

E.T.S. de Ingeniería Industrial,
Informática y de Telecomunicación

Fabricación y validación de un dispositivo microfluídico con capacidad de monitorización de oxígeno



Máster en Ingeniería Biomédica

Trabajo Fin de Máster

Autor: Santiago Mañosas Sánchez

Directores: Mauro Malvè, Luis E. Serrano.

Pamplona, junio de 2021

upna

Universidad Pública de Navarra
Nafarroako Unibertsitate Publikoa

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen.....	1
Abstract	2
Objetivos, Motivación, Alcance y Resultados.....	3
Lista de Figuras.....	5
Lista de Tablas.....	7
Abreviaturas y Símbolos	7
Capítulo 1. Introducción.....	9
Capítulo 2. Contexto Histórico.....	13
2.1. Breve historia de la experimentación animal:	13
2.2. EL principio de las 3R:	14
2.3. Legislaciones actuales de la experimentación animal:	14
2.4. Alternativas a la experimentación animal. <i>In vitro</i> vs. <i>In vivo</i> :	15
2.5. Microfluídica:	16
2.5.1. Características de la microfluídica:	16
2.5.2. Aplicaciones principales:	18
Capítulo 3. Métodos y materiales de fabricación en microfluídica.	23
3.1. Métodos de fabricación de dispositivos microfluídicos:.....	23
3.1.1. Litografía blanda (Moldeo de Réplica):.....	24
3.1.2. Hot Embossing:	25
3.1.3. Moldeo por microinyección (Microinjection Moulding):	26
3.1.4. Impresión 3D:	27
3.1.5. Xurografía/Laminación:	29
3.1.6. Resumen de los procesos de fabricación:	31
3.2. Materiales utilizados en la fabricación de dispositivos microfluídicos:	31
3.2.1. PMMA:	31
3.2.2. PDMS:	32
3.2.3. PS:	33
3.2.4. PC:.....	34
3.2.5. COC:	35
3.2.6. Tabla comparativa de los materiales estudiados:	37
3.2.7. Ejemplos de dispositivos microfluídicos:	37
Capítulo 4. Fabricación, validación y uso en ensayos experimentales de un dispositivo microfluídico con capacidad de monitorización de oxígeno.	41
4.1. Ámbito del proyecto: colaboración entre BEOnChip y PreSens.	41
4.2. BEOnChip:	41

4.2.1.	Presentación de BEOChip.....	41
4.2.2.	Producto utilizado de la empresa: BE-Flow.....	42
4.2.3.	Ejemplos del uso de sus productos en la bibliografía:.....	43
4.3.	PreSens:	44
4.3.1.	Presentación de PreSens:	44
4.3.2.	Productos utilizados de la empresa: SensorPlugs, POF, OXY-4 ST, PMS2.	44
4.3.3.	Ejemplos del uso de sus productos en la bibliografía:.....	48
4.4.	Objetivos, metodología y materiales:.....	49
4.4.1.	Equipo físico:.....	49
4.4.2.	Software utilizado:.....	52
4.4.3.	Materiales de fabricación utilizados:.....	53
4.5.	Consideraciones y estudios iniciales sobre la combinación de ambos productos:	53
4.5.1.	Modificaciones necesarias en el BE-Flow:.....	54
4.5.2.	Método de unión de las capas del dispositivo microfluídico:	56
4.5.3.	Procesos de fabricación diseñados:.....	56
4.6.	Desarrollo de prototipos:.....	59
4.6.1.	Prototipo con unión por adhesivo:.....	59
4.6.2.	Prototipo con unión por termocompresión:	60
4.6.3.	Elección final:.....	60
4.7.	Validación del prototipo final:	62
4.7.1.	Validación de la hermeticidad y robustez del dispositivo final:	62
4.7.2.	Validación de la biocompatibilidad del dispositivo final:	62
4.7.3.	Validación de la capacidad de medida de los SensorPlug tras el proceso de fabricación:.....	65
4.7.4.	Consideraciones finales del producto desarrollado:	69
4.8.	Ensayos experimentales:	69
4.8.1.	Objetivo y número de ensayos:	69
4.8.2.	Ensayo experimental en condiciones de hipoxia:.....	70
4.8.3.	Valoración de la capacidad de reutilización del dispositivo final:	73
4.8.4.	Conclusiones sobre los ensayos experimentales:.....	76
Capítulo 5.	Conclusiones y líneas futuras.	77
5.1.	Conclusiones del Proyecto	77
5.2.	Líneas futuras:.....	79
REFERENCIAS	81
<u>ANEXO I:</u> FICHAS TÉCNICAS DEL PRODUCTO DE BEONCHIP Y PRESENS.		
<u>ANEXO II:</u> FICHAS TÉCNICAS DEL EQUIPO UTILIZADO EN LOS PROCESOS DE FABRICACIÓN, VALIDACIÓN Y EXPERIMENTACIÓN.		

Fabricación y validación de un dispositivo microfluídico con capacidad de monitorización de oxígeno.

Santiago Mañosas Sánchez

santiago.manosas@unavarra.es

Departamento de Ingeniería

Universidad Pública de Navarra

Calle Cataluña, S/N

Pamplona, Navarra (España), 31006

Resumen

La creciente preocupación por el bienestar animal ha hecho que prácticas comunes en el ámbito científico como puede ser el uso de modelos animales para la observación de la toxicidad de ciertos productos o tratamientos novedosos se hayan puesto en entredicho, creando un debate ético y llevando a la aparición de diversas regulaciones por parte de los principales organismos internacionales. En respuesta a esto, los ensayos experimentales *in vitro* y más específicamente el uso de plataformas microfluídicas con este fin han sufrido un desarrollo impresionante, al ser considerados una alternativa viable a estas prácticas. En este proyecto se analizará brevemente la historia de la experimentación animal y la llegada de los ensayos *in vitro* como alternativa a su uso. Analizando la microfluídica como una alternativa ventajosa a los cultivos celulares tradicionales, se estudiarán tanto los procesos de fabricación seguidos para el desarrollo de los dispositivos microfluídicos en todos sus ámbitos de aplicación como los materiales más utilizados para la fabricación de dispositivos microfluídicos plásticos. Finalmente se estudiará en detalle el desarrollo y validación de un novedoso dispositivo microfluídico con capacidad de monitorización de oxígeno para su uso en la medición de la adaptación del medio celular a cambios bruscos en el oxígeno ambiente. A raíz de estas mediciones se extrae la conclusión de que sin el uso de medios externos para reducir la cantidad de oxígeno disuelto en el medio la adaptación de éste al oxígeno ambiental resulta muy lenta, lo que en un ensayo real podría llevar a errores en los resultados obtenidos.

Palabras Clave

Microfluídica, Sensores de oxígeno, Xurografía, COC/COP, Hipoxia, Ensayos in vitro, Experimentación animal

Fabrication and validation of a microfluidic platform with oxygen monitoring capacity.

Santiago Mañosas Sánchez

santiago.manosas@unavarra.es

Engineering Department

Public University of Navarre

Calle Cataluña, S/N

Pamplona, Navarre (Spain), 31006

Abstract

The increasing concern about the animal's welfare has put the spotlight in common scientific practices such as the use of animal models in scientific testing to analyze the toxicity of new products or medical treatments, creating an ethical debate and leading to the legislation of some regulations from the main international organisations. As an answer to this concern, *in vitro* experimental testing and in particular the use of microfluidic platforms to that end have suffered an incredible development, as they are considered viable alternatives to those practices. In this project, a brief analysis of the animal experimentation's history will be done, as well as the arrival of *in vitro* experimental tests as an alternative. Analysing the use of microfluidics as an upgrade to traditional cell cultures, this work will study the main microfluidic devices' fabrication processes in all its range of application as well as the main materials used for the fabrication of plastic microfluidic devices. Finally, a study about the development and validation of a novel microfluidic device with oxygen monitoring capacity to measure of the adaptation of the cellular medium in response to rapid changes in environmental oxygen. From these measurements, it is concluded that without the use of external procedures to reduce the dissolved oxygen concentration in the medium its adaptation to environmental oxygen concentration is too slow, fact that in a real assay could lead to errors in the results.

Keywords

Microfluidics, Oxygen Sensors, Xurography, COP/COC, Hypoxia, In vitro testing, Animal testing

Objetivos

El principal objetivo de este proyecto es el desarrollo de un dispositivo microfluídico con capacidad de monitorización de oxígeno para su uso como plataforma de cultivo celular dentro del marco de los modelos *OoC* en el campo de la biomedicina.

Motivación

La microfluídica trae ciertas ventajas al mundo de la biomedicina, y específicamente los modelos *OoC* suponen un gran avance con el fin de evitar el uso de modelos animales: No solo son capaces de reproducir la jerarquía celular de distintos tejidos biológicos, sino también de simular las condiciones fisiológicas al aplicar estímulos eléctricos, mecánicos o químicos a las células estudiadas. A raíz de esto, este proyecto posee 2 motivaciones principales: Por un lado, el gran abanico de aplicaciones que la microfluídica tiene en el ámbito de la biomedicina a modo de plataformas automatizadas para cultivos celulares y de modelos *OoC* y, por el otro, el estudio de una de las principales alternativas al uso de modelos animales en la práctica científica

Alcance

El dispositivo microfluídico desarrollado en este proyecto deberá ser completamente funcional, además de cumplir los requisitos de fabricación y de uso establecidos. Así, el alcance de este proyecto será el desarrollo de un proceso de fabricación reproducible, la realización de unas pruebas de validación seleccionadas para estudiar su robustez y la fiabilidad en su uso y la obtención de resultados experimentales. Este ensayo consistirá en un estudio de la evolución y del tiempo de adaptación de la concentración de oxígeno de las muestras en distintos ambientes, simulando lo que ocurre durante un ensayo de hipoxia. De aquí se pretenden extraer conclusiones relevantes sobre los protocolos seguidos para el desarrollo de estos estudios.

Resultados

Del desarrollo de las 3 pruebas de validación se observa que el dispositivo creado es robusto, biocompatible y fiable: Aguanta una presión interna de hasta 2 bar, no produce citotoxicidad en un cultivo celular de la línea Caco-2 y sus sensores mantienen la misma capacidad de medida original. Se trata así de un dispositivo en TRL-4 tras haber sido validado en laboratorio. Tras el desarrollo del estudio experimental en condiciones de normoxia e hipoxia con muestras tanto líquidas (medio de cultivo) como gaseosas (aire) se concluye que en el caso de utilizar muestras líquidas existe un tiempo de adaptación de 17 horas como mínimo para llegar a las condiciones ambientales requeridas, e incluso tras este tiempo la concentración ambiental de 1% no se alcanza (se queda en 4%). Es por eso por lo que para obtener resultados correctos y reproducibles los ensayos en hipoxia deberían tener una duración considerablemente mayor a las 17 horas que duró el estudio en este proyecto.

Lista de Figuras

Fig. 1.1. Gráfica que muestra el número de animales utilizados por primera vez con fines de investigación y ensayo en el año 2017 en la UE. Extraído de [1].	10
Fig. 2.1. Dispositivo LoC para el tratamiento total de una muestra de sangre desarrollado por Micronics inc.	19
Fig. 2.2. Esquema que muestra las ventajas y desventajas del uso de la microfluídica como plataforma de cultivos celulares in vitro. Extraído de [15].	20
Fig. 2.3. Lung on a Chip: Dispositivo microfluídico que asemeja el comportamiento de la barrera aire/sangre pulmonar. Extraído de [17].	21
Fig. 3.1. Proceso de creación de la réplica negativa (litografía blanda) a partir del molde maestro fabricado por fotolitografía. Extraído de [19] y [20].	24
Fig. 3.2. Proceso de estampación de material tras el proceso de litografía blanda. Con el molde réplica fabricado por litografía blanda se estampa material sobre una oblea de silicio (I) tras lo cual se puede o bien realizar procesos de etching (II) o bien realizar deposición de material (II). Extraído de [19].	24
Fig. 3.3. Esquema del proceso de Hot Embossing. Fuente.	25
Fig. 3.4. Comparación de los resultados obtenidos mediante litografía blanda (PDMS CHIP) y Soft Embossing (FLEXDYM CHIP) con el uso de un sello de Metacrilato (METHACRYLATE MOLD). Extraído de [27].	26
Fig. 3.5. Esquema del montaje utilizado para realizar un moldeo por micro – inyección. El polímero fundido se introduce en un extrusor que lo inyecta a alta presión en la cámara del molde, que posee control de temperatura para un calentamiento y enfriamiento controlado de la pieza. Una bomba de vacío evita la aparición de burbujas de aire o el llenado incompleto de la cavidad. Extraído de [25].	27
Fig. 3.6. Configuraciones de los sistemas de SLA: Superficie libre (izq.) y Superficie restringida (drcha.). Extraído de [30].	27
Fig. 3.7. Estructura de un sistema de impresión por inkjet. Extraído de [29].	28
Fig. 3.8. Esquema de un sistema de impresión FDM. Extraído de [30].	28
Fig. 3.9. Ejemplo de plotter de corte, equipo utilizado en la Xurografía. Fuente.	29
Fig. 3.10. Ejemplo de los resultados obtenidos por medio del uso de la Xurografía en distintas geometrías: Canales rectos, relieves y serpentines. Extraído de [32].	29
Fig. 3.11. Ejemplo de un proceso de laminación posterior al corte de las capas mediante Xurografía. Extraído de [34].	30
Fig. 3.12. Dispositivo microfluídico para electroforesis fabricado con PMMA y proceso de fabricación seguido para su obtención. Extraído de [40].	32
Fig. 3.13. Ejemplo de chip microfluídico fabricado en PDMS con bomba de flujo manual y el proceso de fabricación seguido. Extraído de [45].	33
Fig. 3.14. Micromezclador 3D fabricado en PS por Xurografía y Laminación por unión térmica. A la derecha se pueden ver las capas que conforman el dispositivo y la geometría 3D que se forma tras su unión. Extraído de [53].	34
Fig. 3.15. Dispositivo microfluídico fabricado en PC para el completo tratamiento de muestras de ácidos nucleicos. Extraído de [60].	35
Fig. 3.16. Dispositivo microfluídico fabricado en COC mediante Xurografía y Laminación. Extraído de [71].	36
Fig. 3.17. Esquema del proceso de fabricación seguido para la fabricación del dispositivo microfluídico de COC por Hot Embossing de Jeon y su equipo. Extraído de [72].	39
Fig. 3.18. Plataforma de cultivo celular in vitro fabricada por Jeon y su equipo. Extraído de [72].	39
Fig. 4.1. Producto de la empresa BEOnChip. De izquierda a derecha: BE-Flow, BE-Doubleflow, BE-Transflow y BE-Gradient. Fuente: BEOnChip.	42
Fig. 4.2. Dispositivo BE-Flow de la empresa BEOnChip (izq.) y modelo virtual mostrando las distintas capas de las que se compone (drcha.). Fuente.	43
Fig. 4.3. Dispositivo BE-Flow con un equipo de flujo conectado a las conexiones roscadas. Fuente: BEOnChip.	43
Fig. 4.4. Ejemplo del uso de un dispositivo microfluídico de BEOnChip en el estudio de la citotoxicidad de distintos métodos de entrega de la proteína TRAIL: Método convencional (sTRAIL, soluble) y con nanopartículas lipídicas (LUV-TRAIL). Extraído de [78].	44
Fig. 4.5. Línea de sensores SensorPlug (izq.), O ₂ SensorPlug (centro) y su modelo 3D mostrando sus dos componentes (drcha.). Fuente.	45
Fig. 4.6. Detalle del Plug y de sus conexiones.	45

Fig. 4.7.. Esquema del fenómeno de quenching dinámico de luminiscencia que ocurre en los sensores para la detección del oxígeno molecular. (1) En la ausencia de O ₂ molecular, toda la luz absorbida por el sensor es emitida de vuelta. (2). En la presencia de oxígeno, la luz absorbida por el sensor es transmitida al O ₂ , de modo que no es emitida de vuelta. Fuente.	46
Fig. 4.8. Equipo OXY-4 ST (G3) de la empresa PreSens. Fuente: Anexo I.....	47
Fig. 4.9. POF de la empresa PreSens. Fuente: Anexo I.....	48
Fig. 4.10. Ejemplo del uso de los SensorPlug, en este caso de CO ₂ y pH, en un modelo de inflamación de la microglía. Fuente: [84].	48
Fig. 4.11. Equipo de corte por láser de CO ₂ Liaocheng City Hengchunyuan Machinery Equipment Co., Ltd FL-K40. Fuente.	50
Fig. 4.12. Equipo SLA FormLabs Form 2. Fuente.....	50
Fig. 4.13. Plotter de corte GRAPHTEC FC8600. Fuente.....	50
Fig. 4.14. Plancha de transferencia o termocompresora manual GEO Knight DC8. Fuente.....	51
Fig. 4.15. Cámara de flujo laminar Telstar Bio II Advance Plus. Fuente.....	51
Fig. 4.16. Equipo de tratamiento con plasma de O ₂ Diener ATTO. Fuente.....	52
Fig. 4.17. Cámara de incubación o biorreactor de perfusión EBERS TEB1000. Fuente.....	52
Fig. 4.18. Útil de taladrado fabricado en PMMA (izq.) y su modelo virtual con las piezas de inyección colocadas en su lugar y preparadas para ser taladradas (drcha.).	54
Fig. 4.19. Esquema mostrando la comparación del diámetro del SensorSpot (1.9 mm) y del ancho de los canales original (1.5 mm, izq.) y modificado (2.2 mm, drcha.) para permitir su entrada en ellos.	55
Fig. 4.20. Esquema del uso de la superficie no cubierta por el SensorSpot.	55
Fig. 4.21. Útil de liberación del Spot fabricado en PMMA (izq.); Modelo virtual del útil de liberación del Spot con las piezas de inyección y los aplicadores colocados en su lugar para proceder a introducir los SensorPlug (centro); Aplicador y su método de uso (drcha.).	56
Fig. 4.22. Modelo virtual explosionado del prototipo ensamblado mediante el proceso de unión por adhesivo (izqda.) y zum del ensamblaje final y la posición relativa del SensorPlug con respecto a las demás capas del BE-Flow (drcha.).	57
Fig. 4.23. Modelo virtual explosionado del prototipo ensamblado mediante el proceso de unión por termocompresión, resaltando el posicionamiento de las capas de COC hibridado, con el compuesto siliconado (rojo) hacia abajo (sup.) y zum del ensamblaje final y la posición relativa del SensorPlug con respecto a las demás capas del BE-Flow (inf.).	58
Fig. 4.24. Forma de los agujeros estructurados en el espaciador de compuesto siliconado. Se puede ver que el SensorPlug hace tope en las zonas señaladas con flechas, por lo que su introducción queda limitada por esta superficie.	59
Fig. 4.25. Prototipo desarrollado mediante el proceso de unión con adhesivo (izq.) y su modelo virtual (drcha.). Se destacan las zonas de aparición de burbujas derivadas del uso de adhesivos.....	59
Fig. 4.26. Prototipo desarrollado mediante el proceso de unión por termocompresión (sup.) y su modelo virtual (inf.).	60
Fig. 4.27. Montaje del SensorPlug una vez el BE-Flow se encuentra totalmente ensamblado. El montaje se lleva a cabo dentro de la campana de flujo laminar.....	61
Fig. 4.28. Composición final del dispositivo diseñado. De izquierda a derecha: Pieza de inyección taladrada, Espaciador siliconado, Canales de COC híbrido y Base de COP.....	61
Fig. 4.29. Ejemplo del monocapa celular recién adherido, al inicio de la incubación con medio de cultivo.	63
Fig. 4.30. Imágenes de fluorescencia tomadas en los 3 cultivos celulares (A: control, B: Balancín, C: Estático) estudiados a las 24 horas de su cultivo. De arriba a abajo se puede ver: Imagen combinada de los 3 canales de emisión (azul, verde y rojo); Emisión de la calceína, indicando las células vivas; Emisión del yoduro de propidio, indicando las células muertas.	64
Fig. 4.31. Resultados del ensayo de viabilidad. Se compara el % Área con respecto al total ocupado por las células vivas (verde) y muertas (rojo) en los 3 dispositivos estudiados: Control (control rocker), Balancín (Sensor rocker) y Estático (Sensor static).	64
Fig. 4.32. Montaje experimental utilizado para las mediciones con el dispositivo modificado, indicando cada parte del que éste se compone.....	65
Fig. 4.33. Esquema del proceso seguido para llevar a cabo la medición.	66
Fig. 4.34. Gráfica que muestra la concentración de oxígeno de las diferentes muestras con el SensorPlug introducido en el dispositivo: Aire (azul), Agua (naranja), PBS (gris) y Medio de cultivo (amarillo).	66
Fig. 4.35. Montaje experimental utilizado para las mediciones con el sensor externo, indicando cada parte del que éste se compone.	67

Fig. 4.36. Gráfica que muestra la concentración de oxígeno de las diferentes muestras medidas con un SensorPlug externo: Aire (azul oscuro), PBS (verde).	68
Fig. 4.37. Gráfica comparativa de la concentración de oxígeno de las diferentes muestras medidas con un SensorPlug externo (Aire (azul oscuro), PBS (verde)) y con un SensorPlug introducido en el dispositivo (Aire (azul claro), PBS (naranja)).	68
Fig. 4.38. Montaje experimental utilizado en el ensayo de hipoxia, indicando cada parte del que éste se compone.	70
Fig. 4.39. Gráfica de la evolución de la concentración de oxígeno de las diferentes muestras (Aire y Medio de cultivo) en normoxia e hipoxia.	71
Fig. 4.40. Gráfica que muestra la evolución de la concentración de oxígeno de las diferentes muestras (Aire en naranja y Medio de cultivo en amarillo) en ambiente de hipoxia.	71
Fig. 4.41. Gráfica que muestra la evolución de la concentración de oxígeno de las diferentes muestras (Aire en azul y Medio de cultivo gris) en ambiente de normoxia.	72
Fig. 4.42. Imágenes tomadas durante el transcurso del protocolo de reutilización, correspondientes a la introducción de la solución de etanol al 70% en los canales a reutilizar.	73
Fig. 4.43. Gráfica que muestra la concentración de oxígeno de las diferentes muestras medidas en el ensayo de reutilización: Aire (azul), Agua (naranja), PBS (gris) y Medio de cultivo (amarillo).	74
Fig. 4.44. Comparación del %O ₂ en las muestras antes y después de aplicar el protocolo de reutilización de dispositivo.	75
Copia de Fig. 5.1. Gráfica de la evolución de la concentración de oxígeno de las diferentes muestras (Aire y Medio de cultivo) en normoxia e hipoxia.	79

Lista de Tablas

Tabla 3.1. Comparación de las propiedades físicas más relevantes de los materiales estudiados.	37
Tabla 4.1. Medidas del Plug y del SensorSpot, tanto las aportadas por el proveedor (Plano) como las tomadas mediante microscopía (Medida Microscopio). A la derecha se encuentra la leyenda de las medidas.	46

Abreviaturas y Símbolos

ABS: Acrilonitrilo Butadieno Estireno.	PC: Policarbonato.
CAD: <i>Computer Aided Design</i> (Diseño Asistido por Ordenador).	PCR: <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa).
CNC: <i>Computer Numerical Control</i> (Control Numérico).	PDMS: Polidimetilsiloxano.
COC: <i>Cyclic Olefin Co-polymer</i> (Copolímero de olefina cíclica).	PE: Polietileno.
COP: <i>Cyclic Olefin Polymer</i> (Polímero de olefina cíclica).	PET: Tereftalato de polietileno.
DMD: <i>Digital Micromirror Device</i> (Dispositivo Digital de Microespejos).	PLA: Ácido Poliláctico.
E: Módulo de Young.	PMMA: Polimetilmetacrilato.
FDM: <i>Fused Deposition Modelling</i> (Modelado por Deposición Fundida).	PoC: <i>Point of Care</i> (Punto de Atención).
GBM: Glioblastoma Multiforme.	POF: <i>Polymer Optic Fibre</i> (Fibra Óptica Polimérica).
LED: <i>Light Emitting Diode</i> (Diodo Emisor de Luz).	PS: Poliestireno.
LoC: <i>Lab on a Chip</i> (Laboratorio en un Chip).	PSA: <i>Pressure Sensitive Adhesive</i> (Adhesivo Sensible a la Presión).
MEMS: <i>Microelectromechanical Systems</i> (Sistemas Microelectromecánicos)	SLA: <i>Stereolithography</i> (Estereolitografía).
MMA: Metilmetacrilato.	TME: <i>Tumour Microenvironment</i> (Microambiente Tumoral).
OoC: <i>Organ on a Chip</i> (Órgano en un Chip).	µTAS: <i>Micro Total Analysis Systems</i> (Microsistemas de análisis total).

Capítulo 1. Introducción.

Sin duda, uno de los campos que más desarrollo ha sufrido en el último siglo ha sido el de la medicina. Los avances tecnológicos actuales han permitido el desarrollo de nuevos tratamientos, medicamentos, productos y protocolos de higiene, cada vez con tiempos de desarrollo menores obteniendo resultados igualmente satisfactorios (tal y como se ha visto durante la actual pandemia de la COVID-19 en el desarrollo de las distintas vacunas) y consiguiendo que la salud global y la esperanza de vida mejoren de manera considerable.

Este desarrollo incansable está a cargo de campos científicos como son la química o la biología. Estos campos están constantemente estudiando la aplicación de nuevos compuestos naturales y sintéticos para el tratamiento de distintas afecciones, intentando encontrar alternativas que solucionen problemas específicos. No obstante, con el fin de certificar que los tratamientos ideados funcionen correctamente en sujetos humanos, anteriormente han de pasarse distintas pruebas de validación de modo que se vea que éstos no resultan tóxicos o incluso mortales para el organismo.

Es aquí donde aparece uno de los mayores dilemas morales y éticos de la práctica científica: La experimentación animal. En el año 2017, un estudio estadístico de la UE reveló que un total de 9.388.162 modelos animales habían sido utilizados ese año por primera vez con fines de investigación y ensayo [1] destacando el uso de modelos murinos (Fig. 1.1). Si bien esta cantidad resultaba menor que en el año 2016, su magnitud no evita cuestionarse si este tipo de prácticas son éticamente correctas incluso con el fin que poseen, dadas las situaciones en las que estos animales se ven involucrados o sus condiciones de vida. Es tal el problema que existe que diversas organizaciones mundiales han regulado estas prácticas, incluyendo como uno de los puntos de sus proyectos estratégicos la reducción del uso de modelos animales para fines científicos.

Como respuesta a este dilema, otro tipo de estudios se han comenzado a desarrollar como alternativas viables o complementarias a la experimentación animal. Es el caso de los ensayos *in vitro*, que en contraposición con los ensayos *in vivo* en animales abogan por el uso de cultivos celulares sintéticos para el estudio de nuevos tratamientos médicos o del comportamiento celular en general. Estas prácticas no son tan nuevas como se esperaría, pues llevan décadas llevándose a cabo en el campo biológico y actualmente forman parte de todos los procesos de validación de nuevos tratamientos. Sin embargo, no llegan a sustituir totalmente a la experimentación animal debido a la dificultad de desarrollar de manera sintética tejidos u órganos biológicos, evitando que se obtengan resultados concluyentes.

Es en este ámbito donde el uso de la microfluídica resulta cada vez más interesante. Contando con infinitud de aplicaciones en distintos ámbitos, uno de los más relevantes en la actualidad es su uso como plataforma de cultivo celular para el desarrollo de ensayos *in vitro*. Aquí, la cantidad de publicaciones sobre el uso de la microfluídica ha aumentado un 250% en los últimos 10 años, poseyendo un crecimiento constante en respuesta a su utilidad como plataformas de cultivo celular. La microfluídica aportaría muchas ventajas al campo de los ensayos *in vitro*, sobre todo en lo referente al control de las condiciones de ensayo, a la capacidad de organizar distintos tejidos de forma jerárquica para asemejar en modelos de laboratorio el comportamiento fisiológico de distintos órganos humanos o animales, o la capacidad de crear ambientes biomiméticos aplicando estímulos de distintos tipos a las células estudiadas. Se crea así el concepto del *OoC* (Órgano en un chip, haciendo referencia a un dispositivo microfluídico de pequeño tamaño).

Este concepto, de llegarse a desarrollar en su totalidad, podría suponer el fin de la experimentación animal tal y como se conoce. Es por eso por lo que se está invirtiendo mucho en él, tal y como muestra el incremento exponencial en las publicaciones sobre el tema. Además, este incremento es aún mayor desde la regulación del uso de modelos animales para la experimentación por parte de la UE en 2010 [2], lo que reflejaría una búsqueda activa de alternativas a este tipo de prácticas. Por otro lado, tal y como se indica en el informe de mercado sobre el *OoC* llevado a cabo por Allied Market [3], se espera que el valor de este campo sufra un crecimiento entre los años 2016 y 2023 desde los 5 millones de dólares hasta los 170 millones de dólares, respectivamente, siendo así un campo con un horizonte muy prometedor.

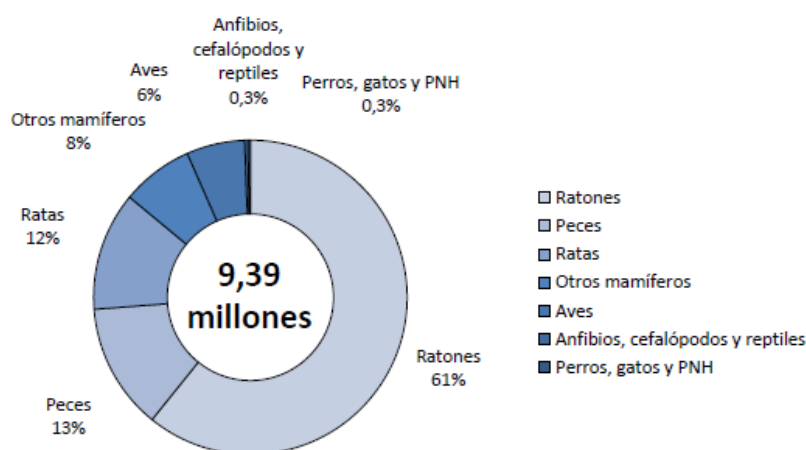


Fig. 1.1. Gráfica que muestra el número de animales utilizados por primera vez con fines de investigación y ensayo en el año 2017 en la UE. Extraído de [1].

Partiendo de lo anterior, en el presente trabajo se desarrollarán estos temas más a fondo. Se expondrá inicialmente un breve resumen sobre la historia de la experimentación animal mundial, presentando distintas iniciativas para reducir el uso de estos modelos de laboratorio y centrándose en la experimentación *in vitro*.

Se introducirá el campo de la microfluídica como plataforma de experimentación *in vitro*, hablando brevemente sobre la evolución de este concepto desde sus inicios y las principales características que poseen los fluidos a la escala micrométrica en comparación con sus propiedades macroscópicas. Se tratarán sus aplicaciones actuales en los distintos ámbitos científicos, destacando su uso en el campo de la biomedicina como plataformas de cultivo celular. Se pasará a estudiar con mayor detalle los distintos métodos de fabricación utilizados para el desarrollo de este tipo de dispositivos, así como los materiales más utilizados para ello. Se excluirán de este análisis los dispositivos basados en papel al basarse en unos conceptos de funcionamiento y de fabricación diferentes, centrándose únicamente en los dispositivos poliméricos.

Finalmente se explicará paso a paso el desarrollo de un dispositivo microfluídico novedoso con capacidad de monitorización de oxígeno en la empresa BEOChip de Zaragoza. Se comenzará con una breve presentación de las empresas a partir de cuyos productos se desarrolla el dispositivo, analizando detenidamente cada uno de estos productos y estudiando algunos ejemplos sobre su uso. Se estudiará posteriormente el proceso de fabricación y validación del dispositivo, finalizando con su uso en pruebas experimentales enfocadas principalmente al análisis de la adaptación del medio celular ante un cambio brusco en la concentración de oxígeno ambiente.

Se concluirá el proyecto con una discusión sobre los resultados obtenidos en las pruebas experimentales y su repercusión, extrayendo finalmente una serie de conclusiones de todo el proceso de fabricación. Se indicarán posibles líneas de investigación futuras a partir de las cuales desarrollar más el dispositivo creado, haciendo hincapié es el desarrollo de métodos de fabricación más fiables, eficientes y reproducibles para conseguir mejores resultados y así ampliar su espectro de aplicación.

Capítulo 2. Contexto Histórico.

2.1. Breve historia de la experimentación animal:

El uso de modelos animales para la experimentación científica es algo que se lleva haciendo desde tiempos inmemoriales. Los primeros registros sobre el uso de animales para la experimentación científica datan del 500 A. C., en la Antigua Grecia, donde se realizaban vivisecciones con el fin de comprender los mecanismos y las funciones de los organismos vivos [4], [5]. A partir de aquí, la creencia de la superioridad del ser humano y de la incapacidad de los animales para sentir llevó a su uso indiscriminado con el fin de desarrollar el conocimiento científico. Célebres científicos y filósofos hacían uso de modelos animales con fines científicos: Francis Bacon (1561 – 1626) defendía el uso de la vivisección como método de aprendizaje científico [5] o René Descartes (1596 – 1650) llevaba a cabo vivisecciones indicando que si bien los animales podían sentir o sufrir, no podían experimentar de manera consciente esos sentimientos al no razonar, considerándolos “autómatas” o “mecanismos vivientes” [4], [5]. A lo largo del renacimiento, los animales eran así tratados como instrumentos al servicio del conocimiento humano, con los cuales se podía actuar como se quisiera. No obstante, era reconocido que la crueldad hacia los animales podría llevar finalmente a la crueldad hacia los seres humanos, siendo Tomás de Aquino (S. XIII) o Kant (1724 – 1804) defensores de este precepto [5]. Aun así, el uso de modelos animales llevó en esas épocas al descubrimiento de grandes hitos de la anatomía humana, como fue el caso de William Harvey (1578 – 1657) y su descripción del circuito circulatorio, así como el descubrimiento de que la sangre era bombeada por el corazón y no por los pulmones [4], [5]. Fue en esta época cuando Johann Wepfer (1620 – 1695) comenzó con el desarrollo de estudios en animales sobre la toxicidad de ciertas sustancias [5]. A partir de este punto, la utilidad de los modelos animales en la investigación científica comenzó a ser demostrada, pese a la existencia de figuras importantes como Jean Riolan, Jr (1580 – 1657) o Edmund O’Meara (1614 – 1681), que afirmaban que la tortura a la que se sometía a los animales alteraba los resultados obtenidos, invalidándolos [6]. Así, destacarían personalidades como Claude Bernard (1813 – 1878), fiel defensor de la experimentación animal y uno de sus mayores promotores, y Louise Pasteur (1822 – 1895), siendo este último conocido principalmente por la *pasteurización* o por el estudio y tratamiento de diversas enfermedades infecciosas (por ejemplo, la rabia). Hitos posteriores conseguidos por medio de estas prácticas fueron, por ejemplo, el desarrollo de los sistemas de diálisis, la quimioterapia, la radioterapia o ciertos avances en cirugía, lo que contribuye a la salvación de un número incontable de vidas humanas.

No obstante, la historia no ha estado exenta de movimientos en contra de la vivisección animal y de su uso para el desarrollo médico. A partir del S. XVIII comienza a cuestionarse de manera ética el uso de modelos animales a manos de filósofos como Voltaire (1694 – 1778), Rousseau (1712 – 1778) o Schopenhauer (1788 – 1860), quienes criticaban el uso de animales como un medio para un fin [5]. Posteriormente, diversos grupos anti-vivisección fueron creados en todo el mundo, como lo son la Sociedad Americana para la Prevención de la Crueldad Animal creada en los Estados Unidos en 1860 y la Sociedad Nacional Anti-Vivisección creada en Inglaterra en 1875, aún sin conseguir un gran impacto pese a la convocatoria de una gran cantidad de manifestaciones a lo largo de los SS. XIX y XX.

No fue hasta la publicación de *Liberación Animal* en 1975 por parte del filósofo australiano Peter Singer y de *La teoría de los derechos animales* de Tom Regan en 1983 cuando se comenzó a tomar este debate más en serio, creándose la ética animal como tal [5]. El paso final antes de la regulación mundial de estas prácticas se dio en el S. XX a través de la publicación del libro *The Principles of Humane Experimental Technique*: el principio de las 3 R (Reemplazar, Reducir, Refinar), que posteriormente se convertiría en una de las directrices de calidad básicas en la ciencia y uno de los principios reguladores del uso de modelos animales en la experimentación [5].

2.2. EL principio de las 3R:

El principio de las 3Rs es uno de los preceptos más sencillos y relevantes de la práctica científica. Nacido de las manos de William Russel y Red Burch en 1959 [7], no tarda mucho en convertirse en uno de los aspectos más importantes de calidad científica, así como de una base para la reducción del uso de modelos animales en los laboratorios mundiales. Este principio sienta las bases para lo que posteriormente serían las legislaciones mundiales que regulan la experimentación animal. El principio de las 3 R hace referencia a 3 conceptos: Reemplazar, Reducir y Refinar [8].

- **Reemplazar:** Búsqueda de métodos que eviten o sustituyan el uso de animales, principalmente de animales vertebrados.
- **Reducir:** Búsqueda de estrategias para conseguir resultados suficientes con el uso de un menor número de modelos animales. Se busca también maximizar la información obtenida de cada uno de los modelos utilizados.
- **Refinar:** Búsqueda de mejora en las prácticas científicas que posean como fin una reducción del dolor sufrido por los animales durante los experimentos, así como una mejora en sus condiciones de vida dentro del laboratorio.

Si bien todos los conceptos son igual de relevantes, Russel y Burch ya indican en su libro *The Principles of Humane Experimental Technique* que “solo el refinamiento no es suficiente, y debería priorizarse la reducción y, si es posible, el reemplazo.”. Así, uno de los principales retos del uso de este principio es la búsqueda de alternativas viables para la experimentación animal.

2.3. Legislaciones actuales de la experimentación animal:

Según el continente, las legislaciones que regulan la experimentación animal son diferentes. Así, destacan las legislaciones seguidas en Europa y en los Estados Unidos:

- **DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos** [2], en el que la UE establece el uso del principio de las 3R y en el que se establecen los tipos de animales que pueden ser utilizados, cómo deben ser utilizados y las condiciones en las que deben mantenerse.

- **Animal Welfare Act (AWA)**, ley federal firmada en 1966 que regula el uso de todo tipo de animales en cualquier tipo de actividades,

2.4. Alternativas a la experimentación animal. *In vitro* vs. *In vivo*:

Diversas alternativas han sido propuestas al uso de modelos experimentales animales, si bien se ha estipulado que actualmente el uso de modelos animales es indispensable para el desarrollo biomédico humano bajo unas estrictas regulaciones [2]. Entre estas alternativas se pueden encontrar principalmente 2 grupos [7]:

- **Ensayos *in silico***: Ensayos computacionales llevados a cabo con el uso de ordenadores. En estos ensayos, con el uso de distintos softwares o tecnologías como la inteligencia artificial o el machine learning, por ejemplo, puede llegarse a estudiar la respuesta de estructuras o tejidos biológicos (como pueden ser huesos, músculos e incluso células). Los métodos *in silico* suponen una alternativa práctica al uso de modelos animales, teniendo un control absoluto de las condiciones en las que se realiza los cálculos computacionales. Aún así, en su estado actual no podrían llegar a sustituirlos ya que su implementación y los datos obtenidos con ellos debe estar basada y contrastada con datos experimentales, obtenidos normalmente con el uso de modelos animales, humanos y por medio de estudios clínicos.
- **Ensayos *in vitro***: Ensayos que se basan en el cultivo de células extraídas tanto de humanos como de animales para así estudiar su respuesta a distintos entornos y estímulos en lugar de utilizar modelos animales. Su aplicación comenzó a mediados del S. XX, sin embargo, posee como principal inconveniente la poca complejidad que poseen los cultivos celulares tradicionales, que normalmente son cultivos 2D y que no se asemejan a las estructuras 3D jerárquicas del organismo humano. Aun así, si bien actualmente no suponen una alternativa a los ensayos animales, son un requisito previo indispensable para pasar al desarrollo de ensayos animales.

Centrándose únicamente en los ensayos *in vitro* como alternativa al resultar más interesante para este proyecto, se pueden encontrar diversas ventajas de su uso en comparación con los modelos animales [9]:

- No producen daño animal.
- Se obtienen resultados reproducibles.
- Acceso no invasivo a las células sujetas a estudio.
- Se reduce el uso de reactivos y el tamaño de muestras.
- Mayor control y facilidad en el desarrollo de los estudios.
- Métodos de ensayo más eficientes y robustos.

Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, la principal desventaja de los modelos *in vitro* es la falta de complejidad que los cultivos celulares poseen, no siendo capaces de reproducir la jerarquía que poseen los tejidos biológicos. Una alternativa reciente a los cultivos celulares *in vitro* tradicionales, con aplicaciones no solo en el ámbito biológico sino también en el químico o en la industria farmacéutica, es la microfluídica. Este campo ha sufrido un desarrollo exponencial en las últimas décadas, sobre todo en lo referente a su aplicación como plataformas de cultivo celular o como alternativa al uso de modelos animales. Específicamente, el uso de los denominados *Organ on a Chip (OoC)* podrían llegar a suponer una revolución en el uso de los ensayos *in vitro* frente a los modelos animales, ya que con ellos se pueden llegar a desarrollar estructuras 3D que gozan de gran complejidad además de poder reproducir unas condiciones ambientales biomiméticas mediante la aplicación de estímulos de distintos tipos.

2.5. Microfluídica:

La microfluídica es el estudio del comportamiento y de la manipulación de pequeños volúmenes de fluidos (líquidos o gases) a través de conductos o canales con al menos una de sus dimensiones menor a 1 mm, es decir, en el rango de los micrómetros.

El concepto de microfluídica nace de la industria de la microelectrónica, en una época en la que las ventajas vistas en la reducción del tamaño de los componentes electrónicos en cuanto a robustez y coste se querían extrapolar a otros campos de investigación [10]. Fue así como en el año 1979, Terry y su equipo desarrollaron lo que ahora se conoce como el primer dispositivo LoC: Un cromatógrafo de gases fabricado sobre una oblea de silicio [11]. Es a partir de este momento cuando se comienza a investigar más a fondo en este campo científico, tras observar las principales ventajas o diferencias que un sistema microfluídico posee con respecto a uno macroscópico. Y es que un fluido fluyendo a través de un conducto microscópico no se comporta exactamente igual a lo que se observa normalmente.

Se analizarán a continuación las principales diferencias entre un sistema microfluídico y uno macroscópico, para pasar finalmente a analizar las principales aplicaciones que estos dispositivos poseen en el mundo actual.

2.5.1. Características de la microfluídica:

Los microfluidos poseen características muy interesantes y atractivas con respecto a los macrofluidos. Las principales diferencias se pueden encontrar en:

- **Régimen de flujo:** El régimen de un fluido hace referencia a la forma en la que éste se mueve: Su perfil de velocidades, la aparición de vórtices o de zonas de recirculación, entre otros. Para diferenciar entre los distintos regímenes de flujo se tiene el número de Reynolds, un número adimensional que hace referencia al cociente entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas que sufre un fluido a su paso a través de un conducto determinado. Matemáticamente, este número se representa de la siguiente manera (Ecuación 1):

Ecuación 1. Número de Reynolds.

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

Donde ρ es la densidad del fluido, v su velocidad, L es su longitud característica (Diámetro del canal cilíndrico) y μ es la viscosidad del fluido. El número de Reynolds se utiliza para distinguir flujos en los que domina el término viscoso o el término inercial, denominados flujos de régimen laminar o flujos de régimen turbulento (respectivamente), o bien una combinación de ambos (flujo transitorio). La ventaja de la microfluídica en este aspecto reside en que, al tratar con dimensiones muy bajas, el término L de la Ecuación 1 decrece: La influencia de las fuerzas inerciales es mucho más baja, dominando así las fuerzas viscosas. Se trata en microfluídica con regímenes laminares, flujos matemáticamente mucho más predecibles y modelables [10], [12]. Por ejemplo, se puede dar la aparición de flujos de Poiseuille, flujos muy sencillos y con un perfil de velocidades conocido.

- **Difusión:** La difusión hace referencia al transporte de masa en el seno de uno o más fluidos. Haciendo referencia a este proceso se encuentra el número de Peclet (Ecuación 2).

Ecuación 2. Número de Peclet.

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

Donde v es la velocidad del flujo, L es la longitud característica y D es el coeficiente de difusión. El número de Peclet representa el cociente entre el tiempo para el transporte convectivo y el tiempo para el transporte difusivo [13]. A partir de esto se puede observar que en sistemas donde la dimensión L es muy baja, al igual que en el número de Reynolds, el transporte convectivo pierde fuerza frente al transporte difusivo, indicado por la D . Se puede concluir así que en los sistemas microfluídicos el transporte de masa dentro del sistema ocurre principalmente por difusión y no por convección.

- **Mezcla de especies:** Al tratarse de un sistema con un régimen puramente laminar y en el que el transporte de especies es puramente difusivo, la mezcla de especies ocurre a baja velocidad [13]. Esto es muy relevante de cara al uso de la microfluídica en ensayos en los que 2 o más especies químicas deben mezclarse con rapidez, casos en los que se diseñan canales con geometrías que fomenten el mezclado difusivo o que fuercen el mezclado convectivo. No obstante, resulta muy interesante a la hora de controlar la localización y la velocidad de las reacciones químicas.
- **Tensión superficial y capilaridad:** La tensión superficial (Ecuación 3) es la energía requerida para la creación de áreas de contacto o interfaces entre distintas especies.

Ecuación 3. Tensión superficial en una superficie esférica.

$$\gamma = \frac{\Delta P}{R}$$

Donde ΔP la diferencia de presión entre las dos fases y R es el radio de la esfera. En dimensiones muy pequeñas de R la tensión superficial se convierte en una fuerza muy relevante, lo que es especialmente importante a la hora de crear emulsiones en las que se forman gotas o burbujas dentro de un medio bifásico. Aquí, una alta tensión superficial indicaría una gran estabilidad de las gotas generadas, permitiendo además llevar a cabo un control muy fino de su tamaño en función de la diferencia de presión entre las fases. Se crean así emulsiones muy monodispersas [10], [13]. Por otro lado, un aspecto muy interesante es la capilaridad: Al poseer canales de dimensiones tan reducidas, las fuerzas capilares comienzan a dominar a las de la gravedad, permitiendo a los líquidos fluir a través de los canales o materiales porosos sin la necesidad de bombas [10].

Por otro lado, al margen de las diferencias en el comportamiento de los microfluidos con respecto a los macrofluidos, el desarrollo de dispositivos que hagan uso de estas características también conlleva una serie de ventajas:

- **Volumen de reactivos reducido:** Uno de los aspectos más importantes de la microfluídica es el manejo de volúmenes reducidos para la obtención de resultados similares o mejores debido al mayor control que se tiene del flujo y de las reacciones que en él ocurren. El uso de menos volumen de reactivos puede conllevar una reducción considerable en la inversión necesaria para el desarrollo de ciertas actividades, sobre todo en el campo farmacéutico y bioquímico [10], [12].
- **Automatización y paralelización:** Al tratarse de sistemas tan reducidos, compactos y autocontenidos, la capacidad de automatización y paralelización de los procesos conseguidos es mucho mayor.
- **Portabilidad:** Al tratarse de dispositivos tan reducidos, compactos y autocontenidos se incrementa su portabilidad. Este aspecto resulta muy interesante para el desarrollo de sensores o dispositivos *Point of Care (PoC)*, uno de los grandes campos de aplicación de la microfluídica y de los sistemas *Lab on a Chip (LoC)*.

- **Menor coste de fabricación:** Al contar con una menor cantidad de componentes y, en total, de un menor tamaño, los costes de fabricación relacionados a la microfluídica son mucho menores.

No obstante, si bien la microfluídica trae consigo muchas ventajas, lo cierto es que su aplicación en el mundo real aún es muy limitada, quedándose en la mayoría de los casos en el ámbito académico debido a una falta de estándares de fabricación o a la falta de desarrollo de aplicaciones realmente útiles que sustituyan o complementen procesos específicos ya existentes [10], [14].

2.5.2. Aplicaciones principales:

Las distintas características de los microfluidos analizadas anteriormente hacen de su uso algo muy interesante en diferentes sectores. Así, este tipo de dispositivos tienen cabida en campos como lo son la química, la bioquímica, la biología, la biomedicina o la industria farmacéutica.

- **Química: Control de la cinética de las reacciones, generación de emulsiones y encapsulaciones.**

Los aspectos más interesantes en este ámbito son: La capacidad de control de la velocidad y la localización de las reacciones químicas (pudiendo hacer que estas solo ocurran en la interfase entre 2 medios con flujo paralelo de forma muy controlada y obteniendo resultados muy reproducibles) y, sobre todo, lo referente a la tensión superficial. Esta última característica tendría una increíble cabida en la creación de emulsiones *oil-in-water* o *water-in-oil* y habilita un control sin precedentes del tamaño de las gotas que conforman la emulsión, no obtenido con el uso de sistemas macroscópicos. Además, supondría un método de creación de emulsiones de bajo coste, utilizando la cantidad justa de disoluciones para obtener emulsiones monodispersas. Lo mismo podría aplicarse a la industria farmacéutica en la creación del encapsulado de los principios activos.

- **Lab on a Chip (LoC):**

Los sistemas *LoC*, también llamados *Micro Total Analysis Systems (μ TAS)*, abogan por la creación de dispositivos integrados y autocontenidos para el desarrollo integral de distintos procesos llevados a cabo de manera rutinaria en los laboratorios haciendo uso del tamaño reducido y de la naturaleza compacta de los dispositivos microfluídicos. En otras palabras, buscan conseguir con el uso de un único dispositivo lo conseguido a través de distintas fases o con el uso de un amplio abanico de equipos diferentes. De ahí su denominación "Laboratorio de un chip". El objetivo de estos dispositivos no sería otro que la reducción de los costes y de la complejidad en el desarrollo de estos procesos, así como habilitar el desarrollo de dispositivos portátiles. Un ejemplo es el desarrollo de los denominados dispositivos *PoC*, que hacen referencia a aquellos dispositivos que pueden ser utilizados allí donde se necesiten (por ejemplo, en las consultas de atención primaria) para el tratamiento de ciertas muestras que en otros casos necesitarían de su traslado a laboratorios especializados.

Entre los diferentes dispositivos *LoC* se podrían encontrar biosensores, dispositivos PCR para el tratamiento de muestras de ácidos nucleicos o dispositivos hematológicos para el tratamiento total de muestras sanguíneas, entre otros. Todo ello, de nuevo, haciendo uso de un tamaño de muestras biológicas muy reducido, idóneo para aquellos tipos de muestras cuya obtención pueda resultar invasiva de cara al paciente (por ejemplo, la sangre). Se muestra en la Fig. 2.1 un ejemplo de un dispositivo *LoC* desarrollado por *Micronics inc.* diseñado para el tratamiento completo de una muestra de sangre y para el conteo de glóbulos rojos, blancos y plaquetas y el cálculo de la concentración de hemoglobina.

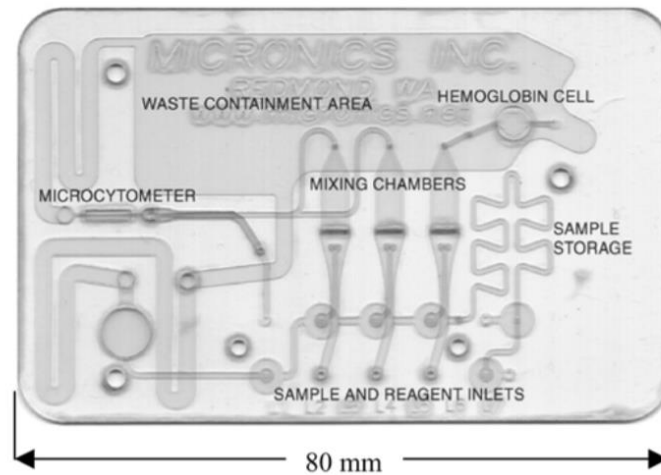


Fig. 2.1. Dispositivo LoC para el tratamiento total de una muestra de sangre desarrollado por Micronics inc.

Destacaría también el uso de los sistemas LoC en la Medicina Personalizada. En este ámbito habilitarían el desarrollo de un gran número de pruebas diagnósticas al paciente de manera fácil y rápida con el objetivo de conocer de manera exacta su condición y así poder ser diagnosticado de la forma más correcta posible.

- **Plataformas de cultivo celular *in vitro*:**

Uno de los aspectos más destacados de la microfluídica es su aplicación en el campo de la biología como plataformas de cultivo celular *in vitro*. En lo referente a esta aplicación y en comparación con los cultivos celulares más tradicionales, el uso de este tipo de dispositivos trae consigo una serie de ventajas [15]:

- Una mayor flexibilidad y control tanto en el diseño de las plataformas de cultivo como en el desarrollo del experimento.
- Se necesita un número de células reducido para cultivar todo el dispositivo, suponiendo una reducción de costes.
- Posibilidad de interactuar con unidades celulares individuales.
- Creación de un ambiente biomimético: El uso de dispositivos microfluídicos posibilita la introducción de estímulos a las células cultivadas con el fin de simular en mejor medida las condiciones ambientales fisiológicas. Se puede así introducir estímulos mecánicos, eléctricos e incluso químicos.
- Con su bajo tamaño y portabilidad, permiten la observación de los resultados o de la evolución del cultivo en tiempo real.
- Permiten desarrollar una automatización de los procesos de cultivo o del procesado de muestras celulares.
- Posibilitan el desarrollo de cultivos celulares en perfusión para la renovación de medio o para el estudio de la respuesta celular a estímulos mecánicos.
- Posibilidad de desarrollar co-cultivos celulares de forma controlada.

Aun así, esta tecnología aún adolece de ciertas desventajas frente a los cultivos celulares cotidianos:

- Falta de estandarización en los protocolos de cultivo en cada dispositivo, ya que cada fabricante o laboratorio desarrolla sus propios protocolos para sus productos.
- Los materiales de cultivo utilizados pueden resultar novedosos y no se conoce a ciencia cierta la respuesta celular en contacto con ellos.
- Los diseños y el control de algunos dispositivos microfluídicos pueden resultar muy complejos para el usuario.

Se muestra en la Fig. 2.2 un esquema que muestra las distintas ventajas del uso de dispositivos microfluídicos frente a los cultivos tradicionales, creado por Halldorsson y su equipo [15].

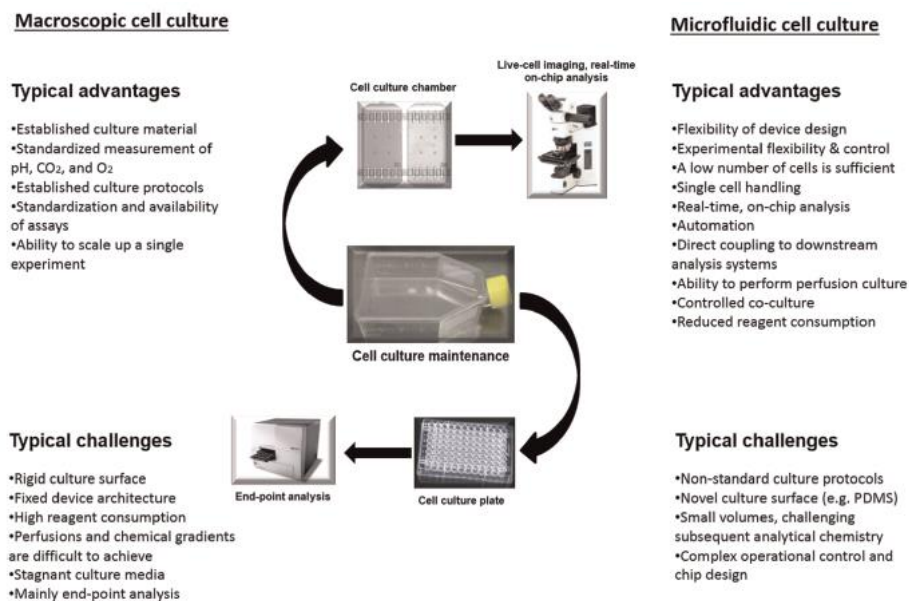


Fig. 2.2. Esquema que muestra las ventajas y desventajas del uso de la microfluídica como plataforma de cultivos celulares *in vitro*. Extraído de [15].

- **Organ on a Chip (OoC):**

Los sistemas *OoC* son una evolución en el uso de dispositivos microfluídicos como plataformas de cultivo celular *in vitro*. Haciendo uso de algunas de las ventajas del uso de la microfluídica (como pueden ser el control del cultivo, la manipulación de células individuales, el desarrollo de co-cultivos celulares de forma controlada o la posibilidad de realizar cultivos en perfusión) por lo que se aboga en este ámbito es por el desarrollo de dispositivos que asemejen el comportamiento fisiológico de ciertos tejidos u órganos biológicos en contacto con fluidos biológicos (sangre o aire, principalmente) en condiciones de ensayo lo más biomiméticas posibles.

Estos sistemas permiten jugar tanto con el diseño de los dispositivos como con las condiciones de cultivo para desarrollar co-cultivos celulares complejos que asemejen un tejido específico y sometiéndolos a las condiciones fisiológicas a las que están expuestos de forma natural, con la esperanza de que se establezca la jerarquía y el funcionamiento propio del tejido biológico en el interior del dispositivo microfluídico. Las aplicaciones que estos dispositivos *OoC* tendrían serían revolucionarias [16]:

- Permitirían estudiar los efectos de distintos fármacos en los tejidos biológicos en plataformas *in vitro*, sin la necesidad del uso de modelos animales.
- Permitirían el desarrollo de nuevos fármacos de forma más rápida al contar con modelos comerciales de tejidos biológicos para su estudio.
- Permitirían el estudio de la morfogénesis de distintos tejidos, así como su respuesta patológica ante distintas enfermedades o ante estímulos mecánicos, químicos e incluso eléctricos.
- Supondrían un desarrollo de la denominada Medicina Personalizada, de forma que se pudieran realizar estudios genéticos y farmacológicos en modelos *in vitro* de los tejidos de los pacientes de forma individual, conociendo así de antemano su respuesta ante distintos tratamientos y pudiendo así optar por aquél que fuera más adecuado para el paciente.

Se pueden encontrar muchos ejemplos de dispositivos *OoC* en la literatura (*Heart on a Chip*, *Liver on a Chip*, *Kidney on a Chip*) siendo el más destacado y con mayor repercusión el *Lung on a Chip* [3], [17] (Fig. 2.3).

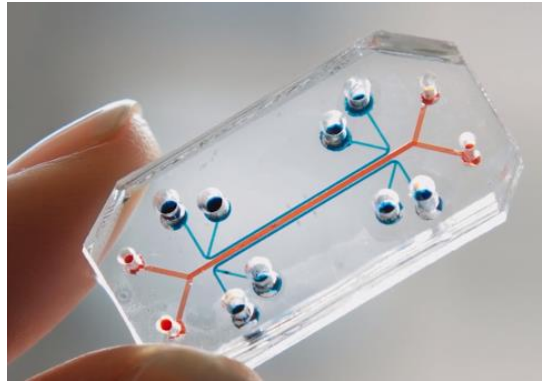


Fig. 2.3. Lung on a Chip: Dispositivo microfluídico que asemeja el comportamiento de la barrera aire/sangre pulmonar. Extraído de [17].

Con esto se da por finalizado el Capítulo 2. A continuación, se explicarán los distintos métodos de fabricación que se utilizan para obtener estos pequeños pero complejos productos, los materiales más utilizados para su implementación y algunos ejemplos de dispositivos microfluídicos de la literatura.

Capítulo 3. Métodos y materiales de fabricación en microfluídica.

3.1. Métodos de fabricación de dispositivos microfluídicos:

Los procesos de fabricación de los dispositivos microfluídicos han ido cambiando conforme se iba desarrollando más la tecnología en la que se basan. En sus inicios era necesario llevar a cabo la fabricación de estos dispositivos dentro de una *sala blanca*, suponiendo un gasto extra de tiempo y dinero. Sin embargo, en la actualidad se han desarrollado procesos mucho menos exigentes, pudiendo llevar la fabricación de dispositivos microfluídicos a los talleres industriales obteniendo resultados con mayor funcionalidad y, en definitiva, mucho más rentables [18]. Se estudiarán a continuación los principales procesos de fabricación utilizados en la actualidad, indicando en cada uno de ellos sus fortalezas y sus limitaciones y llevando a cabo una breve comparación entre ellos.

Se llaman procesos de microfabricación al conjunto de técnicas mediante las cuales se pueden llegar a obtener piezas o componentes con resoluciones micrométricas, normalmente utilizadas en la fabricación de componentes electrónicos o de MEMS en base de silicio. La microfluídica y los procesos de microfabricación de silicio son dos conceptos que han ido de la mano desde los inicios de esta tecnología. Es más, el que se considera el primer dispositivo microfluídico *LoC* de la historia (el cromatógrafo de gases de C. Terry [11]) fue fabricado con el uso de técnicas de microfabricación de silicio. Y es que la microfluídica, como se ha comentado anteriormente, nace del campo de la microelectrónica y de la fabricación de MEMS [10].

Si bien muchas de las técnicas de microfabricación pueden llegar a ser utilizadas en la microfluídica, tanto haciendo uso de silicio o vidrio como de materiales poliméricos, destaca el uso de la litografía blanda (*Soft Lithography*, en conjunción con métodos de fotolitografía y de *etching* seco o húmedo). Sin embargo, este tipo de procesos originalmente resultaban una gran limitación al necesitar de equipo y entornos muy específicos. Esto llevó al desarrollo de nuevas técnicas de prototipado con las cuales se podían fabricar dispositivos microfluídicos en un taller industrial. Así, se comenzaron a utilizar el *Hot Embossing*, el moldeo por inyección, la impresión 3D y la Xurografía/Laminación.

3.1.1. Litografía blanda (Moldeo de Réplica):

La litografía blanda es un proceso mediante el cual a partir de un molde maestro creado por fotolitografía se fabrica su réplica negativa con materiales flexibles o elastómeros, normalmente PDMS. Esta réplica será o bien el producto final o bien será utilizado para la estampación de resinas sobre láminas de vidrio. Tras este primer paso se puede depositar material en las localizaciones no ocupadas por el polímero o eliminar el material no cubierto con procesos de *etching* seco o húmedo [19], [20]. El proceso seguido en esta técnica se puede observar en las Fig. 3.1 y Fig. 3.2.

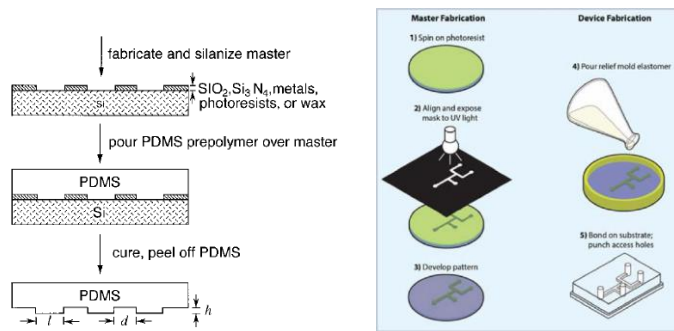


Fig. 3.1. Proceso de creación de la réplica negativa (litografía blanda) a partir del molde maestro fabricado por fotolitografía. Extraído de [19] y [20].

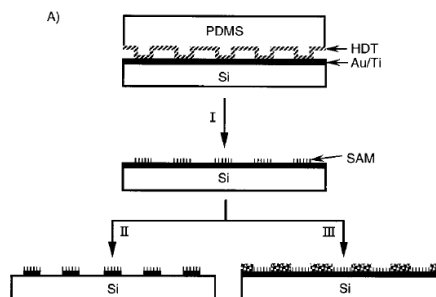


Fig. 3.2. Proceso de estampación de material tras el proceso de litografía blanda. Con el molde réplica fabricado por litografía blanda se estampa material sobre una oblea de silicio (I) tras lo cual se puede o bien realizar procesos de *etching* (II) o bien realizar deposición de material (II). Extraído de [19].

Las principales ventajas de la litografía blanda son: Resolución estándar de 20-100 μm , pudiendo ser menor en caso de utilizar *salas blancas* [21]; gran facilidad de desarrollo de prototipos [21]; gran versatilidad del uso de la réplica, que puede ser utilizada como producto final o para estampación de superficies [19]–[21]; capacidad de fabricación con PDMS, que permite la creación de patrones en superficies curvas [21] para su uso en el campo de la biomedicina [20].

Las principales desventajas de esta técnica vienen dadas durante la creación de los moldes maestros, cuya resolución está limitada por la difracción de la luz al pasar por la máscara en el proceso de fotolitografía [21]. Además, el proceso de fabricación es relativamente largo (creación del molde maestro, vertido del PDMS, curado, extracción y adhesión a la superficie de cristal por tratamiento con plasma) en comparación con otros métodos de fabricación como el moldeo por inyección [20]. Además, la poca escalabilidad de la técnica y el precio elevado del PDMS en comparación con otros materiales poliméricos hace que la litografía blanda no se utilice para la producción en masa [22], [23]. Por último, el uso de moldes flexibles puede llevar a la deformación de los patrones creados y en el proceso de retirada del molde tras el curado puede darse la aparición de defectos o adhesiones, entre otros problemas [18].

3.1.2. Hot Embossing:

En los procesos de *Hot Embossing* se utiliza la termocompresión (uso de altas temperaturas y presiones aplicadas normalmente por medio de equipos hidráulicos o neumáticos) para realizar la transferencia de la geometría superficial de un molde maestro (sello) a una lámina plana. Los sellos utilizados suelen estar compuestos de silicio o de otros metales (si bien se han dado casos del uso de polímeros como PDMS para su fabricación [21]) mientras que el material objetivo debe ser un polímero termoplástico [24], [25]. Es un proceso muy similar a la litografía blanda en tanto que se consigue una geometría negativa de la presente en el sello. Su funcionamiento se basa en acercar al material a su temperatura de transición vítrea [25]. En la Fig. 3.3 se puede ver el proceso de *Hot Embossing*.

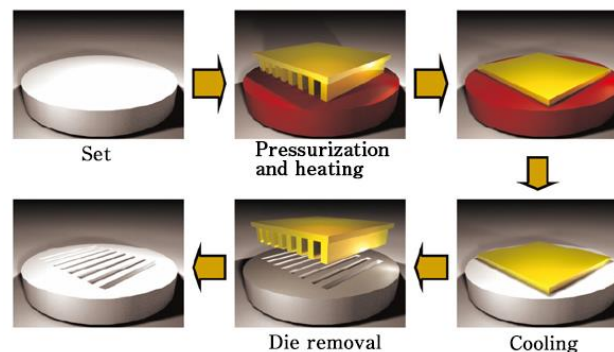


Fig. 3.3. Esquema del proceso de *Hot Embossing*. [Fuente](#).

Una de las principales ventajas y limitaciones de los procesos de *Hot Embossing* es la necesidad de utilizar polímeros termoplásticos [18]. Además, esta técnica es más barata, rápida y escalable que la litografía blanda ([18], [25]), obteniendo unos resultados en cuanto a resolución espacial muy similares a los obtenidos con esta última, tal y como se puede observar en la Fig. 3.4. Se hace uso aquí de un sello de metacrilato, lo que correspondería a un proceso de *Soft Embossing* (derivado del *Hot Embossing* en el que se alcanzan T^a y presiones menores [27] de 120°C, 5 bar durante 5 minutos).

Como desventaja, esta técnica está limitada al estampado de geometrías bidimensionales poco complejas, limitando su aplicación ([18], [25]). En función del material utilizado las temperaturas, presiones e intervalos de tiempo del proceso varían considerablemente al variar su temperatura de transición vítrea. Por ejemplo, para la estampación de cierta geometría en una lámina de 1.6 mm de PMMA se requiere una T^a de 128°C y una presión de 1.38 MPa durante 5 minutos, mientras que para una lámina de 1.6 mm de PC hace falta una T^a de 168°C y una presión de 1.72 MPa durante 5 minutos [26]. Además, la fabricación de los sellos metálicos o de silicio suele ser costosa tanto en tiempo como en dinero [18] y su resolución depende directamente del método de fabricación utilizado para ello [25].

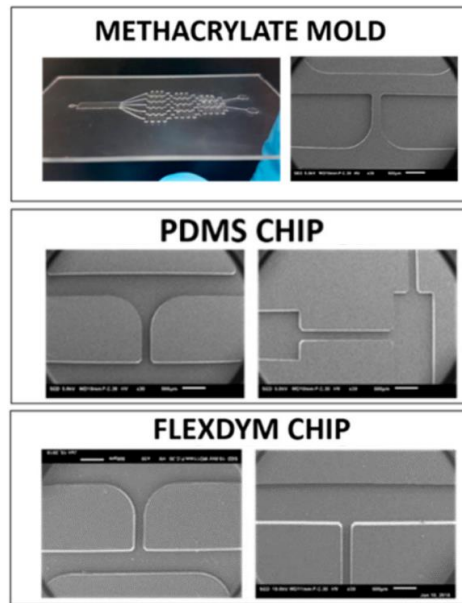


Fig. 3.4. Comparación de los resultados obtenidos mediante litografía blanda (PDMS CHIP) y Soft Embossing (FLEXDYM CHIP) con el uso de un sello de Metacrilato (METHACRYLATE MOLD). Extraído de [27].

3.1.3. Moldeo por microinyección (Microinjection Moulding):

El moldeo por microinyección es un proceso mediante el cual se introduce un material termoplástico fundido dentro de una cámara cerrada, adoptando muy fácilmente la geometría que el molde posee y consiguiendo reproducciones de alta resolución una vez enfriado y solidificado el material. Se diferencia de los procesos de *Hot Embossing* en que en estos últimos la fusión del material se consigue de manera localizada mientras que en el moldeo por inyección el polímero se funde en toda su totalidad. Esto, inicialmente, ya presenta una gran desventaja: En el moldeo por inyección el material fluye una distancia mucho mayor que en el *Hot Embossing*, lo que introduce unas tensiones mayores en el material [18]. Se puede ver en la Fig. 3.5 una esquematización del proceso seguido.

Las principales ventajas del moldeo por microinyección son similares a las que ofrece el *Hot Embossing*: Proceso rápido, escalable y cuyos resultados poseen una resolución espacial óptima. Esta resolución posee gran dependencia del método de fabricación utilizado en los moldes, pudiendo llegar a los 25 μm en moldes micro fresados [18]. Además, es muy apto para su uso en grandes volúmenes de producción, consiguiendo unos resultados muy reproducibles en intervalos más cortos que con el *Hot Embossing*. Esto hace que su uso en la industria sea muy atractivo [18], [25], [28].

No obstante, en comparación el *Hot Embossing* posee ciertas limitaciones: Las ya mencionadas tensiones a las que se somete el material y las contracciones que éste sufre durante el proceso de enfriamiento pueden afectar al estado tensional y a las dimensiones finales de la pieza, con la formación de rechupes si no se poseen espesores de pared similares [18], [28]. Además, el coste y tiempo de fabricación de los moldes supone una gran inversión inicial, haciendo al proceso inviable en etapas de prototipado [28].

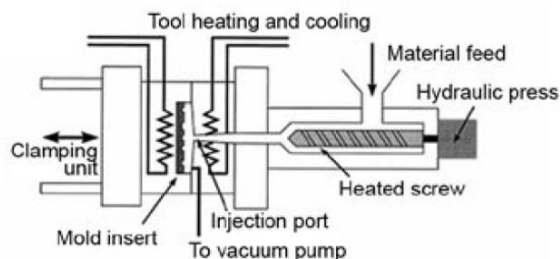


Fig. 3.5. Esquema del montaje utilizado para realizar un moldeo por micro – inyección. El polímero fundido se introduce en un extrusor que lo inyecta a alta presión en la cámara del molde, que posee control de temperatura para un calentamiento y enfriamiento controlado de la pieza. Una bomba de vacío evita la aparición de burbujas de aire o el llenado incompleto de la cavidad. Extraído de [25].

3.1.4. Impresión 3D:

Los sistemas de impresión 3D son un conjunto de técnicas de fabricación aditiva mediante las cuales se pueden llegar a fabricar geometrías 3D complejas de forma automática. El proceso que siguen es muy sencillo: Un modelo 3D virtual es dividido en capas de un espesor constante, cada una de las cuales forma una estructura 2D. Así, mediante la adición de material en capas 2D una sobre otra se consigue finalmente la estructura tridimensional. El espesor de las capas impresas determinará la resolución de este método de fabricación, así como la semejanza del resultado final a la geometría original.

El término “Impresión 3D” es bastante amplio, abarcando una gran cantidad de técnicas de fabricación aditiva. Se analizarán brevemente 3 de ellas por ser las más comunes:

- **Estereolitografía (SLA, Fig. 3.6):**

Sistema de impresión 3D que hace uso de una fotoresina y de un haz LED o láser para llevar a cabo la fabricación del producto final. Con el uso o bien de un haz puntal o bien de un dispositivo digital de microespejos (DMD), se expone a luz UV (normalmente) a la fotoresina presente en una bandeja de impresión creando capas que se irán superponiendo una sobre la otra hasta formar la geometría 3D [29]–[31]. En los sistemas más comunes, la resolución que obtienen depende principalmente de: Tamaño de píxel (si se usan DMD), espesor del haz láser y espesor de la capa curada, pudiendo encontrarse en resoluciones cercanas a las 25 micras en ambos planos (en el caso de la FormLabs Form2, cuya ficha técnica se encuentra en el **Anexo II**).

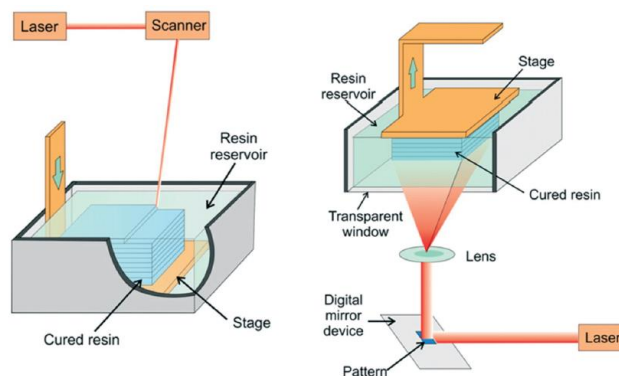


Fig. 3.6. Configuraciones de los sistemas de SLA: Superficie libre (izq.) y Superficie restringida (dcha.). Extraído de [30].

○ **Inkjet de polímeros (Fig. 3.7):**

Los sistemas de impresión 3D por *inkjet* realizan una deposición de material polimérico fotocurable líquido que es curado con luz UV inmediatamente después de salir de la boquilla de deposición gracias a una lámpara UV en su extremo [31]. Posee como rasgos definitorios la posibilidad de eyectar distintos materiales de forma simultánea (pudiendo eyectar material de sacrificio a modo de soporte), creando diseños muy precisos y de gran calidad en un bajo intervalo de tiempo. Como desventaja se podría indicar que no se conoce bien la biocompatibilidad de los materiales utilizados [29]–[31].

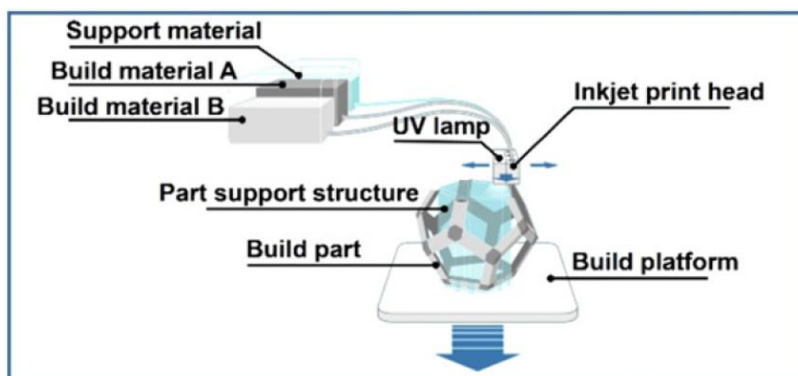


Fig. 3.7. Estructura de un sistema de impresión por inkjet. Extraído de [29].

○ **FDM (Fig. 3.8):**

El modelado por deposición fundida es tal vez el sistema de impresión 3D más conocido actualmente. Su funcionamiento se basa en la extrusión de un material termoplástico fundido que se enfría casi instantáneamente al contacto con el ambiente. Con este material se van estructurando capas 2D que se van superponiendo una sobre otra, creando finalmente una geometría 3D. Si bien posee ciertos puntos fuertes como el uso de materiales biocompatibles muy baratos como el PLA o el ABS, su uso en el campo de la microfluídica está muy limitado debido a: Baja rigidez de las piezas impresas (baja adhesión capa – capa); La aparición de aire o escoria entre las capas puede causar errores dimensionales; Su resolución espacial, determinada por la boquilla de extrusión, suele ser mayor al tamaño de los canales a imprimir [29]–[31].

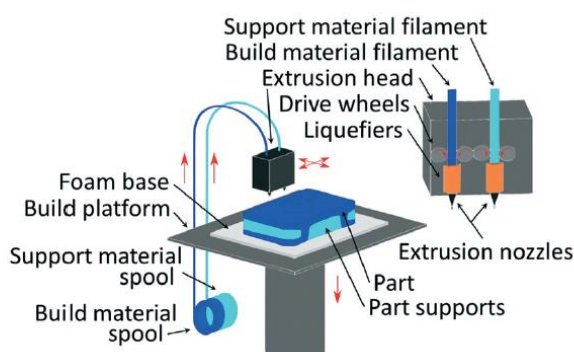


Fig. 3.8. Esquema de un sistema de impresión FDM. Extraído de [30].

Los sistemas de impresión 3D, en comparación con la litografía blanda, aportan la ventaja de reducir el tiempo, coste y complejidad del desarrollo de prototipos al fabricarse en un único paso de forma automática. No obstante, la resolución alcanzada con los sistemas de impresión 3D aún no puede llegar a compararse con la que se obtiene con procesos de litografía blanda o de *Hot Embossing* [30].

3.1.5. Xurografía/Laminación:

Se conoce como *Xurografía* al proceso de prototipado rápido en el cual se realiza el corte de finas láminas de papel o polímero con el uso de un plotter de corte (Fig. 3.9). Esta máquina, perteneciente desde sus orígenes al sector de la papelería o de la serigrafía, se encarga de realizar cortes poco profundos con el uso de una pequeña cuchilla muy delgada y afilada siguiendo un control CNC a partir de los diseños realizados en un software tipo CAD.

La Xurografía se introduce como proceso de fabricación en microfluídica en el año 2005 [32]. Con ella se lleva a cabo la estructuración de láminas de diversos materiales (principalmente polímeros) de grosores entre los 25 y los 1000 μm con resoluciones mínimas de hasta 10 μm en función del equipo utilizado. Los distintos cortes se superpondrán posteriormente conformando un dispositivo microfluídico 3D final.



Fig. 3.9. Ejemplo de plotter de corte, equipo utilizado en la Xurografía. [Fuente](#).

Como ventajas de este método de fabricación se encuentran, en primer lugar, la gran rapidez y facilidad con la que se lleva a cabo. Resulta así muy útil para el desarrollo de prototipos iniciales donde a diferencia de la litografía blanda o del *Hot Embossing* no hace falta el desarrollo de un molde maestro o sello, lo que reduce también el coste del proceso. Además, su escalabilidad está asegurada, pudiendo dar el salto a la fabricación industrial muy fácilmente. Posee también un gran abanico de materiales a utilizar, tanto termoplásticos como termoestables, siempre y cuando estén laminados.

Todo esto hace que sea un proceso muy atractivo para su uso en el campo de la biomedicina, además de no necesitar del uso de una *sala blanca* para su implementación [18], [32]–[34]. Se puede incluso llegar a utilizar para la fabricación de moldes maestros para litografía blanda o *Hot Embossing* [33].

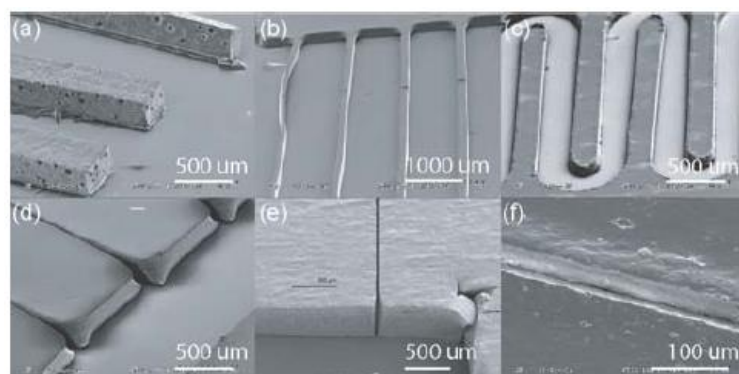


Fig. 3.10. Ejemplo de los resultados obtenidos por medio del uso de la Xurografía en distintas geometrías: Canales rectos, relieves y serpentina. Extraído de [32].

No obstante, ciertos aspectos hacen que este método no consiga unos resultados tan buenos como sí se obtienen con el resto: La profundidad de corte, así como la semejanza del resultado final con el diseño original, depende mucho de la cuchilla utilizada o del método de corte empleado. Esto último posee gran relevancia, ya que en función del método de corte empleado la punta de la cuchilla puede llegar a romperse por la aplicación de grandes esfuerzos laterales [32]. Esto también sucede en caso de cortar materiales excesivamente rígidos.

Además, la resolución de este método no siempre es la resolución mecánica de la máquina (mínimo 10 μm), consiguiendo resultados no tan precisos en geometrías de dimensiones inferiores a 300 – 500 μm . Se ha observado también que los cortes resultantes poseen una alta rugosidad, y en función tanto del material como de la velocidad de corte utilizada pueden llegar a no ser completamente rectos o incluso a doblarse en los vértices de las geometrías, tal y como se ve en la Fig. 3.10 [18], [32]–[34].

Por otro lado, al proceso de fabricación por el cual se superponen distintas láminas estructuradas y con su unión se conforma un dispositivo microfluídico 3D se le denomina **laminación** (Fig. 3.11). Este proceso puede llevarse a cabo siguiendo 2 tipos principales de unión entre las capas: Unión por adhesivo y unión térmica (termocompresión). Esta primera se lleva a cabo con el uso de adhesivos sensibles a la presión (PSA) de doble cara, los cuales se intercalarían entre las distintas laminas del dispositivo para posteriormente proporcionar un método de unión tras la aplicación de presión (por medio, por ejemplo, de máquinas de laminación). Por otro lado, para realizar la unión por termocompresión se lleva a cabo el calentamiento de las láminas hasta llegar a límites cercanos a su temperatura de transición vítrea y, tras aplicarles cierta presión entre sí, se forma una unión casi indistinguible entre ambos materiales [18]. Cada uno de estos procesos de unión traería consigo sus propias virtudes e inconvenientes:

- En el caso de la unión por adhesivos existe una gran cantidad de materiales distintos que pueden llegar a utilizarse en la fabricación de los dispositivos microfluídicos, ya que no hay limitaciones en los materiales que pueden llegar a adherirse. Sin embargo, esto viene a expensas de conseguir una integridad estructural algo más baja, además de una posible intrusión del adhesivo en los canales microfluídicos, que no siempre está compuesto por un material biocompatible [18], [33].
- Los aspectos anteriores se mejoran con el uso de la unión por termocompresión. Sin embargo, con este método de unión se pueden llegar a deformar las láminas, además de que se restringen las opciones de materiales únicamente a aquellos que sean termoplásticos [18].

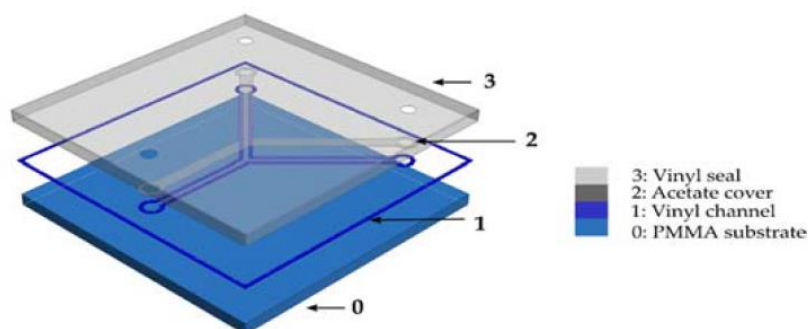


Fig. 3.11. Ejemplo de un proceso de laminación posterior al corte de las capas mediante Xurografía. Extraído de [34].

3.1.6. Resumen de los procesos de fabricación:

Analizando lo que se ha indicado de cada uno de los procesos y a modo de resumen:

- La litografía blanda sería el proceso que mayor resolución poseería, similar o inferior a la conseguida con *Hot Embossing* pero con la capacidad de crear geometrías complejas o curvas. Sin embargo, su implementación es costosa en tiempo y dinero y no puede escalarse a nivel industrial.
- Con el *Hot Embossing* se obtienen resultados similares a la litografía blanda, siendo un método mucho más rápido, barato y escalable. Si se compara con el moldeo por microinyección, los resultados resultarían similares, además de que poseería diversas ventajas como son la menor distancia de flujo del material y la menor aparición de efectos de compresión - expansión tras su enfriamiento. No obstante, solo permite la creación de geometrías 2D, y su uso está restringido a materiales termoplásticos.
- El moldeo por microinyección estaría más destinado al desarrollo de productos finales de forma industrial (gran volumen de producción), con un alto coste de fabricación de los moldes de inyección utilizados. A diferencia del *Hot Embossing* y de la litografía blanda, éste permite el desarrollo de geometrías 3D. Su uso sigue estando restringido a materiales termoplásticos.
- La impresión 3D en todas sus variantes es la tecnología que mayor complejidad de geometría permite conseguir. De entre sus 3 variante estudiadas, las que mayor resolución tendrían serían el SLA y el *inkjet*, siendo este uno de los mayores problemas con el FDM sumado a su baja integridad estructural. Su uso es recomendado para el desarrollo de prototipos en un corto intervalo de tiempo, aunque el tiempo de impresión puede ser alto en resoluciones muy finas y el postratamiento de la pieza final aumenta el tiempo de fabricación. Puede utilizarse con un amplio abanico de materiales: Resinas fotocurables y Termoplásticos.
- Por último, la Xurografía/Laminación podría considerarse la alternativa más barata, rápida y sencilla de todas las estudiadas. No obstante, los resultados obtenidos con esta tecnología son también los menos precisos, quedando prácticamente restringido su uso para geometrías de más de 300 – 500 μm al utilizar un método mecánico para el corte (cuchilla de corte) que puede romperse o causar arrastre del material cortado. Permite la creación de geometrías 3D por laminación (superposición de geometrías 2D) y el abanico de materiales que pueden ser utilizados es el mayor de todos los procesos estudiados.

3.2. Materiales utilizados en la fabricación de dispositivos microfluídicos:

En la literatura pueden encontrarse una gran cantidad de materiales utilizados para el desarrollo de dispositivos microfluídicos: PMMA, PDMS, PS, PC, PET, PE, COC/COP, entre otros. En este apartado, sin embargo, se analizarán los que resultan más interesantes para los procesos de fabricación estudiados y los más comunes en el campo de la microfluídica. Destaca así el uso de 5 materiales: El PMMA, el PDMS, el COC/COP, el PS y el PC.

3.2.1. PMMA:

El PMMA es un material termoplástico obtenido de la polimerización del monómero MMA. Su aplicación en microfluídica es muy relevante, principalmente por su alta transparencia óptica, su bajo coste de fabricación, su facilidad de uso y modificación y su alta biocompatibilidad [35], [36]. Entre sus principales características destaca:

- Alta transparencia óptica: Trasmisión de la luz mayor del 93% [37].
- Alta rigidez ($E = 2.24 - 3.24$ GPa [38]), con una resistencia a los impactos mayor que la del cristal [37].
- Alta estabilidad química: Resistente a disolventes apolares y a rayos UV, absorción de agua del 0.3% [37].
- Permeabilidad de gases: Baja para el O_2 y para el vapor de agua [39].
- 100% reciclable, pudiendo aguantar hasta 4 ciclos de reciclado sin alterar su biocompatibilidad, si bien se modifican de forma importante sus propiedades ópticas [36].
- Alta biocompatibilidad [36].
- Material muy hidrofílico sin la necesidad de ningún tratamiento superficial debido a los grupos éster que poseen sus cadenas moleculares [37]. Se ha llegado a considerar el material polimérico más hidrofílico de los normalmente utilizados [35].
- Propiedades eléctricas: Excelente aislante eléctrico [35], [37].
- Propiedades térmicas: Aislante térmico, con temperatura de servicio de hasta 85°C [37].

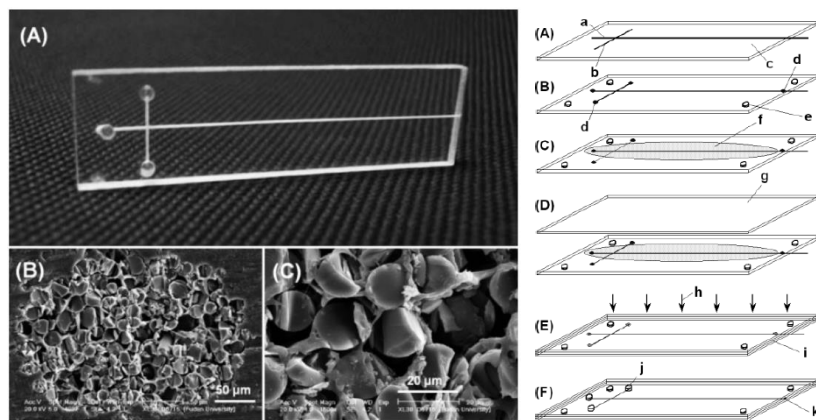


Fig. 3.12. Dispositivo microfluídico para electroforesis fabricado con PMMA y proceso de fabricación seguido para su obtención. Extraído de [40].

Los procesos de fabricación seguidos para la creación de dispositivos microfluídicos con PMMA suelen ser [35]–[37], [41]:

- Moldeo por microinyección – Al ser un material termoplástico es fácilmente inyectable.
- *Hot Embossing* – Con el uso de láminas de PMMA prefabricadas.
- Laminación – Muy utilizado en procesos de laminación por superposición de láminas cortadas, normalmente, por medio de corte por láser de CO_2 . La unión de las capas puede llevarse a cabo por unión por adhesivo, térmica, química o incluso por medio de disolventes.

3.2.2. PDMS:

El PDMS es un elastómero, copolímero de silicona, sintetizado por un proceso de curado tras la mezcla de la base (pre-polímero) con un agente de curado (normalmente platino) a una temperatura de $60-70^\circ\text{C}$ durante más de 1 hora. Es por eso que es muy utilizado para la fabricación de dispositivos microfluídicos por litografía blanda: Reproduce con alta resolución la geometría del molde maestro y su curado es corto y a baja temperatura [15], [42]. Es el material más utilizado en el campo de la investigación en microfluídica [43]. Entre sus principales características destacan:

- Alta transparencia óptica: Ópticamente transparente para rayos con longitud de onda superior a los 230 – 280 nm [21], [42].
- Elastómero muy flexible: $E \approx 750$ kPa [44].
- Alta estabilidad química: Resistente a disolventes polares, impermeable al agua líquida [15], [42], [44].
- Permeabilidad de gases: Alta permeabilidad al CO₂, O₂ y vapor de agua [15], [21], [44].
- No reciclable [36].
- Alta biocompatibilidad [15], [21], [42], [44].
- Material muy hidrofóbico: Grupo metilo en su cadena molecular. Puede volverse hidrofílico con tratamientos de activación superficial [15], [42].
- Propiedades eléctricas: Aislante eléctrico [44].
- Propiedades térmicas: Aislante térmico [21], [44].

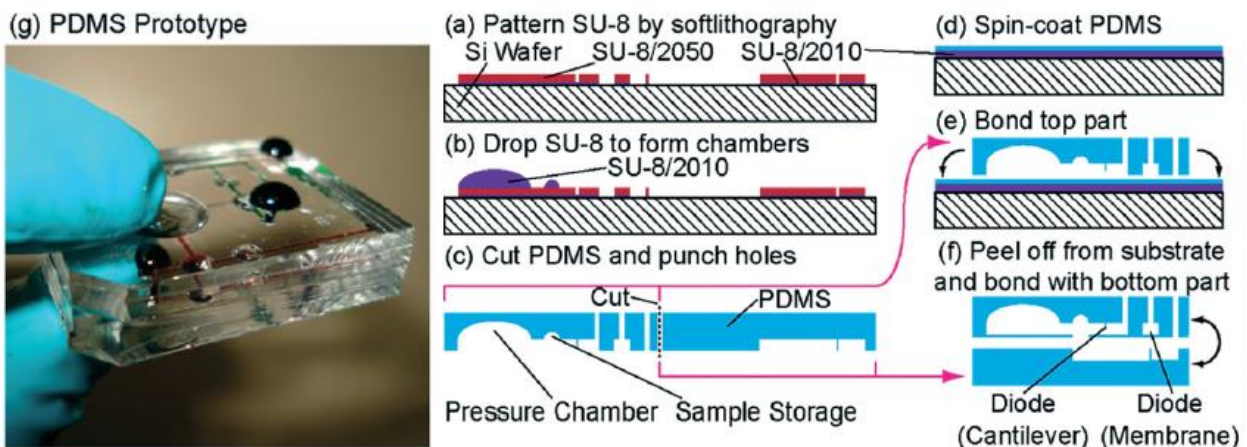


Fig. 3.13. Ejemplo de chip microfluídico fabricado en PDMS con bomba de flujo manual y el proceso de fabricación seguido. Extraído de [45].

Los procesos de fabricación seguidos para la creación de dispositivos microfluídicos con PDMS son [42], [44]:

- Litografía blanda – Se hace el curado del PDMS sobre el molde maestro creado por fotolitografía.
- Moldeo por microinyección – Al ser un material fotocurable es fácilmente inyectable y curado una vez dentro del molde utilizado.
- Laminación – Por superposición de distintas láminas creadas por litografía blanda se puede crear una geometría 3D. Su unión se puede llevar a cabo de forma reversible por contacto directo entre piezas de PDMS (atracción por fuerzas de Van der Waals) o de forma irreversible, aplicando un tratamiento de plasma y poniendo en contacto al PDMS con otra superficie (uniones covalentes) o por medio de disolventes.

3.2.3. PS:

El PS es uno de los materiales termoplásticos más utilizados en la actualidad, siendo el componente principal de productos desechables de uso cotidiano como envases o envolturas plásticas. Este polímero, obtenido de la polimerización del monómero estireno, ha encontrado una buena aceptación en el campo de la biología debido a sus propiedades ópticas, químicas y a su buena biocompatibilidad. Es así el componente principal del equipo de laboratorio estándar [46]. Sin embargo, su uso en la microfluídica aún no ha sido completamente estudiado, dado que su proceso de fabricación resulta más caro y complicado en comparación con otros materiales, por ejemplo, el PDMS [47]. Entre sus principales características destacan:

- Alta transparencia óptica: Ópticamente transparente en el campo visible debido a que es un material amorfo [48].
- Alta rigidez ($E = 2.28 - 3.28$ GPa) y fragilidad [38], [48].
- Alta estabilidad química: Resistente a disolventes polares, ácidos/bases e impermeable al agua líquida [46]–[49].
- Permeabilidad de gases: Alta permeabilidad al O_2 y vapor de agua [50].
- Reciclable [48].
- Alta biocompatibilidad [46], [47], [49].
- Material muy hidrófobo: Anillos de benceno en su cadena molecular. Puede volverse hidrofílico con tratamientos de activación superficial [46], [47], [49], [51].
- Propiedades eléctricas: Aislante eléctrico [50].
- Propiedades térmicas: Aislante térmico, temperatura de servicio hasta los 70°C [52].

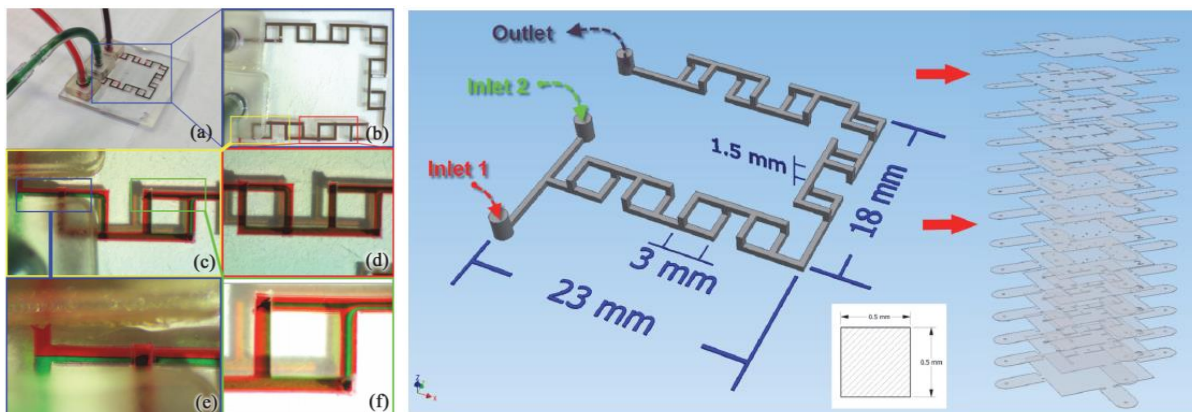


Fig. 3.14. Micromezclador 3D fabricado en PS por Xurografía y Laminación por unión térmica. A la derecha se pueden ver las capas que conforman el dispositivo y la geometría 3D que se forma tras su unión. Extraído de [53].

Los procesos de fabricación seguidos para la creación de dispositivos microfluídicos con PS son [46], [47], [49]:

- Moldeo por microinyección: Es un material termoplástico con una temperatura de transición vítrea muy baja (100°C) [50].
- *Hot Embossing*: Debido a su baja temperatura de transición vítrea puede ser conformado por *Hot Embossing* tanto con el uso de sellos metálicos (por ejemplo, de silicio) como con el uso de sellos poliméricos (por ejemplo, de PDMS). Se sabe que durante su enfriamiento su contracción es grande, lo que puede ayudar a conseguir dimensiones más bajas a las del sello utilizado [43].
- Ablación y corte por láser de CO_2 : Ha sido utilizado para su conformación como método de grabado y corte de canales microfluídicos.

3.2.4. PC:

El PC es un material termoplástico que surge de la polimerización del Bisfenol A y del fosgeno [54]. La principal característica que hace su uso interesante en el campo de la biomédica, especialmente en el de la microfluídica, es su alta temperatura de transición vítrea (145°C). Esta característica lo hace especialmente útil para dispositivos PCR, para la aplicación de ciclos térmicos al ADN o para el reconocimiento de patógenos o bacterias [54]–[56]. Además, resulta más hidrofílico que el COC/COP [56], consiguiendo un mejor flujo en sus canales por capilaridad. Entre sus principales características destacan:

Fabricación y validación de un dispositivo microfluídico con capacidad de monitorización de oxígeno.

- Alta transparencia óptica: Ópticamente transparente en el campo visible debido a que es un material amorfo, opaco para la luz UV [55], [57].
- Alta rigidez ($E = 2.38 \text{ GPa}$) y resistencia a impactos [38], [57].
- Alta estabilidad química: Resistente a ácidos y alcoholes, baja absorción de agua ($<0.3\%$) [55]–[57].
- Permeabilidad de gases: Alta permeabilidad al vapor de agua y baja al O_2 [50].
- Reciclable.
- Biocompatible [58].
- Material hidrofílico [59].
- Propiedades eléctricas: Aislante eléctrico [57].
- Propiedades térmicas: Aislante térmico, temperatura de servicio hasta los 135°C [57].

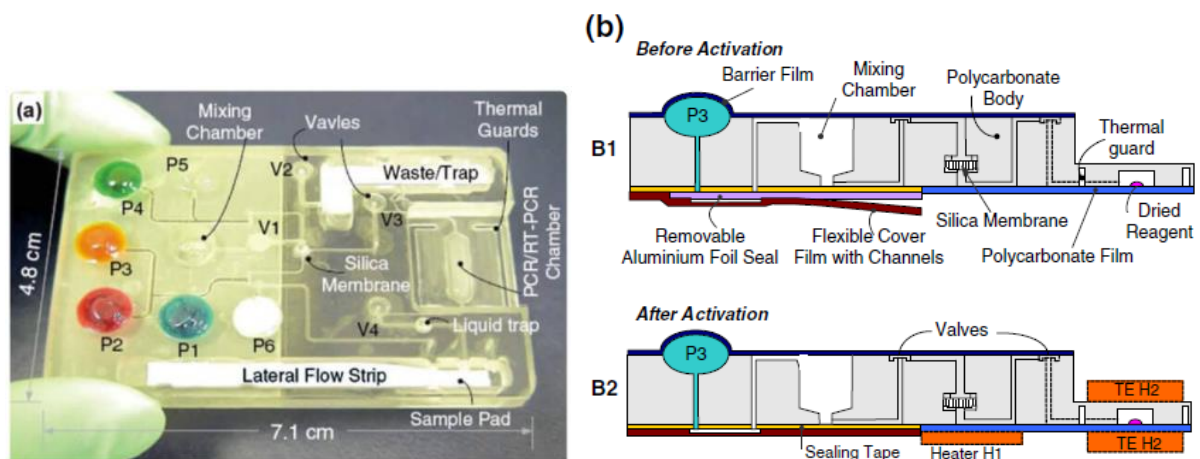


Fig. 3.15. Dispositivo microfluídico fabricado en PC para el completo tratamiento de muestras de ácidos nucleicos. Extraído de [60].

Los procesos de fabricación seguidos para la creación de dispositivos microfluídicos con PC son [54], [55]:

- *Hot Embossing*: Puede ser conformado por *Hot Embossing*, aunque para ello necesita el uso de temperaturas altas.
- Micromecanizado.
- Laminación: Para unir distintas capas 2D conformadas con los métodos anteriores. El método más estudiado para realizar la laminación del PC es la unión térmica, cuyo resultado puede mejorarse con el uso de tratamientos superficiales por plasma [55]. Puede unirse tanto a PC como a PDMS, como se ha visto en algunas aplicaciones [54].

3.2.5. COC:

El COC es una clase de material termoplástico amorfo, formado por la polimerización de monómeros de olefina cíclica con eteno [43]. Es un material muy novedoso, cuya aplicación en el campo de la farmacéutica y de la microfluídica se remonta a la última década, por lo que sus aplicaciones están aún siendo estudiadas. Dadas sus increíbles propiedades ópticas, químicas y mecánicas, es también utilizado para otras aplicaciones como el envasado o la producción de pantallas LCD [43], [61]

No obstante, el término COC no se refiere únicamente a un único material: Abarca una amplia gama de materiales, en función de los monómeros con los que esté polimerizado ([43], [55]). Existe así también el material COP, formado únicamente por la polimerización de un único tipo de monómeros [43].

Existen diversas variantes de COP en función del método con el que han sido polimerizados o fabricados [62], cada una de ellas poseyendo un nombre comercial propio correspondiente a la empresa que lo comercializa. Destacan Zeonor, Zeonex o Topas. Este análisis se centrará en el COC de forma más general.

Se conoce que el COC y en específico el Zeonex posee propiedades físicas muy atractivas en comparación con otro tipo de materiales poliméricos. Así, el Zeonex posee menor autofluorescencia que el PMMA, una mayor estabilidad química y dimensional, una absorción de agua hasta 10 veces menor que el PMMA y el PC, una rigidez algo mayor que el PMMA y una temperatura de transición vítrea muy cercana la del PC ([62]–[64]). Otros aspectos interesantes que posee son:

- Alta transparencia óptica: Ópticamente transparente por encima de los 250 nm, con una transmitancia de 92% [55], [65], [66].
- Alta rigidez ($E = 2.6 - 3.2 \text{ GPa}$), pero alta fragilidad [43], [64].
- Alta estabilidad química: Resistente a disolventes polares, ácidos y bases, baja absorción de agua ($<0.01\%$) [62], [65].
- Permeabilidad de gases: Baja permeabilidad al vapor de agua y al O_2 [50], [67].
- Reciclable [68].
- Biocompatible [69].
- Material hidrofóbico. Puede volverse hidrofílico con tratamientos de activación superficial [66].
- Propiedades eléctricas: Aislante eléctrico [64].
- Propiedades térmicas: Aislante térmico [70].

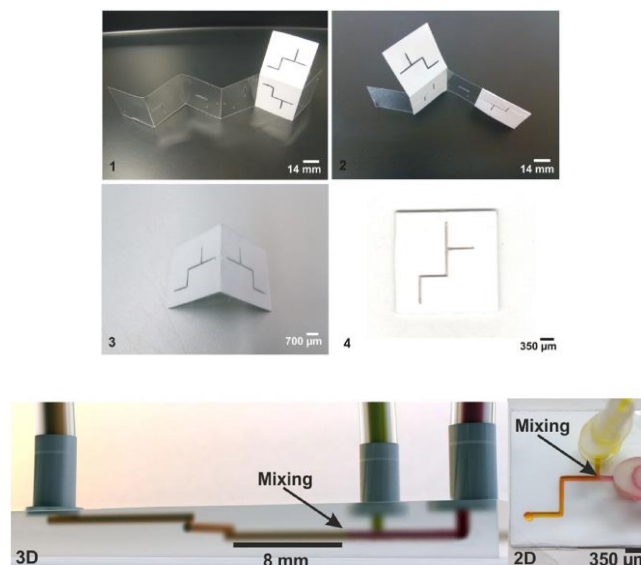


Fig. 3.16. Dispositivo microfluídico fabricado en COC mediante Xurografía y Laminación. Extraído de [71].

Los procesos de fabricación seguidos para la creación de dispositivos microfluídicos con COC son [43], [55], [62], [63]:

- Moldeo por microinyección: Al ser un material termoplástico, el COC puede ser utilizado en procesos de inyección, con gran facilidad para su conformado por este proceso además de ser un material de bajo coste [43].
- *Hot Embossing*: Puede ser conformado por *Hot Embossing*, aunque para ello necesita el uso de temperaturas altas. Se ha visto que puede ser utilizado como sello de *Hot Embossing* [43].
- Xurografía: Zeonor, Zeonex o Topas se ofrecen en formato laminado con muy bajo espesor, que puede llegar a ser de hasta $100 \mu\text{m}$. Con esto, el COC puede ser estructurado con el uso de un plotter de corte, tal y como se verá en el Capítulo 0.

- Laminación: Para unir distintas capas 2D conformadas con los métodos anteriores. Al igual que los materiales anteriores, el proceso más estudiado para la unión de láminas de COC entre sí o a otros materiales es la unión térmica, si bien se ha visto que existe cierta dificultad para llevar a cabo la unión de este material [62]. Por otro lado, puede ser unido por medio de adhesivos.

3.2.6. Tabla comparativa de los materiales estudiados:

Tabla 3.1. Comparación de las propiedades físicas más relevantes de los materiales estudiados.

	Trasparencia Óptica	Propiedades Químicas	Permeabilidad	Reciclabilidad	Biocompatibilidad	Hidrofobicidad	Propiedades Térmicas	Propiedades Eléctricas	Propiedades Mecánicas
PMMA	> 93%. Excelente en todo el espectro de luz [37]	Resistente a disolventes apolares y a rayos UV, absorción H ₂ O del 0.3% [37]	Baja [39]	Sí [36]	Alta [36]	Hidrófilo (Grupos éster) [37]	Aislante [37]	Aislante [37]	Muy rígido (E = 2.24-3.24 GPa) y resistencia a impactos [38]
PDMS	Con luz > 230 - 280 nm [21], [42]	Resistente a disolventes polares, impermeable al agua [15], [42], [44]	Alta al CO ₂ , O ₂ y vapor de agua [15], [21], [44]	No [36]	Alta [15], [21], [42], [44]	Hidrófobo (Grupos Metil) [15], [42]	Aislante [21], [44]	Aislante [28]	Muy flexible (E = 750 kPa) [44]
PS	Alta (material amorfo) para la luz visible [48]	Resistente a disolventes polares, ácidos/bases, impermeable al agua [46]-[49]	Alta al O ₂ y vapor de agua [50]	Sí [48]	Alta [46], [47], [49]	Hidrófobo (Anillos de benceno) [51]	Aislante térmico [52]	Aislante eléctrico [50]	Alta rigidez (E = 2.28 - 3.28 GPa) y fragilidad [38], [48]
PC	Alta (material amorfo) para luz visible, opaco para la luz UV [55], [57].	Resistente a ácidos y alcoholes, baja absorción de agua (<0.3%) [55]-[57].	Alta al vapor de agua y baja al O ₂ [50].	Sí	Alta [58]	Hidrofílico [59]	Aislante térmico [57]	Aislante eléctrico [57].	Alta rigidez (E = 2.38 GPa) y resistencia a impactos [38], [57]
COP/COC	Luz > 250 nm, transmitancia de 92% [55], [65], [66].	Resistente a disolventes polares, ácidos, bases, baja absorción de agua (<0.01%) [62], [65]	Baja al vapor de agua y al O ₂ [50], [67].	Sí [68]	Alta [69]	Hidrofóbico [66]	Aislante térmico [70]	Aislante eléctrico [64]	Alta rigidez (E = 2.6 - 3.2 GPa), alta fragilidad [43], [64]

3.2.7. Ejemplos de dispositivos microfluídicos:

Se pueden encontrar distintos ejemplos de dispositivos microfluídicos fabricado con los materiales anteriores siguiendo los procesos de fabricación explicados en la Sección 3.1.

Un ejemplo se puede encontrar en el trabajo de Chen y su equipo [40], en el que se trata la fabricación de un dispositivo microfluídico de PMMA para su uso en procesos de electroforesis por un proceso de laminación o de "sándwich". En él, partiendo de una placa rectangular de PMMA, se colocan en su superficie dos paquetes de fibras de vidrio entrecruzadas. Estas fibras de vidrio actuarán como los canales porosos a través de los cuales se hará la separación por electroforesis. Posteriormente, se vierte sobre la superficie de este conjunto una solución de MMA y, sobre ésta, se coloca otra placa rectangular de PMMA. Exponiendo el conjunto a una fuente de luz UV, se realiza el curado del MMA intermedio, que funcionará a modo de unión, obteniendo el dispositivo completamente fabricado. Se puede observar el resultado en la Fig. 3.12, en la que se muestra por un lado el dispositivo final (A), y por otro una sección de los paquetes de fibras de vidrio para la electroforesis (B y C).

Un segundo ejemplo se puede encontrar en el trabajo de Iwai y su equipo [45]. En él, haciendo uso por un lado de procesos de litografía blanda y por otro de moldeo por microinyección se lleva a cabo la fabricación de un dispositivo de PDMS y silicona transparente para su uso como generador de gotas o emulsiones. Un aspecto muy innovador de este dispositivo es la introducción de un sistema de bombeo del flujo por medio de activación dactilar: Con la pulsación de una membrana flexible se origina un avance del flujo en la dirección escogida. Además, el incremento de presión causado en el interior de los canales puede ser configurado en función de su geometría. En el caso de la fabricación por litografía blanda, el proceso seguido parte de una oblea de silicio con material SU8 en su superficie formando el negativo de la geometría que se quiere conseguir. Este material suele utilizarse como resina de sacrificio en estos procesos de litografía blanda. Posteriormente, se vierte el PDMS en esta superficie y se hace su curado, obteniendo en este caso las dos mitades que conformarán el dispositivo final. Por último, añadiendo una fina capa de separación entre ellas también de PDMS, se lleva a cabo la unión de ambas mitades obteniendo el dispositivo mostrado en la Fig. 3.13. Un esquema de este proceso se puede encontrar también en la Fig. 3.13.

Un ejemplo del uso de PS se puede encontrar en el trabajo de Cao y su equipo [53], en el que mediante el uso de un proceso de Xurografía y Laminación llevan a cabo la fabricación de un dispositivo micromezclador tridimensional. En él, mediante la unión por termocompresión de un total de 14 capas de PS (cada una de ellas de 125 μm de espesor) cortadas con un plotter de corte de escritorio, conforman la intrincada geometría 3D que puede verse en la Fig. 3.14. Se puede observar también en la Fig. 3.14 las capas que conforman en su conjunto la geometría 3D y el resultado final durante su uso, viéndose la capacidad de mezclado que el dispositivo posee.

En el trabajo de Chen y su equipo [60] se explicaría el proceso de fabricación de un dispositivo microfluídico autocontenido para el aislamiento, amplificación y detección de ácidos nucleicos. Este dispositivo estaría fabricado en PC por su alta temperatura de transición vítrea, tal y como se ha analizado anteriormente. Se puede ver en la Fig. 3.15 el resultado final tan complejo que obtienen, así como la vista en sección del producto. Para conseguir un producto de tal complejidad, el conjunto de investigadores hace uso de un proceso de microfresado, aunque explican que el dispositivo está diseñado para su fabricación por medio de moldeo por microinyección.

Por último, en los trabajos de Saez y su equipo [71] y de Jeon y su equipo [72] se pueden encontrar ejemplos del uso de COC para la fabricación de dispositivos microfluídicos.

En el primer trabajo [71] se puede observar la fabricación de un dispositivo 3D formado por un canal en forma de serpentín a modo de mezclador fabricado por Xurografía y Laminación por unión con PSA siguiendo lo que se denomina “*técnica del Origami*”. Esta técnica se llevaría a cabo por el corte no de varias capas de COC que luego se superpondrían, si no de una única lámina de COC que cuenta con todas las capas que el dispositivo necesita (Fig. 3.16). Esta lámina sería plegada de una manera determinada, formando un complejo ensamblaje que da como resultado el producto final. Unas láminas de PSA colocadas de forma estratégica servirían como métodos de unión (elementos blancos sobre la superficie de COC). Se puede observar en la Fig. 3.16 el resultado final de este proceso siendo utilizado.

En el segundo trabajo [72] el grupo de Jeon lleva a cabo la fabricación de una plataforma de cultivo celular *in vitro* en COC mediante procesos de *Hot Embossing*. En este caso, el proceso seguido para la fabricación del dispositivo se muestra en la Fig. 3.17: Partiendo de una oblea de silicio conformada con la geometría negativa que se quiere obtener (a), se fabrica inicialmente un molde de PDMS (b). Posteriormente, con este molde de PDMS se fabrica un segundo molde de resina epoxi (c, d) para llevar a cabo el sellado de una oblea de COC por *Hot Embossing* (e). Tras este proceso, la oblea se prepara (f, g) y se sella con una segunda lámina de COC por termocompresión, obteniendo el dispositivo final (h). Se muestra en la Fig. 3.18 el resultado final de este proceso de fabricación y un detalle de sus canales, mostrando la gran resolución del resultado final por *Hot Embossing*.

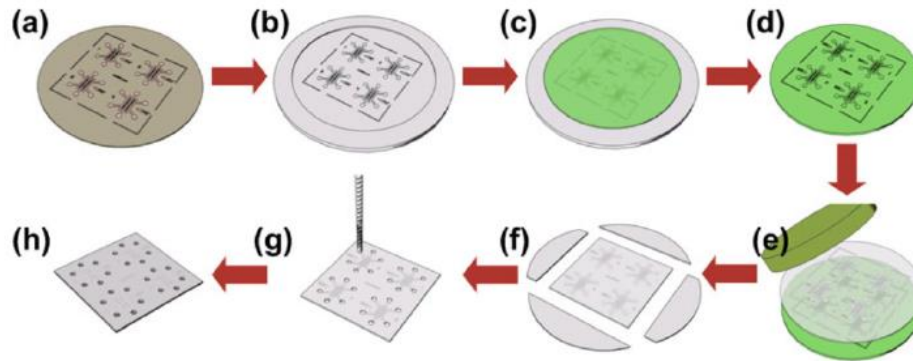


Fig. 3.17. Esquema del proceso de fabricación seguido para la fabricación del dispositivo microfluídico de COC por Hot Embossing de Jeon y su equipo. Extraído de [72].

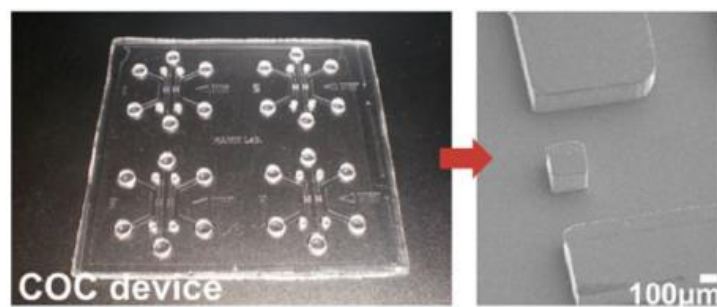


Fig. 3.18. Plataforma de cultivo celular in vitro fabricada por Jeon y su equipo. Extraído de [72].

Capítulo 4. Fabricación, validación y uso en ensayos experimentales de un dispositivo microfluídico con capacidad de monitorización de oxígeno.

4.1. Ámbito del proyecto: colaboración entre BEOnChip y PreSens.

Todo lo introducido con anterioridad, en especial lo referente a la Xurografía/Laminación como método de fabricación y al COC como material utilizado, aporta el contexto teórico para tratar la fabricación, validación y uso en ensayos experimentales de un dispositivo microfluídico con capacidad de monitorización de oxígeno. Como se ha indicado en los objetivos del proyecto, este sería el punto principal por desarrollar.

Con el fin de comprender qué productos se desean combinar y las potenciales capacidades que poseería el producto final, se dispone a hacer una breve presentación de ambas empresas y productos, indicando en la medida de lo posible ejemplos de su uso real en la literatura.

4.2. BEOnChip:

4.2.1. Presentación de BEOnChip.

BEOnChip Biomimetic Environment On Chip S.L., tal y como especifican en su página web [73], es una empresa fundada en 2016 a raíz de la investigación llevada a cabo por Rosa Monge, Ignacio Ochoa y Luis Fernández en la Universidad de Zaragoza.

BEOnChip se especializa en el desarrollo de dispositivos microfluídicos principalmente para su uso en estudios *in vitro* en el ámbito *OoC*. La oferta de producto que esta empresa posee varía entre productos propios ya desarrollados o productos personalizados, hechos para cumplir las necesidades especificadas por el cliente. En este proyecto se centra la atención únicamente en los productos propios de la empresa.



Fig. 4.1. Producto de la empresa BEOnChip. De izquierda a derecha: BE-Flow, BE-Doubleflow, BE-Transflow y BE-Gradient. Fuente: BEOnChip.

En la Fig. 4.1 se pueden ver los principales productos de BEOnChip: BE-Flow, BE-DoubleFlow, BE-Transflow y BE-Gradient. Todos sus productos propios se fabrican siguiendo una combinación de dos técnicas de fabricación: Moldeo por microinyección y Xurografía/Laminación:

- La parte superior de los dispositivos o “pieza inyectada” se fabrica mediante un proceso de moldeo por microinyección. En esta capa (a excepción del BE-Gradient, en el cual también se conforman los canales) estarán presentes únicamente las conexiones fluidicas entre el dispositivo y el equipamiento de perfusión externo y los reservorios de evaporación, contando en la parte más baja con una superficie plana. Cabe indicar que las conexiones roscadas utilizadas por BEOnChip están patentadas, pues poseen una abertura hacia los reservorios de evaporación que evita la introducción de burbujas en el circuito microfluídico al realizar la conexión con el equipo externo.
- Los canales y la base de los dispositivos se conforman siguiendo un proceso de Xurografía: Mediante el uso de un plotter de corte, distintos materiales laminados son estructurados según los diseños que se hayan realizado en softwares tipo CAD. Se forman así las distintas formas de sus canales, que posteriormente se unirán entre sí y a la pieza inyectada por medio de adhesivos o de procesos de termocompresión.

4.2.2. Producto utilizado de la empresa: BE-Flow.

Si bien todos ellos poseen cualidades propias muy interesantes, se pone el foco en el dispositivo BE-Flow, al ser a partir del cual se va a desarrollar el dispositivo de este proyecto. Se puede observar en la Fig. 4.2 un ejemplo del BE-Flow. Este producto es el más simple de la empresa, contando con 2 canales paralelos de tamaño variable (normalmente de 1.5 mm de ancho por 0.375 mm de espesor y 43 mm de largo) en los cuales se pueden llevar a cabo hasta 2 cultivos celulares simultáneos. Las especificaciones técnicas del BE-Flow pueden encontrarse en **Anexo I**. La metodología de uso de estos dispositivos es la siguiente:

- Se debe tener un cultivo celular previo del cual extraer las células para su sembrado en el dispositivo. Así, tras tripsinizar el cultivo existente, se aspiran 100 μ l y se añaden en el interior de los canales. Se dejará reposar el conjunto para asegurar una adhesión de las células a la superficie del dispositivo.
- Una vez se tenga una capa confluyente de células, se puede conectar el dispositivo a los sistemas de flujo que se vayan a utilizar. Para ello se debe hacer uso de las conexiones roscadas presentes en la pieza inyectada. Se muestra en la Fig. 4.3 un ejemplo de un dispositivo BE-Flow con un equipo de flujo conectado.
- Para más información sobre el uso y el cultivo de células en el BE-Flow, consultar su ficha técnica en el **Anexo I**.

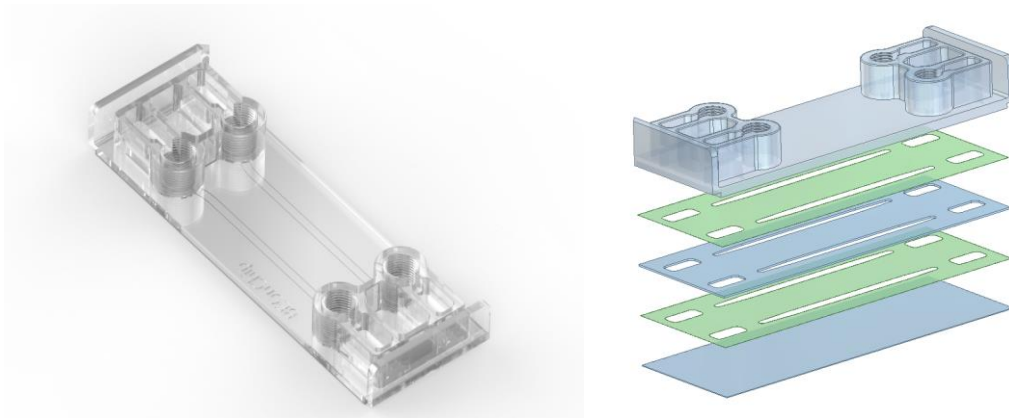


Fig. 4.2. Dispositivo BE-Flow de la empresa BEOnChip (izq.) y modelo virtual mostrando las distintas capas de las que se compone (dcha.). [Fuente](#).

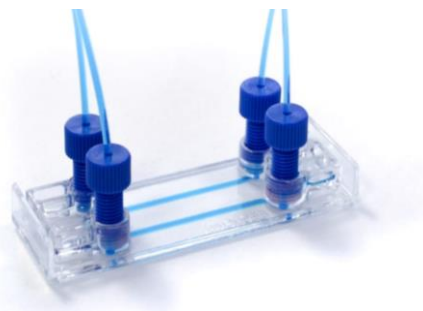


Fig. 4.3. Dispositivo BE-Flow con un equipo de flujo conectado a las conexiones roscadas. Fuente: BEOnChip.

Se muestran en la Fig. 4.2 las distintas capas que conforman el dispositivo. Tal y como se ha comentado con anterioridad, éste se compone de una pieza fabricada por inyección (pieza superior) y de dos capas inferiores, que conformarán los canales (azul, estructurado) y la base del dispositivo (azul, liso), pegadas entre sí por medio de capas de adhesivo (verde).

4.2.3. Ejemplos del uso de sus productos en la bibliografía:

Se pueden encontrar diversos ejemplos en la bibliografía sobre el uso de productos de esta empresa, normalmente de productos personalizados basados en su mayoría en el dispositivo BE-Gradient. Así, se puede observar que se ha hecho uso de los productos de BEOnChip para: el desarrollo de modelos microfluídicos de Glioblastoma Multiforme (GBM), a través de los cuales han podido estudiar los efectos que tienen las obstrucciones vasculares en la agresividad y migración tumoral [74]; la creación de un modelo *in vitro* del Microambiente Tumoral (TME, uno de los aspectos más importantes de cara al desarrollo tumoral o a la respuesta individual de cada tumor a los tratamientos quimioterapéuticos) que permite el estudio de distintos parámetros característicos de éste (muerte celular o gradientes químicos, entre otros) [75]; la creación de modelos del TME *in vitro* utilizados para el desarrollo de protocolos de recuperación celular, de modo que los cultivos tumorales puedan retirarse y recuperarse de la plataforma microfluídica para su estudio o manipulación externo sin ningún efecto en la viabilidad celular [76] o incluso la creación de modelos tumorales en los cuales poder probar la efectividad de tratamientos antitumorales novedosos (como el uso de las proteínas TRAIL) en función de las líneas tumorales y del método de entrega (de manera convencional o el uso de nanopartículas lipídicas funcionalizadas con TRAIL) en modelos tanto de cáncer de pulmón [77] como de cáncer de colon [78] (Fig. 4.4).

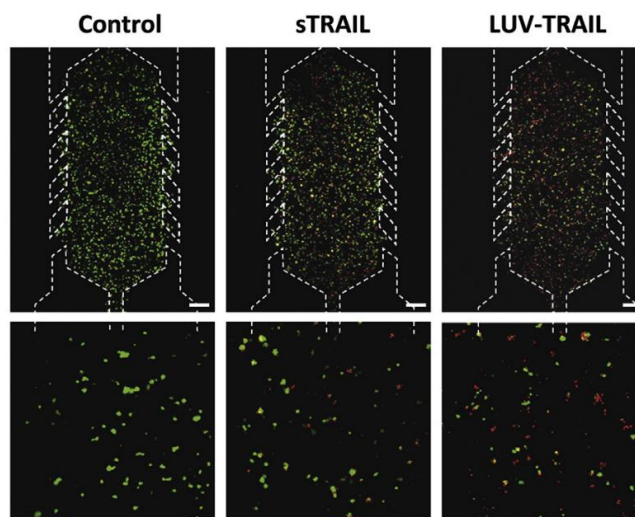


Fig. 4.4. Ejemplo del uso de un dispositivo microfluídico de BEOnChip en el estudio de la citotoxicidad de distintos métodos de entrega de la proteína TRAIL: Método convencional (sTRAIL, soluble) y con nanopartículas lipídicas (LUV-TRAIL). Extraído de [78].

4.3. PreSens:

4.3.1. Presentación de PreSens:

PreSens Precision Sensing GmbH, tal y como se dice en su página web [79], es una empresa nacida en 1997 de las investigaciones realizadas en la Universidad de Regensburg, en Alemania. Esta compañía se especializa en el desarrollo tanto de sensores químicos, especialmente para la medición de pH, CO₂ y O₂, como del equipo electrónico utilizado para el control y tratamiento de los datos medidos. Poseen un amplio abanico de productos, especialmente destinados para el sector biomédico o agroalimentario, que destacan por ser métodos de medición no invasivos y en tiempo real

4.3.2. Productos utilizados de la empresa: SensorPlugs, POF, OXY-4 ST, PMS2.

En este apartado se analizarán los diversos productos de la compañía que serán utilizados en el desarrollo del dispositivo microfluídico integrado. Así, estos productos son:

SensorPlugs (Fig. 4.5):

Línea de sensores desechables de la compañía PreSens especialmente diseñados para su uso en mili/microfluídica. Suponen una combinación del producto principal de la empresa (sus sensores moleculares ópticos) y una conexión plástica a modo de interfaz microfluídica mediante la cual se llevaría a cabo la integración del sensor en el interior de los dispositivos microfluídicos. La combinación de ambos elementos crea un dispositivo del tipo *Plug & Play* que solo necesita ser introducido en un circuito microfluídico para poder ser utilizado. Esta familia se divide en 3 tipos de sensores, cada uno de los cuales detectaría una señal biométrica diferente: O₂ SensorPlug, pH SensorPlug y CO₂ SensorPlug. De entre éstos, en este proyecto únicamente se utilizarán los O₂ SensorPlugs (Fig. 4.5), al ser los sensores más robustos de PreSens y los que se quieren integrar con el producto de BEOnChip en este proyecto.

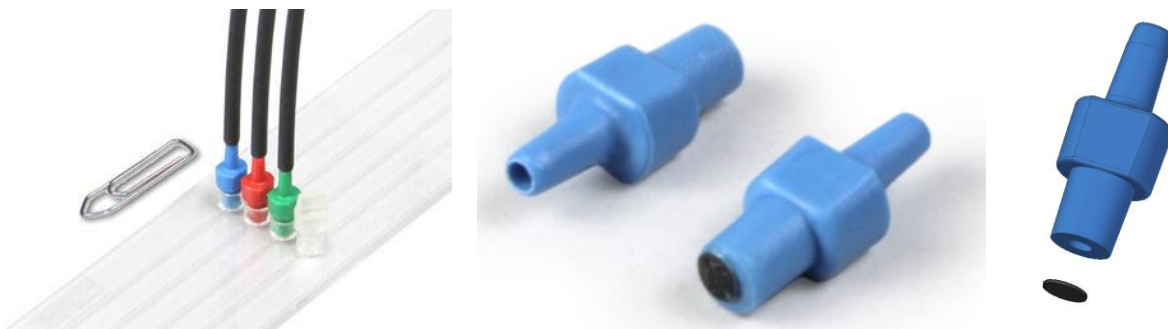


Fig. 4.5. Línea de sensores SensorPlug (izq.), O₂ SensorPlug (centro) y su modelo 3D mostrando sus dos componentes (drcha.). [Fuente](#).

El O₂ SensorPlug está formado principalmente por 2 partes: El Plug y el SensorSpot.

- **Plug (Fig. 4.6):** Es una pieza de material polimérico que sirve tanto de soporte de la parte activa (SensorSpot) en la medición como de método de conexión entre el interior del dispositivo microfluídico y el exterior. En el caso del sensor de O₂ esta pieza es de color azul, mientras que para el CO₂ es de color verde y para el pH es de color rojo (Fig. 4.5).

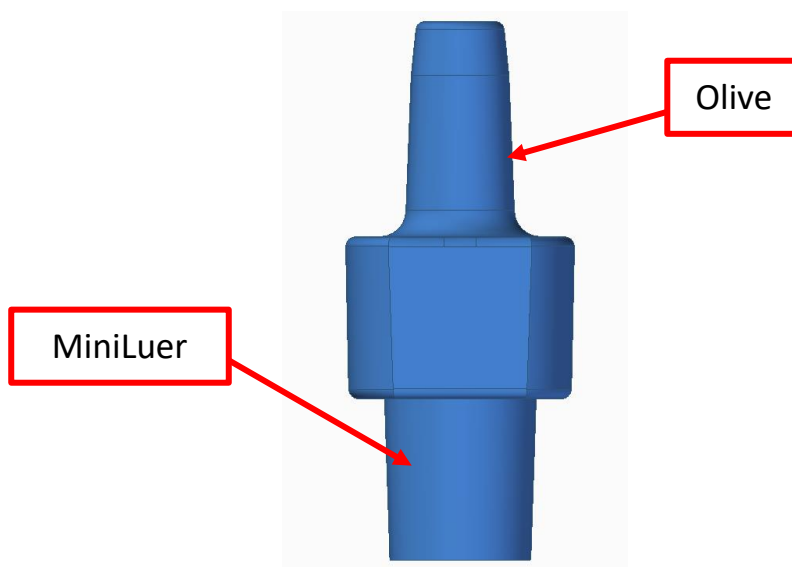


Fig. 4.6. Detalle del Plug y de sus conexiones.

Se puede ver en la Fig. 4.6 la forma que éste posee, estando éste dividido en 2 conexiones fluídicas distintas:

- **Puerto MiniLuer (macho):** Conexión microfluídica estándar que servirá como método de encaje en un puerto MiniLuer hembra del dispositivo microfluídico.
- **Puerto Olive (macho):** Conexión microfluídica normalmente utilizada para la conexión de tubos flexibles a través del cual se hará la conexión del dispositivo de medida (en este caso, una fibra óptica polimérica o POF).

Las medidas aproximadas de estos puertos se pueden encontrar en la Tabla 4.1, que expone una comparación entre las medidas dadas por el proveedor y otras medidas tomadas mediante microscopía óptica a modo de control de calidad (resultado de la media de las dimensiones de 3 Plugs distintos).

Tabla 4.1. Medidas del Plug y del SensorSpot, tanto las aportadas por el proveedor (Plano) como las tomadas mediante microscopía (Medida Microscopio). A la derecha se encuentra la leyenda de las medidas.

LEYENDA	PLANO (mm)	MEDIDA MICROSCOPIO (mm)
A	2.61	2.62
B	2.81	2.80
C	4.21	4.11
D	4.40	4.24
E	2.00	2.01
F	1.80	1.76
G	1.63	1.61
1	3.00	2.92
2	3.00	2.86
3	4.00	4.02

- **SensorSpot:** En la punta del Plug (extremo de la conexión MiniLuer) se encuentra adherido el SensorSpot (O₂ SensorSpot modelo PSt7-10-YOP), componente en donde se lleva a cabo la medida de la concentración de oxígeno. Estos sensores poseerían como partes constitutivas: Una fina base polimérica (sustrato) recubierta por un recubrimiento biocompatible USP de Clase VI, una capa de adhesivo biocompatible como método de unión al Plug y una capa de tinta fluorescente (biorreceptor) en la cual se daría un fenómeno de *quenching dinámico de luminiscencia* al entrar en contacto con oxígeno molecular. En la Fig. 4.7 se puede ver un esquema del funcionamiento de estos sensores. Se puede observar en la Tabla 4.1 que su diámetro es de 1.9 mm, inferior al diámetro del extremo de la conexión MiniLuer, aspecto que será relevante a la hora de llevar a cabo su integración con el BE-Flow.

El espesor de este SensorSpot varía en función de qué tipo de sensor se tiene. En el caso del O₂ SensorSpot, el espesor es de 152 ± 6 μm.

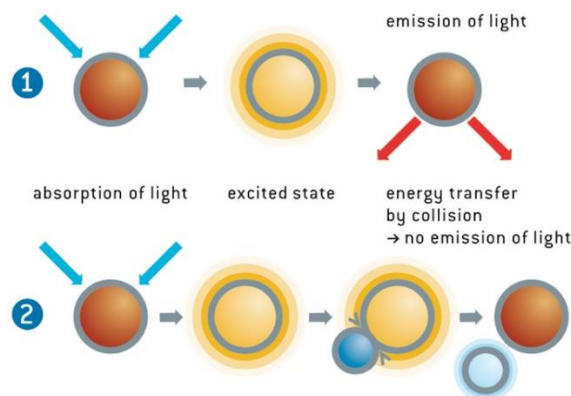


Fig. 4.7.. Esquema del fenómeno de quenching dinámico de luminiscencia que ocurre en los sensores para la detección del oxígeno molecular. (1) En la ausencia de O₂ molecular, toda la luz absorbida por el sensor es emitida de vuelta. (2). En la presencia de oxígeno, la luz absorbida por el sensor es transmitida al O₂, de modo que no es emitida de vuelta. Fuente.

Cabe indicar que en el O₂ SensorPlug el SensorSpot es su parte más delicada. Este tipo de sensor posee así una serie de contraindicaciones durante su uso o manipulación:

- Se debe evitar la aplicación de tratamientos basados en plasma (de cualquier tipo) o de luz UV a los sensores para evitar su inhibición (fotoblanqueo). Este aspecto será muy relevante, ya que ambos métodos son comúnmente utilizados para llevar a cabo procesos de esterilización o de activación superficial de dispositivos microfluídicos. Según indica el fabricante, los únicos métodos de esterilización admitidos serían así el uso de Etanol 70%, Óxido de Etileno o Radiación β .
- Se debe evitar el contacto con el SensorSpot en la medida de lo posible, huyendo de la aplicación de esfuerzos tangenciales o normales. Esto posee una implicación muy importante a la hora de llevar a cabo la introducción del sensor en el dispositivo, afectando al proceso de montaje.
- Los SensorPlugs vienen calibrados de fábrica y listos para su uso. Debe así evitarse cualquier manipulación indebida, exposición a la luz o colocación errónea que pueda llegar a afectar a su calibración para así evitar cualquier error en la medida. Aun así, es posible llevar a cabo un proceso de limpieza y recalibración del producto tras su uso (aun siendo considerado un producto desechable).

La información técnica del SensorPlug se puede encontrar en el **Anexo I**.

Equipo de medida de oxígeno OXY-4 ST (G3) (Fig. 4.8):

Equipo de medida óptico desarrollado por PreSens. Siguiendo un montaje de medida por reflexión, el equipo OXY-4 ST envía una señal láser desde su conexión y a través de la POF al O₂ SensorPlug, la cual es reflejada por el SensorSpot. El OXY-4 ST mediría así la diferencia entre la señal recibida y la enviada, a partir de la cual se calcularía la cantidad de oxígeno molecular presente en la muestra en relación con la absorción que se ha dado en el SensorSpot.



Fig. 4.8. Equipo OXY-4 ST (G3) de la empresa PreSens. Fuente: Anexo I.

Este equipo posee un total de 4 conexiones de tipo ST hembra a través de las cuales se conectarían las POF, y al conformar cada una de ellas un canal de medición se podrían llegar a hacer un total de 4 medidas de oxígeno de forma simultánea. Además, en caso de ser necesario, cada uno de los canales del OXY-4 ST posee una posible conexión a una sonda Pt-100 para llevar a cabo una compensación de la concentración de O₂ en función de la temperatura de la muestra. Esta característica no será utilizada en este proyecto.

El OXY-4 ST puede medir únicamente los datos provenientes del O₂ SensorPlug, no así los del resto. La información técnica de este equipo puede encontrarse en el **Anexo I**.

POF (Fibra Óptica Polimérica, Fig. 4.9):



Fig. 4.9. POF de la empresa PreSens. Fuente: Anexo I.

Elemento de conexión entre los SensorPlug y el OXY-4 ST. Se le denomina POF al estar su núcleo fabricado mediante un material polimérico (normalmente PMMA, [80]) en lugar de vidrio. Esta fibra óptica guía la señal luminosa saliente del OXY-4 ST, que llega hasta el SensorSpot y es reflejada de nuevo al OXY-4 ST para su medición. Posee dos extremos: Una conexión ST macho que se conecta a la conexión ST hembra del equipo de medida y un extremo sin recubrir (9 mm del núcleo de la fibra óptica al descubierto) que se conecta al puerto Olive del SensorPlug. La ficha técnica de este equipo puede encontrarse en el **Anexo I**.

PreSens Measurement Studio 2:

Software de medida desarrollado por PreSens, compatible con todos sus equipos de medida y sensores, que permite la monitorización simultánea de todos los equipos enlazados a él. La explicación de cómo utilizarlo se encuentra en el siguiente [enlace](#).

4.3.3. Ejemplos del uso de sus productos en la bibliografía:

Al igual que con los productos desarrollados por BEOnChip, se pueden encontrar en la literatura diversos ejemplos del uso real de los sensores de PreSens en los sectores agroalimentario y biomédico. Se destaca aquí la aplicación de la línea SensorPlug, al ser los sensores que mayor interés despiertan para este proyecto. Así, se puede observar el uso de los SensorPlug para: la monitorización de las concentraciones de O₂, CO₂ y pH para la validación de un modelo microfluídico de pulmón (*Lung on a Chip*) utilizado en cultivos celulares con Interfaz Aire-Líquido [81]; para monitorizar la evolución de un cultivo de fibroblastos de mamífero [82]; el estudio de los cambios en el pH y en la concentración tanto del O₂ como del CO₂ salivares al mascar chicles con xilitol (una variante de esta goma de mascar menos perjudicial para los dientes ya que reduce la aparición de caries) en un dispositivo microfluídico analítico [83]; el estudio de los cambios en la concentración de O₂ y de pH en modelos de inflamación de la microglía *in vitro*, parámetros a través de los cuales estudiar los cambios metabólicos que tienen lugar durante la polarización de la microglía en estos procesos inflamatorios (Fig. 4.10) [84] o incluso el estudio del crecimiento bacteriano (*E. Coli*) en biorreactores microfluídicos para el estudio de la posible contaminación de alimentos, medido en función de los cambios en CO₂, pH y O₂ [85].

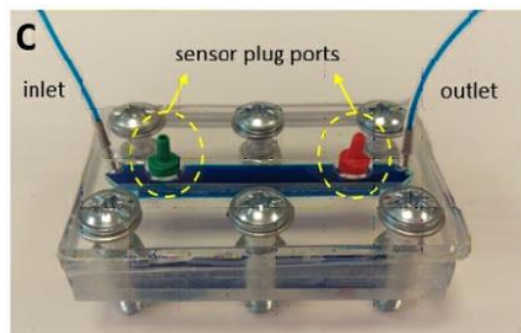


Fig. 4.10. Ejemplo del uso de los SensorPlug, en este caso de CO₂ y pH, en un modelo de inflamación de la microglía. Fuente: [84].

4.4. Objetivos, metodología y materiales:

Se ha visto en el apartado anterior que tanto los productos de PreSens como de BEOnChip poseen muchas potenciales aplicaciones en diversos campos de estudio, y el uso conjunto de los SensorPlug con dispositivos microfluídicos *OoC* es algo que cada vez resulta más interesante.

Partiendo de esto, se establece como objetivo de este proyecto analizar la combinación de estos dos productos en un nuevo dispositivo. La idea de este dispositivo surge a raíz de la colaboración BEOnChip y PreSens, con la intención de suplir esta creciente necesidad de controlar y monitorizar la concentración de oxígeno de ciertos modelos de cultivo celular en los que este parámetro es crucial (como sucede en el caso de modelos *Lung on-a Chip* [81], *Heart on a Chip* o en modelos cerebrales [74]). Este mejor control permitiría una reproducción más fiable de las condiciones fisiológicas, consiguiendo así modelos mucho más biomiméticos y, en definitiva, alternativas más competitivas a la experimentación animal.

La concentración de oxígeno pericelular puede llegar a ser un parámetro muy relevante, ya que no solo ésta molécula es la responsable del metabolismo celular, sino que también es un factor muy importante en el proceso de diferenciación celular [86]. Además, como se ha visto en distintos ensayos *in vitro*, puede llegar a ser muy diferente a la concentración de oxígeno ambiental [87].

Con este objetivo, se analizará en primer lugar el método de fabricación utilizado y las modificaciones a las que se debe someter el BE-Flow de BEOnChip, pasando a analizar el rendimiento del producto final para cumplir una serie de requisitos:

- Ausencia de fugas y una presión interna máxima de 2 bar.
- Biocompatibilidad.
- La capacidad de medida de los SensorPlug no se debe ver alterada tras su manipulación.

Finalmente, se hará uso del dispositivo fabricado para estudiar el intervalo de adaptación de un cultivo celular a un ambiente de hipoxia, para así resaltar una de las limitaciones de este tipo de estudios: La lentitud a la que el oxígeno disuelto en el medio de cultivo se equilibra con el del entorno, retrasando la consecución de las condiciones de ensayo.

Para este proyecto se han utilizado distintos recursos, tanto físicos como virtuales, además de materiales de fabricación. Excluyendo aquellos analizados en la Sección 4.2.2 y 4.3.2, estos recursos son:

4.4.1. Equipo físico:

Para el desarrollo del dispositivo microfluídico se hace uso tanto de equipos de prototipado rápido como de equipo propio de laboratorio:

Corte por láser de CO₂ (Fig. 4.11):

Hace uso de un láser pulsátil de CO₂ (9.4 – 10.6 μ m, 40 W) para causar la sublimación del material sólido a cortar. Este equipo cuenta con una resolución de 0.0125 mm y una velocidad de corte de 100 mm/s. Se utiliza en este proyecto para el corte de placas de PMMA. La ficha técnica de este equipo se encuentra en el **Anexo II**.

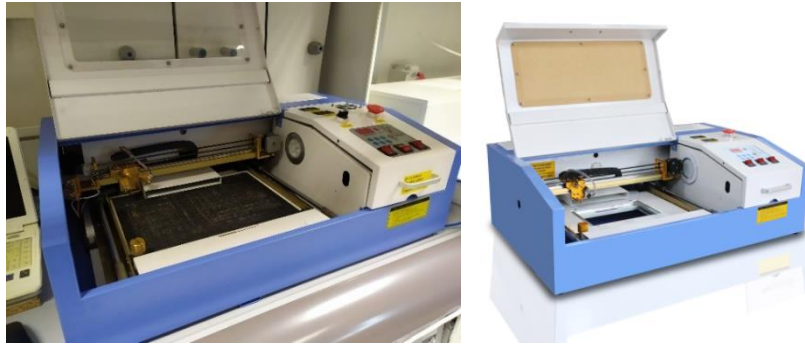


Fig. 4.11. Equipo de corte por láser de CO₂ Liaocheng City Hengchunyuan Machinery Equipment Co., Ltd FL-K40. [Fuente.](#)

Equipo de estereolitografía (SLA, Fig. 4.12):

Sistemas de impresión 3D que hacen uso de una combinación de una piscina de fotoresina y de un láser UV (405 nm). Cuenta con una plataforma de impresión que se introduce en la piscina, en la cual el láser va curando la fotoresina capa a capa hasta crear una geometría 3D que queda adherida a la plataforma. La resolución de este equipo es de 25 μm en el plano XY, y en el eje vertical varía en función del número de capas establecido para la impresión. La ficha técnica de este equipo se encuentra en el **Anexo II**.



Fig. 4.12. Equipo SLA FormLabs Form 2. [Fuente.](#)

Plotter de corte (Fig. 4.13):

Máquina de corte para Xurografía. Normalmente este tipo de equipos se utilizan en el sector del diseño textil o de la papelería, sin embargo, su uso en el campo de la microfluídica ha sido muy estudiado al ser una herramienta de prototipado rápido de coste reducido y con la cual se obtienen resultados muy buenos sin la necesidad de utilizar *salas blancas*. Este equipo cuenta con una resolución de 0.005 mm, una velocidad de corte máxima de 1.49 m/s y una fuerza de corte máxima de 5.88 N. La ficha técnica de este equipo se encuentra en el **Anexo II**.



Fig. 4.13. Plotter de corte GRAPHTEC FC8600. [Fuente.](#)

Plancha de transferencia o de termocompresión (Fig. 4.14):

Sistema para la unión de materiales por termocompresión. Este tipo de equipos son normalmente utilizados en la industria textil para el estampado de diseños, sin embargo, su uso es muy atractivo en procesos de Xurografía/Laminación. Este equipo alcanza una temperatura máxima de 316°C, estando la presión controlada por la fuerza de cierre manual. La ficha técnica de este equipo se encuentra en el **Anexo II**.

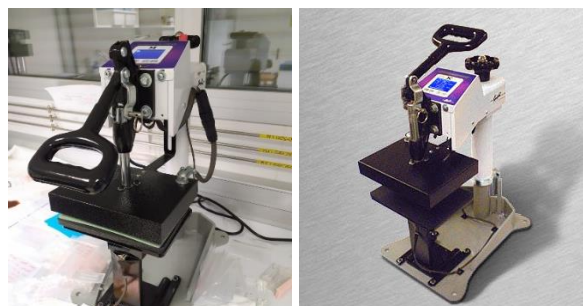


Fig. 4.14. Plancha de transferencia o termocompresora manual GEO Knight DC8. Fuente.

Cámara de flujo laminar (Fig. 4.15):

Una cámara de flujo laminar es un espacio a través del cual fluye de manera constante un flujo de aire vertical que desemboca en una serie de elementos de filtrado para llevar a cabo una limpieza constante del interior de la cámara.

Su uso es muy común en el campo de la biología y de la biomédica, siendo utilizados como cabinas de seguridad microbiológica. Su uso previene por un lado que el investigador aspire partículas o microbios presentes en el interior de la cámara y por el otro la entrada de partículas contaminantes desde el exterior.

Su uso en la fabricación de dispositivos microfluídicos es muy importante, sobre todo siguiendo procesos de Xurografía/Laminación, pues evita la aparición de escoria entre las distintas capas al proporcionar un aire libre de partículas. La ficha técnica de este equipo se encuentra en el **Anexo II**.

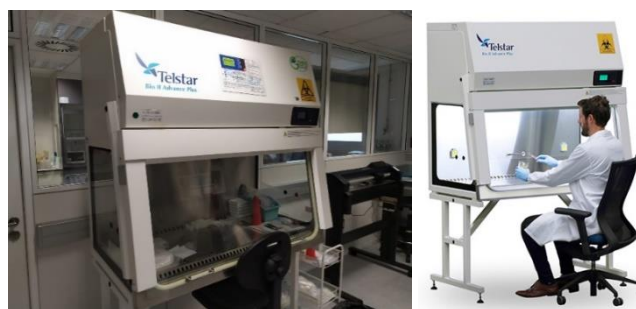


Fig. 4.15. Cámara de flujo laminar Telstar Bio II Advance Plus. Fuente.

Equipo de tratamiento por plasma de O₂ a baja presión (Fig. 4.16):

Los equipos de tratamiento o limpieza por plasma de O₂ a baja presión son cámaras de vacío en las cuales se crea un plasma frío de O₂, en cuyo interior se encuentran las piezas a tratar/limpiar. La interacción entre el plasma y la superficie de la pieza a tratar puede causar diversos efectos, tanto químicos como físicos: la formación de compuestos químicos, la creación de recubrimientos o, lo que resulta más interesante para este proyecto, la activación superficial del dispositivo. Aquí, las partículas del plasma impactan con la superficie y crean grupos funcionales hidrófilos, mejorando la mojabilidad del material utilizado y con ello el flujo a través de sus canales. La ficha técnica de este equipo se encuentra en el **Anexo II**.



Fig. 4.16. Equipo de tratamiento con plasma de O₂ Diener ATTO. [Fuente](#).

Cámaras de incubación/Biorreactores de perfusión (Fig. 4.17):

Los biorreactores son cámaras herméticas dentro de las cuales se lleva a cabo la recreación de las condiciones fisiológicas de las células cultivadas, fomentando así su supervivencia o proliferación. Se utilizan, en este caso, para estudiar la respuesta celular ante distintos tipos de ambientes (Hipoxia, Humedad excesiva, entre otros). Los biorreactores de perfusión, por su parte, son un tipo de equipos más desarrollados en cuyo interior se incluyen una o varias bombas peristálticas para el estudio de cultivos bajo perfusión. Los cultivos por perfusión por un lado aumentan la supervivencia celular (renovación del medio de cultivo y excreción de desechos) y por otro lado permite el estudio de la respuesta celular ante la aparición de flujos y los esfuerzos de cizalla resultantes.

Las cámaras de incubación utilizadas cuentan con sistemas para el control de 4 parámetros ambientales: %O₂, %CO₂, Temperatura y Humedad Relativa, además de contar con sistemas de perfusión. Estos equipos serán utilizados de cara al uso del dispositivo en los ensayos experimentales, donde se utilizarán 2 biorreactores de perfusión (sin hacer uso de las bombas peristálticas, únicamente como cámaras de incubación): uno en condiciones de normoxia (%O₂ ambiente) y otro en condiciones de hipoxia (%O₂ reducido), con %CO₂, Temperaturas y Humedades similares. La ficha técnica de este equipo se encuentra en el **Anexo II**.



Fig. 4.17. Cámara de incubación o biorreactor de perfusión EBERS TEB1000. [Fuente](#).

4.4.2. Software utilizado:

De manera análoga al equipo físico utilizado en el desarrollo del dispositivo integrado, también se hace uso de una serie de recursos virtuales (software) durante el proceso de fabricación. Estos softwares son:

- **AutoCAD:** Programa de diseño asistido por ordenador (CAD) perteneciente a la empresa Autodesk. Utilizado para desarrollo de modelos 2D de la estructuración de las distintas capas del dispositivo, que posteriormente serían enviados al Plotter de corte o al equipo de ablación por láser de CO₂ para llevar a cabo la fabricación, por ejemplo, de los canales del dispositivo.

- **Solid Edge:** Programa de diseño asistido por ordenador (CAD) de Siemens más enfocado al diseño 3D. Utilizado principalmente como herramienta de visualización y creación de modelos virtuales para su impresión con el equipo SLA.

4.4.3. Materiales de fabricación utilizados:

En cuanto a la selección de los materiales para desarrollar el producto, destaca el uso del COP y del COC, cuyas características han sido analizadas con anterioridad. Con esto en mente, en función de la disposición de estos materiales se tiene:

- **COP laminado:** Láminas de COP de 188 μm de espesor. Son utilizadas para que mediante su estructuración por corte con Plotter conformen varias capas del dispositivo microfluídico.
- **COC híbrido laminado:** Láminas de COC hibridado con un material siliconado de 150 μm de espesor. En sección, 100 μm serían de COC y el resto del material siliconado. Son utilizadas para que mediante su estructuración por corte con Plotter conformen los canales del dispositivo microfluídico.
- **COP inyectado:** Material del que se componen la pieza inyectada superior de los dispositivos microfluídicos de BEOnChip, en la cual están presentes las conexiones fluidicas y los depósitos de medio de cultivo.
- **Adhesivo laminado:** Láminas de adhesivo de 25 μm de espesor mediante las cuales se lleva a cabo la adhesión por aplicación de presión de las distintas capas que conforman el dispositivo microfluídico.
- **Compuesto siliconado laminado:** Láminas de 100 μm de espesor conformadas por un compuesto siliconado que poseen la función de habilitar la unión de las distintas capas que conforman el dispositivo microfluídico mediante procesos de termocompresión.

4.5. Consideraciones y estudios iniciales sobre la combinación de ambos productos:

Conocidos los principales aspectos técnicos tanto de los productos que se quieren combinar como de los equipos o del software a utilizar se procede a diseñar un proceso de fabricación para el dispositivo estudiado. El desarrollo de este proceso nace de la respuesta a 3 cuestiones principales:

- ¿Qué modificaciones en el BE-Flow son necesarias para la inclusión del SensorPlug?
- ¿Qué método de unión se utiliza para las distintas capas del dispositivo microfluídico?
- ¿Qué proceso de fabricación es necesario para conseguir el producto final respetando las indicaciones del fabricante?

Las respuestas a cada una de estas cuestiones conforman un apartado propio, y finalmente llevan al producto completamente desarrollado.

4.5.1. Modificaciones necesarias en el BE-Flow:

Modificaciones en la pieza de inyección:

Para asemejar la integración de los SensorPlug en dispositivos microfluídicos llevada a cabo tanto por PreSens como por otros grupos de investigación (Fig. 4.10) se decide que la aproximación a realizar sea la más simple y a la vez efectiva: El uso de un taladro vertical para crear orificios en la pieza de inyección, a través de los cuales se llevará a cabo la introducción de los sensores al dispositivo. Estos agujeros deben quedar centrados con respecto a los canales que se encuentran en la capa inmediatamente inferior, y se realizarán algo desfasados con respecto a la línea media de la pieza de inyección para habilitar la implementación en otro tipo de dispositivos de BEOnChip (Be-Transflow). Los orificios tras la introducción de los SensorPlugs deberán ser herméticos para evitar posibles fugas del interior de los canales, aportando el apriete necesario para aguantar una presión interna de 2 bar. Es por eso por lo que su diámetro será un aspecto muy relevante.

Existe un problema relacionado con el posicionamiento de los orificios: El taladrado de estos huecos debe ser totalmente reproducible, y dado que el proceso se realiza de manera manual resulta muy complicado. Para solventar esto se decide fabricar el denominado “**Útil de taladrado**” (Fig. 4.18), un útil de fabricación desarrollado en PMMA y fabricado por medio de corte por láser en el que se introducirán hasta 3 piezas de inyección. Con él, y gracias a una serie de orificios a través de los cuales se introducirá la broca del taladro, se posibilita la creación de los agujeros siempre en la misma localización de manera completamente reproducible.



Fig. 4.18. Útil de taladrado fabricado en PMMA (izq.) y su modelo virtual con las piezas de inyección colocadas en su lugar y preparadas para ser taladradas (dcha.).

Tras el desarrollo de una serie de pruebas de ajuste del sensor a los huecos taladrados, se llega a la conclusión de que el tamaño de broca óptimo es de 2.75 mm. Con este tamaño de agujero el apriete máximo conseguido entre el sensor (de diámetro máximo de 2.81 mm) y la pieza de inyección es suficiente para asegurar una unión *a priori* suficientemente fuerte. Además, las pruebas con el *útil de taladrado* muestran que la posición de los orificios es siempre idéntica, por lo que el proceso es totalmente reproducible.

Modificaciones en los canales del BE-Flow:

Se ha visto en la Sección 4.2.2 que Producto utilizado de la empresa: BE-Flow. el tamaño estándar de los canales del BE-Flow es de 1.5 mm. Si se compara esta dimensión con el ancho el SensorSpot, de 1.9 mm, se ve que este último no podría entrar en el interior de los canales para llevar a cabo la medición.

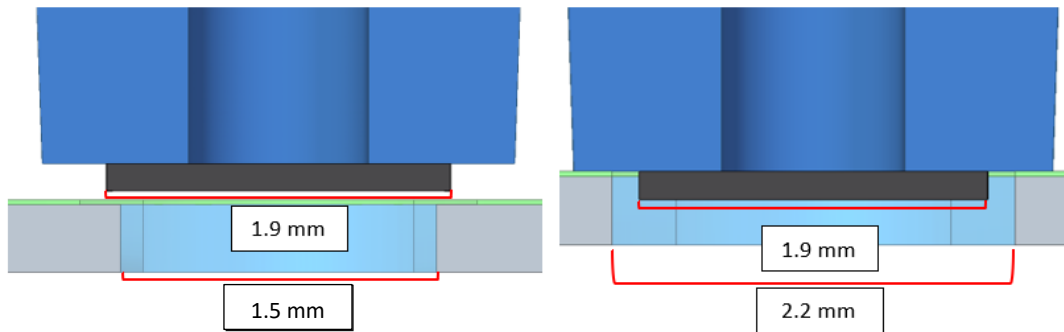


Fig. 4.19. Esquema mostrando la comparación del diámetro del SensorSpot (1.9 mm) y del ancho de los canales original (1.5 mm, izq.) y modificado (2.2 mm, drcha.) para permitir su entrada en ellos.

Es por eso por lo que el ancho de los canales debe alterarse. Dado que la concentricidad del SensorSpot con respecto al eje longitudinal del Plug no está asegurada por parte del fabricante, se decide que el ancho de los canales sea de 2.2 mm de modo que se deje un cierto margen de seguridad para estas variaciones de la concentricidad (Fig. 4.19). La profundidad de los canales deberá ser en principio mayor de 152 μm , aspecto que se cumple con el diseño estándar. Sin embargo, por parte de BEOnChip se decide que la penetración del SensorSpot en el interior del canal debe ser la mínima posible para asegurar que el sensor realice sus mediciones de manera fiable, pero no excesiva de modo que no interrumpa o altere el flujo del canal. Se recomienda así que el SensorSpot no se introduzca más de 50 μm . La consecución de este aspecto se explica en la Sección 4.5.3.

Otro aspecto muy importante es que el Plug quede completamente rasante con la superficie inferior de la pieza de inyección. Esto es requerido por 3 motivos:

- La parte inferior de la pieza de inyección debe poseer una planitud total para asegurar una unión hermética con los canales.
- Una penetración excesiva del SensorPlug en los canales podría causar cambios locales en la velocidad del flujo, con el consiguiente aumento en las tensiones de cizalla sobre las células.
- Una penetración insuficiente del SensorPlug podría funcionar como una trampa de burbujas, manteniendo aire en las cercanías del sensor y potencialmente falseando la medida tomada.

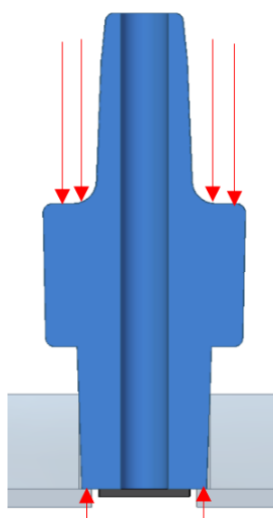


Fig. 4.20. Esquema del uso de la superficie no cubierta por el SensorSpot.

Tras varias pruebas, se establece que esto se conseguirá utilizando la superficie no ocupada por el SensorSpot del puerto MiniLuer del Plug. El planteamiento es el siguiente (Fig. 4.20):

- Se utiliza un agujero en una superficie aparte cuyo diámetro se encuentre entre los 1.9 mm (\varnothing SensorSpot) y los 2.61 mm (\varnothing Extremo distal de la conexión MiniLuer), de modo que se apoye en la superficie restante. Se establece que este diámetro sea de 2.2 mm, al igual que los canales, para tener en cuenta la posible no concentricidad del SensorSpot.
- Con este agujero, se superpone de manera concéntrica el agujero de la pieza de inyección. Posteriormente se introduce el SensorPlug, que al llegar a la interfase entre ambas piezas hará tope con el orificio inferior y quedará completamente rasante con la pieza de inyección.

Un desafío para conseguir esto es asegurar la concetricidad de ambos orificios a la hora del montaje del SensorPlug, ya que cualquier desfase podría llevar a que el sensor recibiera esfuerzos normales o de cizalla y se dañara. Por ello, se desarrolla otro útil, denominado **“Útil de liberación del Spot”** (Fig. 4.21), fabricado en PMMA por corte láser con el que se asegura la concetricidad de ambos orificios al colocar las piezas de inyección en una posición determinada.



Fig. 4.21. Útil de liberación del Spot fabricado en PMMA (izq.); Modelo virtual del útil de liberación del Spot con las piezas de inyección y los aplicadores colocados en su lugar para proceder a introducir los SensorPlug (centro); Aplicador y su método de uso (drcha.).

Para facilitar la introducción de los SensorPlug y facilitar la aplicación de la presión necesaria para su introducción se diseñan unos **“aplicadores”** (Fig. 4.21), unas piezas que a modo de capuchón se colocan sobre los SensorPlug y permiten aplicar una presión constante de manera sencilla. Se evita así la deformación del puerto Olive durante el proceso de montaje. Estos aplicadores son fabricados por medio de impresión 3D de estereolitografía (SLA).

El último de los problemas surge dada la diferencia de longitud entre el conector MiniLuer del Plug y el espesor de la pieza de inyección (3 mm vs. 2 mm, respectivamente), que causa que al introducir el SensorPlug y enrasarlo con la base de la pieza quede 1 mm del Plug sin introducirse. Esto podría llegar a ser causa de problemas no solo en la introducción del SensorPlug sino también durante su uso, ya que esfuerzos de flexión repetidos aplicados al Plug podrían causar un desajuste. Con el fin de solucionar esto de manera parcial, se coloca una junta tórica de 2 mm de diámetro y 1 mm de espesor (en su configuración indeformada) que suplirá ese milímetro restante, además de actuar como barrera de hermeticidad extra.

4.5.2. Método de unión de las capas del dispositivo microfluídico:

Partiendo de la estructura de un BE-Flow estándar, se plantea a continuación el método de unión entre sus distintas capas. Como se ha analizado en la Sección 3.1.5, en la Xurografía/Laminación los métodos de unión más comunes son la unión por medio de adhesivos o con métodos de termocompresión. Se decide así llevar a cabo la construcción de 2 tipos de prototipos, uno con cada tipo de unión, para analizar sus características y ver qué tipo de unión se elige.

4.5.3. Procesos de fabricación diseñados:

Con el fin de desarrollar cada uno de los prototipos, se establecen 2 procesos de fabricación distintos para cada uno en función del tipo de unión. Es importante resaltar que, en función del tipo de unión utilizada, los materiales que conforman las distintas capas del dispositivo variarán:

Proceso de unión por adhesivo:

La estructura y composición del dispositivo será tal cual la del BE-Flow estándar con la incorporación del SensorPlug (Fig. 4.22). Así, de arriba abajo en el esquema, el dispositivo poseerá las siguientes capas:

- SensorPlug.
- Junta tórica.
- Pieza de inyección fabricada en COP.
- Adhesivo estructurado de forma idéntica a los canales. De esta forma el canal no está expuesto en su totalidad a la presencia de adhesivo.
- Canales fabricados en COP de 375 μm de espesor y 2.2 mm de ancho.
- Base fabricada en COP.

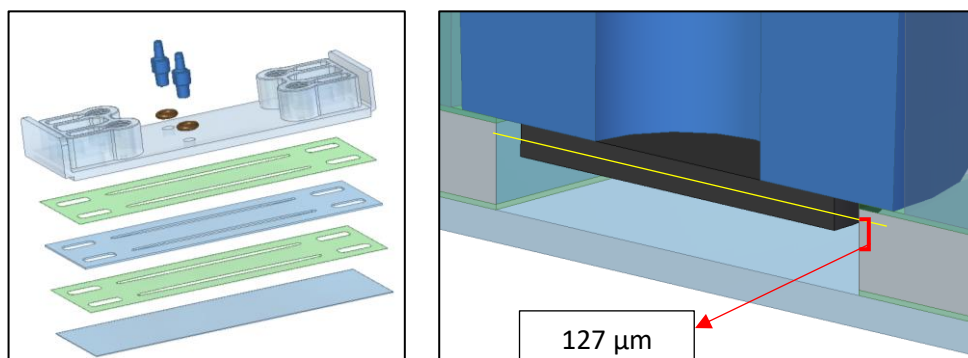


Fig. 4.22. Modelo virtual explosionado del prototipo ensamblado mediante el proceso de unión por adhesivo (izqda.) y zum del ensamblaje final y la posición relativa del SensorPlug con respecto a las demás capas del BE-Flow (drcha.).

El proceso de fabricación seguido en este caso sería el siguiente:

1. Taladrado de la pieza de inyección con el uso del *útil de taladrado*.
2. Unión de los canales a la base del dispositivo por medio de adhesivo.
3. Tratamiento de todo el conjunto con plasma de O_2 a baja presión. Se lleva a cabo así una activación superficial, además de un proceso de esterilización.
4. Tratamiento con luz UV del conjunto para una máxima esterilización.
5. Introducción del SensorPlug a la pieza de inyección taladrada con el uso del *útil de liberación del Spot* y de los *aplicadores*.
6. Unión de la pieza de inyección al conjunto canales + base con adhesivo.

Proceso de unión por termocompresión:

En este caso el proceso cambia. El COP es un material muy rígido y estable, por lo que llevar a cabo su unión por medio de procesos de termocompresión supondría someter al material a temperaturas y presiones demasiado elevadas. Es por eso por lo que en este caso se hace uso del laminado de COC híbrido con un compuesto siliconado. En este material, aunque el COC posea características similares al COP y su unión a él sea algo compleja, la capa de compuesto siliconado actúa como método de unión al ser un material mucho más flexible y cuya temperatura de transición vítrea es más baja. Se utiliza este material para unir tanto los canales entre sí como la base.

No obstante, se presenta un problema de cara a realizar la unión entre los canales y la pieza inyectada: entran en contacto el COP de la pieza inyectada y el COC de los canales, y su unión es algo muy complejo. Para resolver esto se usa como unión entre ambos un laminado de compuesto siliconado de 100 μm de espesor.

Las capas que conformarían a la alternativa por termocompresión serían, de arriba abajo según la Fig. 4.23:

- SensorPlug.
- Junta tórica.
- Pieza de inyección fabricada en COP.
- Laminado de compuesto siliconado estructurado con las entradas de flujo y con los orificios para el paso de los SensorPlugs.
- Canales fabricados en COC híbrido con un compuesto siliconado de 300 μm de espesor y 2.2 mm de ancho. La capa siliconada iría enfocada hacia abajo, habilitando la unión por termocompresión con la capa inmediatamente inferior.
- Base fabricada en COP.

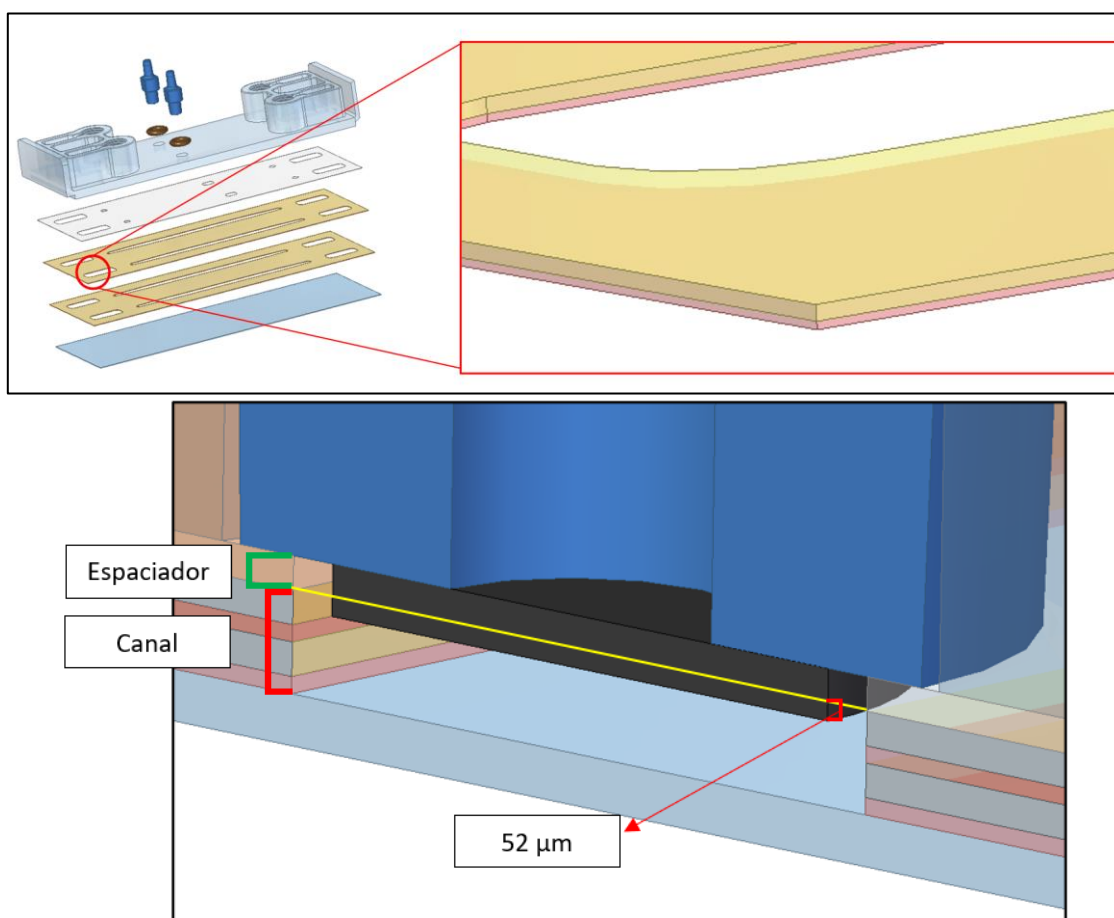


Fig. 4.23. Modelo virtual explosionado del prototipo ensamblado mediante el proceso de unión por termocompresión, resaltando el posicionamiento de las capas de COC híbrido, con el compuesto siliconado (rojo) hacia abajo (sup.) y zum del ensamblaje final y la posición relativa del SensorPlug con respecto a las demás capas del BE-Flow (inf.).

El proceso de fabricación seguido en este caso sería el siguiente:

- Taladrado de la pieza de inyección con el uso del *útil de taladrado*.
- Unión de los canales entre sí por termocompresión.
- Unión de los canales a la base por termocompresión.
- Unión del compuesto siliconado a la pieza de inyección por termocompresión.
- Unión de los distintos conjuntos por termocompresión.
- Tratamiento con plasma (activación superficial + esterilización) y esterilización por luz UV.
- Introducción de los SensorPlug con el uso de los *aplicadores*.

La principal diferencia entre ambos procesos de fabricación es el momento de la introducción del SensorPlug: Con la unión por adhesivo, la introducción del sensor en la pieza de inyección puede llevarse a cabo en cualquier momento siempre que sea previo al ensamblaje final. En el caso de la unión por termocompresión, la introducción debe realizarse una vez el dispositivo ya esté completamente ensamblado, evitando meter el SensorPlug en la termocompresora. Esto lleva a que en el segundo proceso de fabricación se prescindiera del uso del útil de liberación del spot, cambiándolo por otro sistema de enrasado: Jugando con la estructuración de las distintas capas del dispositivo se puede llegar a conseguir este mismo efecto (Fig. 4.24). Aquí la capa siliconada de 100 μm de espesor actuaría como espaciador entre la base del Plug y los canales, de modo que el SensorPlug haga tope con esta lámina y se introduzca un máximo de 52 μm en los canales, tal y como se ve en la Fig. 4.23. Con esta solución se consigue además limitar la introducción del SensorSpot en los canales a 50 μm , cumpliendo otro de los requisitos establecidos.

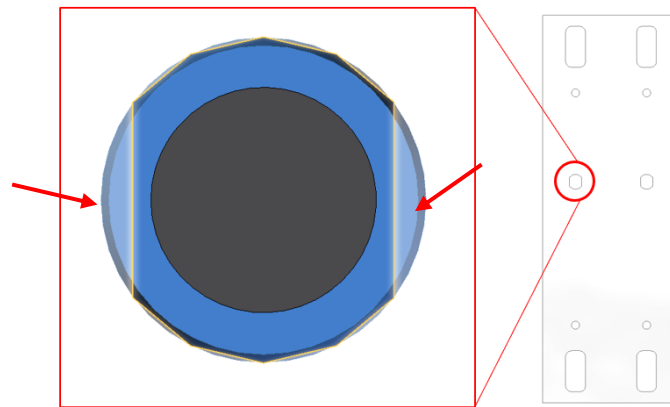


Fig. 4.24. Forma de los agujeros estructurados en el espaciador de compuesto siliconado. Se puede ver que el SensorPlug hace tope en las zonas señaladas con flechas, por lo que su introducción queda limitada por esta superficie.

4.6. Desarrollo de prototipos:

Una vez conocidas las distintas alternativas que se pueden llegar a tomar para conseguir un producto final completamente funcional se aplican estos procesos y se desarrollan 2 prototipos:

4.6.1. Prototipo con unión por adhesivo:

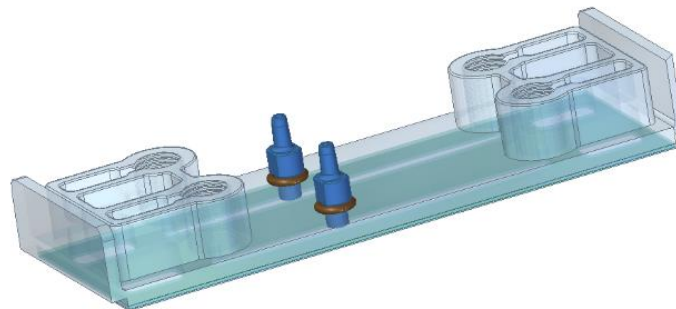
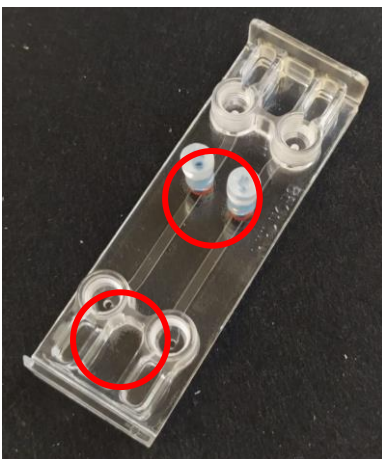


Fig. 4.25. Prototipo desarrollado mediante el proceso de unión con adhesivo (izq.) y su modelo virtual (drcha.). Se destacan las zonas de aparición de burbujas derivadas del uso de adhesivos.

Las características más relevantes de este dispositivo, mostrado en la Fig. 4.25, son:

- Canales de 375 μm de espesor, 2.2 mm de ancho y 46 mm de largo,
- Longitud de introducción del SensorSpot de 127 μm .
- La introducción del SensorPlug se realiza tras la esterilización y activación superficial pero antes de que el dispositivo esté completamente ensamblado, lo que hace que haya que manipular el interior del dispositivo tras su esterilización.
- Presencia de adhesivo en el perímetro de los canales, que aun siendo poco puede llevar a una bajada en la supervivencia celular.

4.6.2. Prototipo con unión por termocompresión:

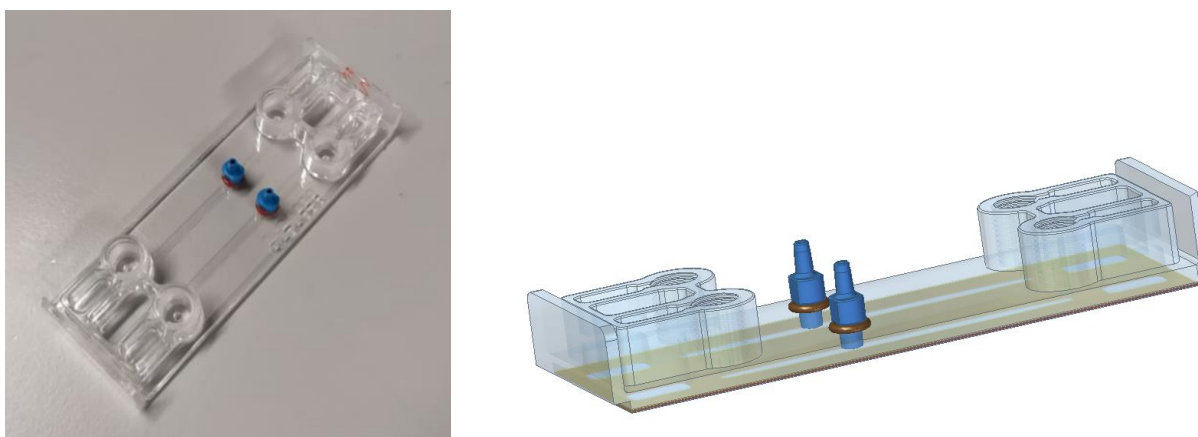


Fig. 4.26. Prototipo desarrollado mediante el proceso de unión por termocompresión (sup.) y su modelo virtual (inf.).

Las características más relevantes de este dispositivo, mostrado en la Fig. 4.26, son:

- Canales de 350 μm de espesor, 2.2 mm de ancho y 46 mm de largo,
- Longitud de introducción del SensorSpot de 52 μm .
- La introducción del SensorPlug se realiza al final del proceso de fabricación, por lo que no se manipula el interior del dispositivo tras su esterilización.
- Ausencia total de adhesivo en el dispositivo.
- Las células están expuestas a un medio menos rígido en la parte superior de los canales (compuesto siliconado), lo que puede alterar su comportamiento.

4.6.3. Elección final:

Para finalizar esta sección sobre la fabricación del dispositivo modificado, se toma una elección final tras analizar comparativamente ambas propuestas. Se concluye que la alternativa más viable es la fabricada mediante procesos de termocompresión debido a los siguientes puntos clave:

- Se consigue limitar la introducción del SensorSpot en los canales a los 50 μm establecidos como requisito, resultando aparentemente imposible en el caso del adhesivo. Esta es una de las principales razones de la elección de esta alternativa.
- La ausencia total de adhesivo resulta muy atractiva, ya que permite que el dispositivo sea utilizado en estudios con células muy sensibles a este compuesto.

- La unión por termocompresión, si bien no se aprecia muy bien en las imágenes, da como resultado un dispositivo con mayor transparencia al desvirtuarse las interfases entre los distintos materiales y eliminar gran parte de la difracción de la luz que en ellas pudiera suceder. Además, el dispositivo final es más robusto, consiguiendo una unión más fuerte. Por último, elimina un problema común del uso de adhesivos: La aparición de pequeñas burbujas de gas tras el pegado, fenómeno que se puede ver en la Fig. 4.25.
- La unión por termocompresión requiere, y por tanto habilita, la introducción del SensorPlug al final del proceso de producción. Esto hace que todo el dispositivo pueda ser tratado con plasma y UV cuando se encuentra completamente ensamblado. La única manipulación restante sería la introducción de los SensorPlug, que al venir estériles de fábrica y al ser montados dentro de la campana de flujo laminar no romperían la esterilidad del dispositivo (Fig. 4.27).

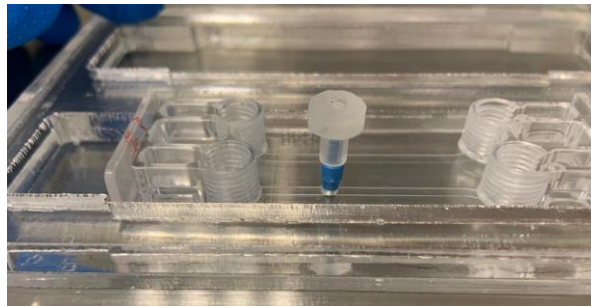


Fig. 4.27. Montaje del SensorPlug una vez el BE-Flow se encuentra totalmente ensamblado. El montaje se lleva a cabo dentro de la campana de flujo laminar.

La composición final real del dispositivo diseñado se muestra en la Fig. 4.28:



Fig. 4.28. Composición final del dispositivo diseñado. De izquierda a derecha: Pieza de inyección taladrada, Espaciador siliconado, Canales de COC híbrido y Base de COP.

Antes de pasar a su uso en el ensayo experimental aún queda un último paso: La validación de los prototipos finales, de forma que se cumplan los principales requisitos del proyecto. A modo de recordatorio, estos requisitos son: La ausencia de fugas a través de los taladrados de modo que aguante una presión interna de 2 bar; que su interior sea biocompatible y que los SensorPlug conserven su capacidad de medición tras el proceso de fabricación.

4.7. Validación del prototipo final:

Llegado este punto ya se posee un proceso de fabricación único, válido y reproducible para llevar a cabo el desarrollo de distintos prototipos del dispositivo final, todos ellos completamente funcionales. Sin embargo, es necesario aún que estos prototipos pasen una serie de pruebas de validación para asegurar que su respuesta sea correcta en las condiciones de laboratorio requeridas. Se plantea así someter a los prototipos finales a 3 pruebas de validación:

4.7.1. Validación de la hermeticidad y robustez del dispositivo final:

Con esta prueba se plantea estudiar por un lado la hermeticidad de la unión entre el dispositivo y el sensor y por otro lado la presión ejercida entre ambos componentes, que debe ser tal que soporte la aplicación de una presión dentro del canal de 2 bar. Se lleva a cabo de la siguiente forma:

- Se taponan los orificios de salida (*outlets*) de cada canal.
- Se conecta a cada entrada una bomba peristáltica y se aumenta de forma gradual la presión aplicada por la bomba.
- Como el flujo entrante no puede salir por ningún lado lo que ocurre es que la presión interna comienza a ascender en sintonía con la presión aplicada por la bomba, hasta llegar a los 2 bar.
- En caso de que la unión entre el sensor y el dispositivo no fuera suficientemente apretada, ocurrirían escapes de flujo a su través, o podría darse que los sensores salieran eyectados del dispositivo.

Tras llevar a cabo este ensayo de presión se vio que los taladrados poseían un diámetro suficientemente pequeño de forma que la presión ejercida entre los componentes cumpla con los requisitos del dispositivo.

4.7.2. Validación de la biocompatibilidad del dispositivo final:

Ya que este dispositivo va a ser utilizado en el desarrollo de estudios *in vitro* dentro del ámbito del *OoC* es necesario que posea una buena biocompatibilidad. Se estudiará así la supervivencia celular en el interior de sus canales y la diferencia que pudiera existir entre esta supervivencia en un BE-Flow sin modificar y en un BE-Flow modificado con los SensorPlug. Estas pruebas fueron llevadas a cabo por el equipo de investigación TME del CEMINEM (Universidad de Zaragoza).

Se usa para este ensayo la línea celular Caco-2, células normalmente utilizadas para el desarrollo de modelos *in vitro* de la barrera epitelial intestinal. Estas células son cultivadas en 3 dispositivos microfluídicos, de modo que:

- Se tiene un dispositivo control: Caco-2 sembradas en un BE-Flow estándar con cultivo por perfusión inespecífica (el medio de cultivo se moviliza por la acción de la gravedad, al montar al dispositivo en un balancín).
- Se tienen dos dispositivos en observación:
 - Un BE-Flow modificado con un cultivo estático de Caco-2 (lo que significa que el medio de cultivo no se mueve ni renueva en el interior de los canales).
 - Un BE-Flow modificado con un cultivo con perfusión inespecífica de Caco-2.

El cultivo de estas células en los canales de los tres dispositivos se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Densidad del cultivo: 1.39 millones de células/mm².
- Tiempo de adhesión celular: 2 horas.
- Tras la adhesión se añade medio de cultivo (Mezcla de disoluciones DMEM + 1%MEM NEA, ambos de la casa comercial Thermo Fisher).
- 20 horas después se hace el ensayo de viabilidad celular.

Se puede observar en la Fig. 4.29 el monocapa celular recién adherida y con el medio de cultivo recientemente introducido.

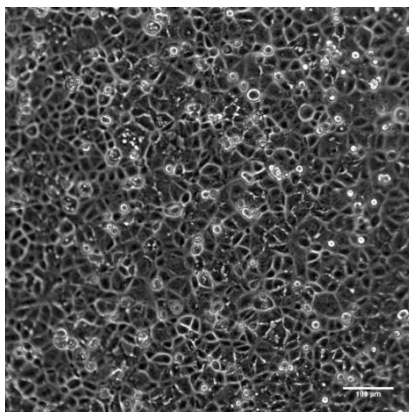


Fig. 4.29. Ejemplo del monocapa celular recién adherido, al inicio de la incubación con medio de cultivo.

Tras las 20 horas de cultivo se estudia la viabilidad celular. Para ello:

- Se incuban las células durante 30 minutos a 37°C.
- La incubación se lleva a cabo con los siguientes marcadores fluorescentes:
 - o Calceína: 2 µl/ml. Sirve para observar mediante fluorescencia las células vivas. Emite fluorescencia verde (515 nm).
 - o Yoduro de propidio: 6 µl/ml. Sirve para observar mediante fluorescencia las células muertas. Emite fluorescencia roja (615 nm).
 - o Tinción de Hoechst: 0.78 µg/ml. Sirve para observar mediante fluorescencia los núcleos celulares y de la membrana celular. Emite fluorescencia azul cian (460 nm).
- Una vez se ha realizado la tinción, se toman un total de 3 imágenes por fluorescencia en cada uno de los dispositivos (mínimo de muestras para poder aplicar estadística en los resultados) en los distintos canales. Se estudia en ellas con el Software de imagen *Image J* la diferencia en área de la fluorescencia captada en el canal verde (vivas) y en el rojo (muertas). Los resultados obtenidos se muestran en las Fig. 4.30 y Fig. 4.31.

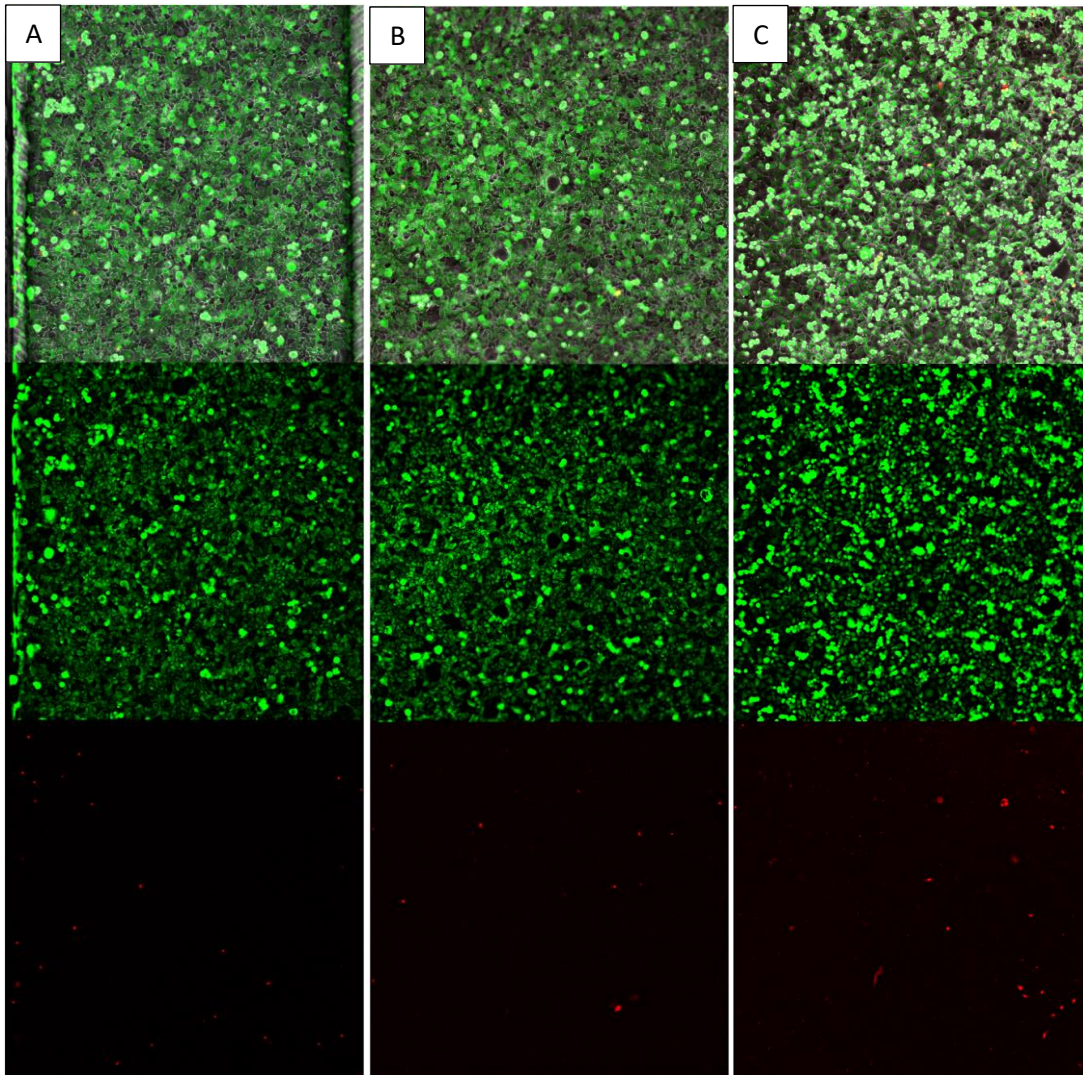


Fig. 4.30. Imágenes de fluorescencia tomadas en los 3 cultivos celulares (A: control, B: Balancín, C: Estático) estudiados a las 24 horas de su cultivo. De arriba a abajo se puede ver: Imagen combinada de los 3 canales de emisión (azul, verde y rojo); Emisión de la calceína, indicando las células vivas; Emisión del yoduro de propidio, indicando las células muertas.

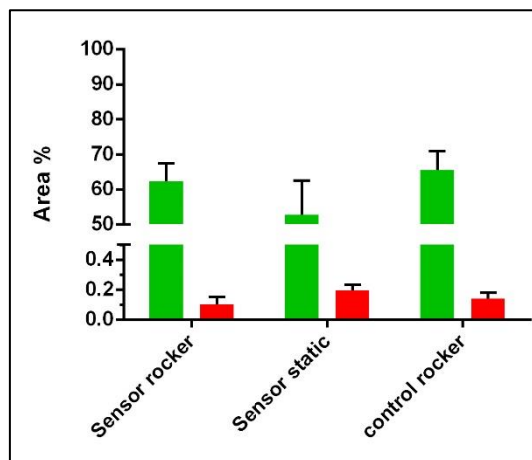


Fig. 4.31. Resultados del ensayo de viabilidad. Se compara el % Área con respecto al total ocupado por las células vivas (verde) y muertas (rojo) en los 3 dispositivos estudiados: Control (control rocker), Balancín (Sensor rocker) y Estático (Sensor static).

Se puede observar en base a los resultados obtenidos que las diferencias en la viabilidad celular entre los dispositivos estudiados no son significativas, lo que indicaría que la inclusión de los SensorPlug en el BE-Flow no causa citotoxicidad. Se puede observar que sí existe, aun así, cierta diferencia entre los dispositivos con cultivo por perfusión inespecífica (Control y Balancín) y el del cultivo estático. Esto, lejos de deberse a los SensorPlug, radica en que aun siendo inespecífica la perfusión ocurrida en los dispositivos montados en el balancín dota de cierta renovación del medio de cultivo al que están expuestas las células, y con ello de una entrada constante de oxígeno. Cabe indicar que las Caco-2 son una línea celular que consume una gran cantidad de O₂, por lo que este tipo de cultivos de perfusión incrementan su supervivencia.

Se concluye así que el dispositivo diseñado es suficientemente biocompatible para su uso como plataforma celular *in vitro*.

4.7.3. Validación de la capacidad de medida de los SensorPlug tras el proceso de fabricación:

Por último, es necesario comprobar que la capacidad de medición del SensorPlug no se ha visto mermada o alterada tras su introducción en el BE-Flow o durante su manipulación previa. Así, se lleva a cabo un ensayo comparativo entre las medidas de la concentración de O₂ en 4 muestras diferentes tomadas con un sensor individual (externo al BE-Flow) y con el sensor introducido en el dispositivo final.

En un principio se lleva a cabo la medición de 4 muestras distintas con el sensor introducido en el dispositivo modificado. Para ello se introducen mediante una pipeta P-100 o P-1000 cada una de las muestras al interior de los canales a través de las conexiones fluidicas del dispositivo, con cuidado de que no se generen ningún tipo de burbujas en su seno que puedan llegar a adulterar la medida del sensor. Las 4 muestras utilizadas son:

- **Aire:** Medida de referencia sin ninguna muestra en el interior de los canales. Se espera que la medición del %O₂ del aire sea cercana al 21 %, concentración media en el aire.
- **Agua destilada:** Se espera que el %O₂ sea menor al del aire y más o menos similar en todas las disoluciones acuosas.
- **PBS.**
- **Medio de cultivo con Suero.**

Para el cambio de muestra en el canal, se aspira la anterior o bien con una pipeta P-100 o P-1000 o mediante una bomba de vacío. Una vez limpio el canal se introduce la siguiente muestra. Como se va de muestras "limpias" a "sucias" (con mayor cantidad de elementos disueltos) no se cree que haga falta realizar un lavado del canal entre cada medida, como sí sucedería en el caso contrario.

El montaje experimental utilizado en este ensayo se muestra en la Fig. 4.32.

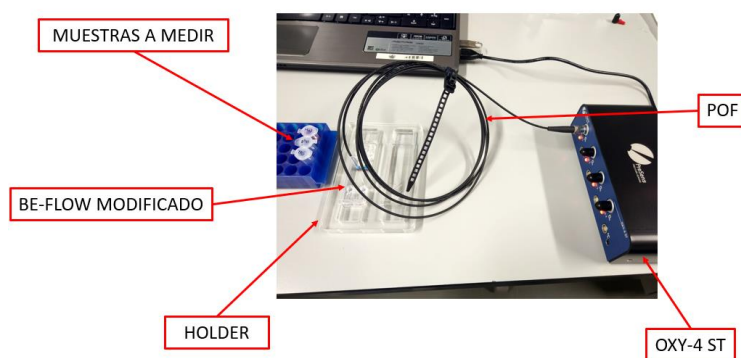


Fig. 4.32. Montaje experimental utilizado para las mediciones con el dispositivo modificado, indicando cada parte del que éste se compone.

Este montaje resulta muy sencillo, pues basta con conectar el OXY-4 ST al PC y al BE-Flow modificado con la POF. Por uno de los canales del dispositivo se harán pasar en distintos instantes las 4 muestras para así realizar su medición. Es importante saber que, para evitar que el BE-Flow vuelque al conectarle la POF, éste debe ser colocado en el interior de un *holder*, un dispositivo de soporte creado con PMMA que se puede ver en la Fig. 4.32.

Las medidas se realizan en intervalos de medición – pausa, analizando así también la estabilidad de la medida. Se comienza con un intervalo de medida más extenso, de entre 7 y 10 minutos, al cual le sigue una pausa de 3 minutos. Después, otra medición de 5-7 minutos, pausa de 3 minutos y una última medición de 5-7 minutos. Este proceso se esquematiza en la Fig. 4.33.

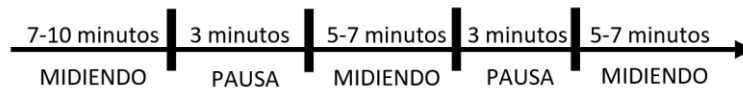


Fig. 4.33. Esquema del proceso seguido para llevar a cabo la medición.

Las condiciones del ensayo son:

- **Temperatura:** 23°C.
- **Presión:** 1013 mbar (Presión atmosférica)
- **Tiempo de muestreo:** 10 segundos, intervalo de tiempo entre cada medición.
- **Tipo de muestra:** Dry (Aire) y Humid las demás.
- **Salinidad:** 0%.

Los resultados de la medición con el sensor incluido en el dispositivo se muestran en la Fig. 4.34.

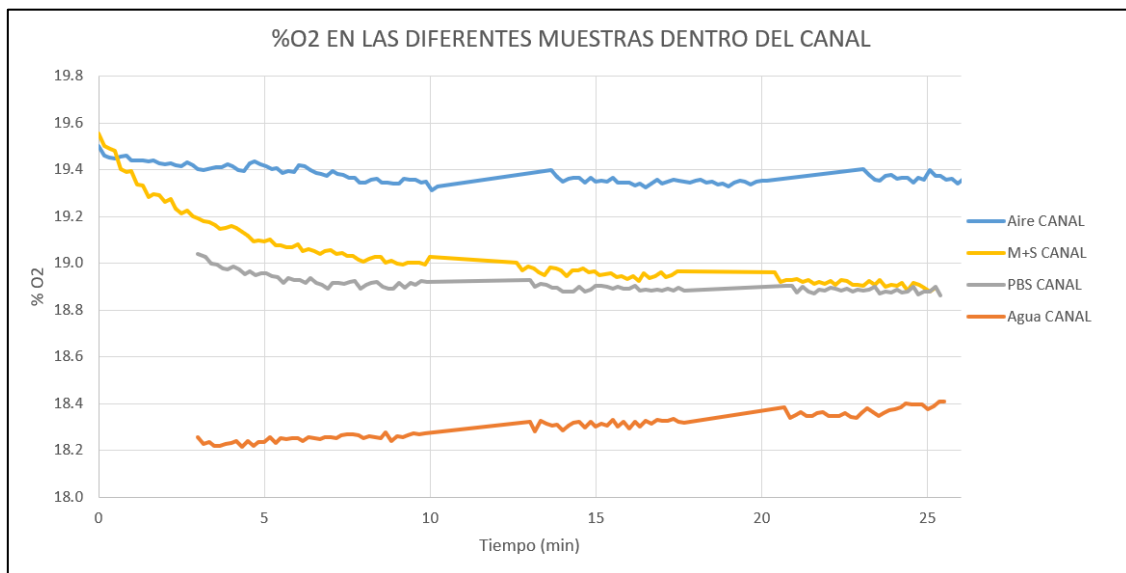


Fig. 4.34. Gráfica que muestra la concentración de oxígeno de las diferentes muestras con el SensorPlug introducido en el dispositivo: Aire (azul), Agua (naranja), PBS (gris) y Medio de cultivo (amarillo).

Los resultados de este ensayo, a primera vista, indicarían que el sensor posee capacidad de medida suficiente para diferenciar entre cada una de las muestras aun estando introducido en el dispositivo. Es decir, *a priori* la introducción del sensor en el BE-Flow no limita su capacidad de medida.

Como se había planteado, el aire posee la mayor concentración de oxígeno, si bien esta no es de un 21% como cabía esperar. Esto indicaría que el aire del laboratorio en el que se lleva a cabo la medición posee una concentración de O₂ algo menor que la media.

En cuanto al agua destilada, su concentración de oxígeno disuelto es claramente menor a la del aire, como cabría esperar. No obstante, a diferencia de la medida de aire (que resulta estable a lo largo de todo el intervalo de medición) la concentración de O₂ en el agua destilada va aumentando. Esto podría ser causa de una mala oxigenación original de la muestra, que al entrar en contacto con el entorno comienza a captar oxígeno.

En cuanto a las muestras acuosas (PBS y Medio de cultivo), se observa cómo hay un descenso inicial de la concentración de O₂ en ambas muestras. Esto podría corresponder al proceso de estabilización de la medida del SensorPlug (aproximadamente 7 minutos) o a una oxigenación excesiva de la muestra, tal y como se ve en el descenso de la cantidad de O₂ disuelto en el Medio de cultivo. Sin embargo, si bien sus concentraciones son casi idénticas entre sí, existe una clara diferencia con la medida del agua destilada. Se desconoce si esto ocurre por la posible falta de oxigenación de la muestra de agua o por la distinta salinidad que poseen tanto el PBS como el Medio de cultivo. Sin embargo, dada la tendencia ascendente constante de la muestra de agua destilada, es posible que eventualmente la concentración de las tres muestras llegara a estabilizarse en un mismo valor.

Finalizadas las mediciones anteriores se lleva a cabo la segunda tanda de medidas, en este caso mediante el uso de un SensorPlug externo al BE-Flow modificado. Se llevará a cabo la monitorización de O₂ únicamente de 2 muestras:

- **Aire.**
- **PBS.**

Se considera que si las medidas de sus concentraciones se corresponden con las tomadas con el sensor introducido en el dispositivo se puede concluir que la capacidad de medida de este no ha variado tras el proceso de fabricación.

El montaje experimental utilizado en este ensayo se muestra en la Fig. 4.35.

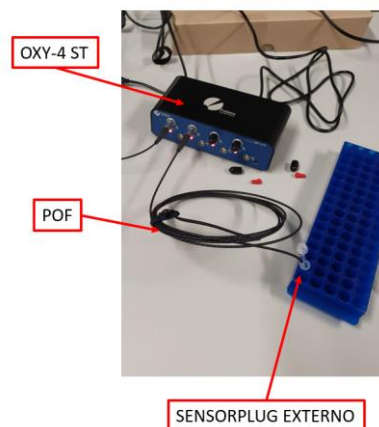


Fig. 4.35. Montaje experimental utilizado para las mediciones con el sensor externo, indicando cada parte del que éste se compone.

Las medidas se realizarán siguiendo el mismo esquema que en el mostrado en la Fig. 4.33.

Las condiciones del ensayo son, en este caso:

- **Temperatura:** 21°C.
- **Presión:** 1013 mbar (Presión atmosférica)
- **Tiempo de muestreo:** 10 segundos, intervalo de tiempo entre cada medición.
- **Tipo de muestra:** Dry (Aire) y Humid (PBS).
- **Salinidad:** 0%.

Los resultados de la medición con el sensor externo al dispositivo se muestran en la Fig. 4.36.

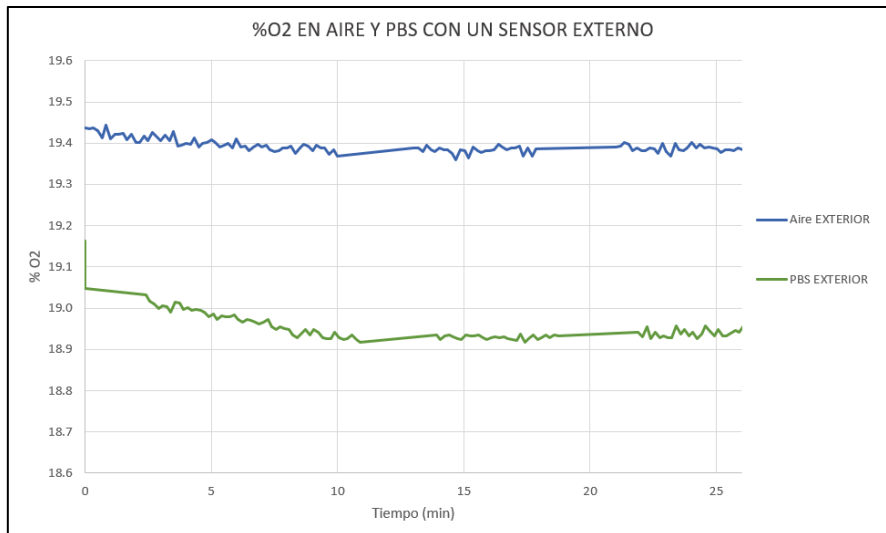


Fig. 4.36. Gráfica que muestra la concentración de oxígeno de las diferentes muestras medidas con un SensorPlug externo: Aire (azul oscuro), PBS (verde).

Se observa que la medida sigue la misma tendencia que en el ensayo anterior: El aire posee la mayor concentración de O_2 , sin llegar a los 21%, mientras que el PBS se queda cercano al 19% de oxígeno disuelto. Si comparamos ambas medidas en una misma gráfica, tal y como se tiene en la Fig. 4.37, se puede llegar a observar que ambas medidas son idénticas: Tanto su valor como su tendencia son muy similares, lo que indicaría que el sensor no pierde capacidad de medida tras su manipulación e introducción en el BE-Flow modificado.

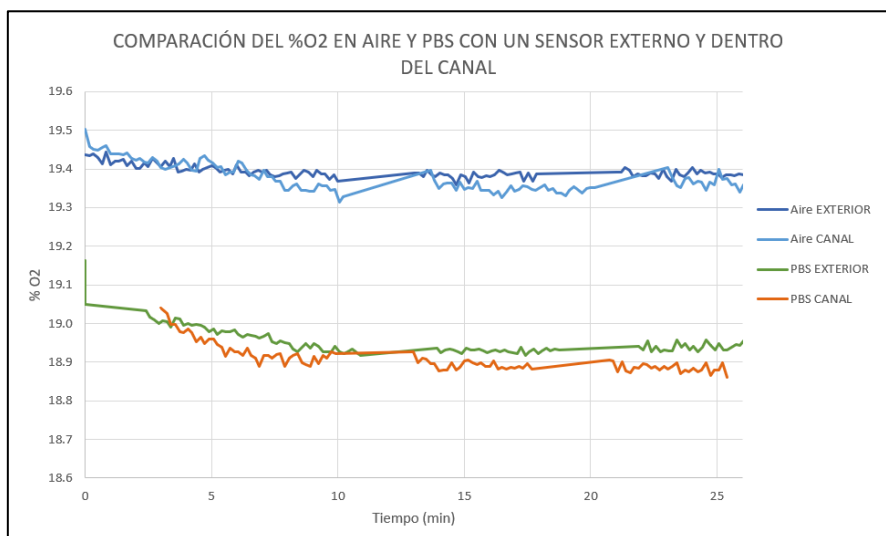


Fig. 4.37. Gráfica comparativa de la concentración de oxígeno de las diferentes muestras medidas con un SensorPlug externo (Aire (azul oscuro), PBS (verde)) y con un SensorPlug introducido en el dispositivo (Aire (azul claro), PBS (naranja)).

4.7.4. Consideraciones finales del producto desarrollado:

Una vez finalizadas las distintas pruebas de validación a las que se ha sometido el prototipo final es acertado decir que el dispositivo diseñado cumple aparentemente con los requisitos establecidos:

- No produce fugas a presiones tan altas como 2 bar, contando con una unión completamente hermética.
- Su biocompatibilidad, si bien se ha estudiado en un intervalo de tiempo corto, se considera suficiente para asegurar una supervivencia a largo plazo, al menos de la línea celular estudiada.
- En el ensayo de medición se ha determinado que las mediciones de la concentración de O₂ tomadas por ambos sensores son muy similares, si no idénticas, lo que querría indicar que al manipular o al introducir los SensorPlug en el BE-Flow modificado no se ha alterado su capacidad de medida ni su calibración de fábrica.

Con todo esto se puede concluir que tanto el proceso de fabricación como el dispositivo final cumplen satisfactoriamente con los requisitos establecidos:

- **Al SensorPlug no se le somete a ningún tipo de tratamiento por plasma o luz UV:** Todos estos tratamientos son aplicados al dispositivo previo al montaje del sensor, que al venir estéril de fábrica no afectaría a la esterilidad del conjunto.
- **Al SensorSpot no se le somete a ningún tipo de esfuerzos, ni tangenciales ni normales:** Con el proceso de fabricación diseñado y con la estructuración de las distintas capas del dispositivo (especialmente del espaciador de material siliconado de 100 µm de espesor) se asegura que en el montaje del sensor solamente se aplican este tipo de tensiones al Plug, haciendo uso de la diferencia de diámetros entre ambos componentes.
- **El dispositivo final es hermético, robusto, biocompatible y su capacidad de medida es idéntica a la que poseen los SensorPlug de forma individual** perturbando lo menos posible el flujo existente en el interior de los canales al mantener la introducción del SensorSpot al mínimo establecido (aproximadamente 50 µm).

4.8. Ensayos experimentales:

4.8.1. Objetivo y número de ensayos:

Una vez validados los prototipos fabricados, y con ellos el proceso de fabricación diseñado, se plantea su uso para estudiar la respuesta de un cultivo celular al pasar de un ambiente de normoxia a uno de hipoxia. Esto surge en respuesta a uno de los principales problemas de los ensayos *in vitro* en este tipo de ambientes: La diferencia en la concentración de oxígeno pericelular y ambiental [87] que se cree que puede ser causada en parte por la lenta adaptación de la concentración del oxígeno disuelto en el medio de cultivo a las condiciones exteriores. En casos extremos, esto podría causar que el medio de cultivo no alcanzara la concentración de oxígeno requerida para el desarrollo del estudio en cuestión, falseando los resultados obtenidos de él. Se espera así mediante el uso de este novedoso dispositivo estudiar cuánto tiempo le lleva a una muestra de medio de cultivo normo-oxigenada pasar de la concentración de oxígeno ambiente a la presente en la cámara de hipoxia.

Se plantea también el desarrollo de un ensayo de reutilización del dispositivo. Si bien ambos componentes por separado son desechables por naturaleza, de cara a incrementar su ciclo de vida se estudia un protocolo de esterilización/reutilización del dispositivo. Para ello, haciendo caso a las especificaciones de los fabricantes de ambos componentes, se hará uso de una disolución de etanol al 70% en un baño de 20 minutos con el fin de limpiar cada canal y cada sensor de cualquier resquicio de los fluidos que contenía con anterioridad.

Se quiere estudiar así la variación de las medidas tomadas por el sensor de las mismas muestras (o del mismo tipo, ya que se toman en días diferentes) antes y después del proceso de esterilización.

4.8.2. Ensayo experimental en condiciones de hipoxia:

El montaje experimental utilizado en el ensayo de hipoxia se analiza en la Fig. 4.38.

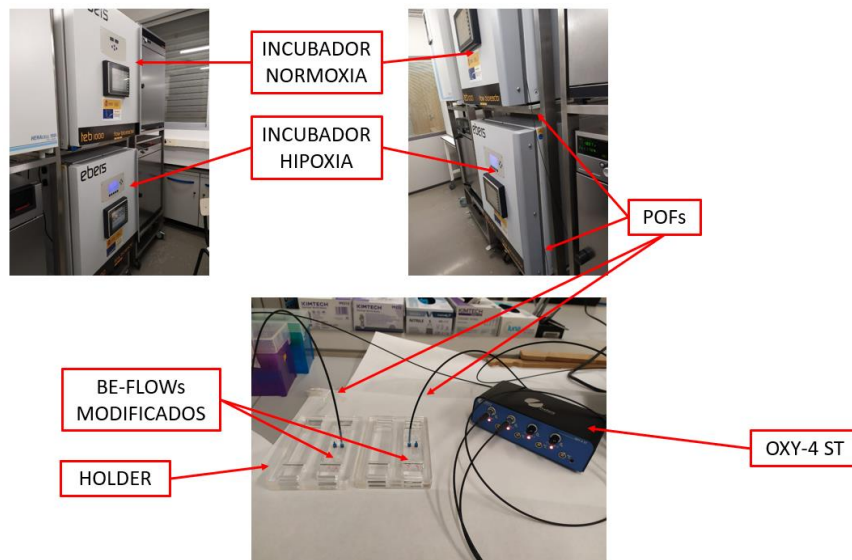


Fig. 4.38. Montaje experimental utilizado en el ensayo de hipoxia, indicando cada parte del que éste se compone.

En este caso, el montaje es algo más complejo al contar con un mayor número de componentes y equipo externo. Ambos BE-Flow, montados en sus respectivos holders y con la muestra ya introducida, se introducen en sus respectivas cámaras de incubación. Hay que tener cuidado en este caso pues las POFs son elementos medianamente frágiles que no admiten una gran curvatura, por lo que se deben manejar y asegurar con cuidado.

Las medidas se llevan a cabo en un intervalo total aproximado de 17 horas, cuidándose de que no haya posibles alteraciones de la medida causadas por la apertura de las puertas de los incubadores durante el transcurso del experimento.

Las condiciones del ensayo son:

- **Temperatura:**
 - o Normoxia: 37°C.
 - o Hipoxia: 37°C.
- **Presión:**
 - o Normoxia: 1013 mbar (Presión atmosférica).
 - o Hipoxia: 1013 mbar (Presión atmosférica).
- **%CO₂:**
 - o Normoxia: 5%.
 - o Hipoxia: 5%.
- **%O₂:**
 - o Normoxia: Ambiental.
 - o Hipoxia: 1%.
- **Tiempo de muestreo:** 5 minutos, intervalo de tiempo entre cada medición.

- **Tipo de muestra:** Humid (Incluso en aire, pues la humedad relativa dentro de los incubadores es mayor del 50%).
- **Salinidad:** 0%.

Se muestran en la Fig. 4.39 los resultados en forma de gráfica para su análisis:

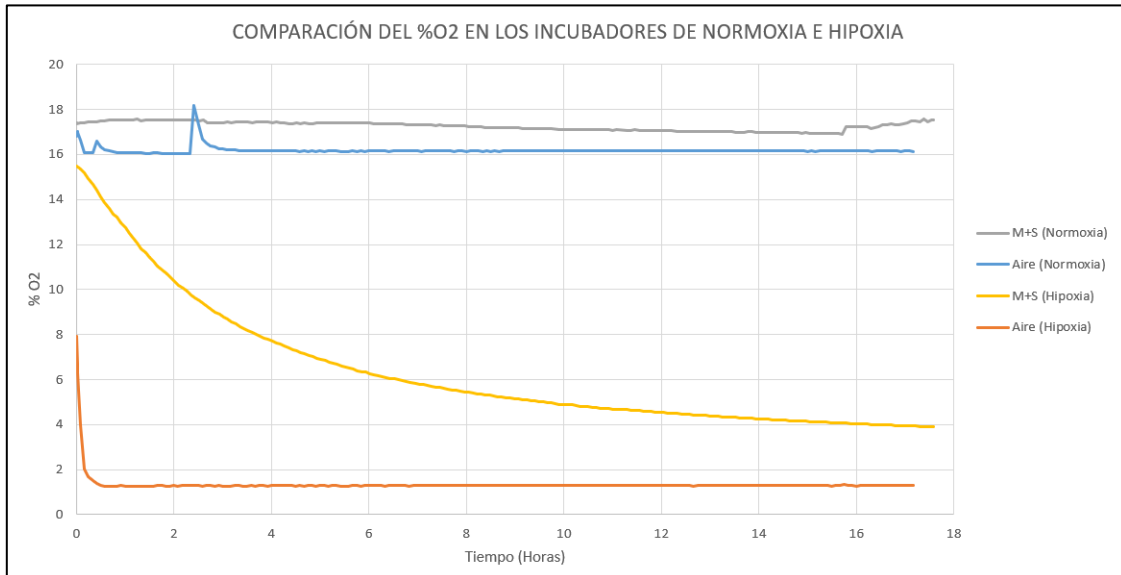


Fig. 4.39. Gráfica de la evolución de la concentración de oxígeno de las diferentes muestras (Aire y Medio de cultivo) en normoxia e hipoxia.

Lo primero que se observa de manera evidente es que la concentración de O_2 en cada una de las cámaras es radicalmente distinta: Mientras en la cámara de normoxia se mantiene en aproximadamente 16-18%, en la cámara de Hipoxia esta concentración tiende al 1% indicado en la máquina.

Analizando las curvas por separado, en el incubador de hipoxia (Fig. 4.40):

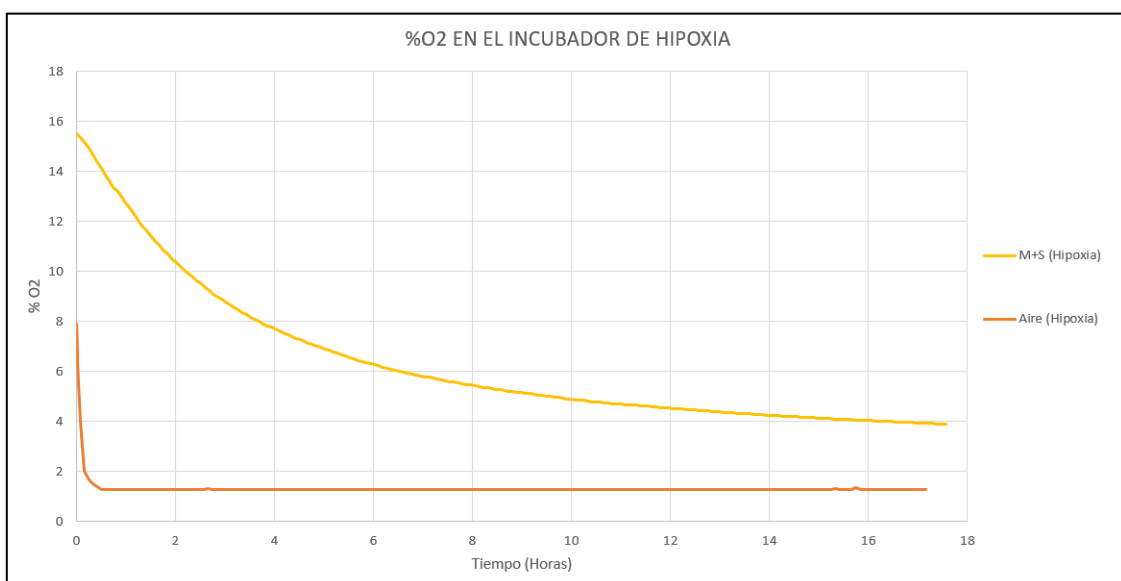


Fig. 4.40. Gráfica que muestra la evolución de la concentración de oxígeno de las diferentes muestras (Aire en naranja y Medio de cultivo en amarillo) en ambiente de hipoxia.

- En el aire, si bien se comienza con una concentración de O_2 de aproximadamente 21%, se reduce rápidamente hasta llegar a valores cercanos al 16% en el que se encuentra la máquina. Cabe indicar que el tiempo de duración de esta bajada coincide con el tiempo que tarda la máquina en alcanzar el % O_2 que se indica tras abrirla y romper las condiciones interiores, por lo que se piensa que los cambios en la medida de O_2 son instantáneos. Esto concuerda con lo esperado ya que al tratarse de una muestra gaseosa el O_2 difunde a través de los canales con mayor facilidad, causando una adaptación al oxígeno ambiente inmediata.
- El Medio de cultivo, por otro lado, se comporta de manera distinta. Comenzando con una concentración de O_2 mayor cercana a la medida en la cámara de normoxia (en donde se encontraba previo a su introducción en la cámara de hipoxia), esta concentración se va reduciendo de manera aparentemente hiperbólica durante el desarrollo del experimento.
 - o La forma de la curva responde al cambio del gradiente de concentración de O_2 entre el Medio y la cámara. Al principio, este gradiente es muy grande, por lo que la velocidad de difusión del O_2 es mayor. Cuanto más se va acercando la concentración de O_2 del medio a la del ambiente, este gradiente se reduce, por lo que la velocidad de difusión se ve sesgada.
 - o A las 17 horas de experimento la concentración de O_2 del medio no ha alcanzado la del incubador (No llega al 16%, manteniéndose en un valor cercano al 17%), lo que indicaría que es necesario un experimento de mayor duración para alcanzar el valor ambiente. Esto posee una gran relevancia a la hora de realizar experimentos biológicos en ambientes de hipoxia, pues hace ver que es necesario un tiempo de experimento prolongado (según lo visto en este estudio, mayor a 17 horas para una diferencia de % O_2 inicial de aprox. 15%) para que las células (o el medio en el que se encuentran) alcancen el % O_2 que se busca cuando estos experimentos suelen tener una duración menor.

En el incubador de normoxia (Fig. 4.41):

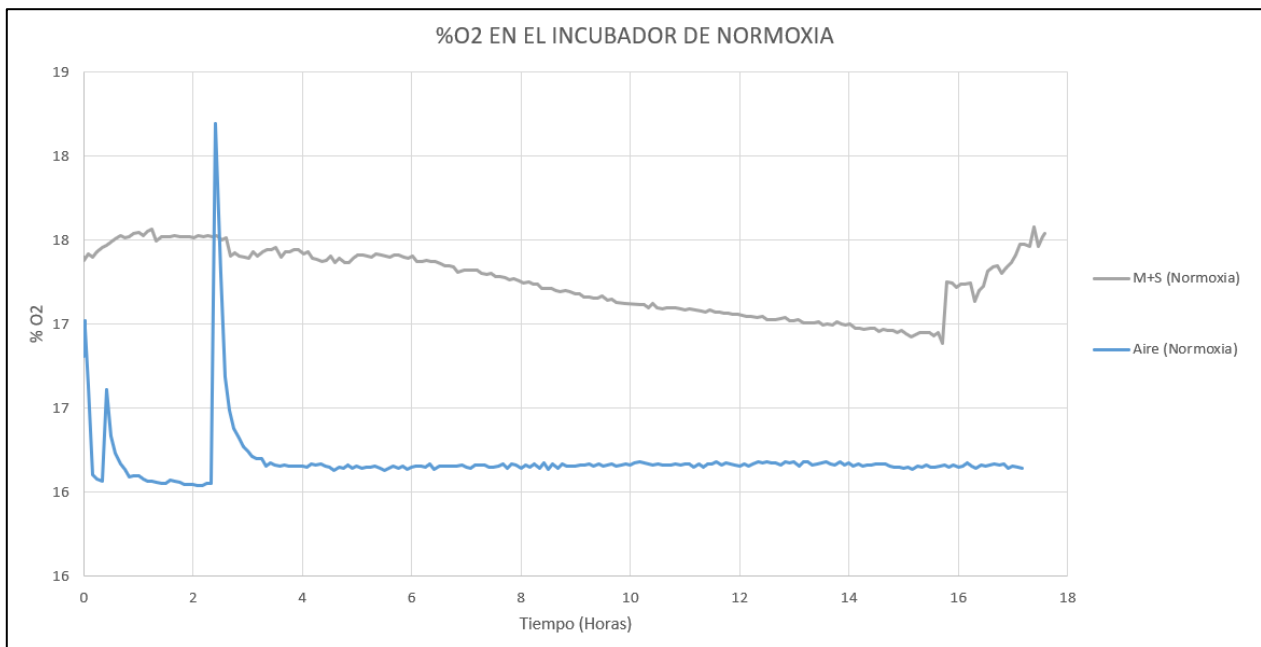


Fig. 4.41. Gráfica que muestra la evolución de la concentración de oxígeno de las diferentes muestras (Aire en azul y Medio de cultivo gris) en ambiente de normoxia.

- El aire, al igual que en el incubador de hipoxia, posee una respuesta instantánea al cambio de concentración de O_2 de la cámara. Esto puede observarse en los picos que ocurren al inicio de la medida, que corresponderían a varias aperturas de la cámara durante el transcurso del experimento. Esto es algo normal con la cámara de normoxia (una apertura de la cámara no varía en gran medida las condiciones ambientales internas), y es bastante interesante que los sensores hayan sido capaces de captarlo. Por lo demás, la medida se mantiene muy estable y cercana a los 16.2%, lo que indica que la cantidad de O_2 en el incubador es algo menor que en el exterior. Esto podría ser debido a la diferencia de condiciones ambientales o a la actividad celular que en su interior ocurre.
- En cuanto al Medio de cultivo, éste comienza más oxigenado que el aire. Al inicio del experimento, el % O_2 medido sufre algunas fluctuaciones, mucho más suaves que en el caso del aire, también correspondientes a la apertura de la puerta del incubador. Durante la noche, la concentración de O_2 en la muestra va decreciendo muy lentamente tendiendo a los 16.2% a los que se encuentra el incubador. Esto ocurre a muy baja velocidad, debido a un gradiente de concentraciones muy bajo. Al llegar la mañana, la concentración vuelve a subir, similar a lo que ocurría al inicio de la medida, por la apertura de la puerta de la cámara. Es interesante ver que en la línea del aire no se han captado estas modificaciones finales del % O_2 , aspecto que se ha relacionado con que el intervalo de muestreo es mucho más grande que el tiempo que tarda la muestra en estabilizar su % O_2 .

4.8.3. Valoración de la capacidad de reutilización del dispositivo final:

En este último ensayo se llevan a cabo las mismas mediciones que en el ensayo 1 pero tras someter al dispositivo a un proceso de esterilización con el uso de Etanol al 70%.

Este proceso de esterilización se lleva a cabo de la siguiente manera:

- Se extraen de los canales las muestras anteriores con la bomba de vacío hasta que queden limpios.
- Se introduce en los canales Etanol al 70%, llenando los Inlets/Outlets y los reservorios, de manera que todo ello quede estéril (Fig. 4.42).
- Se deja reposar durante 20 minutos.
- Pasado ese tiempo, se retira el Etanol. Se hacen en este punto lavados consecutivos con agua del interior de los canales (unas 4-5 veces bastan) para retirar los restos de Etanol.

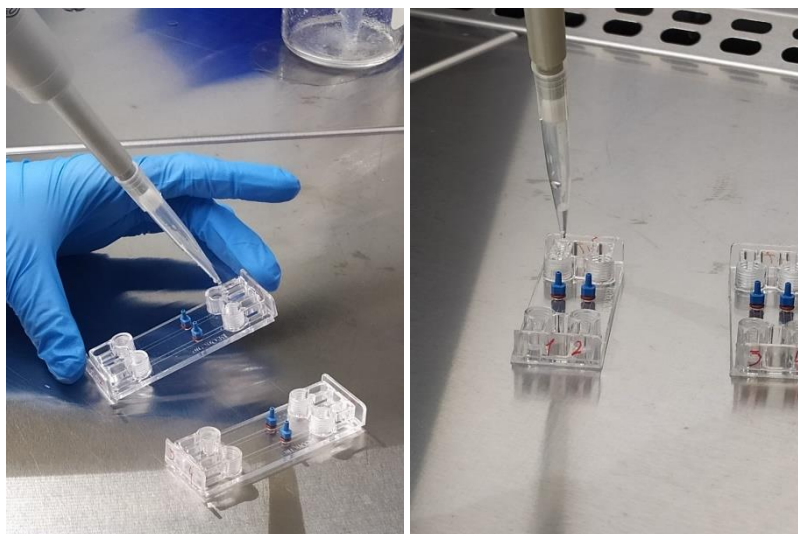


Fig. 4.42. Imágenes tomadas durante el transcurso del protocolo de reutilización, correspondientes a la introducción de la solución de etanol al 70% en los canales a reutilizar.

El proceso de esterilización es llevado a cabo en el mismo canal utilizado para las mediciones analizadas en el ensayo de medición analizado en la Sección 4.7.3. Se hace uso de las 4 muestras utilizadas en dicho ensayo. El montaje experimental en este ensayo es muy similar al encontrado en la Fig. 4.32.

La medida se desarrolla a lo largo de 1 hora de manera ininterrumpida. Se hace esto ya que se ha visto que la medida es más estable si se efectúa de manera seguida tal y como se hace en el ensayo de hipoxia, y no como se estaba haciendo en los ensayos de medición.

Las condiciones del ensayo son:

- **Temperatura:** 21.6°C.
- **Presión:** 1013 mbar (Presión atmosférica).
- **Tiempo de muestreo:** 1 minuto, intervalo de tiempo entre cada medición.
- **Tipo de muestra:** Dry (Aire) y Humid las demás.
- **Salinidad:** 0%.

Se muestran en la Fig. 4.43 los resultados en forma de gráfica para su análisis.

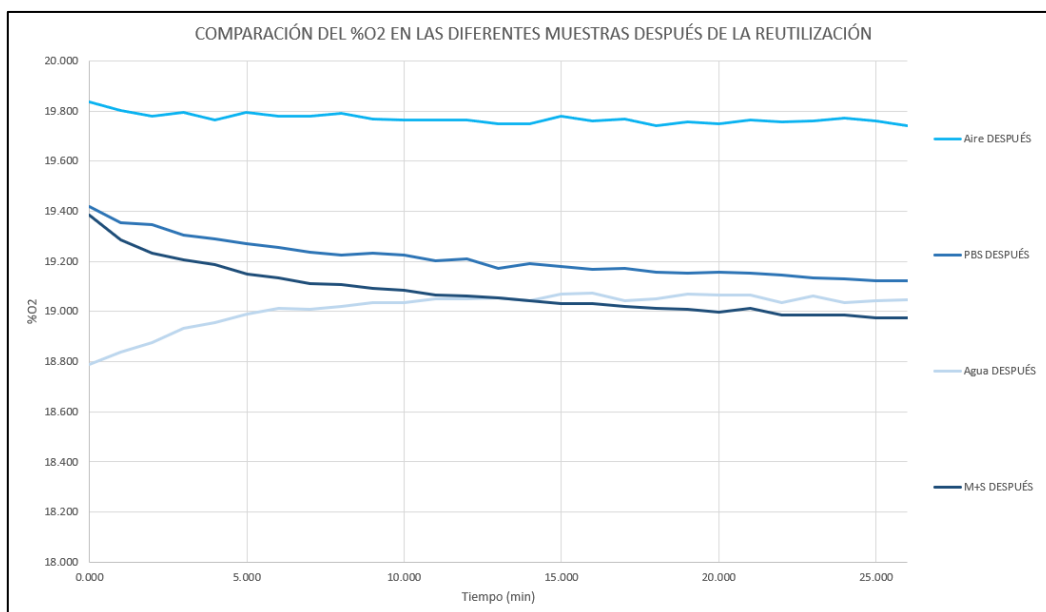


Fig. 4.43. Gráfica que muestra la concentración de oxígeno de las diferentes muestras medidas en el ensayo de reutilización: Aire (azul), Agua (naranja), PBS (gris) y Medio de cultivo (amarillo).

Se puede ver que el comportamiento de las medidas es el esperado:

- El aire posee la mayor concentración de O_2 , como era de esperar.
- Las muestras de disoluciones acuosas (PBS y Medio de cultivo) poseen una concentración casi idéntica y, en este caso, muy similar a la del agua destilada. Puede ser que para estas mediciones las muestras se encontraran correctamente oxigenadas, lo que reforzaría la idea de que en el ensayo de medición la muestra de agua se encontraba poco oxigenada y de ahí la medición tan desigual.

Comparando estos resultados con los vistos en el ensayo de medición en la Sección 4.7.3 (Fig. 4.44):

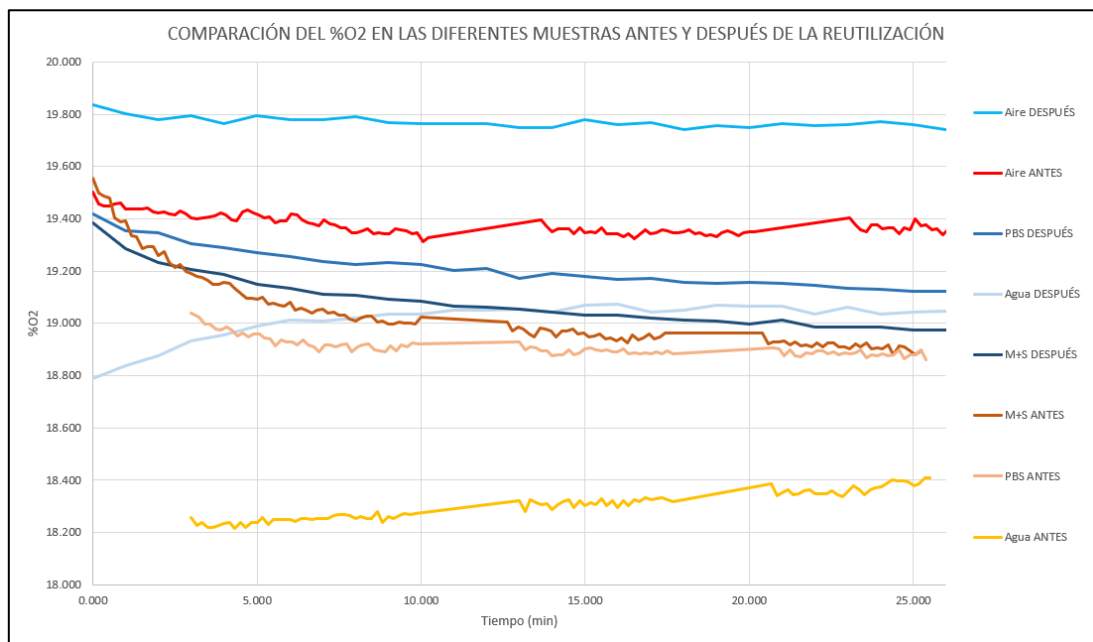


Fig. 4.44. Comparación del %O₂ en las muestras antes y después de aplicar el protocolo de reutilización de dispositivo.

Se puede ver que, *a priori*, los resultados resultan algo diferentes:

- El %O₂ en el aire antes y después es algo distinto. Al haberse tomado las medidas en días distintos, esto es fácilmente explicable al poder variar la concentración de oxígeno del ambiente del laboratorio en función de la ventilación y de la gente que se encuentra en su interior.
- Las medidas de %O₂ de las disoluciones acuosas antes y después de la aplicación del protocolo de reutilización son similares, lo que iría en sintonía con los resultados esperados.
- Una diferencia esencial en estas medidas es la medida de la concentración de oxígeno en el agua destilada. En el caso de la medición después de la reutilización el %O₂ es casi idéntico al de las disoluciones acuosas, mientras que la medición antes es visiblemente diferente. Con esto se comprueba que la muestra medida en el ensayo de medición se encontraba deficientemente oxigenada, siendo la medida esperada la tomada tras la reutilización.

Analizando los datos medidos en general:

- Si bien los resultados son algo distintos, éstos entran dentro del mismo rango, entre 18 y 20% de %O₂. Si se hubiera ocasionado algún daño al sensor, se piensa que las mediciones serían mucho más dispares, por lo que la obtención de resultados similares indicaría que el sensor sigue completamente funcional tras la esterilización.
- Las condiciones en las que se ha realizado la medición son algo distintas: La temperatura es menor y la cantidad de O₂ del medio es algo mayor. Esto podría inducir a cambios en la oxigenación de cada muestra, que se relacionaría con la obtención de resultados similares, pero no idénticos.
- Se concluye así que el dispositivo puede ser reutilizado sin cambios notables en su capacidad de medida con la aplicación del protocolo de reutilización utilizado en este proyecto.

4.8.4. Conclusiones sobre los ensayos experimentales:

Terminados los ensayos experimentales se puede concluir que:

- Gracias al ensayo de hipoxia se han podido extraer resultados muy significativos sobre la metodología de los estudios experimentales en condiciones de hipoxia. Se ha visto que si se trata con muestras gaseosas la adaptación del %O₂ en el interior del dispositivo es inmediata. Sin embargo, si se trata con muestras líquidas (como es el caso de los ensayos biológicos) la adaptación es mucho más lenta, pudiendo llegar a sobrepasar el tiempo del ensayo experimental y haciendo que los resultados de dicho ensayo no fueran del todo correctos al no haberse alcanzado las condiciones requeridas.
- La capacidad de medida del dispositivo, si bien ya había sido validada con anterioridad, resulta sorprendente, pudiendo captar de manera muy precisa el %O₂ en cada una de las cámaras. Sorprende la capacidad de detectar las rápidas variaciones que el %O₂ puede sufrir, por ejemplo, al abrir las puertas de los biorreactores.
- Gracias al ensayo de reutilización se ha conseguido analizar el comportamiento del dispositivo tras aplicar un protocolo de reutilización basado en el uso de Etanol al 70%. Los resultados arrojados por este ensayo no solo indican que la capacidad de medida del SensorPlug permanece intacta tras el lavado, sino que también reafirman ciertas sospechas sobre la causa de la divergencia en las medidas del %O₂ en las muestras acuosas durante el ensayo de medición (Sección 4.7.3). Se consigue así alargar el ciclo de vida de los dispositivos diseñados.

Capítulo 5. Conclusiones y líneas futuras.

5.1. Conclusiones del Proyecto

En este proyecto se introduce la historia de la experimentación animal y las regulaciones actuales que la controlan. A partir de esto se ha introducido la experimentación *in vitro* como una alternativa o complemento al uso de modelos animales, a través de la cual se podría conseguir una reducción del uso de estas prácticas. Analizando comparativamente ambas alternativas de experimentación, se llega a la conclusión de que en su estado actual la experimentación *in vitro* posee aplicaciones específicas diferentes al uso de modelos animales, siendo un paso necesario en los procesos de testeo y regulación de fármacos. No obstante, dada la incapacidad tecnológica de recrear el comportamiento fisiológico de órganos y tejidos biológicos, no supone una alternativa total al uso de modelos animales.

En segundo lugar, se analiza la microfluídica como una tecnología que trae consigo diversas ventajas no solo en su uso en el campo de la biomédica, sino también en otros ámbitos científicos e industriales como la industria farmacéutica, la biología o la química. En concreto, su uso como plataformas de cultivo celular para la experimentación *in vitro* trae ciertas ventajas, sobre todo en lo referente a la capacidad de control de las condiciones del experimento, a la capacidad de reproducción de tejidos biológicos y a la capacidad de creación de ambientes biomiméticos mediante la aplicación de estímulos celulares. Se toma como ejemplo el concepto del *Organ on a Chip*. Aun así, su uso en este ámbito posee ciertas limitaciones que hacen que aún no esté del todo extendido, como por ejemplo la falta de estandarización de los protocolos de experimentación o la dificultad en el uso de estos productos por parte del usuario final. Se tratan también los procesos de fabricación seguidos y los materiales más utilizados para el desarrollo de dispositivos microfluídicos poliméricos, entre los que se destacan la Xurografía, la Laminación y el material COC por ser los que se van a utilizar en este proyecto.

A partir de aquí se han pasado a tratar el desarrollo de un dispositivo microfluídico con capacidad de monitorizar el oxígeno dentro de sus canales en la empresa BEOnChip. Esto supone un aumento en la capacidad de control de las condiciones de los ensayos experimentales, sobre todo de cara a su uso en ensayos en entornos de hipoxia. Sobre este dispositivo se ha analizado, el método de fabricación seguido (una combinación de Xurografía, Moldeo por microinyección y Laminación por termocompresión) y el método de integración de los sensores de oxígeno, provenientes de la empresa PreSens, en el dispositivo final.

Con él se han desarrollado una serie de ensayos de validación con el fin de estudiar su adecuación a 3 requisitos principales: Hermeticidad de la unión Dispositivo – Sensores, Biocompatibilidad y Capacidad de medición de los sensores tras el proceso de fabricación.

En el primero de ellos, el dispositivo creado fue capaz de resistir una presión interna de 2 bar, por lo que se concluye que su robustez es suficiente para su uso en la mayoría de los ensayos biológicos.

En los ensayos de biocompatibilidad, realizado con cultivos de células de la línea Caco-2, el dispositivo no presenta ninguna citotoxicidad. Si bien los ensayos poseían una duración menor de lo recomendado, se concluye que el dispositivo creado posee una buena biocompatibilidad para su uso como plataforma de cultivo celular.

En el último ensayo de validación se midió la capacidad de medición que poseían los sensores una vez introducidos en el dispositivo modificado. Los resultados extraídos de este ensayo indicaron que la capacidad de medición del SensorPlug no había sido alterada, obteniendo unas mediciones muy similares de la concentración de oxígeno dentro del canal y en el exterior. Además, las medidas se relacionaban con lo que se esperaba, siendo la muestra con mayor %O₂ el aire y encontrándose con menor concentración las muestras acuosas. Aun así, se observó que las muestras acuosas poseían cierta variabilidad del %O₂ disuelto, sin embargo, posteriormente se vio que esto podría haber sido fruto de una menor oxigenación de la muestra de agua utilizada en el ensayo de validación. De estos ensayos de validación se concluye que el dispositivo se encuentra en TRL-4 tras haber sido validado en un entorno de laboratorio.

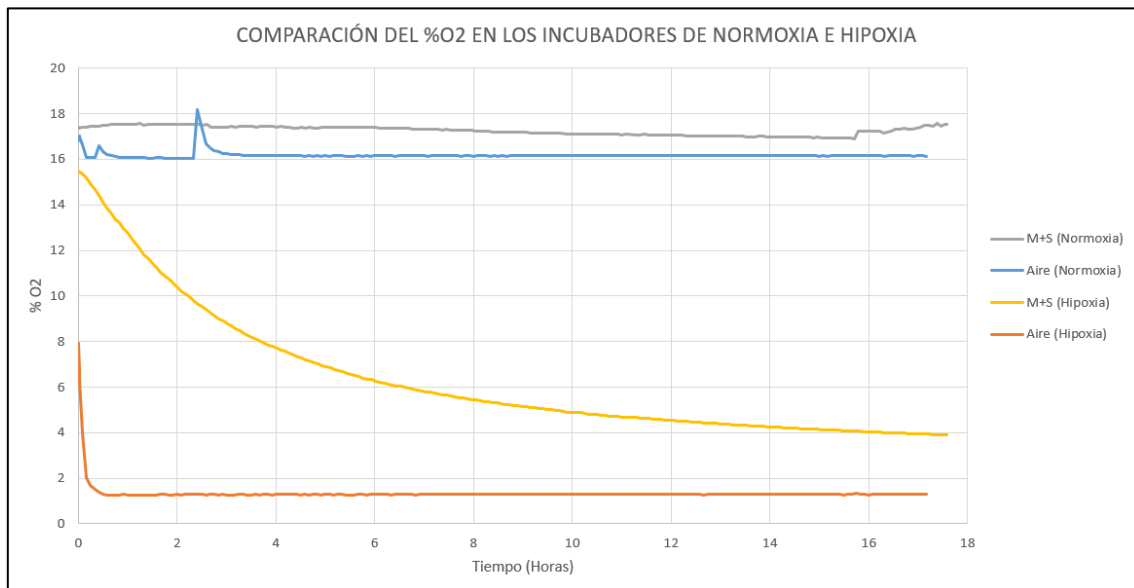
Finalmente, se lleva a cabo un ensayo experimental sobre los cambios en la concentración de oxígeno molecular en medio de cultivo dentro del dispositivo microfluídico al sufrir un cambio brusco en la concentración de oxígeno ambiental. Se simula así lo que sucede al pasar los cultivos celulares de una concentración de oxígeno ambiental normal (21%) a una cámara de hipoxia, en la cual el %O₂ es mucho menor (en este caso, un 1%).

Analizando los resultados obtenidos en este ensayo (Copia de Fig. 4.39) se puede observar que si bien la muestra de aire se adapta inmediatamente a los cambios del oxígeno del medio (se pueden incluso ver los cambios en el %O₂ causados por la apertura de la puerta del incubador de hipoxia), la muestra de medio de cultivo posee una adaptación muchísimo más lenta. Se concluye que esto ocurre debido a que la difusión del oxígeno a través del medio líquido es mucho más lenta que en el medio gaseoso.

Además, la evolución de la concentración de oxígeno en el medio de cultivo en el ambiente de hipoxia es hiperbólica, con una caída inicial muy brusca seguida de una bajada de su pendiente y una respuesta casi asintótica casi al final del ensayo. Se concluye que este comportamiento es fruto del gradiente de concentraciones del oxígeno entre la muestra y el medio, que al ser cada vez menor disminuye la velocidad de difusión del oxígeno ente ambas.

Por otra parte, se puede ver que pasadas las 17 horas que dura el ensayo experimental la concentración de oxígeno del medio en hipoxia no llega a igualarse a la concentración ambiental (mínimo de aprox. 4% vs. 1% de %O₂ ambiental), indicando que para llevar a cabo un ensayo en ambiente de hipoxia a un %O₂ dado el periodo de adaptación del medio de cultivo debe ser al menos mayor a 17 horas. A partir de esto se llega a la conclusión de que sin el uso de métodos complementarios para lograr la depuración del oxígeno del medio de cultivo su adaptación a cambios bruscos del oxígeno ambiente resulta muy lenta. Esto trae consigo una serie de repercusiones de cara al desarrollo de estos ensayos: Con el fin de extraer unos resultados correctos y reproducibles de un ensayo en hipoxia existe un tiempo mínimo de adaptación del medio de cultivo a las condiciones ambientales que debe tenerse en cuenta para asegurar que las condiciones del ensayo son las correctas.

Basándose en los datos obtenidos, serían necesarias de 48 a 72 horas para alcanzar el nivel establecido. Se podría también reducir el %O₂ por debajo del objetivo para aumentar el gradiente de concentraciones y con él la velocidad de la adaptación.



Copia de Fig. 5.1. Gráfica de la evolución de la concentración de oxígeno de las diferentes muestras (Aire y Medio de cultivo) en normoxia e hipoxia.

A modo de conclusión, se ha visto que el dispositivo desarrollado cumple con los requisitos establecidos, resultando ser un dispositivo robusto, biocompatible y reutilizable, cuya capacidad de medición se mantiene intacta tras el proceso de fabricación y que está preparado para su uso en ensayos experimentales más realistas.

5.2. Líneas futuras:

Ciertos aspectos del desarrollo del dispositivo con capacidad de monitorización de oxígeno pueden llegar a mejorarse o desarrollarse con el fin de obtener un dispositivo más fiable y cuya fabricación fuera más reproducible. Estos aspectos podrían ser:

- Introducción de los alojamientos de los sensores directamente en el molde de inyección de la pieza de inyección utilizada como capa superior del dispositivo. Este añadido proporcionaría una mayor reproducibilidad al método de fabricación, asegurando una perfecta adecuación dimensional entre las distintas capas. Además, permitiría prescindir del uso de útiles de fabricación externos que pudieran llegar a aumentar los errores de fabricación y eliminaría una fase del proceso, acelerándolo y reduciendo las tolerancias dimensionales del dispositivo final.
- Desarrollo de los protocolos de laminación por termocompresión y de sus parámetros en cuanto a presión T^a y tiempo para la unión final del dispositivo.
- Desarrollo de pruebas de biocompatibilidad a largo plazo. Además, se podría probar la viabilidad de otro tipo de células más sensibles que puedan llegar a utilizarse con este dispositivo.
- Desarrollo pruebas experimentales más realistas con células cultivadas en sus canales, que aseguren el correcto funcionamiento de los sensores tras los protocolos de cultivo del dispositivo.
- Estudio de mercado sobre la viabilidad de llevar a cabo todo lo anterior en caso de que el producto tuviera cabida en el mercado internacional de dispositivos microfluídicos para su uso en ensayos experimentales *in vitro*.

REFERENCIAS

- [1] European Commission, «Informe de 2019 sobre las estadísticas relativas al uso de animales con fines científicos en los Estados miembros de la Unión Europea en 2015-2017», 2020.
- [2] «DIRECTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO», 2010.
- [3] Allied Market, «Organ on Chip Market Size, Share | Industry Analysis & Forecast - 2023», 2017. <https://www.alliedmarketresearch.com/organ-on-chip-market> (accedido jun. 21, 2021).
- [4] «History of Animal Testing - ProCon.org». <https://animal-testing.procon.org/history-of-animal-testing/> (accedido may 08, 2021).
- [5] N. Henrique Franco, «Animal experiments in biomedical research: A historical perspective», *Animals*, vol. 3, n.º 1, pp. 238-273, 2013, doi: 10.3390/ani3010238.
- [6] A. Sadat y M. Nurunnabi, «Animal Research in Medical Science : Pros and Cons», *Health Sci. J. Pop. Med. Coll.*, vol. 2, n.º March, pp. 28-33, 2012, [En línea]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/239938738_Animal_Research_in_Medical_Science_Pros_and_Cons.
- [7] K. Herrmann, F. Pistollato, y M. L. Stephens, «Food for thought ... beyond the 3Rs: Expanding the use of human-relevant replacement methods in biomedical research», *ALTEX*, vol. 36, n.º 3, pp. 343-352, 2019, doi: 10.14573/altex.1907031.
- [8] «Glosario: Principio de las tres erres (en la experimentación animal)». https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/es/primates-no-humanos/glosario/pqrs/principio-tres-erres.htm (accedido may 10, 2021).
- [9] «In Vitro vs In Vivo Preclinical Studies». <https://www.news-medical.net/life-sciences/In-Vitro-vs-In-Vivo-Preclinical-Studies.aspx> (accedido may 09, 2021).
- [10] N. Convery y N. Gadegaard, «30 years of microfluidics», *Micro and Nano Engineering*, vol. 2. Elsevier B.V., pp. 76-91, 2019, doi: 10.1016/j.mne.2019.01.003.
- [11] S. C. Terry, J. H. Herman, y J. B. Angell, «A Gas Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon Wafer», *IEEE Trans. Electron Devices*, vol. 26, n.º 12, pp. 1880-1886, 1979, doi: 10.1109/T-ED.1979.19791.
- [12] J. Cottet y P. Renaud, *Introduction to microfluidics*. Elsevier Inc., 2021.
- [13] A. Dietzel, «Microsystems for pharmatechnology: Manipulation of fluids, particles, droplets, and cells», *Microsystems Pharmatechnology Manip. Fluids, Part. Droplets, Cells*, pp. 1-348, 2016, doi: 10.1007/978-3-319-26920-7.
- [14] E. K. Sackmann, A. L. Fulton, y D. J. Beebe, «The present and future role of microfluidics in biomedical research», *Nature*, vol. 507, n.º 7491. Nature Publishing Group, pp. 181-189, mar. 12, 2014, doi: 10.1038/nature13118.
- [15] S. Halldorsson, E. Lucumi, R. Gómez-Sjöberg, y R. M. T. Fleming, «Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices», *Biosens. Bioelectron.*, vol. 63, n.º September, pp. 218-231, 2015, doi: 10.1016/j.bios.2014.07.029.
- [16] D. E. Ingber, «Developmentally inspired human 'organs on chips'», *Dev.*, vol. 145, n.º 16 Special Issue, 2018, doi: 10.1242/dev.156125.
- [17] «Lung-on-a-Chip». <https://wyss.harvard.edu/media-post/lung-on-a-chip/> (accedido may 08, 2021).
- [18] B. K. Gale *et al.*, «A review of current methods in microfluidic device fabrication and future commercialization prospects», *Inventions*, vol. 3, n.º 3. 2018, doi: 10.3390/inventions3030060.
- [19] Y. Xia y G. M. Whitesides, «Soft lithography», *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 37, n.º 5, pp. 550-575, 1998, doi: 10.1002/(sici)1521-3773(19980316)37:5<550::aid-anie550>3.3.co;2-7.
- [20] D. I. Walsh, D. S. Kong, S. K. Murthy, y P. A. Carr, «Enabling Microfluidics: from Clean Rooms to Makerspaces», *Trends Biotechnol.*, vol. 35, n.º 5, pp. 383-392, 2017, doi: 10.1016/j.tibtech.2017.01.001.
- [21] J. C. McDonald *et al.*, «Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)», *Electrophoresis*, vol. 21, n.º 1. pp. 27-40, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<27::AID-ELPS27>3.0.CO;2-C.
- [22] B. D. Plouffe y S. K. Murthy, «Perspective on microfluidic cell separation: A solved problem?», *Anal. Chem.*, vol. 86, n.º 23, pp. 11481-11488, 2014, doi: 10.1021/ac5013283.
- [23] C. D. Chin, V. Linder, y S. K. Sia, «Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices», *Lab Chip*, vol. 12, n.º 12, pp. 2118-2134, 2012, doi: 10.1039/c2lc21204h.
- [24] H. Becker y L. E. Locascio, «Polymer microfluidic devices», *Talanta*, vol. 56, n.º 2, pp. 267-287, 2002, doi: 10.1016/S0039-9140(01)00594-X.
- [25] G. S. Fiorini y D. T. Chiu, «Disposable microfluidic devices: Fabrication, function, and application», *Biotechniques*, vol. 38, n.º 3, pp. 429-446, 2005, doi: 10.2144/05383RV02.
- [26] S. Yang y D. L. DeVoe, «Microfluidic device fabrication by thermoplastic hot-embossing», *Methods Mol. Biol.*, vol. 949, pp. 115-123, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-134-9_8.

- [27] H. T. Nguyen, H. Thach, E. Roy, K. Huynh, y C. M. T. Perrault, «Low-cost, accessible fabrication methods for microfluidics research in low-resource settings», *Micromachines*, vol. 9, n.º 9, 2018, doi: 10.3390/mi9090461.
- [28] K. H. Nguyen, «Hot Embossing as a Method for Rapid Prototyping Microfluidic Devices», 2013.
- [29] R. Amin *et al.*, «3D-printed microfluidic devices», *Biofabrication*, vol. 8, n.º 2, pp. 1-16, 2016, doi: 10.1088/1758-5090/8/2/022001.
- [30] N. Bhattacharjee, A. Urrios, S. Kang, y A. Folch, «The upcoming 3D-printing revolution in microfluidics», *Lab Chip*, vol. 16, n.º 10, pp. 1720-1742, 2016, doi: 10.1039/c6lc00163g.
- [31] C. M. B. Ho, S. H. Ng, K. H. H. Li, y Y. J. Yoon, «3D printed microfluidics for biological applications», *Lab Chip*, vol. 15, n.º 18, pp. 3627-3637, 2015, doi: 10.1039/c5lc00685f.
- [32] D. A. Bartholomeusz, R. W. Boutté, y J. D. Andrade, «Xurography: Rapid prototyping of microstructures using a cutting plotter», *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 14, n.º 6, pp. 1364-1374, 2005, doi: 10.1109/JMEMS.2005.859087.
- [33] M. Islam, R. Natu, y R. Martinez-Duarte, «A study on the limits and advantages of using a desktop cutter plotter to fabricate microfluidic networks», *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 19, n.º 4, pp. 973-985, 2015, doi: 10.1007/s10404-015-1626-9.
- [34] J. I. Martínez-López, M. Mojica, C. A. Rodríguez, y H. R. Siller, «Xurography as a rapid fabrication alternative for point-of-care devices: Assessment of passive micromixers», *Sensors (Switzerland)*, vol. 16, n.º 5, pp. 1-21, 2016, doi: 10.3390/s16050705.
- [35] Y. Chen, L. Zhang, y G. Chen, «Fabrication, modification, and application of poly(methyl methacrylate) microfluidic chips», *Electrophoresis*, vol. 29, n.º 9, pp. 1801-1814, may 2008, doi: 10.1002/elps.200700552.
- [36] A. M. D. Wan, D. Devadas, y E. W. K. Young, «Recycled polymethylmethacrylate (PMMA) microfluidic devices», *Sensors and Actuators, B: Chemical*, vol. 253, pp. 738-744, 2017, doi: 10.1016/j.snb.2017.07.011.
- [37] Mexpolímeros, «PMMA | Polimetacrilato de metilo - Polímeros termoplásticos, elastómeros y aditivos». <https://www.mexpolimeros.com/pmma.html> (accedido may 07, 2021).
- [38] «Módulo elástico y coeficiente de Poisson de materiales poliméricos». <https://www.sonelastic.com/es/fundamentos/tablas-propiedades-materiales/polimeros.html> (accedido may 07, 2021).
- [39] W. H. Yang, V. F. Smolen, y N. A. Peppas, «Oxygen permeability coefficients of polymers for hard and soft contact lens applications», *J. Memb. Sci.*, vol. 9, n.º 1-2, pp. 53-67, ene. 1981, doi: 10.1016/S0376-7388(00)85117-0.
- [40] Z. Chen, L. Zhang, y G. Chen, «Fabrication and performance of fiber electrophoresis microchips», *Electrophoresis*, vol. 28, n.º 14, pp. 2466-2473, 2007, doi: 10.1002/elps.200600643.
- [41] K. T. L. Trinh, D. A. Thai, W. R. Chae, y N. Y. Lee, «Rapid Fabrication of Poly(methyl methacrylate) Devices for Lab-on-a-Chip Applications Using Acetic Acid and UV Treatment», *ACS Omega*, vol. 5, n.º 28, pp. 17396-17404, 2020, doi: 10.1021/acsomega.0c01770.
- [42] S. K. Sia y G. M. Whitesides, «Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies», *Electrophoresis*, vol. 24, n.º 21, pp. 3563-3576, 2003, doi: 10.1002/elps.200305584.
- [43] E. Team, «Materials for microfluidic chips fabrication : a review 2017», *Elveflow*, feb. 2021, Accedido: may 07, 2021. [En línea]. Disponible en: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/materials-for-microfluidic-chips-fabrication-a-review-2017/>.
- [44] J. C. McDonald y G. M. Whitesides, «Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices», *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, n.º 7, pp. 491-499, 2002, doi: 10.1021/ar010110q.
- [45] K. Iwai, K. C. Shih, X. Lin, T. A. Brubaker, R. D. Sochol, y L. Lin, «Finger-powered microfluidic systems using multilayer soft lithography and injection molding processes», *Lab Chip*, vol. 14, n.º 19, pp. 3790-3799, 2014, doi: 10.1039/c4lc00500g.
- [46] H. Li, Y. Fan, R. Kodzius, y I. G. Foulds, «Fabrication of polystyrene microfluidic devices using a pulsed CO₂ laser system», *Microsyst. Technol.*, vol. 18, n.º 3, pp. 373-379, mar. 2012, doi: 10.1007/s00542-011-1410-z.
- [47] J. Chen *et al.*, «Silicon based solvent immersion imprint lithography for rapid polystyrene microfluidic chip prototyping», *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 248, n.º September, pp. 311-317, 2017, doi: 10.1016/j.snb.2017.03.146.
- [48] P. Data, A. Us, y H. Ome, «Properties of Polystyrene», *Polymer Database*, 2013. <https://polymerdatabase.com/polymer classes/Polystyrene type.html> (accedido may 07, 2021).
- [49] R. Tran *et al.*, «Simplified prototyping of perfusable polystyrene microfluidics», *Biomicrofluidics*, vol. 8, n.º 4, 2014, doi: 10.1063/1.4892035.
- [50] «Permeability of Polymers». <https://polymerdatabase.com/polymer physics/Permeability.html> (accedido may 07, 2021).
- [51] «Polystyrene Surface – nanoComposix». <https://nanocomposix.com/pages/polystyrene-surface#target> (accedido may 07, 2021).

- [52] «Polystyrene | Designerdata». <https://designerdata.nl/materials/plastics/thermo-plastics/polystyrene> (accedido may 07, 2021).
- [53] Y. Cao, J. Bontrager-Singer, y L. Zhu, «A 3D microfluidic device fabrication method using thermopress bonding with multiple layers of polystyrene film», *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 25, n.º 6, 2015, doi: 10.1088/0960-1317/25/6/065005.
- [54] E. Lavoie, T. Wangdi, y B. Kazmierczak, «Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration and Applications», *Chem. Rev.*, vol. 13, n.º 9, pp. 1133-1145, 2012, doi: 10.1021/cr300337x.Advances.
- [55] «Different thermoplastic polymers used in microfluidics - Blackholelab Softlithography : Make your microfluidic chips». <https://www.blackholelab-soft-lithography.com/different-thermoplastic-polymers-used-in-microfluidics> (accedido may 07, 2021).
- [56] «Polycarbonate - PC - microfluidic ChipShop». <https://www.microfluidic-chipshop.com/microfluidics/materials-in-microfluidics/polymers-in-microfluidics/pc/> (accedido may 07, 2021).
- [57] «Polycarbonate (PC) Plastic: Properties, Uses, & Structure - Guide». <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/polycarbonate-pc-plastic> (accedido may 07, 2021).
- [58] «Polycarbonate Remains Proven and Preferred for Medical Applications - Medical Design Briefs». <https://www.medicaldesignbriefs.com/component/content/article/mdb/features/articles/17693> (accedido may 07, 2021).
- [59] B. S. Yilbas *et al.*, «Wetting and other physical characteristics of polycarbonate surface textured using laser ablation», *Appl. Surf. Sci.*, vol. 320, pp. 21-29, 2014, doi: 10.1016/j.apsusc.2014.09.052.
- [60] D. Chen *et al.*, «An integrated, self-contained microfluidic cassette for isolation, amplification, and detection of nucleic acids», *Biomed. Microdevices*, vol. 12, n.º 4, pp. 705-719, 2010, doi: 10.1007/s10544-010-9423-4.
- [61] ZEON, «ZeonorFilm for High Performance Optical Components», 2019.
- [62] S. Senkbeil, «Design and Fabrication of Polymer-based Lab-on-a-Chip Devices Towards Applications in Food and Environmental Analysis», 2012.
- [63] S. Puza, E. Gencturk, I. E. Odabasi, E. Iseri, S. Mutlu, y K. O. Ulgen, «Fabrication of cyclo olefin polymer microfluidic devices for trapping and culturing of yeast cells», *Biomedical Microdevices*, vol. 19, n.º 2. 2017, doi: 10.1007/s10544-017-0182-3.
- [64] «Properties of Cyclic Olefin Copolymer». <https://omnexus.specialchem.com/selection-guide/cyclic-olefin-copolymer/cyclic-olefin-copolymer-properties> (accedido may 07, 2021).
- [65] «Zeonex - COP - microfluidic ChipShop». <https://www.microfluidic-chipshop.com/microfluidics/materials-in-microfluidics/polymers-in-microfluidics/zeonex/> (accedido may 07, 2021).
- [66] ZEON, «ZEONEX Cyclo Olefin Polymer (COP) High Performance Thermoplastics for Pharmaceutical Packaging». 2019.
- [67] «Cyclo-Olefin Copolymer - an overview | ScienceDirect Topics». <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/cyclo-olefin-copolymer> (accedido may 07, 2021).
- [68] «En Europa, certifican poliolefina de TOPAS como reciclable | Plastics Technology México». <https://www.pt-mexico.com/noticias/post/en-europa-certifican-poliolefina-de-topas-como-reciclable> (accedido may 07, 2021).
- [69] M. Bernard, E. Jubeli, J. Bakar, L. Tortolano, J. Saunier, y N. Yagoubi, «Biocompatibility assessment of cyclic olefin copolymers: Impact of two additives on cytotoxicity, oxidative stress, inflammatory reactions, and hemocompatibility», *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 105, n.º 12, pp. 3333-3349, dic. 2017, doi: 10.1002/jbm.a.36199.
- [70] «Cyclo-olefin copolymer Polymer - online catalogue source - supplier of research materials in small quantities - Goodfellow». <http://www.goodfellow.com/E/Cyclo-olefin-copolymer-Polymer.html> (accedido may 07, 2021).
- [71] J. Saez, L. Basabe-Desmots, y F. Benito-Lopez, «Low-cost origami fabrication of 3D self-aligned hybrid microfluidic structures», *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 20, n.º 8, pp. 1-7, 2016, doi: 10.1007/s10404-016-1781-7.
- [72] J. S. Jeon, S. Chung, R. D. Kamm, y J. L. Charest, «Hot embossing for fabrication of a microfluidic 3D cell culture platform», *Biomed. Microdevices*, vol. 13, n.º 2, pp. 325-333, 2011, doi: 10.1007/s10544-010-9496-0.
- [73] BEOnChip, «What's BEOnChip?» <https://beonchip.com/about-us/> (accedido may 01, 2021).
- [74] J. M. Ayuso *et al.*, «Glioblastoma on a microfluidic chip: Generating pseudopalisades and enhancing aggressiveness through blood vessel obstruction events», *Neuro. Oncol.*, vol. 19, n.º 4, pp. 503-513, 2017, doi: 10.1093/neuonc/now230.
- [75] J. M. Ayuso *et al.*, «Development and characterization of a microfluidic model of the tumour microenvironment», *Sci. Rep.*, vol. 6, n.º June, pp. 1-16, 2016, doi: 10.1038/srep36086.
- [76] M. Virumbrales-Muñoz *et al.*, «Enabling cell recovery from 3D cell culture microfluidic devices for tumour microenvironment biomarker profiling», *Sci. Rep.*, vol. 9, n.º 1, pp. 1-14, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-42529-8.
- [77] D. De Miguel *et al.*, «TRAIL-coated lipid-nanoparticles overcome resistance to soluble recombinant TRAIL in non-

small cell lung cancer cells», *Nanotechnology*, vol. 27, n.º 18, p. 185101, mar. 2016, doi: 10.1088/0957-4484/27/18/185101.

[78] D. De Miguel *et al.*, «High-order TRAIL oligomer formation in TRAIL-coated lipid nanoparticles enhances DR5 cross-linking and increases antitumour effect against colon cancer», *Cancer Lett.*, vol. 383, n.º 2, pp. 250-260, 2016, doi: 10.1016/j.canlet.2016.10.005.

[79] PreSens, «PreSens Company Profile». <https://www.presens.de/company/profile> (accedido may 01, 2021).

[80] K. Bhowmik y G. Peng, *Handbook of Optical Fibers*, n.º March. 2019.

[81] D. Cheng, C. Klassen, y H. C. Ott, «Development of Biomimetic Lung-on-a-Chip Platform Oxygen transfer measurements with SensorPlugs at the inlet and outlet».

[82] V. Radonic, I. Podunavac, M. Djisalov, T. Knezic, y I. Gadjanski, «O₂ , pH and CO₂ Monitoring in Microfluidic Mammalian Cell Culture».

[83] I. Podunavac *et al.*, «Microfluidic Platform for Examination of Effect of Chewing Xylitol Gum on Salivary pH, O₂, and CO₂», *Appl. Sci.*, vol. 11, n.º 5, p. 2049, 2021, doi: 10.3390/app11052049.

[84] E. Polatli, A. Yilmaz, R. Özvilgiç, Í. H. Erbay, D. Sag, y S. Güven, «A Microfluidic Platform for Real- Time Non-Invasive Monitoring of Microglia Polarization». [En línea]. Disponible en: <https://www.presens.de/knowledge/publications/application-note/a-microfluidic-platform-for-real-time-non-invasive-monitoring-of-microglia-polarization-1762>.

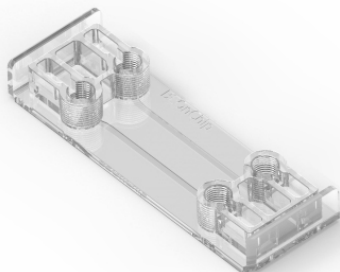
[85] V. Radonic, I. Podunavac, M. Djisalov, T. Knezic, y I. Gadjanski, «Cultivated Meat Bioprocess Optimization».

[86] P. E. Oomen, M. D. Skolimowski, y E. Verpoorte, «Implementing oxygen control in chip-based cell and tissue culture systems», *Lab on a Chip*, vol. 16, n.º 18. pp. 3394-3414, 2016, doi: 10.1039/c6lc00772d.

[87] J. Pavlacky y J. Polak, «Technical Feasibility and Physiological Relevance of Hypoxic Cell Culture Models», *Frontiers in Endocrinology*, vol. 11. 2020, doi: 10.3389/fendo.2020.00057.

.....
Fdo: Mauro Malvé. Director del TFM	Fdo: Luis. E. Serrano. Director del TFM	Fdo: Santiago Mañosas. Autor del TFM

ANEXO I:
FICHAS TÉCNICAS DEL PRODUCTO DE
BEONCHIP Y PRESENS



BE-FLOW is a slide format versatile microfluidic device for cell culture under biomimetic conditions. It does *in vitro* simulation of physiological environments involving flow and shear stress. Long-term 2D or 3D experiments in two independent channels under flow conditions.

Examples of applications are processes related to cell adhesion to the vascular endothelium (infection, cell therapy, metastasis, etc.).

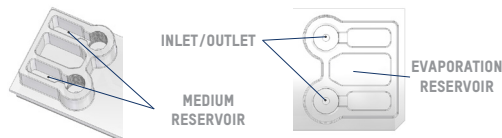
For further information, please contact BEONCHIP

MATERIAL

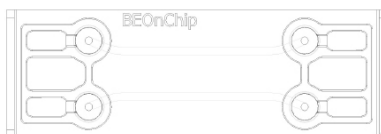
BE-FLOW chips are made of biocompatible plastic and are gas-impermeable, for effective gradients of CO₂, O₂, etc. They have excellent optical properties, with high transparency and low auto-fluorescence.

TECHNICAL FEATURES

The design of the be-flow consists of 2 independent channels with screw-like inlet and outlet wells that allow joining with connectors and tubes to a fluidic system. Evaporation reservoirs are next to the medium reservoirs to be filled with PBS or water during the incubation before closing the system with tubes.



	Height	Width	Length	Total Volume
Channels	375 µm	1'5 mm	43 mm	24 µL
Inlet/Outlet	7 mm	UNF 1/4"- 28		130 µL
M. Reservoir	5 mm	3'6 mm	8'8 mm	185 µL



CONTENT

The product reaches the user sterilized (10 Be-Flow per box). It can be stored in dry places which are not exposed to direct sunlight at room temperature (15-25°C).

CELL CULTURE COATING

BE-FLOW chips have been treated to obtain a hydrophilic surface that facilitates filling the devices with aqueous solutions and/or gels and promotes cell adhesion.

In case of a certain coating is required, prepare your coating solution (Collagen I, Collagen IV, Fibronectin, Poly-L-Lysine, Poly-D-Lysine...) according to the manufacturer's instructions and apply it into each channel. Aspirate the channel and wash with distilled water or PBS to remove excess coating solution by using 5-10 times the volume of the channel.

FILLING AND HANDLING

1. Trypsinize and count cells as usual. Cell concentration will vary with the cell type. It is recommended to seed a cell concentration to obtain a confluent layer within 2-3 days.
2. With a P-100 or P-1000 pipette, take 100 μ L of medium with cells and add it in the inlet. Leave the medium flow through the channel letting it reach the outlet. It is important to add water or PBS in the evaporation reservoirs to avoid evaporation.
3. Let cells adhere to the surface (the time may vary depending on the cell type).
4. If you are not mounting the flow system on the same day of seeding, add the desired amount of medium in the medium reservoirs. Depending on your cell type, pay attention to change the medium. To do this, medium is added carefully in the medium reservoir next to the inlet and the pressure difference will equalise the medium among inlet and outlet.
5. In order to connect the device to a flow system, screw the connectors into the outlet and inlet (in that order). Both inlets and outlets are designed to be screwed to connectors (1/4" - 28). Remember that the device and the tubes have to be primed with medium before connecting.

It is possible to use a rocker to move medium from one reservoir to another. With a final volume of 100 μ l per reservoir it is possible to apply 45° of inclination.

ASSEMBLY OF THE FLOW SYSTEM

Beonchip has some advices to set the flow system configuration.

Previous considerations:

1. Prewarm the tubes and the fluidic elements during 15-20 minutes at the incubator.
2. Set the system in a laminar flow cabinet.
3. Cells must be well adhered to the surface before mounting the flow system.
4. The device should be never left without culture medium inside or in the inlets/outlets.

To assemble the flow system, the following will be considered:

1. Fill the inlet well completely with medium so that no air bubbles remain.
2. Prime the system of tubes that connect to the inlet before assembling the system.
3. Both inlets and outlets are designed to be able to use connectors (1/4" - 28). Once this tube system is primed, the connector can be screwed into the inlet. At this point, extreme care must be taken to ensure that no air bubbles enter the system.
4. Finally, the tube is connected to the outlet and thus the system is closed.
5. Check that there are no leaks in the system. To do this, leave the pump running for a couple of minutes before placing the devices in the bioreactor or in the incubator.



To prevent bubbles from forming during filling, please avoid empty completely tips of pipettes. Hold the plunger firmly while removing the pipette from the inlets so that the negative pressure will not suck the solutions up.

CELLS SEEDING

Interaction between hemodynamics and vascular endothelium is an important factor to consider in cardiovascular function. Vascular endothelial cells from the inner wall of arterial vessels are exposed to the blood flow which acts on the endothelium surface as a tangential force (shear stress). Under mechanical stimuli, cells can adjust several biological responses through mechanotransduction processes. The BE-FLOW design consists of three independent channels. Each channel has an inlet and outlet reservoir that can be connected with a flow system, emulating the frame of a blood vessel. Seeding endothelial cells on top of a ECM coated surface, that meet cell type specific needs for growth and adhesion, makes possible to recreate a dynamic environment under different, physiological and pathological, flow rates.



PREPARATION FOR CELL MICROSCOPY

It is possible to monitor fixed or living cells and also chemical gradients. Most of the monitoring systems used in traditional cell culture can be taken to BEONCHIP microfluidic devices. Common fixatives can be used. Cell viability can be evaluated using different dyes. Moreover, immunofluorescent staining can be performed to identify specific targets. Also, cell cycle fluorescent reporters can be used.

Please contact BEONCHIP for further assistance.

OTHER READOUTS

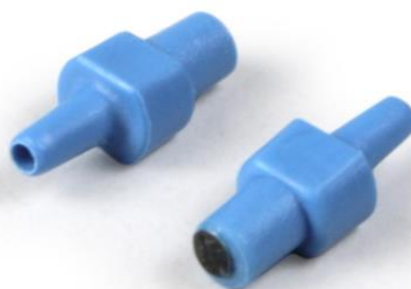
Recovering the cells is possible in order to perform downstream applications such as flow cytometry, RNA extraction (PCR)...

Please contact BEONCHIP for further assistance.

O₂ SensorPlug SPL-ML-PSt7

SENSOR PROBES

○ Instruction Manual



4 Technical Data

Specifications	Gaseous & Dissolved O ₂	Dissolved O ₂
Measurement range	0 – 100 % O ₂ 0 – 1000 hPa	0 – 45 g/mL 0 – 1400 µmol/L
Limit of detection	0.03 % oxygen	15 ppb
Resolution	± 0.01 % O ₂ at 1 % O ₂ ± 0.05 % O ₂ at 20.9 % O ₂	± 0.005 mg/L at 0.4 mg/L ± 0.025 mg/L at 9.06 mg/L
Accuracy at + 20 °C*	± 0.05 % O ₂ or ± 3 % rel.	
Response time (t90)	< 6 sec.	< 40 sec.
Compatible O ₂ meters	OXY-1 ST (trace), OXY-4 ST (trace), Microx 4 (trace)	
Properties		
Compatibility	Aqueous solutions, ethanol, methanol	
No cross-sensitivity	pH 1 – 14, CO ₂ , H ₂ S, SO ₂ , ionic species	
Cross Sensitivity	Organic solvents, such as acetone, toluene, chloroform or methylene chloride; chlorine gas	
Cleaning procedure	Ethylene oxide (EtO), beta irradiation Water, ethanol 70 % (v/v)	
Calibration	SPL are pre-calibrated Two-point calibration in oxygen-free environment (nitrogen, sodium sulfite) and air-saturated environment	
Storage Stability	60 months provided the sensor material is stored in the dark at room temperature	
Plug type	Male Mini Luer fluid connector	

*after two-point calibration

METERS

OXY-4 ST (G3)



Due to its small outer dimensions OXY-4 ST can be set up almost anywhere. It can be used with microsensors (230 μm fiber) in different designs, non-invasive sensors, dipping probes and flow-through cells (1 mm fiber). This makes it the ideal tool especially for benchtop applications. OXY-4 ST is compatible with sensor type PSt7 (detection limit 15 ppb, 0 - 100 % oxygen). This USB-powered oxygen meter is operated with the PreSens Measurement Studio 2 software and offers separate temperature compensation for each channel. The software has numerous features, offers additional pressure and salinity compensation and allows controlling several single and multi-channel meters simultaneously. This oxygen meter is the solution for most precise micro-invasive or non-invasive oxygen measurements.

- Measurement range of max. 0 - 100 % oxygen
- For use with microsensors, dipping probes, non-invasive spots & FTCs
- USB-powered
- Controlled by PreSens Measurement Studio 2
- Compensation of temperature, pressure & salinity
- Small outer dimensions

TECHNICAL

Specifications

Oxygen sensors	PSt7 (optical ST connector)
Temperature sensor	4 x Pt100 temperature connection (sensor not included)
Temperature performance	From 0 °C to + 50 °C, resolution ± 0.1 °C, accuracy ± 1.0 °C
Power supply	Supply voltage: 5 VDC (USB-2.0-Mini-B), current/power: 400 mA
Temperature: operating / storage	From 0 °C to + 50 °C / - 20 °C to + 70 °C
Relative humidity	From 0 to 80 % (non-condensing)
Dimensions (L x W x H)	164 mm x 76 mm x 50 mm
Weight	417 g
Digital interface	USB interface cable to PC, cable included

ACCESSORIES

Polymer Optical Fiber POF



A polymer optical fiber (POF) is needed to transfer excitation light to the sensor and the sensor response back to the meter. We offer different versions for different meters depending on their optical connector type. A POF enables non-invasive and non-destructive measurements to be made from the outside through the wall of a transparent or slightly colored container. The POF with SMA connector is compatible with meters of the Fibox, OXY-1 SMA, OXY-1 WM, OXY mini and pH mini series, as well as the pCO₂ mini. The POF with ST connector is compatible with meters of the Microx 4 and OXY-1 ST series. Different standard lengths are offered, e. g. 2.5 m, and fibers with connectors on one or both ends are available, depending on your adapter or sensor application.

- Enables contactless measurement
- Versatile light guide
- Different lengths available

TECHNICAL

Specifications	SMA	ST
Dimensions	Optical diameter: 2 mm Outer diameter (incl. black cladding): approx. 2.8 mm Min. bending radius: 40 mm	Optical diameter: 1 mm Outer diameter (incl. black cladding): 2.2 mm Min. bending radius: 17 mm
Connector type	SMA connectors on one or both ends available for use with SOA or ARC	ST connectors on one or both ends available for use with SOA or ARC-1 ST
Length of fiber	Available standard lengths 1.0, 2.5 and 5.0 m; for lengths of more than 5 m, please contact our service team	
Compatibility	All devices with SMA connector, e.g. Fibox, OXY-1 SMA, pH mini series, pCO ₂ mini	All devices with ST connector, e.g. Microx 4 or OXY-1 ST series

ANEXO II:

FICHAS TÉCNICAS DEL EQUIPO
UTILIZADO EN LOS PROCESOS DE
FABRICACIÓN, VALIDACIÓN Y
EXPERIMENTACIÓN

CORTE POR LÁSER DE CO2: LIAOCHENG CITY HENGCHUNYUAN MACHINERY EQUIPMENT CO., LTD. FL – K40



1 potencia de láser	40w
2 tensión de alimentación	110/220V ± 10% 50/60Hz
3. Tamaño del área de trabajo	300*200mm
4 de mesa de trabajo de	Placa de aluminio
5. Tamaño arriba y abajo	50mm (opcional)
6. Modo de control de mesa	Manual
7. Velocidad máxima de grabado	500 mm/s
8. Velocidad máxima de corte	100mmis
9 La localización de precisión	<0,01mm
10. Mínimo carácter moldeador	Carácter 2*2mm, letra 1*1mm
11 resolución	0.0125mm
12 espesor de corte	0-15mm depende del material
13 de la configuración de Control de	MINI DSP
14. Interfaz de transferencia de datos	USB
15-Sistema de medio ambiente	WINDOWS XP/ WIN7/8
16 Graggio archivo enemigo \ mat	BMP PLT... AI CDR DXF JPGE... GIF TIF PGN... DXP... DWG de
17.256 color separatrion de salida	Apoyo
18 360 grados pendiente grabado	Apoyo
19 Sin trabajo	Apoyo
20 manera de enfriamiento	Agua de refrigeración
21 la temperatura de funcionamiento	5-35 ° c
22. sensor y alarma de protección del agua	Sí
23. Peso neto/peso del embalaje	35 kg/50kg
24 dimensión de la máquina	810*510*280mm
25 dimensión de embalaje	1000*700*480mm

IMPRESORA 3D SLA: FORMLABS FORM 2

Form 2 Tech Specs

Hardware

Dimensions	35 × 33 × 52 cm 13.5 × 13 × 20.5 in
Weight	13 kg 28.5 lbs
Operating Temperature	Auto-heats to 35° C Auto-heats to 95° F Self-heating Resin Tank
Power Requirements	100–240 V 1.5 A 50/60 Hz 65 W
Laser Specifications	EN 60825-1:2007 certified Class 1 Laser Product 405nm violet laser 250mW laser
Connectivity	Wifi, Ethernet and USB
Optical Path	Protected
Printer control	Interactive Touch-screen with Push-button



Printing Properties

Technology	Stereolithography (SLA)
Peel Mechanism	Sliding Peel Process with wiper
Resin Fill System	Automated
Build Volume	145 × 145 × 175 mm 5.7 × 5.7 × 6.9 in
Layer Thickness (Axis Resolution)	25, 50, 100 microns 0.001, 0.002, 0.004 inches
Laser Spot Size (FWHM)	140 microns 0.0055 inches
Supports	Auto-Generated Easily Removable



PreForm Software

System Requirements	Windows 7 (64-bit) and up Mac OS X 10.10 and up OpenGL 2.1 4GB RAM
Hardware Requirements	Formlabs Form 2 3D Printer
Features	Simple print setup Auto-orient for optimal print position Auto-mesh repair Auto-generation of supports Rotation, scaling and duplication Layer slicer for path inspection .STL and .OBJ file input .FORM file output

Finish Kit

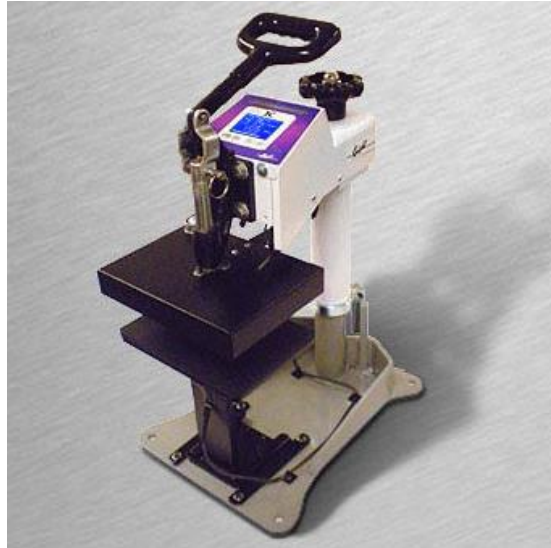
Includes	Finishing Tray Scraper Pre and Post-Rinse Tubs Rinse Basket Squeeze Bottle Flush Cutters Tweezers Disposable Nitrile Gloves PEC*PAD Wipes Microfiber cloth Removal Tool Removal Jig
-----------------	--

PLOTTER DE CORTE: GRAPHTEC FC8600 SERIES



Model	FC8600-60	FC8600-75	FC8600-100	FC8600-130	FC8600-160
CPU	32-bit CPU				
Configuration	Grit rolling type				
Drive method	Digital servo drive				
Max. cutting area (W x L) (¹)	2 ft x 164 ft 610 mm x 50 m	2 ft 6 in x 164 ft 762 mm x 50 m	3 ft 6 in x 164 ft 1067 mm x 50 m	4 ft 6 in x 164 ft 1372 mm x 50 m	5 ft 4 in x 164 ft 1626 mm x 50 m
Cutting area of guaranteed accuracy (²)	23.23 in x 50 ft	29.21 in x 50 ft	41 in x 32 ft, 35.2 in x 50 ft	53 in x 32 ft, 35.2 in x 50 ft	63 in x 32 ft, 35.2 in x 50 ft
Mountable media width	Min. 1.97 in Max. 30.31 in	Min. 1.97 in Max. 36.22 in	Min. 1.97 in Max. 48.19 in	Min. 1.97 in Max. 60.20 in	Min. 1.97 in Max. 72.83 in
Max. cross cut width	2 ft 4.9 in (734 mm)	2 ft 10 in (886 mm)	3 ft 10.88 in (1191 mm)	4 ft 10.9 in (1496 mm)	5 ft 8.9 in (1750 mm)
Number of push rollers	2 rollers	2 rollers	3 rollers	3 rollers	4 rollers
Max. cutting speed	4 ft 10.46 in/s (1485 mm/s) at 45° direction				
Axial acceleration	Max. 39.2 m/s ² (4 G) in 8 steps				
Cutting force	Max. 5.88 N (600 gf) in 48 steps				
Mechanical resolution	0.005 mm				
Programmable resolution	GP-GL: 0.1 / 0.05 / 0.025 / 0.01 mm, HP-GL™: 0.025 mm				
Distance accuracy (²)	Max. 0.1 mm or 0.1 % of plotted length				
Repeatability (²)	Max. 0.1 mm in plot up to 2 m (excluding the expansion and contraction of the media)				
Minimum character size	Approx. 3 mm alphanumeric (varies depending on character font and media)				
Mountable number of tools	1 tool (cutting blade, plotting pen or pouncing tool) in standard; 2 tools (cutting blade and plotting pen) when second penholder (optional) is installed				
Blade types	Supersteel (0.9 mm or 1.5 mm diameter)				
Pen types	Water-based fiber-tip pen, Oil-based ballpoint pen				
Pouncing tool type	Steel pin 1.2 mm diameter, required optional pouncing tool (PPA 33-TP12)				
Media types (³)	Self-adhesive marking film (vinyl, fluorescent, reflective, high-intensity reflective film) up to 0.25 mm thick, Sandblast resist rubber up to 1 mm thick				
Compatible paper for pouncing	Regular paper from 0.06 to 0.13 mm thick				
Light pointer	Built into the tool carriage				
Cross-cutter	Built into the tool carriage				
Perforation cutting	Supported (performed by force control)				
Registration mark sensing system	Scans the mark by optical sensor (ARMS5.0), Segment area and Multiple-mark compensation, 4-points axis alignment, Auto mark detect				
Standard interface	USB2.0 (High speed), RS-232C, and Ethernet (10BASE-T/100BASE-TX)				
Buffer memory	2 MB				
Command sets	GP-GL / HP-GL™ emulation (Set by menu or command, and selects from GP-GL, HP-GL™, or Auto select)				
Condition settings	Dual configuration (save two (2) user settings with eight (8) separate condition setting for each user)				
Display	Graphic type LCD (3-inch, backlight)				
Power source	100 V to 240 V AC, 50 / 60 Hz				
Power consumption	Max. 160 VA				
Operating environment	10 to 35 °C, 35 to 75 % R.H. (non-condensing)				
Guaranteed accuracy environment	16 to 32 °C, 35 to 70 % R.H. (non-condensing)				

PLANCHA DE TRANSFERENCIA POR TERMOCOMPRESIÓN: GEO KNIGHT DC-8



FEATURES

- Fully digital temperature control 32°-600°F range
- Automatic digital timer & dual pre-press timer
- Digital Pressure Bar Graph
- Interchangeable Heat Platens & Tables
- Solid steel welded framework
- SuperCoil-Microwinding™ heater technology
- Accommodates materials up to 1" thick
- Temperature readout accuracy $\pm 2^{\circ}\text{F}$ - can show $^{\circ}\text{C}$ or $^{\circ}\text{F}$
- 70 Programmable presets
- Records number of pressing cycles done
- Teflon-coated 3/4" thick heat platen

WARRANTY

- FREE LIFETIME Tech Support!
- Lifetime warranty on heat platen
- 5-year warranty on frame
- 3-year warranty on controller
- 1 year warranty on parts

SPECS

- **Weight:** 110 lbs
- **Electrical:** 600W / 5A / 120V
- **Shipping Dims:** 24"W x 24"D x 24"H
- (add \$35 for 220V international)

CÁMARA DE FLUJO LAMINAR: TELSTAR BIO II ADVANCE PLUS



Especificaciones

- Profundidad de la cabina de 764 mm (compatible con la mayoría de puertas de laboratorio)
- Altura total de 1260 mm
- Frontal con una inclinación de 10° para mejorar la posición de trabajo
- Cámara de acero inoxidable de 304 L con ángulos redondeados y laterales en vidrio de seguridad templado
- Junta de estanqueidad alrededor del frontal
- Cristal frontal de seguridad antirreflejante con protección contra la luz UV, sin obstáculos visuales en el borde inferior
- Control por microprocesador con autocompensación de la colmatación de los filtros
- Pantalla principal que muestra la velocidad del flujo laminar y el estado de colmatación de los filtros
- Función Ecomode
- Panel de control con código cromático internacional que indica el estado de la cabina
- Cristal frontal deslizante y abatible accionado por pistones neumáticos, que facilita el mantenimiento y la limpieza interior y permite la introducción de elementos y accesorios voluminosos en el interior de la cámara
- Luz UV y ventiladores programables mediante un temporizador
- Cuatro idiomas predefinidos (español, inglés, francés y alemán)
- Acceso a todas las áreas de mantenimiento mediante el frontal de la cabina.

ESPECIFICACIONES TÉCNICAS	unidades	Bio II Advance Plus 3	Bio II Advance Plus 4	Bio II Advance Plus 6
Dimensiones externas (an. × pr. × al.)	mm	1049 × 764 × 1260	1354 × 764 × 1260	1964 × 764 × 1260
Dimensiones internas (an. × pr. × al.)	mm	954 × 602 × 580	1259 × 602 × 580	1869 × 602 × 580
Dimensiones de transporte (an. × pr. × al.)	mm	1105 × 840 × 1450	1450 × 880 × 1640	2040 × 870 × 1640
Peso	kg	180	200	280
Peso de transporte	kg	230	250	330
Velocidad del flujo laminar / caudal del flujo laminar	m/s m ³ /h	0,35 / 669	0,35 / 882	0,35 / 1310
Vel. del aire de entrada frontal / caudal de extracción	m/s m ³ /h	0,55 / 295	0,55 / 402	0,5 / 564
Potencia	kW	0,125	0,125	0,338
Voltaje (otros disponibles bajo solicitud)	V	230	230	230
Frecuencia	Hz	50-60	50-60	50-60
Iluminación	lx	≥1000	≥1000	≥1000
Ruido	dBA	≤ 58	≤ 58	≤ 58
Vibración	mm RMS	<0,005	<0,005	<0,005
Filtros		Filtros HEPA H14 de conformidad con EN 1822: eficiencia del 99,995 % MPPS y 99,999 % DOP		
Calidad del aire		ISO 4 de conformidad con ISO CD 14644-1: 353 part. ≥0,5 μm/m ³ ; 10 000 part. ≥0,1 μm/m ³		

Atto (Low Cost / Low Budget)

Niederdruck Plasma Systeme
Low pressure plasma systems

Technische Daten

Gehäuse

Breite 425 mm
Höhe 275 mm
Tiefe 450 mm

Breite 525 mm
Höhe 257 mm
Tiefe 420 mm

Gewicht

Ca. 20 kg (ohne Pumpe)

Vakuumkammer

Aus Glas (Borosilikat oder Quarzglas)
Ø 211 mm
Länge 300 mm

Kammervolumen

Ca. 10,5 Liter

Gaszuführung

2 Gaskanäle über Nadelventil
MFC

Generator Frequenz

40 kHz / 200 W
13,56 MHz / 300 W

Spannungsversorgung

220 V - 240 V / 6 A, 50 - 60 Hz
(110 V / 10 A / 60Hz)

Vakuumpumpe

Saugleistung min. 3 m³/h

Steuerungen

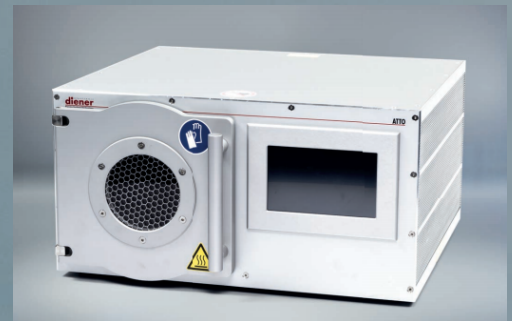
Manuell
PCCE-Steuerung (Microsoft Windows CE)
PC-Steuerung (Microsoft Windows POS Ready 2009)
Drehschalter

Teilaufnahme

1x Warenträger

Druckmessung

Option Pirani



Technical data

Cabinet

Width 425 mm (16.7")
Height 275 mm (10.8")
Depth 450 mm (17.7")

Width 525 mm (20.7")
Height 257 mm (10.1")
Depth 420 mm (17.7")

Weight

Approx. 20 kg (44lbs) (without pump)

Vacuum Chamber

Made of glass (Borosilicate or Quartz glass)
Ø 211 mm (8.3")
Length 300 mm (11.8")

Chamber volume

Approx. 10,5 litres

Gas Connection

Two gas channels via needle valve
MFC

Generator Frequency

40 kHz / 200 W
13,56 MHz / 300 W

Supply voltage

220 V - 240 V / 6 A, 50 - 60 Hz
(110 V / 10 A / 60 Hz)

Vacuum Pump

Suction power min. 3 m³/h

Control

Manual
PCCE-control (Microsoft Windows CE)
PC-control (Microsoft Windows POS Ready 2009)
Rotary switch control

Partial recording

1x Product carrier

Pressure measurement

Option Pirani

TEB1000 flow bioreactor

Temperature control	
Temperature range	Room temperatura +4 to +50 °C
Control	± 0.1 °C
Stability	± 0.1 °C
Uniformity	≤ ± 0.3 °C
CO ₂ control	
Range	0.2-20%
Stability	± 0.1 °C
Service pressure	0.35 bar
Recuperation (up to 90% of preset value)	0.7 %/min
O ₂ control (optional)	
Range	1-19%
Service pressure	1 bar
Pumping system	
Number of pumps	Two independent subsystems with electric engines and electronics located outside the internal chamber of the Master Unit, to avoid overheating, reduce the risk of contamination and increase useful volume.
Number of pumpheads	Up to 2 pumpheads can be used with each subsystem (4 pumpheads in total)
Compatibility	High flow (HF) and Low flow (LF) pumpheads
HF Pumphead	<ul style="list-style-type: none"> 1 channel pumphead Flow rate: 0.1 to 400 ml/min
LF Pumphead	<ul style="list-style-type: none"> 5 channel pumphead Flow rate: 0.003 to 33 ml/min
Channels per pumphead	<ul style="list-style-type: none"> HF pumphead: 1 channel/pumphead LF pumphead: 5 channel/pumphead
Digital control of flow conditions by means of touchscreen	<ul style="list-style-type: none"> Real time electronic flow rate control Automatic graph of pump rotation speed Independent control of each subsystem Pre-configured flow profiles Possibility of introducing user-defined complex flow protocols Flow direction can be alternated Pulsatile flow (regulation of frequency and amplitude) Easy-to-use intuitive interface Special flow control module for alternative dynamic perfusion
Power supply and consumption	
Power supply	110-220 V, 50-60 Hz, IEC 14 power cord
Nominal power	1800 W
Dimensions	
External dimensions [W x D x H]	686 x 803 x 848 mm
Internal dimensions [W x D x H]	540 x 451 x 693 mm
Weight	
Weight	120 kg



EBERS Medical Technology

Tel/Fax (+34) 876 013 826 email: info@ebersmedical.com
C/ María de Luna II, nave 3B E-50018, Zaragoza (Spain)

www.ebersmedical.com