 1,7%. La CCM de productos naturales (pureza: 96,5%) se obtuvo de Konark Herbals & Health Care (Maharashtra, India). El etanol 96% (Bialcohol, Córdoba, Argentina) se compró en el mercado local. Todos los demás productos químicos utilizados fueron de grado analítico y se utilizó agua ultrapura en todos los experimentos.

4.4.2. Dispositivo microfluídico empleado

Los dispositivos de microfluídica se fabricaron con los siguientes componentes: agujas dispensadoras de acero inoxidable (1/2" 21G, 510 μ m ID, 810 μ m OD), conectores en T transparentes (púas de 1/16", polipropileno), tubería de teflón 350 μ m ID y tubos de silicona para accesorios. Los componentes se ensamblaron de manera similar a los prototipos utilizados para la generación de gotas (T. Li et al., 2016), aunque aquí armamos flujos coaxiales para enfoque hidrodinámico. Para la fabricación de este diseño, se quitó el cono plástico de la aguja y se despuntó el bisel usando una máquina pulidora. Luego, el eje de la aguja se insertó a través del conector en T y se ajustó utilizando el extremo cónico de una punta de micropipeta. Este conjunto forma una sección coaxial que se alinea con un tubo capilar, el cual se ajusta al extremo opuesto del conector en T utilizando una pequeña porción de tubo de silicona (**Figura 34b**). El tubo capilar es la sección donde las corrientes son forzadas a fluir conjuntamente y se lleva a cabo el enfoque hidrodinámico (**Figura 34c**).

El dispositivo se fijó a un soporte plano que se colocó verticalmente, con la dirección del flujo alineada con la aceleración de la gravedad. Se utilizó presión hidrostática para el bombeo de fluidos (**Figura 34a**), siguiendo los procedimientos experimentales de configuración, calibración y operación descritos anteriormente en el Capítulo 3. Los caudales para cada condición de funcionamiento se calcularon como se describió

anteriormente en la Sección 4.3.3. Todo el sistema se operó en un laboratorio con condiciones de temperatura controlada.

4.4.3. Preparación de las soluciones.

Se prepararon soluciones acuosas de α -LA al 0,2%(m/v). El polvo seco se agregó poco a poco sobre la solución salina de buffer con fosfato (PBS) 50mmol/L y pH 7, a temperatura ambiente y luego se sometió a agitación magnética durante 30 min. Para evaluar la influencia del tratamiento térmico en la formación de NPs y el entrapamiento del bioactivo, se calentó la solución de α -LA a 70°C durante 10min antes del proceso de nanoprecipitación. Este tratamiento térmico suave tuvo como objetivo inducir un pequeño grado de desnaturalización de la proteína, lo que promovería la exposición de zonas hidrofóbicas para mejorar las interacciones proteína-proteína y proteína-curcumina. A continuación, la solución se enfrió a temperatura ambiente para su uso. Se prepararon soluciones orgánicas de CCM al 0,05%(m/v) en etanol al 96%(v/v) a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad. Ambas soluciones se prepararon y se mantuvieron refrigeradas durante la noche. Previo a su uso, las muestras fueron acondicionadas a temperatura ambiente y luego desgasificadas en un baño ultrasónico (Testlab TB02, Buenos Aires, Argentina). Las condiciones de ultrasonido fueron 80W, 40 kHz, 24°C y 20min, aplicadas por igual a todas las soluciones acuosas. La desgasificación de fluidos es un paso clave en la preparación de muestras microfluídicas, para evitar la generación de burbujas que pueden perturbar el flujo en los microcanales.

4.4.4. Preparación de las NPs

Las soluciones de reactivos se colocaron en jeringas de plástico de 60mL utilizadas como depósitos de fluidos para el sistema de presión hidrostática. Las jeringas se fijaron a plataformas deslizantes sobre rieles verticales de 80cm montados con reglas para medir con precisión la altura de los fluidos, como se muestra en la fotografía de la **Figura 35a**. La producción de NPs de α -LA con CCM fue llevada a cabo en el sistema de flujo coaxial, como se describe en la **Figura 34**: el fluido interno fue la solución orgánica de CCM, inyectada al caudal Q_1 , la cual es hidrodinámicamente enfocada por el fluido externo, la solución acuosa de α -LA, inyectada al caudal Q_2 . Tanto la relación de caudales (Q_2/Q_1) como el caudal total ($Q_1 + Q_2$) fueron controlados, como se describe a continuación en las Secciones 4.5.1 y 4.5.2. El producto de la reacción (suspensión de NPs) se recogió en diferentes viales para su posterior caracterización (**Figura 35b**). Todo el sistema se mantuvo a temperatura controlada en el laboratorio (24°C).

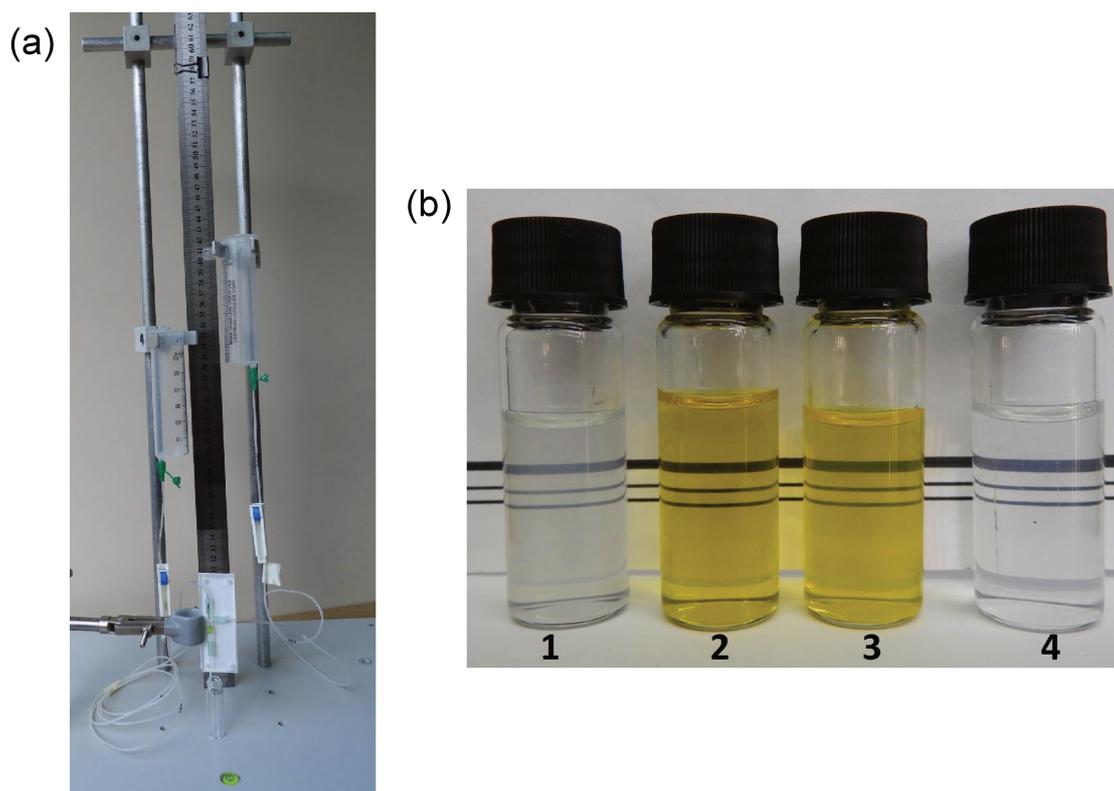


Figura 35. (a) Fotografía de la plataforma de infusión por presión hidrostática con los depósitos de fluidos conectados al dispositivo de flujo coaxial. (b) Fotografía de viales con suspensiones de NPs obtenidas a $Q_2/Q_1 = 10$ y $Q_1 + Q_2 = 20$ mL/h. **1**, α -LA nativa sin CCM; **2**, α -LA nativa con CCM; **3**, α -LA pretratada térmicamente, con CCM; y **4**, α -LA pretratada térmicamente, sin CCM.

4.4.5. Caracterización del tamaño y la forma de las NPs

4.4.5.1. Dispersión de luz dinámica (DLS)

Tanto el diámetro hidrodinámico como el índice de polidispersidad (IPD) de las NPs se determinaron mediante DLS (Brookhaven Instrument, Nueva York, EE. UU.). Las mediciones se realizaron inmediatamente después de recolectar las NPs en la salida del dispositivo de microfluídica. Para cada muestra, se realizaron 4 corridas y el tiempo de adquisición se fijó en 100 s para cada corrida. La temperatura se fijó en 30°C y el ángulo de detección fue de 90°.

4.4.5.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se prepararon diferentes diluciones de la suspensión de NPs (1/5, 1/10, 1/50, 1/100). La solución diluyente fue una mezcla 10:1 de buffer PBS (50mmol/L) y etanol (96%v/v). Se depositaron gotas (5 μ L) de cada dilución sobre sustratos de vidrio limpios de 1cm x 1cm. Las muestras se secaron al aire y luego se recubrieron con una capa de oro mediante el uso de un módulo SPI 12157-AX de recubrimiento por pulverización catódica (SPI Supplies, EE. UU.). Las observaciones se realizaron con

diferentes aumentos en el rango de 2500×–76000×, utilizando un microscopio Phenom PRO (Phenom-World BV, Países Bajos) operado a 10 kV.

4.4.5.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La suspensión de NPs se diluyó 1/200 con la solución de PBS-etanol indicada anteriormente. Se depositó una gota de 5µL en una rejilla de cobre recubierta de carbono de malla 200 formvar (Ted Pella Inc., EE. UU.). Las muestras se secaron al aire a temperatura ambiente y no se añadieron soluciones de tinción a la rejilla. Las observaciones se realizaron con un aumento de 30000x utilizando un microscopio electrónico de alta resolución JEM-2100 plus (JEOL, Tokio, Japón) equipado con un emisor LaB6 y operado a un voltaje de aceleración de 100kV.

4.4.6. Caracterización de la estructura de nanopartículas

Las partículas recién preparadas se recogieron en un vial, se congelaron a -80°C y se liofilizaron durante 24h a una presión de vacío de 0,010mbar en un liofilizador de laboratorio (Cryodos 80, Telstar). El polvo seco (1–2mg) se mezcló con bromuro de potasio (100mg) y comprimido en forma de disco. Los espectros se obtuvieron usando un espectrofotómetro FTIR-8001 PC (Shimadzu). Rango de frecuencia: 4000–400cm⁻¹, resolución espectral: 4cm⁻¹ y número de escaneos: 40.

4.4.7. Eficiencia de atrapamiento de CCM (EE)

Después de la nanoprecipitación microfluídica, las moléculas de α- LA permanecen en dos fracciones: formando las NPs y libres en solución. La CCM no atrapada se separó de las NP mediante ultracentrifugación (centrífuga Bio fuge 28RS, Heraeus Sepatech, Osterode, Alemania) a 20000g durante 15min a 15°C. La cantidad de CCM cargada en las NPs se determinó por la diferencia entre la concentración inicial de CCM y la concentración de CCM presente en el sobrenadante. Se diluyó una alícuota del sobrenadante de centrifugado con PBS y se midió la cantidad de CCM mediante espectrofotometría UV-visible (Agilent Technologies Cary 60, California, EE. UU.). La cantidad de CCM se calculó a partir de una curva estándar de absorbancia a 426 nm. La eficiencia de atrapamiento de CCM de las NPs de con CCM está dada por,

$$EE(\%) = \frac{CCM_T - CCM_S}{CCM_T} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4.9})$$

Donde CCM_T es la concentración total de CCM en la solución que alimenta la corriente central y CCM_S es la concentración de CCM en el sobrenadante después de la nanoprecipitación. En el Apéndice 1 se presenta la curva de calibrado elaborada para la cuantificación.

4.4.8. Rendimiento de NPs (RNPs)

El RNPs determina la cantidad de biopolímero que efectivamente forma NPs en relación a la cantidad de biopolímero utilizado inicialmente (Merodio et al., 2001). Para la cuantificación del porcentaje de α -LA libre remanente tras la nanoprecipitación, las NPs se separaron del sobrenadante mediante centrifugación a 20000g durante 15min a 15°C. La concentración de α -LA en el sobrenadante se determinó mediante el método de Bradford (Kruger, 2009). El contenido de proteína de las muestras se calculó por interpolación en una curva estándar de α -LA previamente preparada para el rango de cantidad de proteína de 10 a 200 μ g. El RNPs se calculó de la siguiente manera:

$$RNPs(\%) = \frac{\alpha LA_T - \alpha LA_S}{\alpha LA_T} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4.10})$$

donde αLA_T es la concentración total de α -LA en la solución que alimenta la corriente envolvente y αLA_S es la concentración de α -LA libre presente en el sobrenadante después de la nanoprecipitación. En el Apéndice 2 se presenta con más detalle la metodología aplicada y la curva de calibrado elaborada para la cuantificación.

4.4.9. Liberación de CCM *in vitro*

Se llevaron a cabo ensayos de liberación de CMM desde las NPs y el efecto potencial del pretratamiento térmico aplicado a la solución de proteína. Se recogieron en viales 3,6mL de NPs recién preparadas. Luego se añadieron 11,1mL de medio de liberación (PBS/etanol 10:1, pH 6,8) para completar un volumen final de 15mL. Además, se agregaron 300 μ L de solución de ácido ascórbico al 1% para evitar la degradación de la CCM (Jithan et al., 2011; Lestari & Indrayanto, 2014). Los viales se mantuvieron a 37°C en un agitador orbital a 130 rpm. Se utilizó un vial para cada tiempo de liberación preseleccionado. Transcurrido el tiempo de liberación especificado, cada vial se centrifugó a 20000g durante 20min a 25°C para obtener el sobrenadante sin NPs. La concentración de CCM en el sobrenadante se cuantificó mediante espectrofotometría UV-visible. Los experimentos se realizaron por triplicado. La liberación de CCM se determinó restando la cantidad de CCM no atrapada inicialmente presente en el medio de liberación. Se calculó el porcentaje de liberación acumulada de fármaco.

4.4.10. Actividad antioxidante (AAO)

A los efectos de evaluar si la CCM liberada mantiene su funcionalidad, se determinó una de sus propiedades funcionales, la actividad antioxidante (AAO). Se recogió un volumen de 3,6mL de las NPs recién elaboradas con y sin CCM y de CCM libre y se

añadieron 11,1mL de medio de liberación (PBS/etanol 10:1, pH 6,8) para completar un volumen final de 15mL. No se adicionó ácido ascórbico para que no interfiera en los resultados de AAO. Por tal motivo se consideró la determinación a los 30 minutos de incubación. Las NPs en medio de liberación se mantuvieron a 37°C en un agitador orbital a 130 rpm. Transcurrido los 30 minutos, se determinó la AAO mediante la metodología propuesta por Re et al. (1999) con algunas modificaciones. Este método consiste en la eliminación del radical ABTS [(2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico))], un cromóforo azul-verde cuya intensidad de color disminuye a medida que se reduce debido a la presencia de un compuesto antioxidante. En este método, se agrega un antioxidante a una solución radical ABTS preformado y después de un período de tiempo fijo, el ABTS restante se cuantifica espectrofotométricamente a 734nm. El radical ABTS se generó con la preparación de una solución madre de ABTS en PBS 5mmol/L a pH 7,4, hasta una concentración de 7mmol/L. Luego se continuó con la generación del catión radical ABTS, reaccionando la solución madre ABTS con una solución concentrada de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) preparada en el momento en PBS 5mmol/L a pH 7,4, de manera de lograr una concentración final de 2,45mmol/L. Seguidamente se incubó la mezcla en oscuridad y a temperatura ambiente durante 12-16h de manera de que se produzca el radical ABTS. Transcurrido este tiempo y al momento previo del ensayo, se preparó la solución de trabajo diluyendo la mezcla de ABTS con PBS 5mmol/L a pH 7,4 hasta lograr una absorbancia de 0,70 ± 0,02 a 734nm (Eberhard et al., 2019).

Para expresar los resultados como capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), se utilizó Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman2-carboxílico) 4mmol/L en PBS 5mmol/L a pH 7,4, un análogo de vitamina E soluble en agua que se utiliza como estándar. La curva de calibración se efectuó midiendo puntos de Trolox en el rango de concentraciones 2-25µmol/L, de forma de lograr un porcentaje de reducción del color inicial de ABTS entre el 20 y el 80%. Se calculó el porcentaje de eliminación del radical ABTS (E_{ABTS}(%)) después de 7 min a partir de la siguiente ecuación:

$$E_{ABTS}(\%) = \frac{A_0 - A_7}{A_0} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4.11})$$

donde A₀ es la absorbancia de la solución de trabajo del radical ABTS al inicio del ensayo, A₇ es la absorbancia de la muestra más la solución de trabajo del radical ABTS, transcurridos los 7 min de incubación. Luego de obtener los porcentajes de

disminución de color, se continuó con la realización de la correspondiente curva de calibración ($E_{ABTS}(\%)$ vs. concentración de Trolox) (Apéndice 3).

Para la determinación de la AAO de las muestras de interés, se adicionó a 1mL de la solución de trabajo del radical ABTS a 30 μ L de la muestra de NPs con medio de liberación y CCM libre. Debido a pruebas realizadas anteriormente se decidió no centrifugar las muestras antes de medir la AAO ya que adicionaba gran variabilidad a los resultados. Con el porcentaje de disminución del color para cada muestra incógnita, se ingresó a la curva de $E_{ABTS}(\%)$ vs. concentración de Trolox (μ mol/L), y los resultados $E_{ABTS}(\%)$ de todas las muestras se expresaron como TEAC, en mmol/g de Trolox por g de muestra, de la siguiente manera:

$$\text{TEAC} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) = \left[\frac{E_{ABTS}(\%) - I}{m} \right] \times \frac{(1000 + S)}{S} \times \frac{1}{1000} \times \frac{1}{C} \quad (\text{Ecuación 4.12})$$

donde $E_{ABTS}(\%)$ se calculó como en la Ecuación 4.11; I es la intercepción; m [L/ μ mol] es la pendiente de la curva de calibración Trolox; S [μ L] es el volumen de muestra empleado en el ensayo; y C [g/L] es la concentración de proteína y CCM presente en la muestra. En todas las muestras se tomó la lectura del blanco como absorbancia inicial antes de tomar cada determinación y todos los ensayos se hicieron por triplicado.

4.4.11. Análisis estadístico

Para discriminar el efecto del pretratamiento térmico en las características de las NPs, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics (Statgraphics Inc., Rockville, MD, EE.UU.). Cuando se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$), se realizó una comparación de medias.

4.5. Resultados y discusión

4.5.1. Generación microfluídica de NPs

Como se describió anteriormente, se utilizó el enfoque hidrodinámico en un dispositivo microfluídico accionado por gravedad ensamblado en nuestro laboratorio (**Figura 34**). En primer lugar, se presentan los resultados de la nanoprecipitación observados macroscópicamente: la **Figura 35** muestra ejemplos típicos de suspensiones recién obtenidas, donde tanto la claridad óptica como la ausencia de precipitados son evidentes. Las suspensiones de α -LA solas son transparentes, con una opalescencia ligeramente diferente según si se aplicó o no el pretratamiento térmico. En cambio, se

observa un color amarillo brillante (todavía claramente transparente) en el caso de las NPs cargadas con CCM. Al observar las suspensiones al microscopio óptico no se visualizaron cristales de CCM. Efectivamente, en el flujo coaxial, a medida que los solventes se interdifunden, el etanol desnaturaliza levemente las moléculas de proteína, lo que expone zonas hidrofóbicas que son capaces de unir CCM, mientras que el agua actúa como un antisolvente para la CCM. Ambos efectos conducen simultáneamente al ensamblaje de NPs- α LA-CCM. El delgado enfoque hidrodinámico aseguró una sobresaturación rápida de los fluidos precursores, lo que dio lugar a partículas nanométricas con una distribución de tamaño estrecha, que forman las suspensiones coloidales transparentes que se observan en la **Figura 35**.

A continuación se reporta la evaluación de las condiciones de flujo que aseguran un proceso de nanoprecipitación eficiente. De acuerdo con el modelo simplificado realizado en la Sección 4.3.2 (Ecuación 4.5), el régimen de flujo está completamente definido por dos parámetros: la relación de caudales Q_2/Q_1 y el caudal total $Q_1 + Q_2$. Los efectos independientes de estas variables fluidodinámicas sobre el tamaño y la polidispersidad de las NPs se presentan en la **Figura 36**. Vale la pena señalar que establecer Q_2/Q_1 para un $Q_1 + Q_2$ dado y *vice versa*, requiere una cuidadosa configuración de altura del fluido, la cual se lleva a cabo a partir de la teoría descrita en la Sección 4.3.3.

La **Figura 36a** muestra que el tamaño de las NPs disminuye monótonamente con la relación de caudal, de acuerdo con las discusiones dadas anteriormente en la Sección 4.3.1. De hecho, el radio de la corriente enfocada disminuye con Q_2/Q_1 y, por lo tanto, el tiempo de interdifusión. Usando la Ecuación 4.3 con $r_0 = 175 \mu\text{m}$ y $D = 1,24 \cdot 10^{-9} \text{m}^2/\text{s}$, se obtiene que t_D disminuye de 470ms en $Q_2/Q_1 = 5$ a 140ms en $Q_2/Q_1 = 18$. Se sabe que cuanto menor es el tiempo de mezcla, mayor es el número de puntos de nucleación y más chicas resultan las NPs, tal como se describe para los procesos de nanoprecipitación (Karnik et al., 2008; Leung & Shen, 2018; Tresset et al., 2013). El aumento adicional de Q_2/Q_1 conduce a NPs aún más pequeñas; sin embargo, el rendimiento disminuye a medida que las NP se diluyen en el fluido envolvente. Precisamente por eso las barras de error aumentan más allá de $Q_2/Q_1 = 10$ en la **Figura 36a**, dado que la sensibilidad de las mediciones de DLS disminuye a concentraciones de partículas muy bajas.

La **Figura 36b** muestra cómo el tamaño de las NPs disminuye fuertemente con el caudal total. Este resultado se ha observado comúnmente en la nanoprecipitación microfluídica, no solo para albúmina (Sun et al., 2020), sino también para partículas de polímero (Xu et al., 2017) y liposomas (Carugo et al., 2016). Usando la Ecuación 4.4

con $r_0 = 175 \mu\text{m}$ y $l = 5\text{cm}$, se observa que el tiempo de residencia disminuye de 1,8s en $Q_1 + Q_2 = 10 \text{ mL/h}$ a alrededor de 0,6 s en $Q_1 + Q_2 = 30 \text{ mL/h}$, induciendo una disminución del tamaño de las NPs de 270 a 130nm. Sin embargo, el mecanismo detrás de tal comportamiento no es fácil de inferir *a priori*. Los posibles factores fueron considerados recientemente por Hamdallah et al. (2020). En cualquier caso, está claro a partir de la **Figura 36** que la técnica microfluídica permite ajustar el diámetro de las NPs controlando las velocidades de flujo de los fluidos precursores.

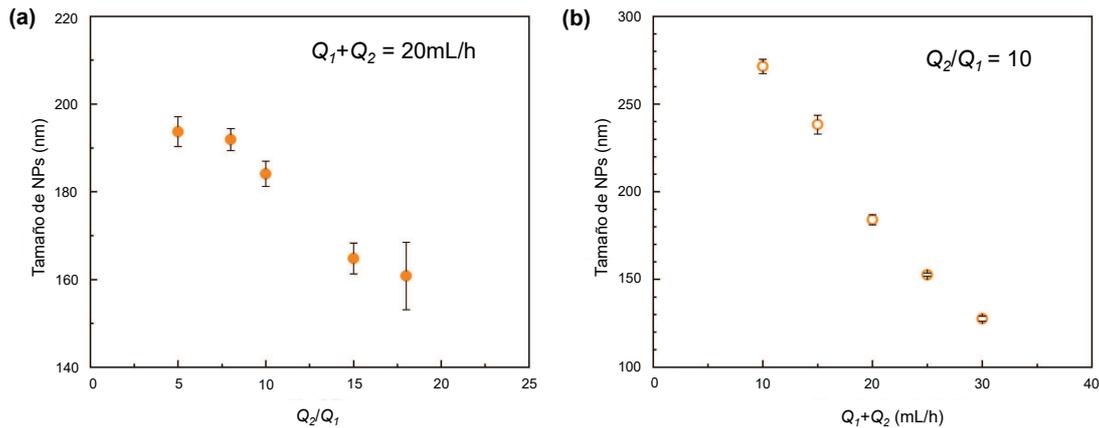


Figura 36. Tamaño de NPs CCM- α LA, medido por DLS, para diferentes condiciones de flujo durante la elaboración por microfluídica. (a) Diámetro de las NPs en función de la relación de caudal, manteniendo constante el caudal total (20mL/h). (b) Diámetro de las NPs en función del caudal total, manteniendo constante la relación de caudales (10). Las barras de error se calcularon con datos obtenidos de cuatro mediciones de DLS diferentes (figura modificada de Minetti et al., 2022).

4.5.2. Condiciones críticas de flujo para la generación de NPs

Sobre la base de la modelización teórica (Sección 4.3) y los experimentos realizados (**Figura 36**), a continuación, definimos el rango de operación de los parámetros fluidodinámicos. La **Figura 37** muestra la ventana dinámica de fluidos óptima (zona gris) para la generación microfluídica de NP cargadas con CCM. Los bordes de la ventana se definieron de acuerdo con los siguientes criterios:

- (i) izquierda, $Q_2/Q_1 > 5$ para lograr tiempos de mezcla inferiores a 500ms, según la Ecuación 4.3;
- (ii) arriba, $Pe < 1$ para la mezcla completa en el dispositivo, según la Ecuación 4.5;
- (iii) derecha, $Q_2/Q_1 < 20$ para mantener un rendimiento razonable de NPs (nótese que la disminución de r aumenta la cantidad de proteína sin reaccionar, lo que disminuye el RNPs, de acuerdo con la Ecuación 4.10);

- (iv) abajo, $Q_2 > 3 \text{ mL/h}$ para garantizar un patrón de enfoque de flujo estable en la dirección de la gravedad debido a que trabajamos con fluidos de diferentes densidades.

En este marco teórico, se decidió elaborar NPs a $Q_2/Q_1 = 10$ y $Q_1 + Q_2 = 20 \text{ mL/h}$, como solución de compromiso entre los atributos de las NPs y una tasa de producción satisfactoria. Efectivamente, en la **Figura 37**, ir hacia la esquina superior izquierda de la ventana operativa conduce a un mejor rendimiento, a expensas del tamaño de las partículas y la homogeneidad. Sucede lo contrario cuando los parámetros operativos se desplazan hacia la zona inferior derecha de la ventana gris, donde la mezcla eficiente produce un tamaño de partícula y una polidispersidad más bajos, a expensas del rendimiento.

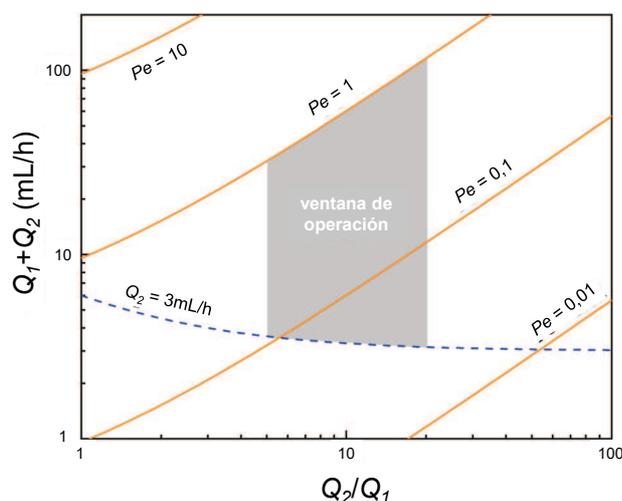


Figura 37. Diagrama construido a partir de los parámetros de flujo del dispositivo microfluídico, considerando el etanol y el agua como fluidos de trabajo. Las líneas completas son el caudal total en función de la relación de caudales, según la Ecuación 4.5, para $D = 1,24 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, $l = 5 \text{ cm}$ y los números Pe indicados. La línea discontinua representa $Q_2 = 3 \text{ mL/h}$. La ventana de operación (zona gris) delimita los regímenes de flujo requeridos para la elaboración de NPs (figura modificada de Minetti et al., 2022).

4.5.3. Condiciones críticas de reactivos para la generación de NPs

Hemos realizado una serie de ensayos preliminares (datos no mostrados) en los que se seleccionaron varios aspectos de la preparación de los reactivos para determinar las condiciones óptimas para obtener NPs estables con tamaños inferiores a 250nm. Tras este análisis, y teniendo en cuenta también información relevante encontrada en la literatura, definimos los siguientes parámetros de trabajo:

- (i) la relación $\alpha\text{-LA/CCM}$ (m/m) se fijó en 4, lo cual es consistente con $Q_2/Q_1 = 10$ y las concentraciones de reactivo indicadas en la Sección

4.4.3, sabiendo que a mayor concentración de proteína aumenta el tamaño de las NPs (Galisteo-González & Molina-Bolívar, 2014);

- (ii) el pH de la solución de proteína se fijó en 7, como un compromiso entre aumentar la carga superficial de las NPs y, por lo tanto, la estabilidad coloidal (Galisteo-González & Molina-Bolívar, 2014), y preservar la integridad de las moléculas de CCM;
- (iii) la concentración de solución salina tamponada con fosfato fue de 50mmol/L, ya que concentraciones más altas pueden afectar el ensamblaje de las moléculas de α -LA, aumentando el tamaño de las NPs (Safavi et al., 2017);
- (iv) el valor de la temperatura para el tratamiento térmico (70°C) se seleccionó en relación con la temperatura de desnaturalización de α -LA (alrededor de 62°C), por lo que los enlaces disulfuro podrían alterarse y el despliegue de la cadena de proteína nativa podría promover las interacciones hidrofóbicas entre moléculas (Etorki et al., 2016);
- (v) se eligió la relación de volúmenes de 10:1 de agua/etanol (consistente con $Q_2/Q_1 = 10$) porque las fracciones de etanol más grandes podrían causar un aumento gradual del diámetro hidrodinámico de las NPs (L. Jiang & Korivi, 2013; Saleh et al., 2018), mientras que fracciones de etanol más bajas disminuirían el rendimiento.

4.5.4. Morfología de las NPs generadas

En esta sección describimos las características de tamaño y forma de las NPs de α -LA cargadas con CCM elaboradas bajo las condiciones de flujo definidas en Sección 4.5.2 y los parámetros de procesamiento optimizados en la Sección 4.5.3. Como se menciona en la descripción de la **Figura 36**, el tamaño de las NPs se estimó como el diámetro hidrodinámico medido por DLS, es decir, el tamaño efectivo de la molécula detectada por la técnica de dispersión dinámica de luz. En particular, la **Tabla 2** informa los valores medios de diámetro correspondientes a $Q_2/Q_1 = 10$ y $Q_1 + Q_2 = 20$ mL/h. La desviación estándar de estos valores se calculó a partir de datos tomados en diferentes experimentos DLS (al menos cuatro), para una suspensión de NPs dada.

El IPD también se midió mediante DLS y se informa en la **Tabla 2** (tercera columna). Se puede notar que las NPs obtenidas son prácticamente monodispersas, considerando que el IPD fue menor a ~ 0.2 .

Otro resultado relevante es que el tratamiento de precalentamiento de α -LA genera partículas más pequeñas (alrededor del 30% del diámetro promedio), en concordancia

con observaciones anteriores (Etorki et al., 2016). Este resultado estaría asociado a la mayor reactividad de la albúmina pretratada, debido a la exposición de zonas hidrofóbicas inducida por la temperatura. Por lo tanto, se espera la rápida formación de un mayor número de puntos de nucleación al comienzo de la nanoprecipitación, lo que conduce a NPs más pequeñas y monodispersas. En consecuencia, las proteínas pretratadas también formarían agregados con menor cantidad de solvente ocluido, por lo tanto, NPs más compactas.

Además, se ha realizado análisis de microscopía electrónica para investigar la morfología de las NPs, así como para contrastar el tamaño de las NPs obtenidas por DLS. La **Figura 38a** presenta una imagen SEM típica, donde se observan NPs esféricas y uniformemente dispersas. Además, el diámetro de las partículas se estimó utilizando una herramienta de análisis de imágenes del microscopio: algunas medidas están marcadas con flechas de color verde claro en la **Figura 38a**. Los valores concuerdan razonablemente bien con los resultados de DLS.

La morfología de las NPs se estudió más a fondo mediante TEM de alta resolución. La **Figura 38b** muestra una imagen clara de un par de NPs de α -LA-CCM, que parecen bastante esféricas y presentan bordes bien definidos. El diámetro de las NPs fue de alrededor de 180nm (en comparación con la barra de escala) lo cual confirma los tamaños observados en los experimentos DLS y SEM.

Vale la pena mencionar que los valores de tamaño promedio e IPD (informados en la **Tabla 2** y discutidos en la **Figura 38**) corresponden a NPs generadas en el mismo proceso microfluídico, y los signos \pm provienen de cuatro mediciones de DLS diferentes. Existe otra variabilidad de producción a producción, que está asociada a una serie de condiciones experimentales que requieren una protocolización cuidadosa, como la preparación de soluciones precursoras y el control de la temperatura en diferentes pasos. Sin embargo, esta variabilidad es bastante pequeña; por ejemplo, las corridas microfluídicas realizadas en tres experimentos diferentes, con intervalos de semanas, conducen a diámetros de NPs de 184,1, 180,7 y 201,8nm, todos ellos para α -LA pretratada en $Q_2/Q_1 = 10$ y $Q_1 + Q_2 = 20$ mL/h. Por lo tanto, se puede estimar un valor promedio (global) alrededor de 188nm, siendo la desviación estándar correspondiente alrededor de 11nm. Por lo tanto, se puede concluir que el enfoque de flujo coaxial bien controlado aseguró un proceso de nanoprecipitación reproducible, que condujo a partículas nanométricas con distribución de tamaño estrecha.

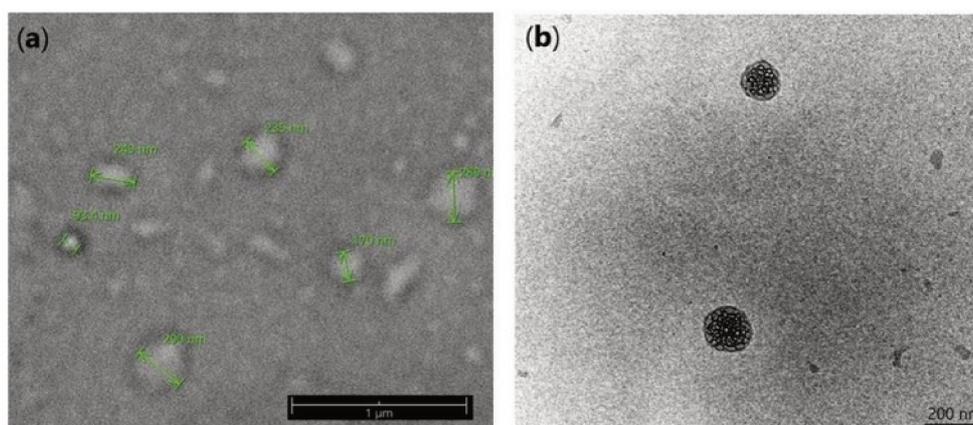


Figura 38. Caracterización por microscopía electrónica: (a) Imágenes SEM de NPs con CCM (α -LA pretratada, dilución 1/100, bombardeo con oro, 70000x, 10 kV). (b) Imágenes TEM de NPs con CCM (α -LA pretratada, dilución 1/200, sin tinción, 30000x, 100kV).

Tabla 2. Características de las NPs CCM- α -LA preparadas a $Q_2/Q_1 = 10$ y $Q_1 + Q_2 = 20$ mL/h. Los nombres de las columnas representan el diámetro (tamaño de NP), el índice de polidispersidad (IPD), la eficiencia de atrapamiento de CCM (EE) y el rendimiento de NPs (RNPs).

NPs de α -LA con CCM Formulación	Tamaño de NPs (nm)	IPD (-)	EE (%)	RNPs (%)
Proteína nativa	255 \pm 8 _a	0,14 \pm 0,03	40,9 \pm 4,7	28 \pm 17
Proteína pretratada	181 \pm 3 _b	0,12 \pm 0,04	43,2 \pm 1,4	32 \pm 8

a, b Los valores promedio son significativamente diferentes según la prueba ANOVA ($p < 0,05$)

4.5.5. Eficiencia de atrapamiento de CCM y rendimiento de NPs

La eficiencia de atrapamiento de la molécula bioactiva durante el proceso de nanoprecipitación se calculó a través de la Ecuación 4.9, y los resultados se informan en la **Tabla 2** (cuarta columna). Los valores de EE informados corresponden a las NPs generadas en el mismo experimento microfluídico, y los signos \pm provienen de tres determinaciones diferentes. Se obtuvieron resultados similares utilizando otros métodos de atrapamiento (Y. Huang et al., 2018). Estudios previos sugirieron que la unión de CCM a las NPs de albúmina puede atribuirse a la existencia de zonas hidrofóbicas (Tang, 2020); más discusiones sobre este aspecto se dan en la siguiente sección. Se requieren investigaciones adicionales para mejorar la EE. Además de optimizar el proceso microfluídico, se pueden considerar ajustes químicos de las proteínas precursoras; por ejemplo, la alteración de los enlaces disulfuro por la cisteína (L. Jiang et al., 2013) o el glutatión (S. Zhao et al., 2014), la inducción del entrecruzamiento por el glutaraldehído (Arroyo-Maya et al., 2014), la variación de la

concentración relativa de proteína y CCM (Chen et al., 2015), o ajuste del pH y la fuerza iónica (Safavi et al., 2017).

El rendimiento de NPs (RNPs) producidas se calculó a partir de la Ecuación 4.10, y los resultados también se informan en la **Tabla 2** (última columna). Los valores de RNPs informados corresponden a NPs generadas en el mismo proceso, y los signos \pm provienen de cuatro determinaciones diferentes. El rendimiento máximo de NPs fue de alrededor del 30%, también para ambas preparaciones (albúmina nativa y pretratada), lo que significa que la mayor fracción de proteína permanece sin reaccionar en la solución exterior del coflujo. En la actualidad, se están considerando diferentes estrategias en nuestro laboratorio para mejorar este rendimiento, mientras se avanza hacia la producción de NPs más pequeñas (por ejemplo, 120nm), que son de interés para varios usos de los nanoportadores basados en albúmina.

4.5.6. Análisis espectroscópico de la estructura de las NPs

La estructura de las NPs se caracterizó por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). El principio básico que rige es que los enlaces y grupos de enlaces de una molécula que se expone a los rayos infrarrojos absorbe energía infrarroja y vibran a frecuencias que son características de esa molécula. La transmitancia y la reflectancia de la muestra de los rayos infrarrojos a diferentes frecuencias se traducen en un gráfico de absorción IR, que luego se analiza y se compara con patrones conocidos de materiales ya identificados en la bibliografía. Se realizaron experimentos de espectroscopia infrarroja para estudiar el proceso de generación de NPs y las interacciones CCM-proteína. La **Figura 39** muestra los espectros de α -LA pura y nativa, NPs de α -LA pretratada térmicamente, CCM pura y NPs de α -LA cargadas con CCM, organizados en paneles (a) y (b) para comparación y discusión.

Los espectros obtenidos para las moléculas individuales (α -LA y CCM) coincidieron con los resultados informados anteriormente (Hasanpoor et al., 2020; Mohan et al., 2012; Waghmare et al., 2020). Para α -LA (**Figura 39a**), los picos en 3307 y 2963 cm^{-1} se debieron al estiramiento de los enlaces CH y NH de amidas A y B. Los picos en 1653 y 1522 cm^{-1} corresponden a amida I (C=O estiramiento) y amida II (flexión NH, estiramiento CN), respectivamente. Los picos de la amida III (flexión NH, estiramiento CN) son aquellos en la región entre 1460 y 1240 cm^{-1} (Hasanpoor et al., 2020; Mohan et al., 2012; Waghmare et al., 2020). La **Figura 39a** también muestra los espectros de las NPs de α -LA con pretratamiento térmico. Se pueden observar algunas diferencias entre este espectro y el de α -LA en las zonas 2900–2800 cm^{-1} y 2400–2300 cm^{-1} , que se pueden atribuir al reordenamiento de las moléculas de proteína que involucran a los grupos OH y NH. Además, se observaron cambios de intensidad y cambios hacia

números de onda más bajos en los picos de amidas I y II. Por ejemplo, el pico en 1522cm^{-1} con 43% de transmitancia para el α -LA pasó a 1543cm^{-1} con 72 % de transmitancia cuando α -LA formó NPs. Se observan otros cambios en la región entre 1460 y 1240cm^{-1} , por ejemplo, la desaparición del pico en 1456cm^{-1} . Los principales cambios fueron la aparición de dos picos pronunciados en 1155 y 1080cm^{-1} , algunos picos entre 980 y 860cm^{-1} y un pico agudo a 534cm^{-1} . Estas alteraciones podrían atribuirse al proceso de disolución de la proteína y la interacción con el etanol durante la formación de NPs. Se obtuvieron resultados similares para NPs con proteína nativa. Además, para CCM (**Figura 39b**) los picos a 3504 y 3396cm^{-1} indican la presencia de grupos OH y el de 1628cm^{-1} corresponde a C=O. Los picos en 1599 y 1510cm^{-1} son una combinación de C=C de los anillos aromáticos y la forma enólica de la cetona alifática. Los picos de 1278 y 1028cm^{-1} se deben al grupo metoxi del anillo aromático mientras que el de 1207cm^{-1} corresponde a la forma enólica del anillo aromático. Los picos en 964 , 856 y 819cm^{-1} son una combinación de CH del alqueno y el anillo aromático. La **Figura 39b** también muestra el espectro de las NPs de α -LA-CCM preparadas sin pretratamiento térmico para una mejor evaluación de la interacción CCM-proteína. Estas interacciones podrían atribuirse a enlaces de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos (Etoriki et al., 2016; Salehiabar et al., 2018; Tang, 2020; Yang et al., 2013). Por ejemplo, las señales de NH (amida I) en 2958 y 1533cm^{-1} en las NPs de α -LA cambiaron a 2933 y 1541cm^{-1} cuando los NPs incluían CCM, lo que podría deberse a los enlaces de hidrógeno entre CCM y la proteína. Además, los picos del grupo metoxi del anillo aromático de CCM estaban presentes en las NPs (1283 y 983cm^{-1}), indicando el atrapamiento del principio activo (Hasanpoor et al., 2020). Sobre la base de estos resultados, se puede concluir que las NPs están compuestas por complejos de α -LA y moléculas CCM no dañadas. En otras palabras, el análisis de los espectros FTIR confirma la conjugación de las NPs de albúmina cargadas con CCM por nanoprecipitación de la solución mediante enfoque hidrodinámico.

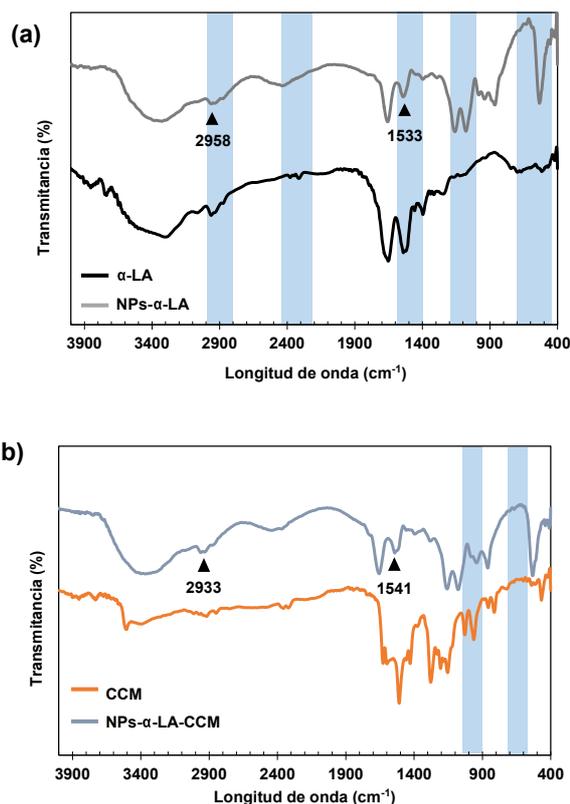


Figura 39. Espectros de la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). (a) Proteína pura y nativa (α -LA) y NPs de proteína pretratada (NPs- α -LA). (b) CCM libre (CCM) y NPs de α -LA cargadas con CCM sin pretratamiento de la proteína (NPs- α -LA-CCM). Las bandas celestes indican zonas de interés para el análisis de espectros (figura modificada de Minetti et al., 2022).

4.5.7. Pruebas de liberación de CCM *in vitro*

Para que cumpla su función específica, es necesario que el bioactivo encapsulado en el transportador sea liberado. Para comprobar este requisito, debe observarse un perfil de liberación desde la matriz polimérica (transportador) al medio circundante durante un periodo de tiempo. La liberación de un fármaco o un nutraceutico puede ser específica de un sitio, un estímulo y un tiempo y/o velocidad determinados (Kumar & Dixit, 2017). Se han identificado varios mecanismos de liberación diferentes que pueden establecerse como único mecanismo o en ocasiones puede existir una combinación de estos. Entre los mecanismos posibles de liberación se incluyen la difusión, disolución, erosión, hinchazón, ósmosis, degradación y fragmentación. A su vez, existen diferentes tipos de perfiles de liberación, como liberación explosiva, sostenida, retrasada, desencadenada o dirigida (Assadpour & Jafari, 2020). La **Figura 40** presenta la liberación acumulada de CCM de las NPs en función del tiempo. El perfil de liberación de las NPs nativas y pretratada térmicamente presentó una fase de liberación explosiva inicial, donde se liberó >70% de la CCM durante la primera media hora. Luego, la cantidad de CCM entregada permaneció casi constante durante el

resto del experimento. No se pueden observar diferencias significativas entre las curvas de liberación de las NPs nativas y pretratada, excepto por una entrega ligeramente mayor de las NPs nativas. Este último resultado podría deberse al hecho de que el precalentamiento exagera las interacciones hidrofóbicas, por lo que las moléculas de CCM podrían ubicarse mejor en las zonas hidrofóbicas de las moléculas de albúmina, lo que finalmente produce velocidades de liberación más lentas. El análisis de las curvas de liberación sugiere que tuvo lugar un proceso de difusión no-Fickiano; presumiblemente, la liberación de CCM fue controlada por la combinación de hinchamiento de las NPs y difusión molecular.

Se obtuvieron resultados comparables a los de la **Figura 40** en trabajos que utilizaron medios de liberación basados únicamente en soluciones acuosas salinas (Araya-sibaja et al., 2022; Choudhary et al., 2020; Jithan et al., 2011). El uso de medios de liberación que contengan tensoactivos (Saleh et al., 2018) o solventes orgánicos (B. Kim et al., 2016) pueden conducir a diferentes perfiles de liberación. Vale la pena mencionar que, aunque se tomaron varias medidas en nuestros ensayos para evitar la degradación de CCM (oscuridad, pH neutro, adición de ácido ascórbico), alguna pérdida gradual de CCM podría ser la causa de la meseta observada en el perfil de liberación. Sin embargo, la **Figura 40** todavía muestra que aproximadamente el 80% de la CCM atrapada está disponible para su suministro desde la suspensión de NPs.

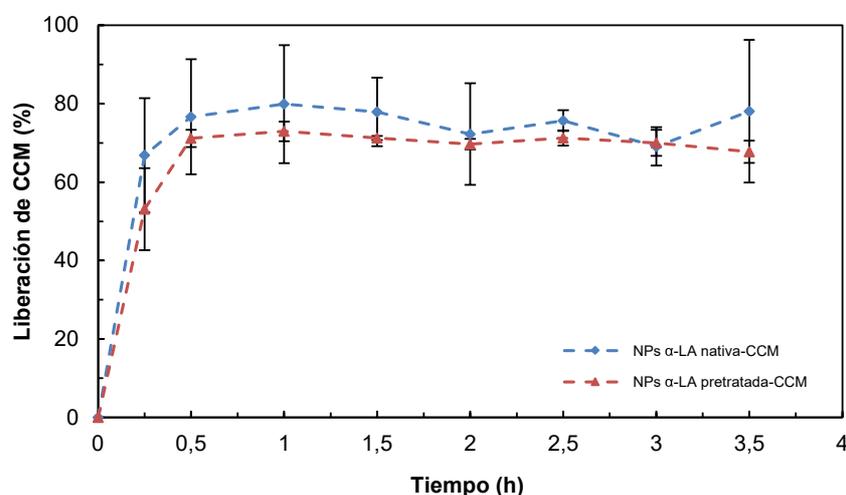


Figura 40. Cantidad de CCM liberada en función del tiempo durante el ensayo *in vitro*: Porcentaje acumulado de CCM liberada por las NPs de α -LA a 37°C en buffer PBS/etanol 10:1, pH 6,8 (figura modificada de Minetti et al., 2022).

4.5.8. Actividad antioxidante

Una vez generadas las NPs y también a la CCM en etanol, se agregó medio de liberación y se incubó 30 minutos para luego medir la AAO y evaluar el impacto de la nanoprecipitación microfluídica sobre la AAO de la CCM. La **Figura 41** muestra la

capacidad antioxidante de las NPs de α -LA nativa y pretratada, con y sin CCM y de la CCM libre sin encapsular. Se observó que las NPs sin CCM presentaron una menor AAO en comparación con las NPs que sí contenían CCM ($p < 0,05$). Los valores de TEAC encontrados para NPs de α -LA nativa y pretratada con contenido de CCM luego de 30 minutos de incubación fueron 7,44 y 12,57mmol equivalente a Trolox/g de muestra, respectivamente. Esta observación fue similar a la obtenida por X. Huang et al. (2016) para NPs de zeína cubiertas con pectina y alginato para encapsular CCM. Como se destacó anteriormente, la CCM al ser un compuesto fenólico presenta una destacada AAO resultante del grupo hidroxilo de los anillos fenólicos, lo que otorga un rol de protección contra la oxidación tanto en alimentos como en el organismo humano (Cosquillo Refael, 2018). A su vez, se puede observar una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la capacidad antioxidante de las NPs con CCM donde la proteína vehiculizadora recibió un pretratamiento térmico, lo que sugiere que el tratamiento con temperatura ejerce un efecto en la proteína que aumenta la capacidad antioxidante. Las proteínas y péptidos poseen AAO debida a los residuos de aminoácidos con actividad antiradical libre. La cisteína, el triptófano y la metionina poseen la más alta AAO de todos los aminoácidos (Báez et al. 2021) y precisamente la α -LA contiene estos aminoácidos en cantidades importantes. El tratamiento térmico junto con el etanol causa una alteración en la estructura terciaria que expondría estos aminoácidos con AAO y el consiguiente aumento de la AAO de la formulación (Elias et al., 2008). Estos resultados mostraron concordancia con las observaciones de Arroyo Maya et al. (2012), quienes informaron la AAO de NPs de α -LA con diferentes solventes como agentes de desolvatación y pretratamiento de calor y alta presión. A su vez, se puede inferir cierto sinergismo en la formulación de CCM y α -LA pretratada al comparar la AAO de la CCM libre y las NPs de α -LA pretratada sin CCM por separado, por lo cual la alta AAO de esta formulación puede ser aportada tanto por CCM como por α -LA. Resultados similares obtuvieron M. Li et al. (2013) al investigar el efecto de la unión de CCM a la β -lactoglobulina bovina en la AAO. El sinergismo puede suponerse por varios mecanismos responsables, pero lo cierto es aún no se han explicado con precisión, principalmente debido a la naturaleza compleja de las mezclas y las diferentes interacciones que pueden establecerse entre los componentes, especialmente con extractos de plantas como es el caso de la CCM (Olszowy-Tomczyk, 2020).

Es posible inferir que el uso de biopolímeros de grado alimentario para la incorporación de CCM permite a la industria alimentaria incorporar compuestos bioactivos de forma eficiente. No obstante, es necesario realizar estudios en alimentos formulados y en líneas celulares para comprobar que estas NPs pueden desempeñar

esta función efectivamente, debido a que existen muchos factores intervinientes que podrían modificar este efecto. El aspecto favorable a destacar es que la CCM atrapada en NPs conservó su actividad terapéutica como antioxidante luego de la nanoprecipitación.

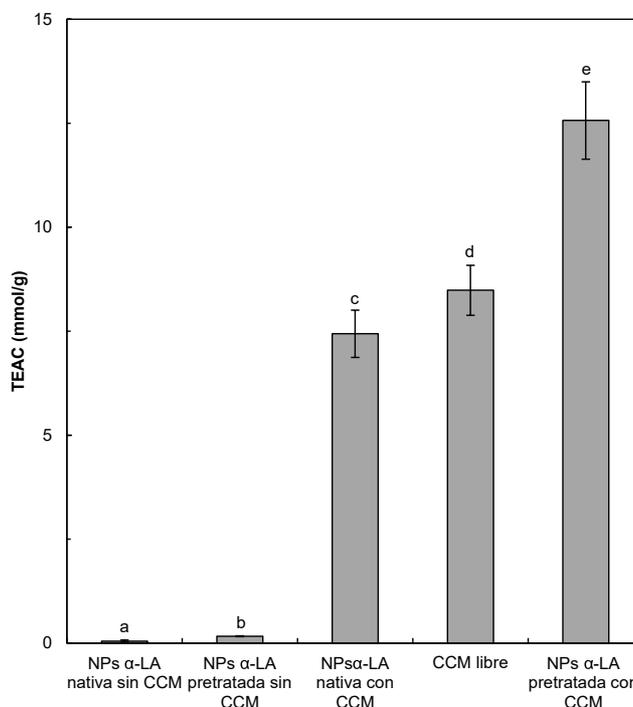


Figura 41. Valor medio de la capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) para eliminar el radical ABTS de NPs de α -LA nativa y pretratada, sin y con CCM y de CCM libre, en medio de liberación (PBS/etanol 10:1, pH 6,8) agregado. Las barras representan la desviación estándar de las determinaciones por triplicado. a-e: los promedios con letras distintas en una misma columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

4.6. Conclusiones parciales

Se llevó a cabo la generación microfluídica de α -LA cargada con CCM de una manera simple y económica, mediante el uso de un dispositivo armado en el laboratorio y un sistema de control de los flujos impulsado por la gravedad. Todo el equipo es robusto y se puede configurar rápidamente. Las fuertes ventajas de esta técnica experimental son:

- (i) la preparación en laboratorios convencionales, ya que no se requieren instalaciones especializadas de microfabricación,
- (ii) el acceso a los fundamentos teóricos necesarios para operar el sistema en condiciones óptimas, y
- (iii) que el proceso continuo podría paralelizarse fácilmente para multiplicar el rendimiento, lo cual es de mucho interés para incrementar la escala de producción.

La reacción de nanoprecipitación con intercambio de solvente implementada en el flujo coaxial produce partículas nanométricas con tamaño controlado, medido por DLS y evidenciado por imágenes SEM y TEM. La zona de operación se definió después de identificar una serie de parámetros críticos de procesamiento, como la relación de caudal, el caudal total, la concentración relativa de ingredientes, las características fisicoquímicas de las soluciones y el pretratamiento térmico de la proteína. Los espectros de FTIR sugieren que el mecanismo de unión de α -LA en las NP es a través de enlaces de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos, y los ensayos *in vitro* demostraron que las NPs podían entregar alrededor del 70% de la CCM cargada. Finalmente, se determinó el impacto de la nanoprecipitación microfluídica en la AAO de la CCM. Este tipo de análisis es importante porque cualquier estrategia utilizada para mejorar la dispersabilidad en agua y la vehiculización del bioactivo no debería afectar negativamente sus propiedades funcionales. Efectivamente, se comprobó que la CCM liberada desde las NPs conserva su propiedad antioxidante y combinada con la α -LA pretratada el efecto es aún mayor. También se midió la capacidad de eliminar los radicales de ABTS de las NPs sin CCM, las cuales exhibieron una escasa capacidad antioxidante como es de esperarse debido a la ausencia del bioactivo. Aunque quedan por mejorar varios aspectos, por ejemplo, la eficiencia de atrapamiento, se puede concluir que la metodología propuesta en esta investigación abre varias posibilidades para expandir aún más la preparación microfluídica de NPs diseñadas para el transporte y liberación de ingredientes activos en alimentos funcionales, productos nutraceúticos o fármacos.

Conclusión

En la presente Tesis doctoral se logró generar conocimientos, desde un punto de vista básico y aplicado, sobre la utilización de la microfluídica como herramienta para la generación de NPs que actúen como vehiculizadores de componentes bioactivos.

Mediante el análisis de los principios que gobiernan los procesos de mezcla en los microcanales, se diseñaron y fabricaron dispositivos que permitieron generar sistemas en coflujo para desarrollar procesos basados en difusión molecular, controlando los tiempos de las reacciones involucradas. Por otra parte, se analizó la geometría más conveniente para lograr un proceso de mezcla rápido y completo, particularmente se diseñaron dispositivos para generar corrientes de enfoque hidrodinámico en 2D y en 3D para generar NPs por precipitación mediante intercambio de solventes. Durante el desarrollo de los experimentos, también se realizó una evaluación teórica y experimental del flujo en microcanales rectangulares impulsados por presión hidrostática. Se demostró que este método de bombeo produce corrientes más estables que las bombas de jeringa y que se pueden controlar los caudales ajustando las alturas de los líquidos, lo cual es esencial para implementar los procesos básicos de nanoprecipitación microfluídica. Se consideraron los efectos de la gravedad tanto en el sistema de bombeo por presión hidrostática como en la formación del patrón del enfoque hidrodinámico. Este es un aspecto crítico, debido a que la nanoprecipitación involucra fluidos de diferentes densidades, cuya estratificación altera significativamente el enfoque hidrodinámico. Para ambos fenómenos se plantearon modelos matemáticos simples que predicen el ancho de la corriente enfocada y el caudal obtenido en función de la altura de la columna de líquido, considerando los parámetros críticos de operación. Se demostró que solo se puede lograr un patrón de enfoque hidrodinámico uniforme si la posición del flujo en el chip se encuentra alineada con el campo gravitacional, en la misma dirección o en la dirección opuesta, y se cuantificaron los efectos en cada uno de los casos. Los resultados de las investigaciones se publicaron en dos revistas de la especialidad, ambas bien reconocidas (*Sensors and Actuators B, Microfluidics and Nanofluidics*).

Utilizando el sistema microfluídico y el conocimiento generado, se llevó a cabo la elaboración microfluídica de NPs de α -LA cargadas con CCM, mediante el uso de un dispositivo de flujo coaxial y una plataforma robusta y de rápida configuración para trabajar con flujos impulsados por la gravedad, ambos fabricados en nuestros laboratorios. La reacción de nanoprecipitación microfluídica implementada produjo NPs de tamaño uniforme y controlado, medido por DLS y evidenciado por imágenes SEM y TEM. Los espectros de FTIR sugieren que el mecanismo de unión de α -LA en las NP es a través de enlaces de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos, y los ensayos *in vitro* demostraron que las NPs podían entregar alrededor del 70% del CCM cargada. A

su vez, se comprobó que la CCM liberada conserva su propiedad funcional antioxidante concluyendo que el método de nanoprecipitación microfluídica no afecta negativamente su funcionalidad, incluso se observó que combinada con la α -LA pretratada térmicamente, el efecto es aún mayor. El resultado general es muy positivo, si bien aún quedan por mejorar varios aspectos, por ejemplo, la eficiencia de atrapamiento y el rendimiento de elaboración de NPs. Por otra parte, estos dispositivos brindan ventajas notables sobre las técnicas de fabricación convencionales y se pueden producir con materiales de bajo costo. Por lo expuesto anteriormente, se puede concluir que la metodología propuesta en esta investigación abre varias posibilidades para expandir aún más el uso de la microfluídica para elaborar NPs destinadas al transporte y liberación de ingredientes activos. El trabajo fue publicado en una importante revista de ciencia y tecnología de alimentos (*Food Research International*).

Un desafío para futuros trabajos de investigación es diseñar dispositivos para lograr una mayor eficiencia de encapsulación y mejor rendimiento del proceso, contando como base todo el conocimiento generado en la presente Tesis, mientras se avanza hacia la producción de NPs más pequeñas (por ejemplo, 120-130nm), que son de interés para varios usos, principalmente en nanomedicina.

Es este sentido, es posible pensar geometrías de dispositivos con mayor relación de aspecto que amplíen la interface de contacto entre las corrientes de intercambio y desarrollen patrones de flujo por difusión y convección que hagan más eficiente la mezcla en distancias cortas. Asimismo, se pueden ajustar parámetros físicos y químicos de las soluciones involucradas que favorezcan la interacción de los compuestos para lograr características deseadas.

Otro desafío importante es lograr que los procesos diseñados a escala de laboratorio (mililitros por hora) sean trasladados a escalas industriales (litros por hora) que se requieren para alcanzar las tasas de elaboración necesarias para la producción en masa. Actualmente la convergencia de la microfluídica y la nanotecnología ha demostrado un creciente interés en la preparación de productos farmacéuticos avanzados, como las recientes vacunas basadas en nanovesículas cargadas con ARN y la formulación basada en albúmina humana presente en el mercado, Abraxane, una formulación inyectable de paclitaxel, un potente agente antitumoral unido a albúmina en forma de NPs, todas estas cuestiones incentivan aún más la búsqueda de estrategias para mejorar la preparación microfluídica de NPs.

Apéndices

APENDICE 1: Curva de calibrado para cuantificación de CCM

Esta calibración es necesaria para la cuantificación de CCM libre y liberada luego del entrapamiento en NPs- α -LA-CCM por espectroscopia UV-Vis. A valores relativamente bajos, la concentración de CCM es directamente proporcional a su absorbancia, satisfaciendo la ley de Beer. La absorbancia a 426nm de varias concentraciones de CCM en presencia de PBS/etanol con relación de volumen 10:1, se midió mediante espectrofotometría UV-visible (Agilent Technologies Cary 60, California, EE. UU.). Se seleccionó esta longitud de onda para la curva de calibración, debido a que previamente se realizó un barrido espectral para detectar en pico de absorbancia máxima del bioactivo. La regresión lineal (mostrada en la **Figura A1**) obtenida con el software Microsoft Excel (2007), se usó para calcular la cantidad de CCM libre sin entrapar y la CCM liberada en los ensayos *in vitro*.

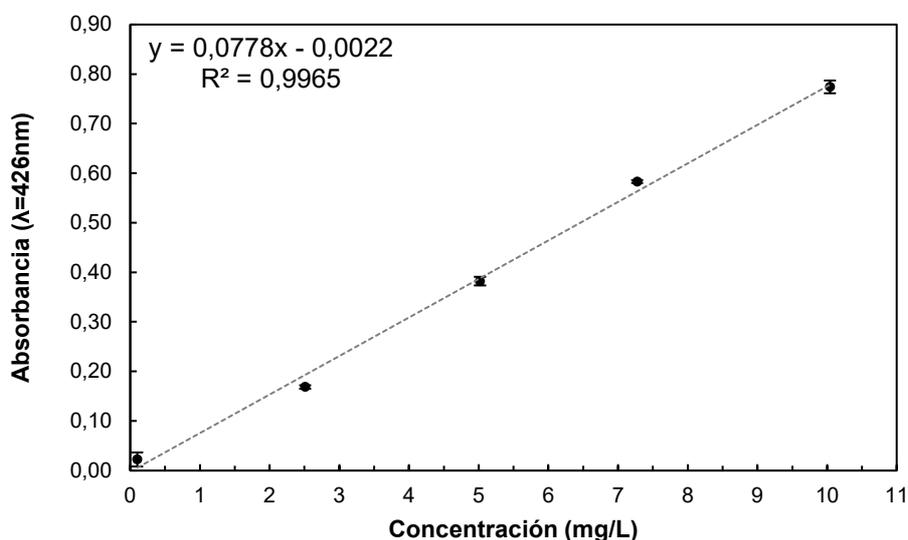


Figura A1: Curva de calibrado de absorbancia a 426nm en función de la concentración de CCM en presencia de PBS/etanol con relación 10:1. Los resultados se presentan como la media de tres experimentos independientes y el error informado es la desviación estándar de la media.

APENDICE 2: Curva de calibrado para cuantificación de α -LA

Método de Bradford

Esta metodología se basa en la unión del colorante Coomassie Blue G-250, constituyente del reactivo de Bradford, a las proteínas. En particular, la forma aniónica del colorante (carga -1), de color azul, es la que se une a las proteínas. Por consiguiente, la cantidad de proteínas puede estimarse mediante la determinación de la cantidad de colorante en la forma iónica azul midiendo la absorbancia de la solución a 595nm.

Para la curva de calibración, se tomaron por duplicado 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μ L de una solución de α -LA de 2 mg/mL en tubos de ensayo y se llevó cada uno a 100 μ L con agua ultra pura. Además se utilizó 100 μ L de agua destilada en un tubo adicional para proporcionar el blanco de reactivo. Se añadió 5mL de reactivo de Bradford, se homogeneizó suavemente evitando la formación de espuma y se incubó en oscuridad 10 minutos. Finalmente se midió la absorbancia de cada solución en espectrofotómetro UV-visible (Agilent Technologies Cary 60, California, EE. UU.).

De esta forma, se construyó la curva de calibrado para el rango de cantidad de proteína de 20-200 μ g graficando la absorbancia a 595nm en función de la cantidad de proteína (Figura A2).

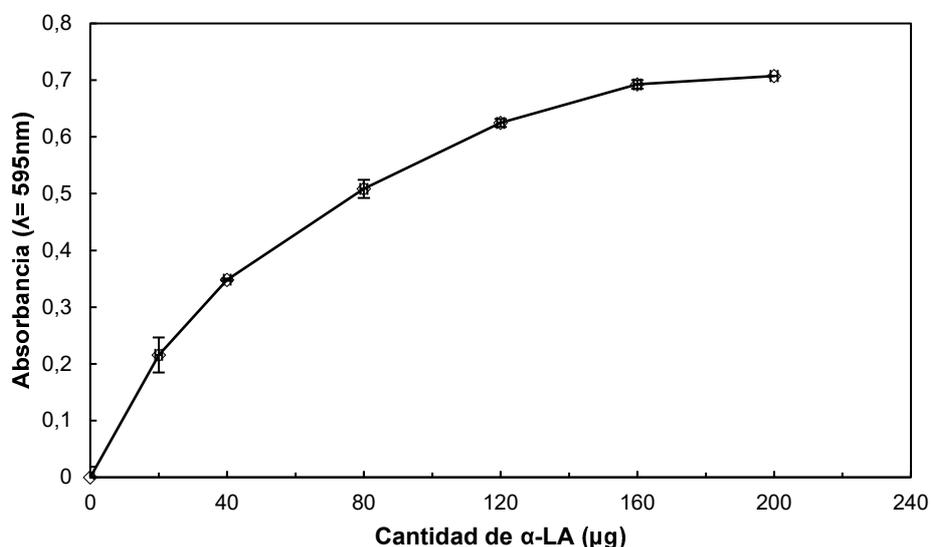


Figura A2: Curva de calibrado de absorbancia a 595nm en función de la cantidad de α -LA. Los resultados se presentan como la media de dos experimentos independientes y las barras son la desviación estándar de la media.

APENDICE 3: Curva de calibrado para TEAC

La curva de calibración se efectuó midiendo diferentes concentraciones de Trolox en el rango de 2-25 $\mu\text{mol/L}$, de forma de lograr un porcentaje de reducción del color inicial de ABTS entre el 20 y el 80% (**Figura A3**). La misma se utilizó para expresar los resultados de la AAO de las NPs como TEAC (Ecuación 4.12).

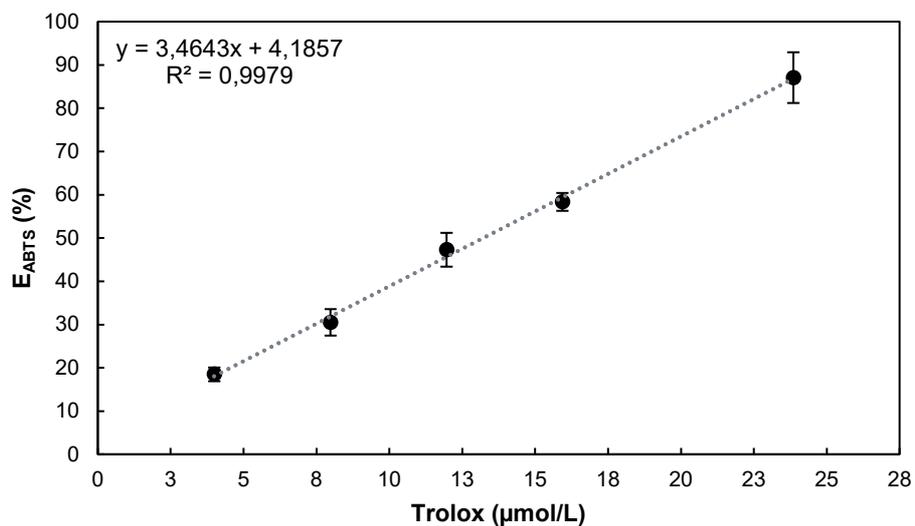


Figura A3: Curva de calibrado del porcentaje de eliminación del radical ABTS en función de la concentración de Trolox. Los resultados se presentan como la media de tres experimentos independientes y las barras son la desviación estándar de la media.

Bibliografía

- Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 14(1), 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.01.002>
- Aditya, N. P., Espinosa, Y. G., & Norton, I. T. (2017). Encapsulation systems for the delivery of hydrophilic nutraceuticals: Food application. *Biotechnology Advances*, 35(4), 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.012>
- Ajdari, A. (2004). Steady flows in networks of microfluidic channels: building on the analogy with electrical circuits. *Comptes Rendus Physique*, 5(5), 539–546. <https://doi.org/10.1016/j.crhy.2004.02.012>
- Aniesrani Delfiya, D. S., Thangavel, K., & Amirtham, D. (2016). Preparation of Curcumin Loaded Egg Albumin Nanoparticles Using Acetone and Optimization of Desolvation Process. *Protein Journal*, 35(2), 124–135. <https://doi.org/10.1007/s10930-016-9652-3>
- Araya-Sibaja, A. M., Wilhelm-Romero, K., Quirós-Fallas, M. I., Vargas Huertas, L. F., Vega-Baudrit, J. R., & Navarro-Hoyos, M. (2022). Bovine Serum Albumin-Based Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Antioxidant Activity Enhancement of Three Main Curcuminoids from *Curcuma longa*. *Molecules*, 27(9), 2758. <https://doi.org/10.3390/molecules27092758>
- Arroyo-Maya, I. J., Hernández-Sánchez, H., Jiménez-Cruz, E., Camarillo-Cadena, M., & Hernández-Arana, A. (2014). α -Lactalbumin nanoparticles prepared by desolvation and cross-linking: Structure and stability of the assembled protein. *Biophysical Chemistry*, 193, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2014.07.003>
- Arroyo-Maya, I. J., Rodiles-López, J. O., Cornejo-Mazon, M., Gutierrez-Lopez, G. F., Hernández-Arana, A., Toledo-Núñez, C., Barbosa-Cánovas, G. V., Flores-Flores, J. O., & Hernandez-Sanchez, H. (2012). Effect of different treatments on the ability of α -lactalbumin to form nanoparticles. *Journal of dairy science*, 95(11), 6204–6214. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5103>
- Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2020). Importance of release and bioavailability studies for nanoencapsulated food ingredients. En *Release and Bioavailability of Nanoencapsulated Food Ingredients*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815665-0.00001-1>
- Baby, T., Liu, Y., Middelberg, A. P. J., & Zhao, C. X. (2017). Fundamental studies on throughput capacities of hydrodynamic flow-focusing microfluidics for producing monodisperse polymer nanoparticles. *Chemical Engineering Science*, 169, 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.04.046>
- Badui Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos* (4ª ed.). Pearson Educación.
- Báez, J., Fernández-Fernández, A. M., Tironi, V., Bollati-Fogolín, M., Añón, M. C., & Medrano-Fernández, A. (2021). Identification and characterization of antioxidant peptides obtained from the bioaccessible fraction of α -lactalbumin hydrolysate. *Journal of Food Science*, 86(10), 4479–4490. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15918>
- Bandulasena, M. V., Vladisavljević, G. T., & Benyahia, B. (2019). Versatile reconfigurable glass capillary microfluidic devices with Lego® inspired blocks for drop generation and micromixing. *Journal of Colloid and Interface Science*, 542, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.01.119>
- Becker, H., & Gärtner, C. (2000). Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis ELECTROPHORESIS: An International*

Journal, 21(1), 12–26. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000101\)21:1<12::AID-ELPS12>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<12::AID-ELPS12>3.0.CO;2-7)

- Beebe, D. J., Mensing, G. A., & Walker, G. M. (2002). Physics and applications of microfluidics in biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 4, 261–286. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916>
- Berli, C. L. (2008). Equivalent circuit modeling of electrokinetically driven analytical microsystems. *Microfluidics and Nanofluidics*, 4, 391–399. <https://doi.org/10.1007/s10404-007-0191-2>
- Berli, C. L., & Deiber, J. A. (2004). Theoretical analysis of the gravity-driven capillary viscometers. *Review of scientific instruments*, 75(4), 976–982. <https://doi.org/10.1063/1.1666987>
- Bottaro, E., & Nastruzzi, C. (2016). “Off-the-shelf” microfluidic devices for the production of liposomes for drug delivery. *Materials Science and Engineering C*, 64, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.056>
- Bourassa, P., Kanakis, C. D., Tarantilis, P., Pollissiou, M. G., & Tajmir-Riahi, H. A. (2010). Resveratrol, genistein, and curcumin bind bovine serum albumin. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(9), 3348–3354. <https://doi.org/10.1021/jp9115996>
- Bragheri, F., Vazquez, R. M., & Osellame, R. (2020). Microfluidics. En *Three-dimensional microfabrication using two-photon polymerization* (pp. 493–526). William Andrew Publishing. <https://doi.org/10.1016/C2018-0-00278-9>
- Broboana, D., Mihai Balan, C., Wohland, T., & Balan, C. (2011). Investigations of the unsteady diffusion process in microchannels. *Chemical Engineering Science*, 66(9), 1962–1972. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2011.01.048>
- Bruus, H. (2007). *Theoretical microfluidics* (Vol. 18). Oxford university press.
- Byun, C. K., Abi-Samra, K., Cho, Y. K., & Takayama, S. (2014). Pumps for microfluidic cell culture. *Electrophoresis*, 35(2–3), 245–257. <https://doi.org/10.1002/elps.201300205>
- Calado, B., dos Santos, A., & Semiao, V. (2016). Characterization of the mixing regimes of Newtonian fluid flows in asymmetrical T-shaped micromixers. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 72, 218–227. <https://doi.org/10.1016/j.expthermflusci.2015.11.010>
- Carugo, D., Bottaro, E., Owen, J., Stride, E., & Nastruzzi, C. (2016). Liposome production by microfluidics: Potential and limiting factors. *Scientific Reports*, 6, 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep25876>
- Chan, H. K., & Kwok, P. C. L. (2011). Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(6), 406–416. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.011>
- Chapeau, A. L., Bertrand, N., Briard-Bion, V., Hamon, P., Poncelet, D., & Bouhallab, S. (2017). Coacervates of whey proteins to protect and improve the oral delivery of a bioactive molecule. *Journal of Functional Foods*, 38, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.009>
- Chen, F. P., Li, B. S., & Tang, C. H. (2015). Nanocomplexation between curcumin and soy protein isolate: Influence on curcumin stability/bioaccessibility and in vitro protein digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(13), 3559–3569. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00448>
- Chia, M. C., Sweeney, C. M., & Odom, T. W. (2011). Chemistry in microfluidic channels. *Journal of Chemical Education*, 88(4), 461–464. <https://doi.org/10.1021/ed1008624>

- Cho, Y. H., & Jones, O. G. (2019). Assembled protein nanoparticles in food or nutrition applications. En *Advances in Food and Nutrition Research* (1st ed., Vol. 88). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.01.002>
- Choudhary, S., Jain, M., & Islam, M. (2020). Design, Development and Characterization of Curcumin loaded Albumin Nanoparticles for the Treatment of Parkinson's Disease. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 12(1), 40–45. <https://doi.org/10.25004/ijpsdr.2020.120107>
- Chow, S. F., Wan, K. Y., Cheng, K. K., Wong, K. W., Sun, C. C., Baum, L., & Chow, A. H. L. (2015). Development of highly stabilized curcumin nanoparticles by flash nanoprecipitation and lyophilization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 94, 436–449. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.06.022>
- Cosquillo Rafael M, Placencia Medina M, Retuerto Figueroa M, Gorriti Gutierrez A, Tarazona Huamaní J. (2018). Caracterización físico-química y capacidad antioxidante de extractos del rizoma de *Curcuma longa* L. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 3(4), 160-166. <https://doi.org/10.26722/rpmi.2018.v3i4.519>
- Croguennec, T., Tavares, G. M., & Bouhallab, S. (2017). Heteroprotein complex coacervation: A generic process. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, 115–126. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.06.009>
- Cuadros-Moreno, A., Pimentel, R. C., Martínez, E. S. M., & Fernandez, J. Y. (2014). Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas. *Latin-American Journal of Physics Education*, 8(4), 1–5.
- Cubaud, T., & Mason, T. G. (2008). Formation of miscible fluid microstructures by hydrodynamic focusing in plane geometries. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 78(5), 1–8. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.78.056308>
- Cussler, E. L. (1997). *Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems* (2.^aed.). Cambridge University Press. <https://books.google.com.ar/books?id=TGRmFTrsPTQC>
- Davidov-Pardo, G., Joye, I. J., & McClements, D. J. (2015). Food-Grade Protein-Based Nanoparticles and Microparticles for Bioactive Delivery: Fabrication, Characterization, and Utilization. En Donev, R. (Ed.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (1^a ed., Vol. 98). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.11.004>
- de Souza Simões, L., Madalena, D. A., Pinheiro, A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Ramos, Ó. L. (2017). Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. *Advances in Colloid and Interface Science*, 243, 23–45. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.02.010>
- Delavari, B., Mamashli, F., Bigdeli, B., Poursoleiman, A., Karami, L., Zolmajd-Haghighi, Z., Ghasemi, A., Samaei-Daryan, S., Hosseini, M., Haertlé, T., Muronetz, V. I., Halskau, Ø., Moosavi-Movahedi, A. A., Goliaei, B., Rezayan, A. H., & Saboury, A. A. (2018). A biophysical study on the mechanism of interactions of DOX or PTX with α -lactalbumin as a delivery carrier. *Scientific Reports*, 8(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35559-1>
- Delavari, B., Saboury, A. A., Atri, M. S., Ghasemi, A., Bigdeli, B., Khammari, A., Maghami, P., Moosavi-Movahedi, A. A., Haertlé, T., & Goliaei, B. (2015). Alpha-lactalbumin: A new carrier for vitamin D3 food enrichment. *Food Hydrocolloids*, 45, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.017>

- Demarest, S. J., Boice, J. A., Fairman, R., & Raleigh, D. P. (1999). Defining the core structure of the α -lactalbumin molten globule state. *Journal of Molecular Biology*, 294(1), 213-221. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3228>
- Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., & Maji, T. K. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>
- Donno, R., Gennari, A., Lallana, E., De La Rosa, J. M. R., d'Arcy, R., Treacher, K., Hill, K., Ashford, M., & Tirelli, N. (2017). Nanomanufacturing through microfluidic-assisted nanoprecipitation: Advanced analytics and structure-activity relationships. *International Journal of Pharmaceutics*, 534(1–2), 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.10.006>
- Duncanson, W. J., Lin, T., Abate, A. R., Seiffert, S., Shah, R. K., & Weitz, D. A. (2012). Microfluidic synthesis of advanced microparticles for encapsulation and controlled release. *Lab on a Chip*, 12(12), 2135–2145. <https://doi.org/10.1039/c2lc21164e>
- Eberhardt, A., López, E. C., Ceruti, R. J., Marino, F., Mammarella, E. J., Manzo, R. M., & Sihufe, G. A. (2019). Influence of the degree of hydrolysis on the bioactive properties of whey protein hydrolysates using Alcalase®. *International Journal of Dairy Technology*, 72(4), 573-584. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12606>
- Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(5), 430-441. <https://doi.org/10.1080/10408390701425615>
- Elzoghby, A. O., Samy, W. M., & Elgindy, N. A. (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 157(2), 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.031>
- Esposito, B. S., Jauregi, P., Tapia-Blácido, D. R., & Martelli-Tosi, M. (2021). Liposomes vs. chitosomes: Encapsulating food bioactives. *Trends in Food Science and Technology*, 108, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.12.003>
- Etorki, A. M., Gao, M., Sadeghi, R., Maldonado-Mejia, L. F., & Kokini, J. L. (2016). Effects of desolvating agent types, ratios, and temperature on size and nanostructure of nanoparticles from α -lactalbumin and ovalbumin. *Journal of Food Science*, 81(10), E2511-E2520. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13447>
- Fach, M., Radi, L., & Wich, P. R. (2016). Nanoparticle Assembly of Surface-Modified Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 138(45), 14820–14823. <https://doi.org/10.1021/jacs.6b06243>
- Fan, Y., Yi, J., Zhang, Y., & Yokoyama, W. (2018). Fabrication of curcumin-loaded bovine serum albumin (BSA)-dextran nanoparticles and the cellular antioxidant activity. *Food Chemistry*, 239, 1210–1218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.075>
- Faustino, V., Catarino, S. O., Lima, R., & Minas, G. (2016). Biomedical microfluidic devices by using low-cost fabrication techniques: A review. *Journal of Biomechanics*, 49(11), 2280–2292. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2015.11.031>
- Feng, Q., Sun, J., & Jiang, X. (2016). Microfluidics-mediated assembly of functional nanoparticles for cancer-related pharmaceutical applications. *Nanoscale*, 8(25), 12430–12443. <https://doi.org/10.1039/c5nr07964k>

- Feng, Y., & Lee, Y. (2019). Microfluidic assembly of food-grade delivery systems: Toward functional delivery structure design. *Trends in Food Science and Technology*, 86, 465–478. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.054>
- Fontana, A., Spolaore, B., & Polverino De Laureto, P. (2013). The biological activities of protein/oleic acid complexes reside in the fatty acid. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1834(6), 1125–1143. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.02.041>
- Galisteo-González, F., & Molina-Bolívar, J. A. (2014). Systematic study on the preparation of BSA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.028>
- Gao, W., Liu, M., Chen, S., Zhang, C., & Zhao, Y. (2019). Droplet microfluidics with gravity-driven overflow system. *Chemical Engineering Journal*, 362, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.01.026>
- García, M., Forbe, T., & Gonzalez, E. (2010). Potenciais aplicações de nanotecnologia no setor agro-alimentar. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 30(3), 573–581. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612010000300002>
- García-Pinel, B., Porrás-Alcalá, C., Ortega-Rodríguez, A., Sarabia, F., Prados, J., Melguizo, C., & López-Romero, J. M. (2019). Lipid-based nanoparticles: Application and recent advances in cancer treatment. *Nanomaterials*, 9(4), 1–23. <https://doi.org/10.3390/nano9040638>
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213–224. <https://doi.org/10.1080/096374899101256>
- Giorello, A., Minetti, F., Nicastro, A., & Berli, C. L. A. (2020). The effect of gravity on microfluidic flow focusing. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 307, 127595. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127595>
- González-Albadalejo, J., Sanz, D., Claramunt, R. M., Lavandera, J. L., Alkorta, I., & Elguero, J. (2015). Curcumin and curcuminoids: Chemistry structural studies and biological properties. *Real Academia Nacional de Farmacia*, 81(4), 278–310.
- Goycoolea, F. M., Remuñán-López, C., & Alonso, M. J. (2009). Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. *Real Academia Nacional de Farmacia*, 103–131. <https://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/990/1024>
- Groisman, A., Enzelberger, M., & Quake, S. R. (2003). Microfluidic memory and control devices. *Science*, 300(5621), 955–958. <https://doi.org/10.1126/science.1083694>
- Grzelczak, M., Vermant, J., Furst, E. M., & Liz-Marzán, L. M. (2010). Directed self-assembly of nanoparticles. *ACS nano*, 4(7), 3591–3605. <https://doi.org/10.1021/nn100869j>
- Guaadaoui, A., Benaicha, S., Elmajdoub, N., Bellaoui, M., & Hamal, A. (2014). What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 3(3), 17–179. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20140303.16>
- Hajian, R., & Hardt, S. (2015). Formation and lateral migration of nanodroplets via solvent shifting in a microfluidic device. *Microfluidics and Nanofluidics*, 19(6), 1281–1296. <https://doi.org/10.1007/s10404-015-1644-7>
- Hakala, T. A., Davies, S., Toprakcioglu, Z., Bernardim, B., Bernardes, G. J. L., & Knowles, T. P. J. (2020). A Microfluidic Co-Flow Route for Human Serum Albumin-Drug-Nanoparticle Assembly. *Chemistry - A European Journal*, 26(27), 5965–5969. <https://doi.org/10.1002/chem.202001146>

- Hamdallah, S. I., Zoqlam, R., Erfle, P., Blyth, M., Alkilany, A. M., Dietzel, A., & Qi, S. (2020). Microfluidics for pharmaceutical nanoparticle fabrication: The truth and the myth. *International journal of pharmaceutics*, 584, 119408. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119408>
- Hasanpoor, Z., Mostafaie, A., Nikokar, I., & Hassan, Z. M. (2020). Curcumin-human serum albumin nanoparticles decorated with PDL1 binding peptide for targeting PDL1-expressing breast cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 137–153. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.130>
- Huang, X., Huang, X., Gong, Y., Xiao, H., McClements, D. J., & Hu, K. (2016). Enhancement of curcumin water dispersibility and antioxidant activity using core–shell protein–polysaccharide nanoparticles. *Food Research International*, 87, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.009>
- Huang, Y., Hu, L., Huang, S., Xu, W., Wan, J., Wang, D., Zheng, G., & Xia, Z. (2018). Curcumin-loaded galactosylated BSA nanoparticles as targeted drug delivery carriers inhibit hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 8309–8323. <https://doi.org/10.2147/IJN.S184379>
- Iakovlev, A. P., Erofeev, A. S., & Gorelkin, P. V. (2022). Novel Pumping Methods for Microfluidic Devices: A Comprehensive Review. *Biosensors*, 12(11), 956. <https://doi.org/10.3390/bios12110956>
- Islam, M., Natu, R., & Martinez-Duarte, R. (2015). A study on the limits and advantages of using a desktop cutter plotter to fabricate microfluidic networks. *Microfluidics and Nanofluidics*, 19(4), 973–985. <https://doi.org/10.1007/s10404-015-1626-9>
- Jafari, S. M., & McClements, D. J. (2017). Nanotechnology Approaches for Increasing Nutrient Bioavailability. *Advances in Food and Nutrition Research*, 81, 1–30. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.12.008>
- Jahanban-Esfahlan, A., Dastmalchi, S., & Davaran, S. (2016). A simple improved desolvation method for the rapid preparation of albumin nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 703–709. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.032>
- Jeon, H. J., Lee, C. Y., Kim, M. J., Nguyen, X. D., Park, D. H., Kim, H. H., Go, J. S., & Paik, H. J. (2017). Preparation of protein nanoparticles using NTA end functionalized polystyrenes on the interface of a multi-laminated flow formed in a microchannel. *Micromachines*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.3390/mi8010010>
- Jiang, L., & Korivi, N. S. (2013). Microfluidics: Technologies and applications. En M. Feldman (Ed.), *Nanolithography: The Art of Fabricating Nanoelectronic and Nanophotonic Devices and Systems* (pp. 424-443). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857098757.424>
- Jiang, L., Xu, Y., Liu, Q., Tang, Y., Ge, L., Zheng, C., Zhu, J., & Liu, J. (2013). A nontoxic disulfide bond reducing method for lipophilic drug-loaded albumin nanoparticle preparation: Formation dynamics, influencing factors and formation mechanisms investigation. *International Journal of Pharmaceutics*, 443(1–2), 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.12.035>
- Jiang, T., Liao, W., & Charcosset, C. (2020). Recent advances in encapsulation of curcumin in nanoemulsions: A review of encapsulation technologies, bioaccessibility and applications. *Food Research International*, 132, 109035. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109035>

- Jithan, A., Madhavi, K., Madhavi, M., & Prabhakar, K. (2011). Preparation and characterization of albumin nanoparticles encapsulating curcumin intended for the treatment of breast cancer. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 1(2), 119. <https://doi.org/10.4103/2230-973x.82432>
- Joye, I. J., & McClements, D. J. (2013). Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems. *Trends in Food Science and Technology*, 34(2), 109–123. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.10.002>
- Joye, I. J., & McClements, D. J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 19(5), 417–427. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.07.002>
- Joye, I. J., Davidov-Pardo, G., & McClements, D. J. (2014). Nanotechnology for increased micronutrient bioavailability. *Trends in Food Science and Technology*, 40(2), 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.08.006>
- Kabanov, A. V., & Vinogradov, S. V. (2009). Nanogels as pharmaceutical carriers: Finite networks of infinite capabilities. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(30), 5418–5429. <https://doi.org/10.1002/anie.200900441>
- Kalam, M. A., Alkholief, M., Badran, M., Alshememry, A., & Alshamsan, A. (2020). Co-encapsulation of metformin hydrochloride and reserpine into flexible liposomes: Characterization and comparison of in vitro release profile. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 57, 101670. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101670>
- Kang, K. K., Lee, B., & Lee, C. S. (2019). Recent progress in the synthesis of inorganic particulate materials using microfluidics. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 98, 2–19. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2018.08.027>
- Karniadakis, G., Beskok, A., & Aluru, N. (2006). *Microflows and nanoflows: fundamentals and simulation* (Vol. 29). Springer Science & Business Media.
- Karnik, R., Gu, F., Basto, P., Cannizzaro, C., Dean, L., Kyei-Manu, W., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2008). Microfluidic platform for controlled synthesis of polymeric nanoparticles. *Nano Letters*, 8(9), 2906–2912. <https://doi.org/10.1021/nl801736q>
- Kazan, A., Yesil-Celiktas, O., & Zhang, Y. S. (2019). Fabrication of Thymoquinone-Loaded Albumin Nanoparticles by Microfluidic Particle Synthesis and Their Effect on Planarian Regeneration. *Macromolecular Bioscience*, 19(11), 1–6. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900182>
- Kestin, J., Khalifa, H. E., & Correia, R. J. (1981). Tables of the dynamic and kinematic viscosity of aqueous NaCl solutions in the temperature range 20–150 °C and the pressure range 0.1–35 MPa. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 10(1), 71–88. <https://doi.org/10.1063/1.555641>
- Khan, S., Iqbal, R., Khan, R. S., & Khalid, N. (2020). Bioavailability of nanoencapsulated food bioactives. In *Release and Bioavailability of Nanoencapsulated Food Ingredients* (pp. 449-481). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815665-0.00012-6>
- Kim, B., Lee, C., Seong, E., & Soo, B. (2016). Paclitaxel and curcumin co-bound albumin nanoparticles having antitumor potential to pancreatic cancer. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(6), 708–714. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.05.005>
- Kim, J. H., Jeon, T. Y., Choi, T. M., Shim, T. S., Kim, S. H., & Yang, S. M. (2014). Droplet microfluidics for producing functional microparticles. *Langmuir*, 30(6), 1473–1488. <https://doi.org/10.1021/la403220p>

- Kim, K., Kang, D. H., Kim, M. S., Kim, K. S., Park, K. M., Hong, S. C., Chang, P. S., & Jung, H. S. (2015). Generation of alginate nanoparticles through microfluidics-aided polyelectrolyte complexation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 471, 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.02.029>
- Kim, P., Kwon, K. W., Park, M. C., Lee, S. H., Kim, S. M., & Suh, K. Y. (2008). Soft lithography for microfluidics: A Review. *Biochip Journal*, 2(1), 1–11.
- Kirby, B. J. (2010). Passive scalar transport: dispersion, patterning, and mixing. En *Micro-and nanoscale fluid mechanics: transport in microfluidic devices*. (pp. 79–96). Cambridge University Press, New York. <https://doi.org/10.1017/CBO978051176072>, 3-006.
- Knight, J. B., Vishwanath, A., Brody, J. P., & Austin, R. H. (1998). Hydrodynamic focusing on a silicon chip: mixing nanoliters in microseconds. *Physical review letters*, 80(17), 3863. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.80.3863>
- Kotha, R. R., & Luthria, D. L. (2019). Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. *Molecules*, 24(16), 2930. <https://doi.org/10.3390/molecules24162930>
- Kovács, A. N., Varga, N., Gombár, G., Hornok, V., & Csapó, E. (2020). Novel feasibilities for preparation of serum albumin-based core-shell nanoparticles in flow conditions. *Journal of Flow Chemistry*, 10(3), 497–505. <https://doi.org/10.1007/s41981-020-00088-4>
- Kruger, N.J. (2009). The Bradford Method For Protein Quantitation. In J. M. Walker (Ed.), *The Protein Protocols Handbook* (pp. 17–24). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_4
- Kumar, A., & Dixit, C. K. (2017). Methods for characterization of nanoparticles. En S. Nimesh, R. Chandra, & N. Gupta (Eds.), *Advances in nanomedicine for the delivery of therapeutic nucleic acids* (pp. 43-58). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1>
- Kurmashev, A., Kwon, S., Park, J. K., & Kang, J. H. (2019). Vertically sheathing laminar flow-based immunoassay using simultaneous diffusion-driven immune reactions. *RSC Advances*, 9(41), 23791–23796. <https://doi.org/10.1039/c9ra03855h>
- Kurukji, D., Norton, I., & Spyropoulos, F. (2016). Fabrication of sub-micron protein-chitosan electrostatic complexes for encapsulation and pH-Modulated delivery of model hydrophilic active compounds. *Food Hydrocolloids*, 53, 249–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.021>
- Kutter, J. P., & Klank, H. (2003). Microfluidics—Theoretical Aspects. En *Microsystem Engineering of Lab-on-a-chip Devices* (pp. 13–37). Wiley-VCH.
- Lafleur, J. P., Senkbeil, S., Jensen, T. G., & Kutter, J. P. (2012). Gold nanoparticle-based optical microfluidic sensors for analysis of environmental pollutants. *Lab on a Chip*, 12(22), 4651–4656. <https://doi.org/10.1039/c2lc40543a>
- Lagally, E. T., Medintz, I., & Mathies, R. A. (2001). Single-molecule DNA amplification and analysis in an integrated microfluidic device. *Analytical Chemistry*, 73(3), 565–570. <https://doi.org/10.1021/ac001026b>
- Langer, K., Balthasar, S., Vogel, V., Dinauer, N., Von Briesen, H., & Schubert, D. (2003). Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 257(1–2), 169–180. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00134-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00134-0)

- Larsen, M. U., & Shapley, N. C. (2007). Stream spreading in multilayer microfluidic flows of suspensions. *Analytical Chemistry*, 79(5), 1947–1953. <https://doi.org/10.1021/ac0612271>
- Layman, D. K., Lönnerdal, B., & Fernstrom, J. D. (2018). Applications for α -lactalbumin in human nutrition. *Nutrition Reviews*, 76(6), 444–460. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy004>
- Lee, G. B., Chang, C. C., Huang, S. Bin, & Yang, R. J. (2006). The hydrodynamic focusing effect inside rectangular microchannels. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 16(5), 1024–1032. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/16/5/020>
- Lee, G. B., Hung, C. I., Ke, B. J., Huang, G. R., Hwei, B. H., & Lai, H. F. (2001). Hydrodynamic focusing for a micromachined flow cytometer. *Journal of Fluids Engineering, Transactions of the ASME*, 123(3), 672–679. <https://doi.org/10.1115/1.1385514>
- Lee, S. H., & Rasaiah, J. C. (2011). Proton transfer and the mobilities of the H⁺ and OH⁻ ions from studies of a dissociating model for water. *The Journal of Chemical Physics*, 135(12), 124505. <https://doi.org/10.1063/1.3632990>
- Lepeltier, E., Bourgaux, C., & Couvreur, P. (2014). Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 71, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.009>
- Leser, M. E., Sagalowicz, L., Michel, M., & Watzke, H. J. (2006). Self-assembly of polar food lipids. *Advances in Colloid and Interface Science*, 123–126, 125–136. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.07.003>
- Lestari, M. L. A. D., & Indrayanto, G. (2014). Curcumin. In *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* (Vol. 39). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800173-8.00003-9>
- Leung, M. H. M., & Shen, A. Q. (2018). Microfluidic Assisted Nanoprecipitation of PLGA Nanoparticles for Curcumin Delivery to Leukemia Jurkat Cells. *Langmuir*, 34(13), 3961–3970. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b04335>
- Li, M., Ma, Y., & Ngadi, M. O. (2013). Binding of curcumin to β -lactoglobulin and its effect on antioxidant characteristics of curcumin. *Food Chemistry*, 141(2), 1504–1511. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.099>
- Li, T., Zhao, L., Liu, W., Xu, J., & Wang, J. (2016). Simple and reusable off-the-shelf microfluidic devices for the versatile generation of droplets. *Lab on a Chip*, 16(24), 4718–4724. <https://doi.org/10.1039/C6LC00967K>
- Li, Z., Mak, S. Y., Sauret, A., & Shum, H. C. (2014). Syringe-pump-induced fluctuation in all-aqueous microfluidic system implications for flow rate accuracy. *Lab on a Chip*, 14(4), 774–749. <https://doi.org/10.1039/c3lc51176f>
- Lide, D. R. (Ed.). (2004). *CRC handbook of chemistry and physics* (Vol. 85). CRC press.
- Lince, F., Marchisio, D. L., & Barresi, A. A. (2008). Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 322(2), 505–515. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.03.033>
- Liu, H., Singh, R. P., Zhang, Z., Han, X., Liu, Y., & Hu, L. (2021). Microfluidic Assembly: An Innovative Tool for the Encapsulation, Protection, and Controlled Release of Nutraceuticals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(10), 2936–2949. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05395>

- Liu, Z. M., Yang, Y., Du, Y., & Pang, Y. (2017). Advances in Droplet-Based Microfluidic Technology and Its Applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 45(2), 282–296. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(17\)60994-0](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(17)60994-0)
- Lopretti, M., Barriero, F., Fernandes, I., Damboriarena, A., Ottati, C., & Olivera, A. (2007). Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. *INNOTEC*, 2, 19–23. <https://doi.org/10.26461/02.06>
- Loureiro, A., G. Azoia, N., C. Gomes, A., & Cavaco-Paulo, A. (2016). Albumin-Based Nanodevices as Drug Carriers. *Current Pharmaceutical Design*, 22(10), 1371–1390. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160125114900>
- Luiza Koop, B., Nascimento da Silva, M., Diniz da Silva, F., Thayres dos Santos Lima, K., Santos Soares, L., José de Andrade, C., Ayala Valencia, G., & Rodrigues Monteiro, A. (2022). Flavonoids, anthocyanins, betalains, curcumin, and carotenoids: Sources, classification and enhanced stabilization by encapsulation and adsorption. *Food Research International*, 153, 110929. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110929>
- Majedi, F. S., Hasani-Sadrabadi, M. M., Hojjati Emami, S., Shokrgozar, M. A., Vandersarl, J. J., Dashtimoghadam, E., Bertsch, A., & Renaud, P. (2013). Microfluidic assisted self-assembly of chitosan based nanoparticles as drug delivery agents. *Lab on a Chip*, 13(2), 204–207. <https://doi.org/10.1039/c2lc41045a>
- Marengo, R. C., Mengatto, L. N., Olivares, M. L., & Berli, C. L. A. (2021). Microfluidics-based encapsulation of isoniazid in egg white/carrageenan microparticles for sustained release. *Food Hydrocolloids for Health*, 1, 100041. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100041>
- Mark, D., Von Stetten, F., & Zengerle, R. (2012). Microfluidic Apps for off-the-shelf instruments. *Lab on a Chip*, 12(14), 2464–2468. <https://doi.org/10.1039/c2lc00043a>
- Marre, S., & Jensen, K. F. (2010). Synthesis of micro and nanostructures in microfluidic systems. *Chemical Society Reviews*, 39(3), 1183–1202. <https://doi.org/10.1039/b821324k>
- Martín Ortega, A. M., & Segura Campos, M. R. (2019). Bioactive Compounds as Therapeutic Alternatives. En *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* (pp. 247-264). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00013-X>
- Martínez Rivas, C. J., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q. A., Galindo Rodríguez, S. A., Román, R. Á., Fessi, H., & Elaissari, A. (2017). Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(1), 66–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>
- McClements, D. J., Li, F., & Xiao, H. (2015). The nutraceutical bioavailability classification scheme: Classifying nutraceuticals according to factors limiting their oral bioavailability. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 299–327. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032814-014043>
- McGuffey, M. K., Epting, K. L., Kelly, R. M., & Foegeding, E. A. (2005). Denaturation and Aggregation of Three α -Lactalbumin Preparations at Neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3182–3190. <https://doi.org/10.1021/jf048863p>
- Merodio, M., Arnedo, A., Renedo, M. J., & Irache, J. M. (2001). Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: Characterization and in vitro release properties. *European*

Journal of Pharmaceutical Sciences, 12(3), 251–259.
[https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00169-X](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00169-X)

- Middha, E., Manghnani, P. N., Ng, D. Z. L., Chen, H., Khan, S. A., & Liu, B. (2019). Direct visualization of the ouzo zone through aggregation-induced dye emission for the synthesis of highly monodispersed polymeric nanoparticles. *Materials Chemistry Frontiers*, 3(7), 1375–1384. <https://doi.org/10.1039/c9qm00020h>
- Miladi, K., Ibraheem, D., Iqbal, M., Sfar, S., Fessi, H., & Elaissari, A. (2014). Particles from preformed polymers as carriers for drug delivery. *EXCLI Journal*, 13, 28–57.
- Miladi, K., Sfar, S., Fessi, H., & Elaissari, A. (2016). Nanoprecipitation process: from particle preparation to in vivo applications. En C. Vauthier & G. Ponchel (Eds.), *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines* (pp. 17–53). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41421-8>
- Minetti, F., Giorello, A., Olivares, M. L., & Berli, C. L. A. (2020). Exact solution of the hydrodynamic focusing driven by hydrostatic pressure. *Microfluidics and Nanofluidics*, 24(2), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s10404-020-2322-y>
- Minetti, F., Mengatto, L. M., Olivares, M. L., & Berli, C. L. A. (2022). Generation of curcumin-loaded albumin nanoparticles by using off-the-shelf microfluidics driven by gravity. *Food Research International*, 111984. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111984>
- Mohan, P. R. K., Sreelakshmi, G., Muraleedharan, C. V., & Joseph, R. (2012). Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 62, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2012.05.002>
- Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles - A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 561–573. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-37127-8.00002-9>
- Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2017). Biopolymer-based coacervates: Structures, functionality and applications in food products. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 28, 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2017.03.006>
- Moussaoui, N., Cansell, M., & Denizot, A. (2002). Marinosomes®, marine lipid-based liposomes: Physical characterization and potential application in cosmetics. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1–2), 361–365. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00217-X](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00217-X)
- Mozafari, M. R., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18(4), 309–327. <https://doi.org/10.1080/08982100802465941>
- Nguyen, N. T., Yap, Y. F., & Sumargo, A. (2008). Microfluidic rheometer based on hydrodynamic focusing. *Measurement Science and Technology*, 19(8). <https://doi.org/10.1088/0957-0233/19/8/085405>
- Ni, M., Tresset, G., & Iliescu, C. (2017). Self-assembled polysulfone nanoparticles using microfluidic chip. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 252, 458–462. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.06.028>
- Niculescu, A. G., Chircov, C., Bîrcă, A. C., & Grumezescu, A. M. (2021). Fabrication and applications of microfluidic devices: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ijms22042011>
- Nobari Azar, F. A., Pezeshki, A., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., & Mohammadi, M. (2020). Nanostructured lipid carriers: Promising delivery systems for

- encapsulation of food ingredients. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2, 100084. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100084>
- Norouzi, N., Bhakta, H. C., & Grover, W. H. (2016). Orientation-based control of microfluidics. *PloS one*, 11(3), e0149259. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149259>
- Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A., & Alshaer, W. (2022). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Heliyon*, 8(5), e09394. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>
- Oliveira, A. F., Pessoa, A. C. S. N., Bastos, R. G., & de la Torre, L. G. (2016). Microfluidic tools toward industrial biotechnology. *Biotechnology Progress*, 32(6), 1372–1389. <https://doi.org/10.1002/btpr.2350>
- Olszowy-Tomczyk, M. (2020). Synergistic, antagonistic and additive antioxidant effects in the binary mixtures. *Phytochemistry reviews*, 19, 63-103. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09658-4>
- Othman, R., Vladislavjević, G. T., & Nagy, Z. K. (2015). Preparation of biodegradable polymeric nanoparticles for pharmaceutical applications using glass capillary microfluidics. *Chemical Engineering Science*, 137, 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2015.06.025>
- Park, J. I., Saffari, A., Kumar, S., Günther, A., & Kumacheva, E. (2010). Microfluidic synthesis of polymer and inorganic particulate materials. *Annual Review of Materials Research*, 40, 415–443. <https://doi.org/10.1146/annurev-matsci-070909-104514>
- Pessoa, A. C. S. N., Sipoli, C. C., & De La Torre, L. G. (2017). Effects of diffusion and mixing pattern on microfluidic-assisted synthesis of chitosan/ATP nanoparticles. *Lab on a Chip*, 17(13), 2281–2293. <https://doi.org/10.1039/c7lc00291b>
- Priftis, D., & Tirrell, M. (2012). Phase behaviour and complex coacervation of aqueous polypeptide solutions. *Soft Matter*, 8(36), 9396–9405. <https://doi.org/10.1039/c2sm25604e>
- Priyadarsini, K. I. (2009). Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 10(2), 81–95. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2009.05.001>
- Probstein, R. F. (2005). *Physicochemical hydrodynamics: an introduction*. John Wiley & Sons.
- Rafiee, Z., Nejatian, M., Daeihamed, M., & Jafari, S. M. (2019). Application of different nanocarriers for encapsulation of curcumin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(21), 3468–3497. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1495174>
- Rahimnejad, M., Najafpour, G., & Bakeri, G. (2012). Investigation and modeling effective parameters influencing the size of BSA protein nanoparticles as colloidal carrier. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 412, 96–100. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.07.022>
- Rangan, A., Manjula, M. V., & Satyanarayana, K. G. (2016). Trends and methods for nanobased delivery for nutraceuticals. In *Emulsions* (pp. 573–609). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804306-6.00017-9>
- Ray, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2016). An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, 13, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rizvi, S. A. A., & Saleh, A. M. (2018). Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 26(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012>
- Robles-García, M. A., Rodríguez-Félix, F., Márquez-Ríos, E., Aguilar, J. A., Barrera-Rodríguez, A., Aguilar, J., Ruiz-Cruz, S., & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2016). Applications of nanotechnology in the agriculture, food, and pharmaceuticals. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(8), 8188–8207. <https://doi.org/10.1166/jnn.2016.12925>
- Rodríguez, J., Martín, M. J., Ruiz, M. A., & Clares, B. (2016). Current encapsulation strategies for bioactive oils: From alimentary to pharmaceutical perspectives. *Food Research International*, 83, 41–59. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.032>
- Saad, W. S., & Prud'Homme, R. K. (2016). Principles of nanoparticle formation by flash nanoprecipitation. *Nano Today*, 11(2), 212–227. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.04.006>
- Sadeghi, A. (2019). Analytical solutions for mass transport in hydrodynamic focusing by considering different diffusivities for sample and sheath flows. *Journal of Fluid Mechanics*, 862, 517-551. <https://doi.org/10.1017/jfm.2018.979>
- Safavi, S. M., Abbas, S., Gyeong, H., Kim, Y., Ji, E., Choon, K., & Hee, D. (2017). Reducing agent-free synthesis of curcumin-loaded albumin nanoparticles by self-assembly at room temperature. *International Journal of Pharmaceutics*, 529(1–2), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.087>
- Salafi, T., Zeming, K. K., & Zhang, Y. (2017). Advancements in microfluidics for nanoparticle separation. *Lab on a Chip*, 17(1), 11–33. <https://doi.org/10.1039/C6LC01045H>
- Saleh, T., Soudi, T., & Shojaosadati, S. A. (2018). International Journal of Biological Macromolecules Redox responsive curcumin-loaded human serum albumin nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro evaluation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 759–766. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.085>
- Salehiabar, M., Nosrati, H., Javani, E., Aliakbarzadeh, F., Kheiri Manjili, H., Davaran, S., & Danafar, H. (2018). Production of biological nanoparticles from bovine serum albumin as controlled release carrier for curcumin delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.043>
- Sasaki, J., & Kichida, M. (2012). Curcumin: Biosynthesis, medicinal uses and health benefits. En *Curcumin: Biosynthesis, Medicinal Uses and Health Benefits*. Nova Science Publishers, Inc.
- Schmitt, C., & Turgeon, S. L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167(1–2), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.001>
- Shahgholian, N., & Rajabzadeh, G. (2016). Fabrication and characterization of curcumin-loaded albumin/gum arabic coacervate. *Food Hydrocolloids*, 59, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.11.031>

- Sharma, A., & Baldi, A. (2018). Nanostructured Lipid Carriers: A Review Journal. *Journal of Developing Drugs*, 7(2), 1–12. <https://doi.org/10.4172/2329-6631.10001>
- Shrimal, P., Jadeja, G., & Patel, S. (2019). A review on novel methodologies for drug nanoparticle preparation: Microfluidic approach. *Chemical Engineering Research and Design*, 153, 728–756. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.11.031>
- Soleymani, A., Kolehmainen, E., & Turunen, I. (2008). Numerical and experimental investigations of liquid mixing in T-type micromixers. *Chemical Engineering Journal*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.07.048>
- Soto, D., & Oliva, H. (2012). Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: una revisión. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 32(2), 154–174.
- Sozer, N., & Kokini, J. L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*, 27(2), 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.10.010>
- Stănciu, N., & Râpeanu, G. (2010). An overview of bovine α -lactalbumin structure and functionality. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati -Fascicle VI – Food Technology*, 34(2), 82–93. <https://www.gup.ugal.ro/ugaljournals/index.php/food/article/view/3631>
- Stiles, T., Fallon, R., Vestad, T., Oakey, J., Marr, D. W. M., Squier, J., & Jimenez, R. (2005). Hydrodynamic focusing for vacuum-pumped microfluidics. *Microfluidics and Nanofluidics*, 1(3), 280–283. <https://doi.org/10.1007/s10404-005-0033-z>
- Sun, Y., Lee, R. J., Meng, F., Wang, G., Zheng, X., Dong, S., & Teng, L. (2020). Microfluidic self-assembly of high cabazitaxel loading albumin nanoparticles. *Nanoscale*, 12(32), 16928–16933. <https://doi.org/10.1039/c9nr10941b>
- Sundar, S., Kundu, J., & Kundu, S. C. (2010). Biopolymeric nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*, 11(1), 014104. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/11/1/014104>
- Suriano, R., Kuznetsov, A., Eaton, S. M., Kiyan, R., Cerullo, G., Osellame, R., Chichkov, B. N., Levi, M., & Turri, S. (2011). Femtosecond laser ablation of polymeric substrates for the fabrication of microfluidic channels. *Applied Surface Science*, 257(14), 6243–6250. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.02.053>
- Tabeling, P. (2005). *Introduction to Microfluidics*. Oxford University Press, New York.
- Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., & Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.002>
- Tang, C. H. (2020). Nanocomplexation of proteins with curcumin: From interaction to nanoencapsulation (A review). *Food Hydrocolloids*, 109, 106106. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106106>
- Tao, J., Chow, S. F., & Zheng, Y. (2019). Application of flash nanoprecipitation to fabricate poorly water-soluble drug nanoparticles. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(1), 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.11.001>
- Tarhini, M., Benlyamani, I., Hamdani, S., Agusti, G., Fessi, H., Greige-Gerges, H., Bentaher, A., & Elaissari, A. (2018). Protein-based nanoparticle preparation via nanoprecipitation method. *Materials*, 11(3), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ma11030394>
- Terray, A., & Hart, S. J. (2010). “Off-the-shelf” 3-D microfluidic nozzle. *Lab on a Chip*, 10(13), 1729–1731. <https://doi.org/10.1039/b927244e>

- Thiele, J., Steinhäuser, D., Pfohl, T., & Förster, S. (2010). Preparation of monodisperse block copolymer vesicles via flow focusing in microfluidics. *Langmuir*, 26(9), 6860–6863. <https://doi.org/10.1021/la904163v>
- Timilsena, Y. P., Akanbi, T. O., Khalid, N., Adhikari, B., & Barrow, C. J. (2019). Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1276–1286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144>
- Tresset, G., Marculescu, C., Salonen, A., Ni, M., & Iliescu, C. (2013). Fine control over the size of surfactant-polyelectrolyte nanoparticles by hydrodynamic flow focusing. *Analytical Chemistry*, 85(12), 5850–5856. <https://doi.org/10.1021/ac4006155>
- Tripathi, S., Chakravarty, P., & Agrawal, A. (2014). On non-monotonic variation of hydrodynamically focused width in a rectangular microchannel. *Current Science*, 107(8), 1260–1274. <http://www.jstor.org/stable/24107167>
- Turgeon, S. L., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2007). Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 12(4–5), 166–178. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2007.07.007>
- Urteaga, R., Elizalde, E., & Berli, C. L. A. (2018). Transverse solute dispersion in microfluidic paper-based analytical devices (μ PADs). *Analyst*, 143(10), 2259–2266. <https://doi.org/10.1039/C8AN00149A>
- Valencia, P. M., Pridgen, E. M., Rhee, M., Langer, R., Farokhzad, O. C., & Karnik, R. (2013). Microfluidic platform for combinatorial synthesis and optimization of targeted nanoparticles for cancer therapy. *ACS nano*, 7(12), 10671–10680. <https://doi.org/10.1021/nn403370e>
- Vempati, B., Panchagnula, M. V., Öztekin, A., & Neti, S. (2007). Numerical investigation of liquid-liquid coaxial flows. *Journal of Fluids Engineering, Transactions of the ASME*, 129(6), 713–719. <https://doi.org/10.1115/1.2734223>
- Waghmare, M. N., Qureshi, T. S., Shaikh, A. N., Khade, B. S., Murali Krishna, C., & Dongre, P. M. (2020). Functionalized Alpha-lactalbumin Conjugated with Gold Nanoparticle for Targeted Drug Delivery. *ChemistrySelect*, 5(6), 2035–2049. <https://doi.org/10.1002/slct.201904190>
- Walstra, P. (2002). *Physical chemistry of foods*. CRC Press.
- Wang, X., Zhao, D., Phan, D. T. T., Liu, J., Chen, X., Yang, B., Hughes, C. C. W., Zhang, W., & Lee, A. P. (2018). A hydrostatic pressure-driven passive micropump enhanced with siphon-based autofill function. *Lab on a Chip*, 18(15), 2167–2177. <https://doi.org/10.1039/c8lc00236c>
- Weibel, D. B., & Whitesides, G. M. (2006). Applications of microfluidics in chemical biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(6), 584–591. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.016>
- Weiss, J., Takhistov, P., & McClements, D. J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71(9), 107–116. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00195.x>
- White, F. M., & Majdalani, J. (2006). *Viscous fluid flow* (Vol. 3). McGraw-Hill.
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101), 368–373. <https://doi.org/10.1038/nature05058>
- Wraight, C. A. (2006). Chance and design—proton transfer in water, channels and bioenergetic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(8), 886–912. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.06.017>

- Wu, P., Wang, Y., Luo, Z., Li, Y., Li, M., & He, L. (2014). A 3D easily-assembled Micro-Cross for droplet generation. *Lab on a Chip*, 14(4), 795–798. <https://doi.org/10.1039/c3lc51126j>
- Wu, Z., & Nguyen, N. T. (2005). Hydrodynamic focusing in microchannels under consideration of diffusive dispersion: Theories and experiments. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 107(2), 965–974. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.11.014>
- Xu, J., Zhang, S., MacHado, A., Lecommandoux, S., Sandre, O., Gu, F., & Colin, A. (2017). Controllable Microfluidic Production of Drug-Loaded PLGA Nanoparticles Using Partially Water-Miscible Mixed Solvent Microdroplets as a Precursor. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05184-5>
- Yang, M., Wu, Y., Li, J., Zhou, H., & Wang, X. (2013). Binding of curcumin with bovine serum albumin in the presence of ι-carrageenan and implications on the stability and antioxidant activity of curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(29), 7150–7155. <https://doi.org/10.1021/jf401827x>
- Yi, J., Fan, Y., Zhang, Y., Wen, Z., Zhao, L., & Lu, Y. (2016). Glycosylated α-lactalbumin-based nanocomplex for curcumin: Physicochemical stability and DPPH-scavenging activity. *Food Hydrocolloids*, 61, 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.036>
- Yu, H., Nguyen, M. H., Cheow, W. S., & Hadinoto, K. (2017). A new bioavailability enhancement strategy of curcumin via self-assembly nano-complexation of curcumin and bovine serum albumin. *Materials Science and Engineering C*, 75, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.018>
- Zeng, W., Jacobi, I., Beck, D. J., & Stone, H. A. (2015). Characterization of syringe-pump-driven induced pressure fluctuations in elastic microchannels. *Lab on a Chip*, 15(4), 1110–1115. <https://doi.org/10.1039/C4LC01347F>
- Zhao, C. X., He, L., Qiao, S. Z., & Middelberg, A. P. J. (2011). Nanoparticle synthesis in microreactors. *Chemical Engineering Science*, 66(7), 1463–1479. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.08.039>
- Zhao, S., Wang, W., Huang, Y., Fu, Y., & Cheng, Y. (2014). Paclitaxel loaded human serum albumin nanoparticles stabilized with intermolecular disulfide bonds. *The Royal Society of Chemistry*, 5(11), 1658–1663. <https://doi.org/10.1039/c4md00200h>