

Trabajo Fin de Máster

**Análisis con Holografía Digital del flujo en microcanales
con partículas deformables.**

**Analysis with Digital Holography of the flow in
microchannels with deformable particles.**

Autor:

Adrián Subías Martín

Directoras:

M^a Nieves Andrés Gimeno

Julia Lobera Salazar

Índice

1. Introducción	3
2. Fundamentos de la holografía	4
2.1. Holografía digital en línea	5
2.2. Holografía digital fuera de eje	6
3. Montaje	8
4. Elección de los fluidos	10
4.1. Generación de microgotas	10
5. Formación de microgotas en el microcanal	12
5.1. Microcanal en forma de T	12
5.2. Microcanal lineal	17
5.2.1. Microscopia holográfica en línea	18
5.2.2. Microscopia holográfica fuera de eje	26
6. Conclusiones	30
7. Bibliografía	31

1. Introducción

La caracterización del movimiento de partículas dentro de un flujo nos permite analizar comportamientos de las células dentro del torrente sanguíneo. En particular, es de especial interés conocer la dinámica de los glóbulos rojos y blancos, que se puede simular con partículas deformables, en concreto en casos de trombosis en los vasos sanguíneos. El estudio de partículas deformables también se puede utilizar para simular el comportamiento de gotas de medicamentos inyectadas en el flujo sanguíneo.¹

Para caracterizar un flujo, se necesita medir en un volumen (3D) las tres componentes de la velocidad (3C). Hay varias técnicas ópticas que nos permiten medir el campo de velocidades 3D-3C de un fluido. Las más utilizadas son: PIV (Particle Image Velocimetry) tomográfico y la holografía digital. En ambas técnicas, es necesario registrar la imagen de las partículas y seguirla a lo largo del tiempo para dibujar su traza y, por consiguiente, su velocidad.

Para simular el torrente sanguíneo, se utiliza un flujo transparente de una viscosidad similar a la sangre y se siembra con partículas trazadoras que dispersan la luz. Para visualizar estas partículas de entre 10 y 80 μm se utilizan técnicas de microscopía. En concreto, se ha utilizado la microscopía holográfica por dos motivos. Por un lado, permite registrar todo el volumen del capilar simultáneamente y recuperar, durante la reconstrucción de la imagen, el plano de mejor enfoque de las partículas. Esto permite solventar el problema de la pequeña profundidad de enfoque de los objetivos de microscopio. Además, es necesario utilizar una técnica con la que obtengamos alta resolución temporal (ms) y que posibilite seguir la evolución temporal durante varios minutos.²

Las partículas trazadoras más utilizadas en este tipo de estudios son partículas esféricas sólidas. Sin embargo, los glóbulos rojos y blancos son partículas deformables. El objetivo principal de este TFM es generar partículas deformables en el flujo de un microcanal y conseguir medir su traza.

Para ello, en primer lugar, se ha realizado una selección de los materiales adecuados para crear las microgotas, y se ha implementado un sistema de fluidica que permite introducir las gotas en el flujo del microcanal. Se van a estudiar dos tipos de microcanales que se nombran por su geometría: rectos o en forma de silla o T.³

Para registrar las partículas deformables o microgotas que se van a crear dentro de un flujo, identificarlas y medir su traza y tamaño se han aplicado dos técnicas de holografía digital. Para la visualización se utilizará la holografía en línea por su sencillez, pero para reconstruir la imagen de las gotas con menos ruido y mejorar su análisis (medir la traza de las gotas), se utilizará un montaje de holografía fuera de eje. Se va a utilizar un montaje de holografía fuera de eje con una iluminación en línea del objeto. De esta forma, bloqueando el haz de referencia el registro corresponde a un holograma en línea. Este tipo de montajes se identifican, también, como holografía de Fourier sin lentes del plano de la apertura del objetivo de microscopio o como holografía de plano imagen con iluminación en línea.

2. Fundamentos de la holografía

La holografía es una técnica óptica que nos permite la formación de imágenes tridimensionales de un objeto. En cada holograma se registra la interferencia producida por la onda dispersada por el objeto al ser iluminado (haz objeto) y la onda de referencia. Para dicho registro se utilizan materiales fotosensibles. En holografía digital, se utilizan sensores de cámaras digitales, que pueden ser CCD o CMOS. Las amplitudes complejas que se asocian a cada uno de estos dos haces se pueden expresar como:

$$\begin{aligned} R(x, y) &= A_R \cdot \exp(i \cdot \phi_R(x, y)) \\ O(x, y) &= A_O \cdot \exp(i \cdot \phi_O(x, y)) \end{aligned} \quad (1)$$

donde el parámetro A se refiere a la amplitud y el parámetro ϕ nos indica la fase. De esta forma, la intensidad registrada en el holograma vendrá descrita por la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} I(x, y) &= |O(x, y) + R(x, y)|^2 = A_O^2 + A_R^2 + 2 \cdot A_O \cdot A_R \cdot \cos(\phi_O - \phi_R) = \\ &= |O(x, y)|^2 + |R(x, y)|^2 + R^*(x, y) \cdot O(x, y) + R(x, y) \cdot O^*(x, y) \end{aligned} \quad (2)$$

donde el tercer y cuarto término son los términos de interferencia, que están presentes si ambos haces son coherentes. En la figura 1, se esquematiza el proceso general de registro de un holograma.



Figura 1: esquema de registro de un holograma.

La reconstrucción del holograma se puede hacer de dos formas distintas. La primera es iluminando el holograma con un haz idéntico al haz de referencia obteniendo así la imagen virtual o iluminando con el haz de referencia conjugado con lo que obtenemos la imagen real del objeto registrado. Estos dos procesos se esquematizan en la figura 2.

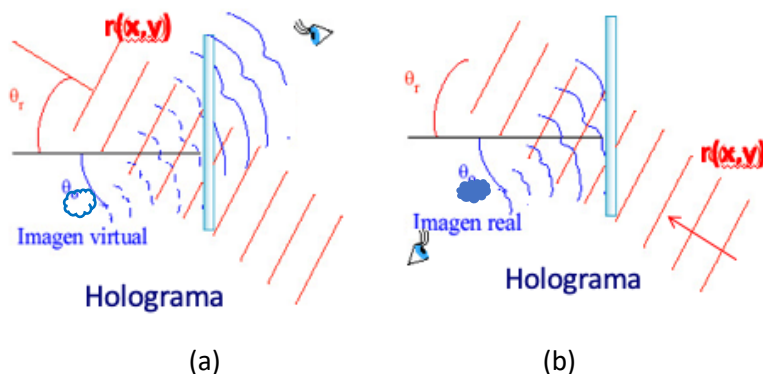


Figura 2: Reconstrucción del holograma. (a) reconstrucción con la onda de referencia para generar la imagen virtual y (b) reconstrucción con la conjugada de la onda de referencia para generar la imagen real.

En la actualidad, el registro digital se ha impuesto en muchas aplicaciones de la holografía y la interferencia se registra en los sensores de las cámaras digitales. Dado el bajo poder resolutivo de estos sensores, el ángulo entre ambos haces ha de ser pequeño. En los registros digitales, la reconstrucción se realiza de forma numérica. Se recupera la información de la onda objeto, tanto la amplitud como la fase. Posteriormente para calcular la onda en otro plano se propaga numéricamente utilizando el método de convolución. En nuestro caso, se propagará la información al plano dónde se encuentre la micropartícula enfocada para su estudio.

En este trabajo se van a utilizar los dos tipos de holografía digital. La holografía en línea y la holografía fuera de eje presentan diferencias no sólo en el registro, sino también en el tipo de la referencia y por tanto del proceso de reconstrucción.

2.1. Holografía digital en línea

En esta holografía, los dos haces (objeto y referencia) son paralelos al eje óptico. El haz de referencia es el haz que atraviesa el objeto sin modificación y la dispersión de luz por parte de las partículas constituye el haz objeto. El esquema del montaje de registro se muestra en la figura 3.

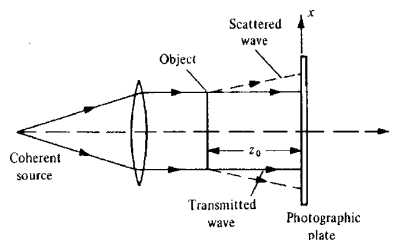


Figura 3: esquema de registro en holografía en línea.

En este caso, la amplitud de la onda de referencia se puede expresar como una constante ya que es un haz colimado y la fase de la referencia es uniforme, $R(x,y)=\text{constante}$. La onda de referencia y su conjugada es la misma, la reconstrucción se puede hacer con la onda de referencia o la conjugada de dicha onda.⁴⁻⁵

La ecuación 3 resume el proceso de reconstrucción numérica de la onda $\Gamma(\xi', \eta')$.⁴⁻⁵ Utilizando la onda de referencia, nos trasladamos al plano imagen a una distancia d con unas coordenadas transversales (ξ', η') :

$$\Gamma(\xi', \eta') = \frac{i}{\lambda} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} h(x, y) R(x, y) \frac{\exp(-i \frac{2\pi}{\lambda} \rho')}{\rho'} dx dy \quad (3)$$

$$\rho' = \sqrt{(x - \xi')^2 + (y - \eta')^2 + d^2} \quad (4)$$

donde $h(x, y)$ es la transmitancia del holograma, y ρ' la distancia entre un punto del plano de propagación (ξ', η') y un punto (x, y) del plano del holograma.

Mediante la ecuación 3 se obtiene la amplitud compleja del haz objeto en el plano a una distancia d del plano del holograma, tomando $R(x,y)=1$. A partir de esta amplitud compleja se puede calcular después la intensidad y de la fase de dicho haz.

El principal problema de este tipo de holografía es que no permite la separación de la imagen real de la virtual. Como consecuencia, durante el proceso de reconstrucción, se observan las dos imágenes superpuestas: una enfocada y otra desenfocada. La imagen desenfocada de las partículas produce un ruido fondo que dificulta su localización.¹⁰

2.2. Holografía digital fuera de eje

Esta holografía se caracteriza porque los dos haces recorren caminos diferentes y se combinan antes de llegar al sensor con un ángulo pequeño. Para ello, se coloca un cubo divisor frente a la cámara para combinar los dos haces y asegurarnos de tener un pequeño ángulo entre ambos. Para registrar un holograma de transformada de Fourier sin lente, se necesita un haz de referencia divergente, cuyo origen se tiene que colocar a la misma distancia que la apertura de la lente utilizada para obtener la imagen objeto. En la figura 4, se muestra un esquema de rayos de un montaje de transformada de Fourier sin lentes (figura 4a), el efecto del cubo divisor (figura 4b) y una representación de la transformada de Fourier típica de este tipo de hologramas (figura 4c), donde se aprecian las imágenes de la apertura en las dos esquinas de la imagen.

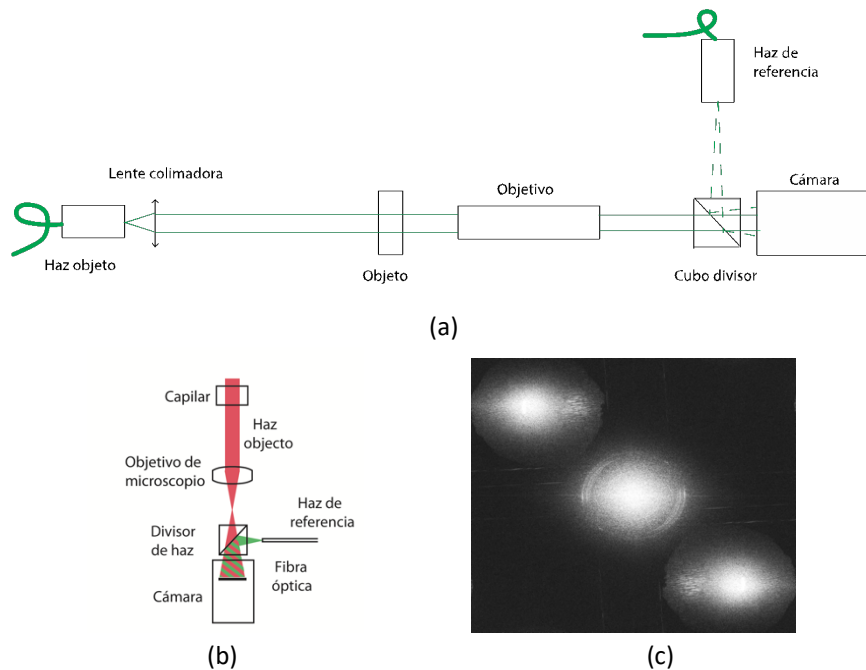


Figura 4: (a) montaje óptico para registrar un holograma de transformada de Fourier sin lente. (b) Esquema de rayos del efecto del cubo divisor. (c) Transformada de Fourier de un holograma registrado

El tamaño de la apertura determina el tamaño de moteado que aparece en el holograma. El ángulo entre el haz de referencia y el haz objeto se introduce para producir una modulación en cada mota. Este desplazamiento espacial de fase (o SPS por sus siglas en inglés) se considera óptimo cuando el espaciado de las franjas que aparecen sobre el moteado es del orden de tres píxeles. De esta forma, se consigue que las imágenes de la apertura no se superpongan con el término central (figura 4c) y evitar el ruido de fondo. Seleccionando una de las imágenes de la apertura y bloqueando el resto, podemos separar la imagen real (o virtual) del haz objeto.

La imagen seleccionada se mueve al centro del plano de frecuencias y se aplica la transformada de Fourier inversa para recuperar la onda objeto en el plano del holograma. Posteriormente, utilizando

el método de convolución, se puede propagar a cualquier plano dentro del capilar y recuperar la información referente a la intensidad y la fase.

Este tipo de holografía nos permite eliminar la imagen virtual (o real) y el término central, reduciendo notablemente el ruido de fondo y mejorando la resolución axial de la técnica. Las desventajas se encuentran en el montaje óptico, la calibración del mismo y el proceso de análisis. Este último resulta ser lo suficientemente complejo para no poder ajustar los flujos "en vivo". La holografía en línea nos permite ver en directo el comportamiento de las gotas y, así, podemos ajustar las presiones y los caudales con facilidad. Posteriormente, conocidos los parámetros óptimos, se trabaja con la holografía fuera de eje para realizar un análisis más detallado y poder eliminar ruido no deseado.

3. Montaje

Se ha utilizado una configuración dual del microscopio holográfico digital (figura 5). Con esta configuración para registrar hologramas en línea solo hay que bloquear el haz de referencia. Se ha utilizado un láser de estado sólido de una longitud de onda (λ) de 515,4 nm. Se usa un divisor de haz para dividir el haz inicial en dos: haz objeto y haz de referencia, que son guiados a través de fibra óptica. La salida del haz objeto se colima mediante una lente y se usa para iluminar el objeto seleccionado. La luz difractada por dicho objeto llega al objetivo del microscopio, atraviesa el cubo divisor y alcanza el sensor CMOS. Las reflexiones que introducen los bordes del cubo divisor se bloquean con cartulina negra colocada alrededor del cubo. El extremo de la fibra de referencia es una onda divergente que está protegida con una lente divergente y aumenta la apertura numérica del haz de referencia. Este haz se combina con el haz objeto en el cubo divisor y llega al sensor digital. Como se ha explicado antes, el origen del haz de referencia se encuentra a la misma distancia del cubo divisor que la apertura de la lente del objetivo para poder registrar un holograma de Fourier sin lente. Con la separación lateral de ambos haces, se consigue un desplazamiento de fase espacial, y la interferencia de los dos haces se registra finalmente en el sensor CMOS. La relación de intensidad entre el haz de referencia y el haz objeto tiene que ser del orden de 10 a 1 para optimizar el contraste sin incrementar el ruido debido al término central (figura 4c).

Antes de comenzar el proceso de medida, hay alinear de la dirección del haz objeto con el eje óptico y que el sensor de la cámara está colocado perpendicularmente al eje óptico. Esto nos permitirá cambiar los aumentos, cambiando el objetivo, sin modificar la alineación.

En los experimentos que se realizan en este Trabajo Fin de Máster se utiliza un montaje de microscopía óptica, que se ha implementado con dos configuraciones distintas. La primera configuración consiste en colocar un capilar horizontalmente como se muestra en la figura 5. En este caso, el flujo va paralelo al suelo.

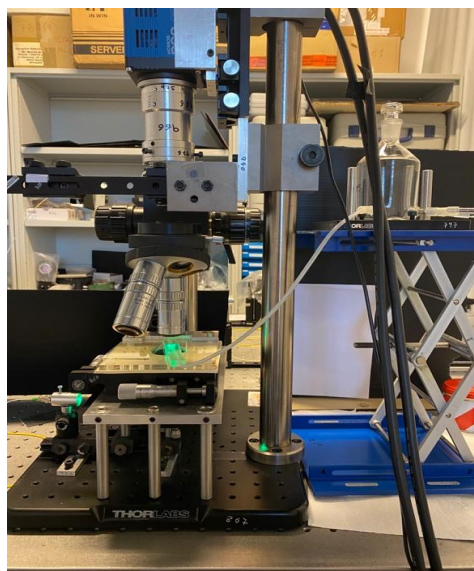


Figura 5: Fotografía del montaje óptico, sistema de fluidica y depósito del líquido de índice.

La segunda forma consiste en colocar el microcapilar verticalmente para favorecer el flujo en su interior como se ve en la figura 6. De esta forma, el flujo va de arriba abajo.

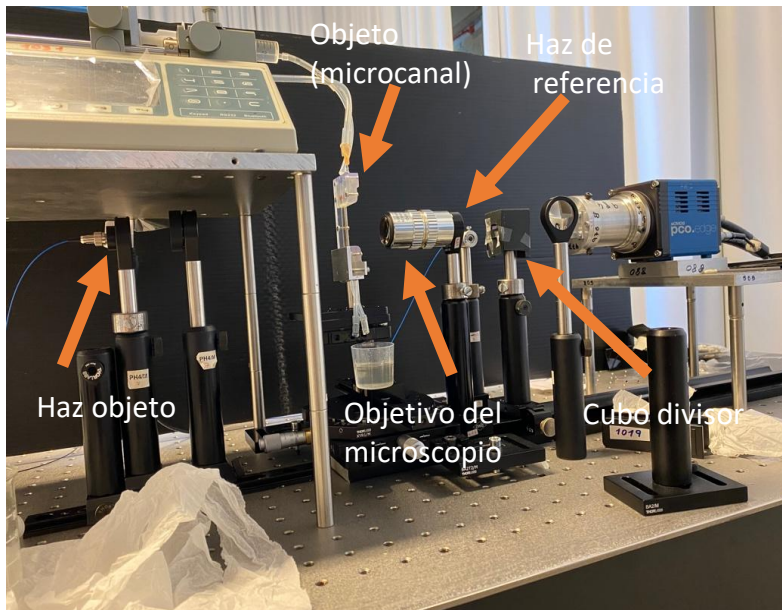


Figura 6: montaje de microscopia holográfica con el objeto vertical.

El caudal principal y el caudal de líquido formador de las microgotas van a estar controlados por una bomba doble. Esta bomba permite controlar la presión ejercida a dos jeringuillas (con los distintos líquidos en nuestro caso) simultáneamente. La relación de caudales se puede calcular como la relación entre los radios de las jeringuillas, como se muestra en la ecuación (5).

$$Q = S \cdot v; \quad S = \pi \cdot r^2$$

$$Q_1 = \alpha \cdot Q_2 \rightarrow r_1 = \sqrt{\alpha} \cdot r_2 \quad (5)$$

Q_1 es el caudal principal y Q_2 es el caudal secundario. El caudal secundario es aquel que está formado por el líquido con el que queremos crear las microgotas. Esta relación es necesaria ya que la bomba aplica la misma presión a las dos jeringuillas. La propia bomba permite seleccionar la jeringuilla y el caudal deseado y ajusta convenientemente la presión que aplica. Con esta configuración, se decide controlar el caudal principal y caracterizar cada prueba con dicho caudal.



Figura 7: bomba que se utiliza para el control de los caudales.

4. Elección de los fluidos

El objetivo principal de este trabajo es el estudio del proceso de creación de microgotas deformables en un flujo dentro de un modelo de vaso sanguíneo. Las partículas deformables simulan mejor que las partículas sólidas el comportamiento de los glóbulos rojos en el torrente sanguíneo cuando circulan por los microcapilares del sistema circulatorio. Estas partículas (o microgotas) además de ser deformables tienen que tener un tamaño de alrededor de unas 10 μm . En este trabajo se propone crearlas por inyección de líquidos inmiscibles en el líquido que constituye nuestro flujo principal. El flujo principal está compuesto por una mezcla de glicerina y agua, ya que su viscosidad se asemeja a la del plasma y su índice de refracción es similar al del microcanal, en lo sucesivo líquido de índice. La mezcla está formada con una proporción de 60% de glicerina y 40% de agua (en peso), y tiene un índice de refracción entre 1,42 y 1,43.

Los líquidos que van a formar las microgotas tienen que tener un índice de refracción suficientemente diferente para visualizarlas con facilidad y que sean inmiscibles en el líquido de índice. Con estas condiciones, los líquidos que se proponen son diferentes tipos de aceites como el aceite de oliva, aceite de silicona (47V10 y 47V100), vinagre de Módena y vitrocien. Este último se descarta en un primer momento al observar por lupa microscópica que está compuesto por partículas sólidas.

Se realiza una primera prueba para ver si los líquidos son adecuados. Consiste en inyectarlos con una aguja en el seno del caudal principal de líquido de índice para ver si forman gotas con cualquier tipo de forma, o el líquido se queda agrupado en una macrogota. Además, al mezclarlos tenemos que comprobar que se forma una figura de difracción, eso nos asegurará que hay una superficie de separación, es decir que ambos líquidos son inmiscibles, y que los índices de ambos líquidos son distintos. Cuanto más clara se vea la “estructura” que crean en la imagen registrada, mejor se podrá recuperar después la forma, el tamaño y la velocidad que llevan estas microgotas.

4.1. Generación de microgotas

Con los cuatro líquidos formadores seleccionados se utiliza un montaje de microscopia holográfica digital en línea para ver si estos líquidos forman partículas en el seno del flujo principal. Para ello, se utiliza el montaje de la figura 5, trabajando solamente con el haz objeto. Colocamos un canal de 5 mm de diámetro por el que hacemos circular un flujo formado por el líquido de índice, con índice de refracción de valor 1,4211. Se genera un flujo en el canal colocando un depósito elevado. Para crear las gotas de los distintos aceites se introduce una aguja justo al inicio del canal y se introduce el líquido con una jeringuilla aplicando una presión manualmente. Aunque los caudales no estén controlados, podemos ver si se forman gotas, si son inmiscibles y su comportamiento dentro del capilar.

Utilizamos los registros de holografía en línea ya que solamente queremos visualizar si somos capaces de crear las gotas con los líquidos elegidos. Se calcula la resta de dos hologramas consecutivos (tiempo de exposición 10 ns y tiempo entre hologramas 50 fps) lo que nos permite eliminar la luz difractada por la parte del objeto inmóvil, es decir, el propio capilar. Únicamente la luz difractada por las gotas, que se mueven entre ambas exposiciones, permanece visible en este tipo de imágenes (figura 8, 9 y 10). La parte blanca de las imágenes proviene de la luz difractada por la gota durante la primera exposición y la parte negra la del segundo holograma. Se muestran tres imágenes para cada líquido que corresponden a distintos instantes de tiempo. Las pruebas se diferencian entre sí por la presión aplicada en la jeringuilla. Los resultados que se obtienen son los siguientes:

- **Aceite de oliva:**

La figura 8 muestra tres pruebas dónde hemos conseguido crear gotas de aceite de oliva en el flujo principal. En las imágenes vemos cómo aparecen gotas aisladas y con diferentes tamaños. También, se observa que se forman varias partículas simultáneamente.

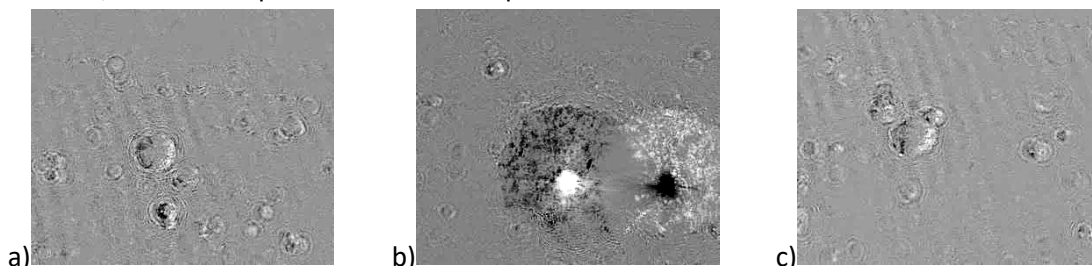


Figura 8: gotas creadas con el aceite de oliva generadas con diferente presión.

- **Aceite de silicona 47V 10:**

La figura 9 muestra tres pruebas dónde hemos conseguido crear gotas de aceite de silicona 47V 10 en el flujo principal. Al igual que en el caso anterior, vemos cómo se forman gotas que tienen diferentes tamaños y que se pueden formar varias partículas a la vez.

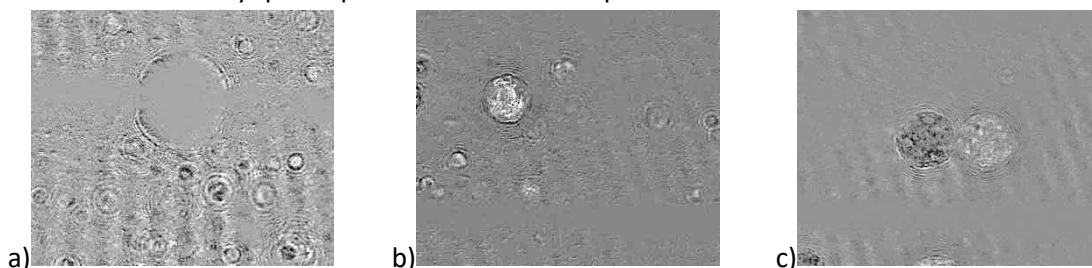


Figura 9: gotas creadas con el aceite de silicona 47V 10 generadas con diferente presión.

- **Aceite de silicona 47V 100:**

La figura 10 muestra tres pruebas dónde hemos conseguido crear gotas de aceite de silicona 47V 100 en el flujo principal. Vemos cómo se forman gotas aisladas de diferentes tamaños pero, en este caso, no se observan varias partículas simultáneamente y se obtienen partículas más grandes que con los líquidos anteriores.

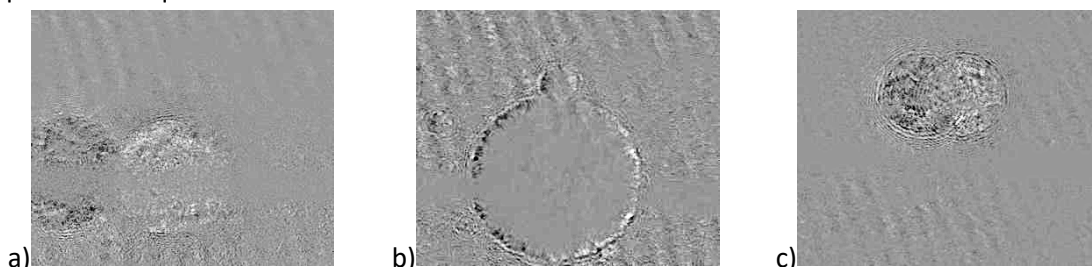


Figura 10: gotas creadas con el aceite de silicona 47V 100 generadas con diferente presión.

Los resultados son similares con los tres aceites y, por tanto, se decide probar con los tres en los experimentos para la formación de las microgotas dentro de los microcapilares, para comprobar si se puede seguir su movimiento y calcular sus trazas. También, nos permiten descartar el cuarto líquido, el vinagre de Módena, al comprobar que es miscible en agua y en el líquido que compone el flujo principal (agua y glicerina).

5. Formación de microgotas en el microcanal

Una vez seleccionados los aceites, montamos y calibramos el sistema óptico del microscopio holográfico para colocar el microcanal de manera vertical. Este montaje nos permite colocar el microcapilar de manera que el caudal discurra del techo hacia el suelo, como se puede ver en la figura 6. Para generar los flujos se va a conectar el microcanal a la bomba utilizando tres tipos distintos de jeringuillas:

- A. BD Plastic de 10 mL: $\varnothing = 14,5$ mm.
- B. BD Plastic de 5 mL: $\varnothing = 12,07$ mm
- C. Terumo de 1 mL: $\varnothing = 4,73$ mm

Lo que nos interesa, más que su capacidad, es el diámetro para conseguir diferentes relaciones de caudales Q_1/Q_2 como marca la ecuación 5. En el caudal principal se utiliza siempre la jeringuilla tipo A y se realizan distintas pruebas cambiando la jeringuilla del caudal secundario.

5.1. Microcanal en forma de T

El primer experimento se realiza en un microcanal en forma de T o de silla, el cual tiene dos entradas para que la mezcla de líquidos se produzca en la zona de medida y que fue diseñado para estudiar la mezcla de dos tipos de fluidos.

Según se indica en la bibliografía⁸, el número de capilaridad de los distintos fluidos es un factor importante en la mezcla de los fluidos, y viene dada por la siguiente ecuación:

$$Ca = \frac{\mu \cdot u}{\sigma} = \frac{\mu \cdot Q}{\sigma \cdot A} \quad (6)$$

donde u es la velocidad, μ es la viscosidad dinámica y σ es la tensión superficial. En la figura 11 se muestra la relación entre los dos números de capilaridad de ambos flujos (principal y secundario) para una situación determinada, con un caudal principal y geometría del microcanal específicos. En este caso particular, se observan 5 estados de interacción entre los líquidos. El rango que nos interesa (rodeado en azul) se encuentra en el centro y corresponde a un rango α entre caudales pequeño. Los rangos de los estados van a variar según los parámetros físicos de los líquidos utilizados y del rango de caudales en el que trabajamos como se verá más adelante.

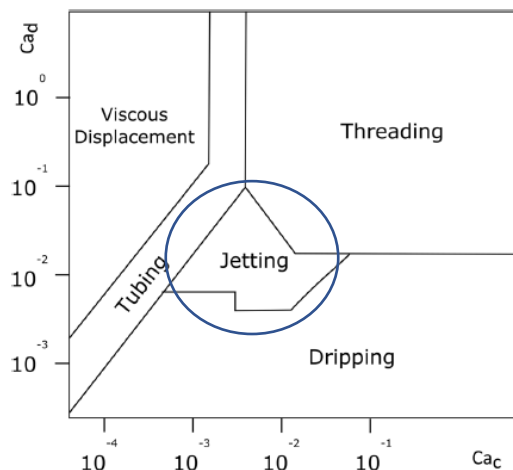


Figura 11: fases encontradas según la relación entre los números de capilaridad.⁸

En el flujo principal (Q_1) se introduce líquido de índice con un valor en su índice de refracción de 1,4270. En el flujo secundario (Q_2) se utiliza el aceite de silicona 47V 100 dado que según la ecuación (6) es el más adecuado para que se formen las microgotas en las condiciones de nuestro experimento. El microcanal tiene una sección cuadrada de lado 500 μm .

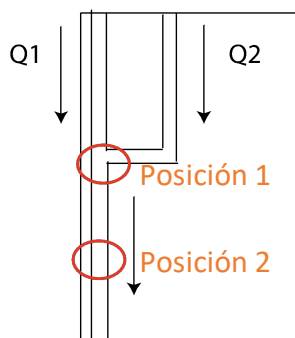


Figura 12: esquema del microcanal en forma de T.

En la figura 12 se muestran rodeadas las dos posiciones donde se va a intentar encontrar las microgotas formadas. La zona de unión es interesante para ver cómo interactúan los dos líquidos. La segunda posición se coloca lejos de la unión para ver si el comportamiento entre los dos líquidos es igual que en la unión, y porque, en la bibliografía consultada⁷, se muestra que la formación de microgotas se puede dar en localizaciones alejadas del punto en el que se mezclan los dos líquidos.

Este experimento se va a caracterizar de manera que vamos a utilizar los tres tipos de jeringuillas (A, B y C) en el caudal 2 mientras que únicamente vamos a utilizar la más grande (A) en el caudal 1. El motivo es que el rango del factor entre caudales (α) para el cual esperamos generar las microgotas es muy pequeño, según la bibliografía consultada.⁸

A-A: Utilizando la misma jeringuilla (BD Plastic de 10 mL) para el flujo principal y el secundario. En esta situación tenemos un coeficiente α de valor unidad. El objetivo de microscopio que se utiliza para este experimento es 20x, y se estudian diferentes valores para el caudal Q_1 .

- Régimen de altos caudales ($Q_1 \geq 5 \mu\text{L}/\text{min}$):

En la figura 13 se muestra un holograma en línea, sobre el que se ha destacado las paredes del microcapilar con una línea amarilla por claridad. La anchura (500 μm) es la separación entre las líneas amarillas que se muestran en las siguientes figuras y que marcan las paredes del microcanal. La figura 13a muestra la interacción en la unión de los caudales (posición 1), donde se aprecia una línea negra que es debida al cambio de índice entre los dos líquidos. Se aprecia la entrada de aceite por la derecha. La figura 13b muestra la interacción de los dos líquidos aproximadamente a 1 cm de distancia del punto de unión (posición 2). En esta segunda posición, sólo se observa la separación entre los dos líquidos: a la derecha, se encuentra el aceite y, a la izquierda, se encuentra el líquido de índice. Esta situación se repite con los caudales Q_1 de 100, 50, 20, 10 y 5 $\mu\text{L}/\text{min}$, con esta configuración se mantiene una separación entre ambos flujos y no se llegan a formar gotas aisladas.

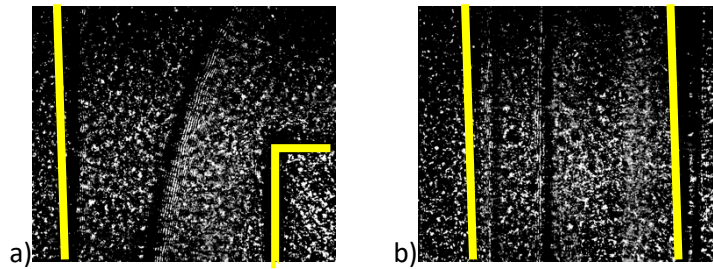


Figura 13: representación de la situación en régimen de alto caudal $Q_1=5 \mu\text{L}/\text{min}$
a) posición 1 y b) posición 2.

- Régimen de bajos caudales ($Q_1 < 5 \mu\text{L}/\text{min}$):

En la figura 14 se muestra el comportamiento del flujo para $Q_1 < 0,5 \mu\text{L}/\text{min}$. Las imágenes de la fila superior muestran la interacción de los dos líquidos en la unión de los caudales (posición 1), y las imágenes de la fila inferior muestran la interacción de los dos líquidos aproximadamente a 1 cm de distancia del punto de unión (posición 2).

Cuando trabajamos con caudales bajos (desde los $3 \mu\text{L}/\text{min}$ hasta $0,2 \mu\text{L}/\text{min}$), se describen situaciones distintas. En la posición 1, se encuentra un comportamiento oscilatorio del segundo caudal. La línea de separación entre ambos líquidos se aleja y se acerca de la entrada lateral para diferentes instantes como se muestra en las 14a, 14b y 14c. En la posición 2 (figuras 14d y 14e), vemos como el aceite llena todo el microcanal y, después, de líquido de índice. Es decir, el aceite desplaza completamente al líquido de índice y ocupa todo el microcapilar formando grandes gotas muy lejos del tamaño deseado.

Si se disminuye el caudal por debajo de $0,2 \mu\text{L}/\text{min}$, el aceite no llega a entrar en el flujo principal.

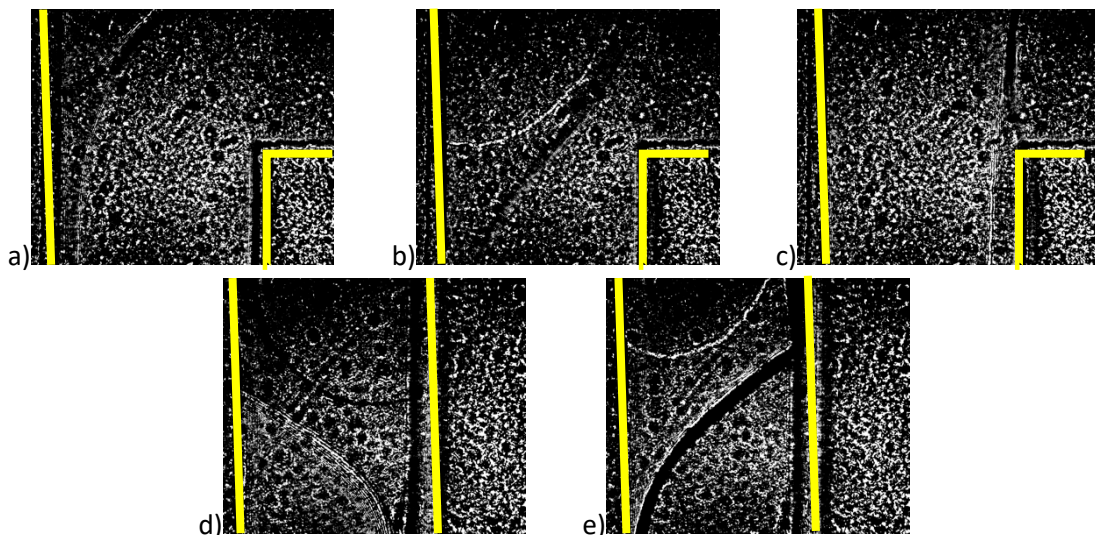


Figura 14: representación de la situación en régimen de bajo caudal: $Q_1=0,5 \mu\text{L}/\text{min}$
a), b) y c) posición 1 y d) y e) posición 2.

A-B: Se utiliza en el flujo secundario la jeringuilla BD Plastic de 5 mL. Se trabaja con un coeficiente α de valor 1,096. El objetivo de microscopio que se utiliza para este experimento es 20x.

- Régimen de altos caudales ($Q_1 \geq 5 \mu\text{L}/\text{min}$):

La figura 15a muestra la interacción de los dos líquidos en la unión de los caudales (posición 1) y la figura 15b muestra la interacción de los dos líquidos en la posición 2.

En estas pruebas, se trabaja con un coeficiente α muy parecido a las primeras pruebas (una diferencia menor al 10%) y, por tanto, la interacción entre los dos líquidos es igual a las pruebas anteriores. En la figura 15 se muestra el resultado para $Q_1 = 5 \mu\text{L}/\text{min}$. Los resultados son similares para caudales de $100 \mu\text{L}/\text{min}$ hasta los $5 \mu\text{L}/\text{min}$.

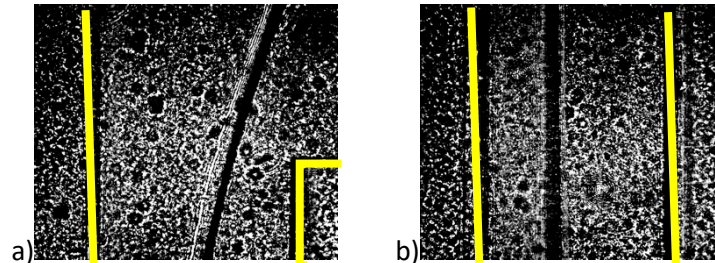


Figura 15: representación de la situación en régimen de alto caudal: $Q_1=5 \mu\text{L}/\text{min}$
a) posición 1 y b) posición 2.

- Régimen de bajos caudales ($Q_1 < 5 \mu\text{L}/\text{min}$):

Las figuras 16a y 16b muestran la interacción de los dos líquidos en la unión de los caudales (posición 1) y las figuras 16c y 16d muestran la interacción de los dos líquidos en la posición 2. Se encuentra el mismo movimiento oscilatorio en la posición 1, como en el caso anterior. En la posición 2, se observan cambios entre el paso de un líquido y el otro como en el caso anterior. El resultado es similar para caudales en el rango entre los $5 \mu\text{L}/\text{min}$ (figura 16) y los $0,2 \mu\text{L}/\text{min}$. Si se disminuye por debajo de los $0,2 \mu\text{L}/\text{min}$, el líquido formador no penetra en el canal principal. Igual que en la situación anterior.

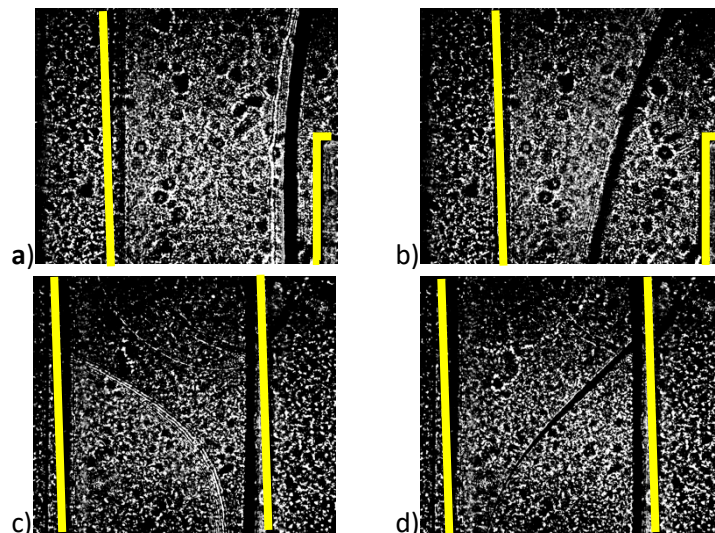


Figura 16: representación de la situación en régimen de bajo caudal: $Q_1=2 \mu\text{L}/\text{min}$.
a) y b) posición 1 y c) y d) posición 2.

A-C: Se utiliza en el flujo secundario la jeringuilla Terumo de 1 mL. Trabajamos con un coeficiente α de valor 1,75. Se cambia los aumentos utilizando un objetivo de microscopio 10x. De esta forma se puede visualizar una zona mayor y no se necesita observar en dos posiciones distintas, ya que el área registrada es suficiente para ver si se forman gotas lejos de la unión.

- Régimen de altos caudales ($Q_1 \geq 5 \mu\text{L}/\text{min}$):

Se observa el mismo comportamiento descrito en las dos pruebas anteriores.

- Régimen de bajos caudales ($Q_1 < 5 \mu\text{L}/\text{min}$):

Observamos cómo se acumula más aceite en la entrada al flujo principal, y aparece el comportamiento oscilatorio de la superficie de separación entre ambos líquidos (figura 17). Estas oscilaciones son ahora más pequeñas y más seguidas. Lo que parece indicar que la relación de caudales se acerca al valor adecuado para el resto de los parámetros. Con estas jeringuillas, hemos aumentado el coeficiente α un 70% respecto del caso anterior.

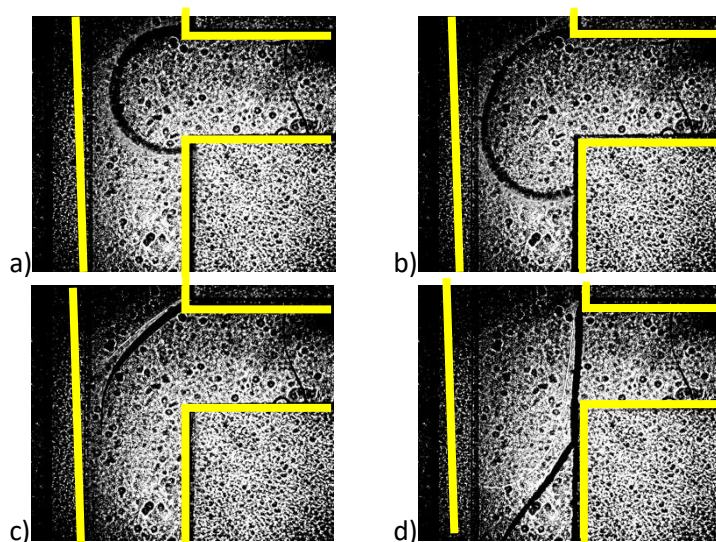


Figura 17: representación de la situación en régimen de bajo caudal: $Q_1=4 \mu\text{L}/\text{min}$.

En las figuras anteriores (figura 13 a 17) se muestran solo los hologramas registrados porque nos permiten ver bien definida la línea de separación entre los líquidos del experimento. Por este motivo, no interesa aplicar la resta entre hologramas consecutivos ya que perderíamos la información de donde se encuentran las paredes del microcanal y de la línea de separación entre líquidos al moverse lentamente.

Con los resultados anteriores, se intenta la formación de microgotas con una relación de caudales α mayor. Como no es posible hacerlo con la bomba y las jeringuillas disponibles, se decide introducir nuevamente el aceite presionando manualmente la jeringuilla, perdiendo así el control del caudal secundario. El caudal principal se sigue controlando con la bomba.

A-C, caudal 2 con presión manual:

El caudal 1 se fija en $20 \mu\text{L}/\text{min}$ y se introduce de manera manual el aceite de silicona 47V 100 con una jeringuilla Terumo de 1 mL (configuración A-C). Se va a visualizar lejos de la unión, porque es dónde nos va a interesar medir y porque es dónde más posibilidades tenemos de encontrar las microgotas.

El montaje de microscopia se calibra con el objetivo 10x para tener mayor zona de visualización.

Se registran varias series con un caudal diferente en el flujo secundario, determinado por la presión manual en la jeringuilla, que no podemos cuantificar. En la siguiente figura, se observa la resta de dos hologramas consecutivos para eliminar el ruido de fondo y se encuentran microgotas de distintos tamaños en las diferentes series. Se observa que el tamaño de las partículas es diferente y está relacionado con el caudal del flujo secundario.

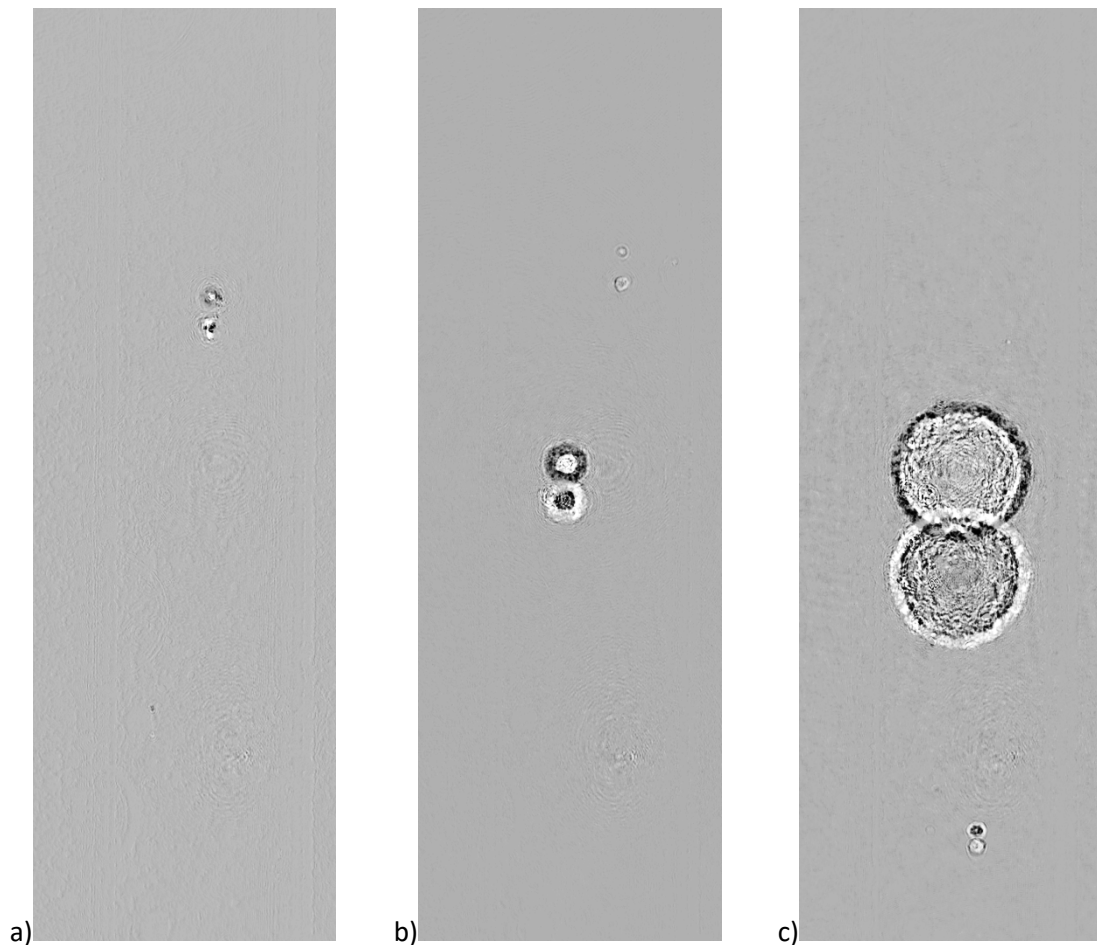


Figura 18: resta de dos hologramas consecutivos en distintas situaciones.

Las imágenes de la figura 18 han sido recortadas para centrarse solamente en la anchura del microcanal y corresponden en este caso a una anchura real de $500\ \mu\text{m}$. Este recorte se hace después de todos los tratamientos aplicados para no perder información en ningún proceso de tratamiento de la imagen.

De las imágenes anteriores se concluye que es factible generar microgotas con el aceite de silicona 47V 100 de diferentes tamaños. Sin embargo, con la geometría del canal actual, la relación de caudales necesaria para conseguirlo es superior a la que podemos obtener con la bomba y jeringuillas disponibles.

5.2. Microcanal lineal

En vista de la dificultad para obtener gotas aisladas en el microcanal en forma de T, se propone estudiar un microcanal de geometría recta. Se elige un microcanal recto (anchura de $250\ \mu\text{m}$ y profundidad $500\ \mu\text{m}$) conectado a la jeringuilla del flujo principal mediante un tubo de silicona (figura 19). El flujo secundario con el aceite se introduce con una aguja que se pincha en el tubo de silicona como se observa en la figura 19. Ambos caudales están controlados por medio de la bomba.

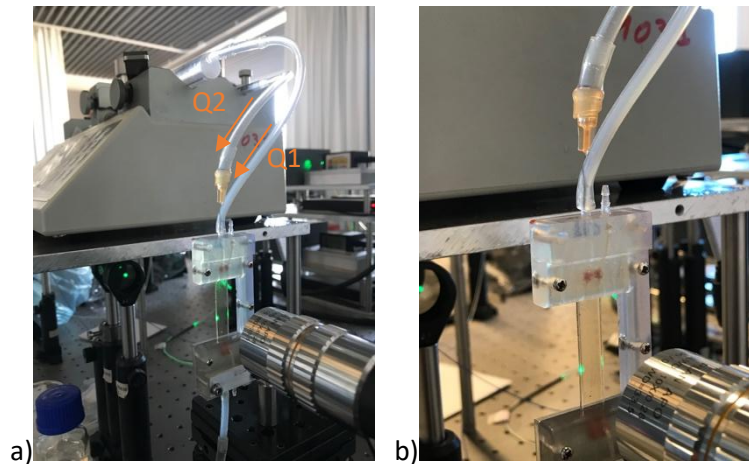


Figura 19: detalles del montaje con el microcanal lineal, el flujo principal y el secundario insertado mediante una jeringuilla al tubo de silicona. a) vista general y b) vista en detalle.

En la figura 19b, se puede observar cómo se conectan los dos flujos al microcanal y las jeringuillas con ambos líquidos a la bomba de control. En la figura 19a, se amplía la zona de entrada al microcanal. El extremo de la aguja se sitúa lo más cerca posible de la entrada del microcapilar. La región de interés se encuentra en la zona que se aprecia el haz de iluminación (en verde en la figura 18) lejos de la entrada, de forma que las partículas están ya formadas e inmersas en el flujo principal.

Las dos jeringuillas con las que vamos a trabajar son la BD Plastic de 10 mL (A) para el caudal principal y la Terumo de 1 mL (C) para el caudal secundario. Durante los experimentos se utilizaron tres jeringuillas de 1 mL, una para cada tipo de aceite.

Se va a trabajar con holografía en línea para visualizar las partículas y, posteriormente, con holografía fuera de eje para poder observar la traza a lo largo de varias exposiciones. En ambos casos, si se quiere recuperar la información del diámetro de la partícula, es necesario propagar a su plano de mejor enfoque. La onda objeto reconstruida y propagada toma un valor complejo en cada pixel, del que mostramos su valor real o su intensidad.

5.2.1. Microscopia holográfica en línea

Se van a realizar registros con un montaje de holografía en línea para visualizar si se forman las microgotas y determinar las características del líquido y los caudales requeridos. Para ello, se utilizan los tres aceites seleccionados y se trabaja con un rango de caudales principales que van desde 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ hasta 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. La relación de caudales es en todos los casos $\alpha=1,75$, ya que viene fijada por las jeringuillas A y C.

La limitación que introduce el tiempo mínimo de exposición, el tamaño del pixel y los aumentos del sistema nos impone tener que trabajar con caudales pequeños. Para registrar correctamente un holograma de las partículas y poder seguir su movimiento, su imagen no debe desplazarse más de un pixel durante el tiempo de captura de la imagen. En segundo lugar, el número de imágenes por segundo (fps) que se puede capturar también limita la velocidad del flujo que se puede seguir, ya que la velocidad máxima debe suponer un desplazamiento inferior o del orden de 10 pixeles para poder realizar la correlación cruzada entorno a la posición de cada partícula durante el algoritmo del seguimiento de la traza (Particle Tracking Velocimetry). En nuestro montaje, eso significa que los caudales más adecuados para seguir la traza de las partículas están entre 1 y 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

En la sistematización del proceso de medida, se deja estabilizar los flujos entre 5 y 10 minutos. Se registran primero series de imágenes para los caudales más altos y posteriormente más bajos. Este orden nos permite asegurar que el líquido secundario se introduzca correctamente en el flujo principal. En cada experimento se va a presentar la resta de dos hologramas consecutivos sin propagar registrados con el sistema de microscopia holográfica en línea. Se registran series de 200 hologramas en cada experimento, de esta manera, se asegura que visualicemos alguna partícula si los parámetros del experimento permiten formarla. Las imágenes que se muestran a continuación se cortan después del procesado de imagen para que se ajuste a la anchura del microcanal, en este caso de 250 μm . En algunos de los siguientes casos, se rodea con un círculo naranja las microgotas para mejorar su identificación.

- **Aceite de silicona 47V 100:**

En la figura 20 se muestran algunos de los resultados para diferentes caudales. Las dos imágenes de cada partícula, corresponden al primer y segundo holograma utilizado para calcular la resta. La separación entre ambas imágenes depende de la velocidad que lleva la gota en cada caso. Esta velocidad, dependerá del caudal del flujo principal, el tamaño de las partículas y su posición dentro del capilar (su cercanía a las paredes).

Se observa que no para todos los valores de caudal registramos microgotas. Esto quiere decir que, para las características físicas de nuestro flujo, existe un caudal límite y que se encuentra dentro de nuestro rango de medida. Al superar este caudal límite no se forman microgotas y se obtienen cambios de líquido en todo el volumen de nuestro microcapilar. En este caso, el caudal límite es de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Además, se observa que se obtienen diferentes tamaños de microgotas según el valor del caudal principal. Se encuentran las microgotas más pequeñas para caudales bajos.

Las microgotas que nos interesan son aquellas que tienen tamaño entre las 10 y las 20 μm (tamaño de los glóbulos rojos y blancos). Este tamaño de microgotas se obtiene para valores de caudales bajos, que son los que se requieren para poder seguir su traza con el montaje disponible. Para calcular el tamaño exacto, es necesario propagar al plano de mejor enfoque de las partículas.

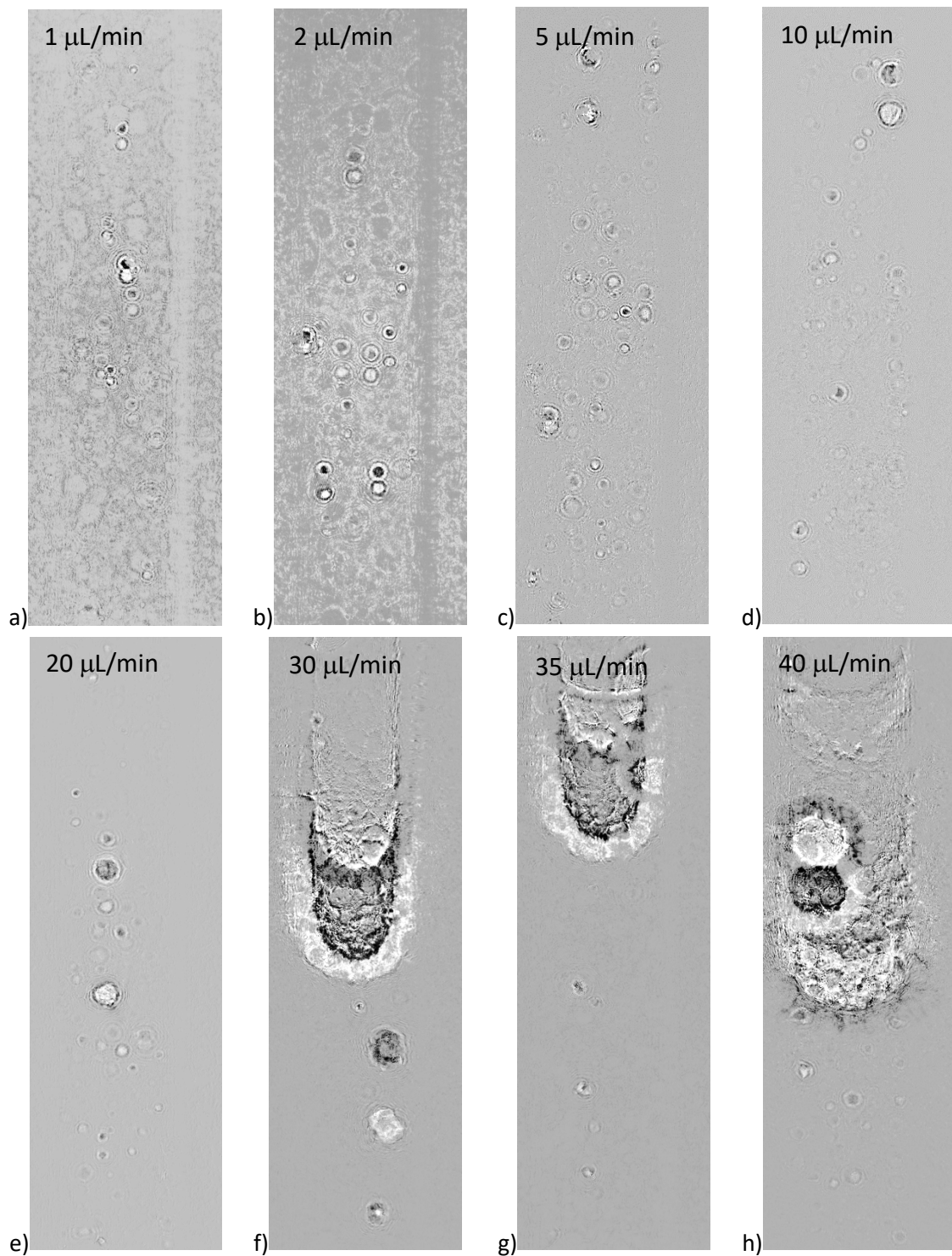


Figura 20: visualización de microgotas de aceite de silicona 47V 100 para distintos caudales.

En la figura 21 se presenta el análisis detallado del ejemplo mostrado en la figura 20a que corresponde al caso con el menor caudal ($Q_1 = 1\mu\text{L}/\text{min}$). El primer paso para poder enfocar la imagen de las gotas es la eliminación del ruido de fondo. Para conseguirlo, primero se calcula el promedio de todos los hologramas registrados en la serie de 200 imágenes. Esta imagen promedio se resta al holograma de interés (figura 20a), de forma que la luz difractada por el microcapilar y la parte del montaje que no se mueve se elimina (figura 20b). También se calcula el promedio local, usando únicamente los 10 hologramas más cercanos temporalmente. El resultado se muestra en la

figura (20c). Ninguna de estas dos formas da buenos resultados ya que no consigue eliminar completamente el fondo. Además, con el segundo método, se distinguen en el fondo las imágenes de la gota en cada holograma utilizado para calcular el promedio. Así que se decide seguir trabajando con la resta de dos hologramas consecutivos. De esta forma sólo aparece la imagen de la gota duplicada, que no afecta para medir los tamaños de las microgotas analizadas y se elimina el ruido de fondo mucho mejor (figura 20d).

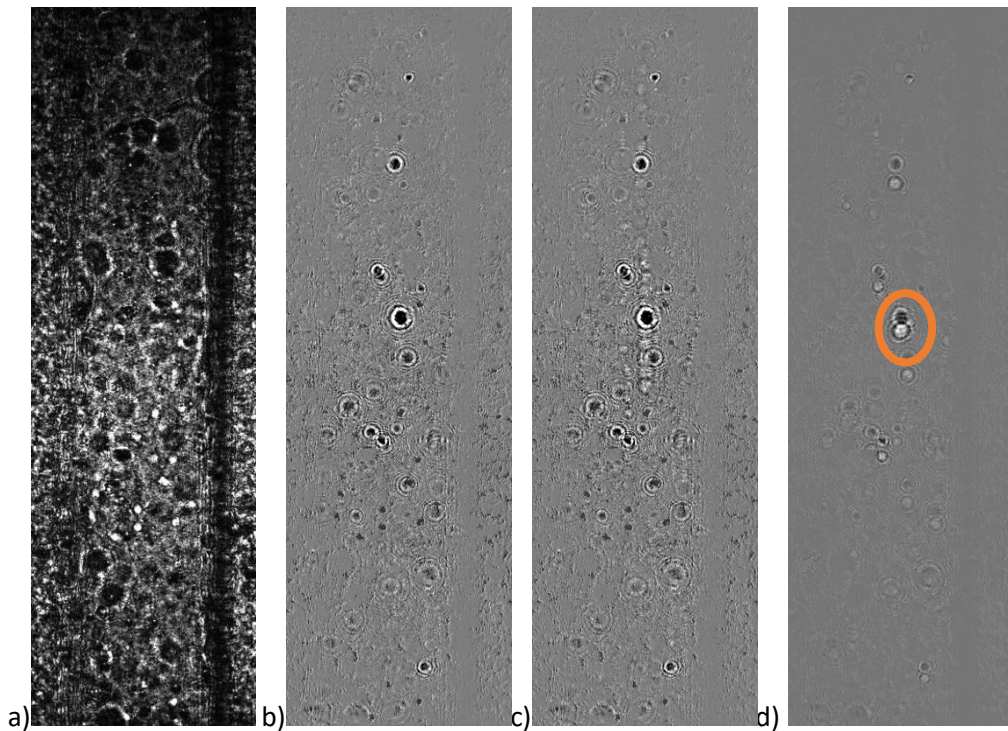


Figura 21: visualización de las microgotas: a) holograma original, b) restando el promedio de 200 imágenes, c) restando el promedio de 10 imágenes y d) restando el holograma consecutivo.

Todas las partículas de la figura 21 se encuentran desenfocadas ya que es la representación del plano de enfoque de la cámara. Para el cálculo del diámetro de la microgota, se propaga la resta de dos hologramas consecutivos hasta el plano donde la imagen de la gota está mejor enfocada. Dado que la partícula se mueve muy poco entre ambas exposiciones, las dos imágenes que aparecen en la resta se consideran enfocadas en el mismo plano.

- **Aceite de silicona 47V 10:**

Utilizando el aceite de silicona 47V 10 se obtienen microgotas a lo largo de todo el rango de caudales seleccionados anteriormente (figura 22). Para el caudal de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ se observa cambios de líquido grandes dentro del microcanal, por lo que el caudal límite es 10 veces superior. La única característica que ha variado, respecto al caso anterior, es la viscosidad en un factor 10. Por lo tanto, podemos afirmar que el caudal límite aumenta al reducir la viscosidad del líquido formador.

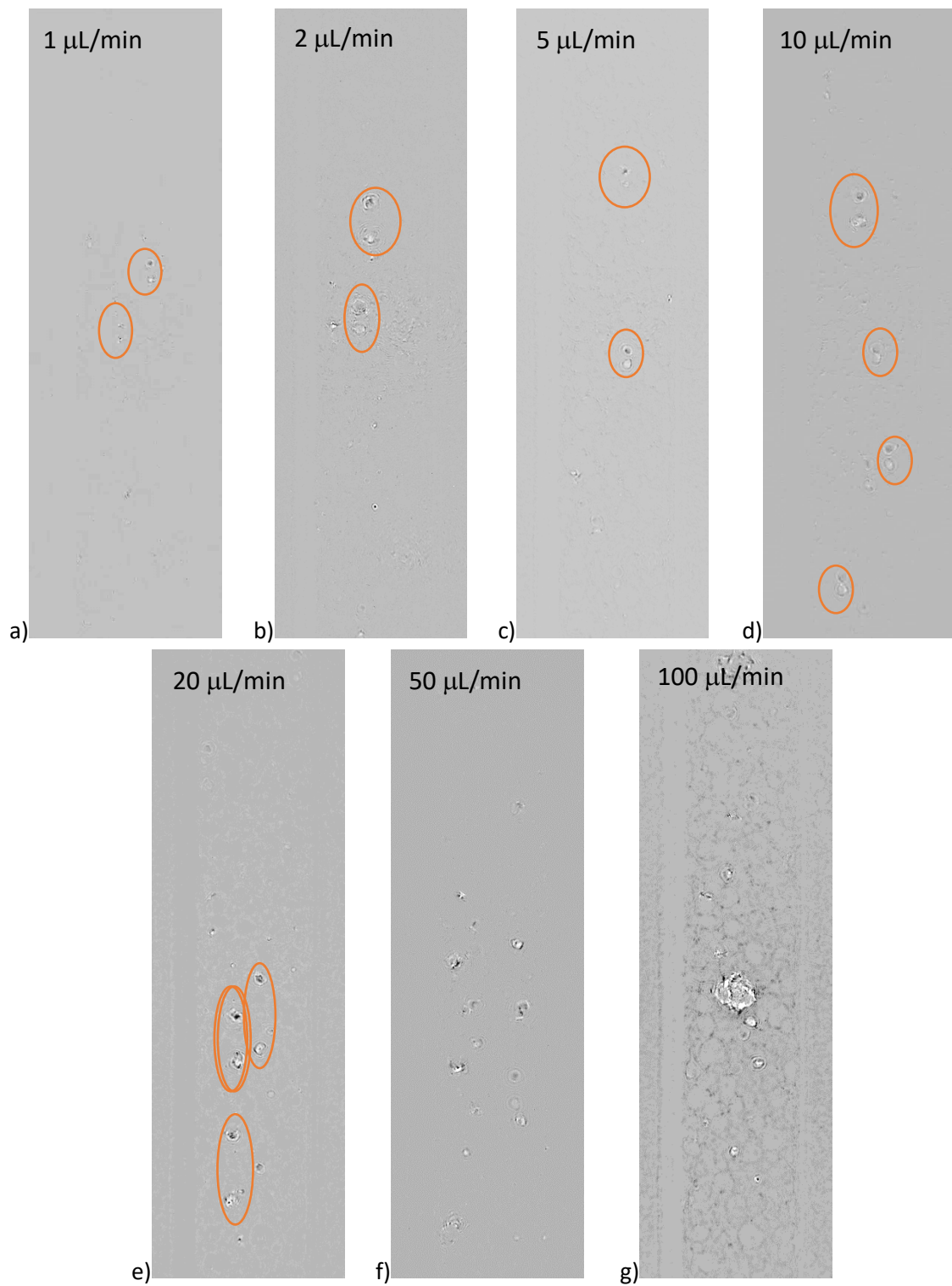


Figura 22: visualización de microgotas de aceite de silicona 47V 10 a distintos caudales.

El tamaño de las microgotas obtenidas sigue estando relacionado con el valor del caudal principal, obteniéndose microgotas más pequeñas para los caudales bajos. Para calcular el tamaño exacto, se procede al análisis de propagación. Se propaga al plano dónde mejor enfocamos la micropartícula que queremos estudiar (figura 23).

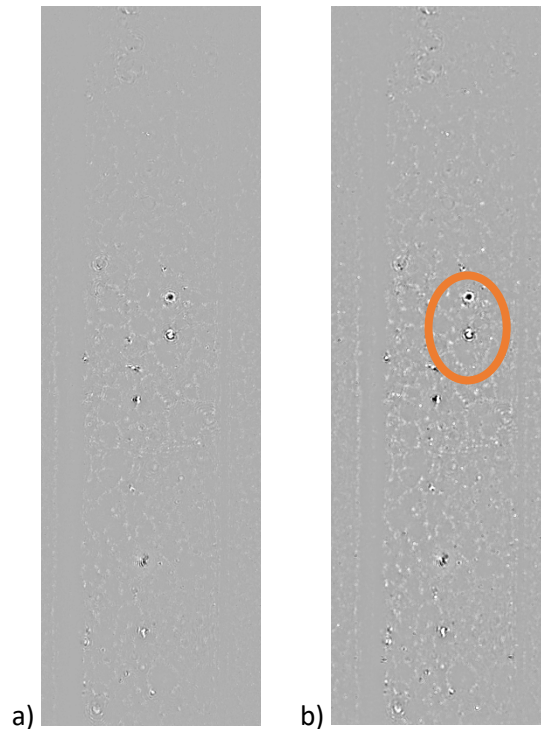


Figura 23: visualización de las microgotas. a) restando el holograma consecutivo y b) propagación de la resta al plano de mejor enfoque.

Para determinar el tamaño de cada partícula hay que encontrar primero el plano de mejor enfoque. La dificultad radica en que los anillos de difracción no desaparecen en ningún plano, dado que la imagen virtual está siempre presente, aunque desenfocada. Se considera el plano de mejor enfoque (de la imagen real de la partícula) donde el disco central es más estrecho. El diámetro es la anchura de dicho disco medido en pixeles y traducido a micras teniendo en cuenta los aumentos del sistema. El problema de la imagen virtual desaparecerá con los hologramas fuera de eje. La microgota de la figura 23 se encuentra enfocada en un plano situado a $20\ \mu\text{m}$ del plano de enfoque de la cámara. El diámetro de la microgota analizada se encuentra entorno a $10\ \mu\text{m}$ para un caudal de $1\ \mu\text{L}/\text{min}$.

- **Aceite de oliva:**

En la figura 24 se muestra las microgotas de aceite de oliva que se obtienen a lo largo de todo el rango de caudales seleccionado. Además, se observa que también se obtienen diferentes tamaños de microgotas según el valor del caudal principal. Se encuentran nuevamente las microgotas más pequeñas para caudales bajos y las microgotas más grandes para caudales altos.

Las microgotas con tamaño adecuado se vuelven a encontrar en el régimen de bajos caudales y se muestra en la siguiente figura 24. También, se calcula el tamaño de la microgota para un caudal principal de $1\ \mu\text{L}/\text{min}$.

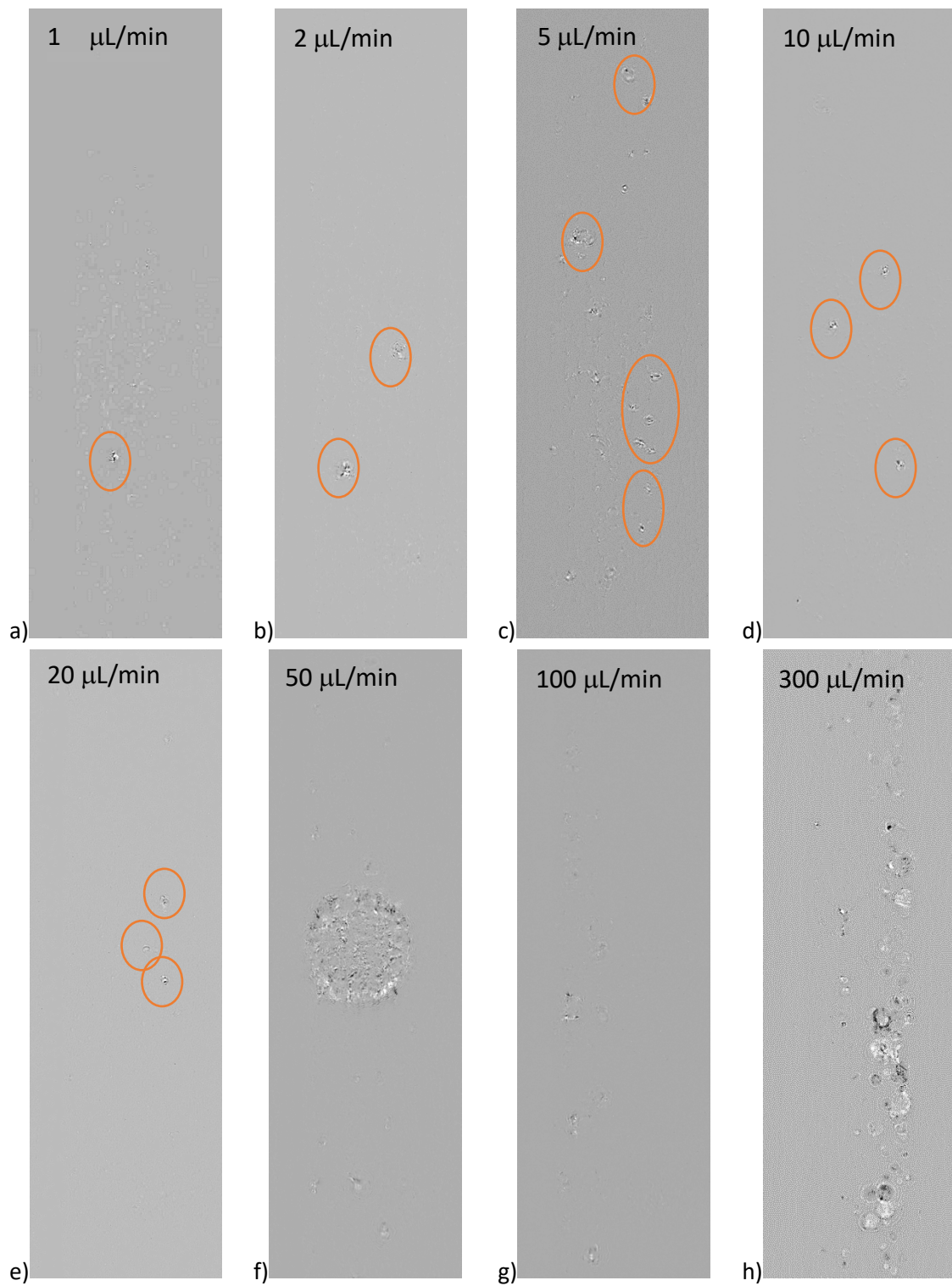


Figura 24: visualización de microgotas de aceite de oliva a distintos caudales.

La figura 25a muestra el holograma registrado y la 25b muestra el resultado cuando restamos y propagamos dos hologramas consecutivos restados. El tamaño de la microgota analizada en este ejemplo es la más pequeña de las tres teniendo un diámetro alrededor de las 7 μm .

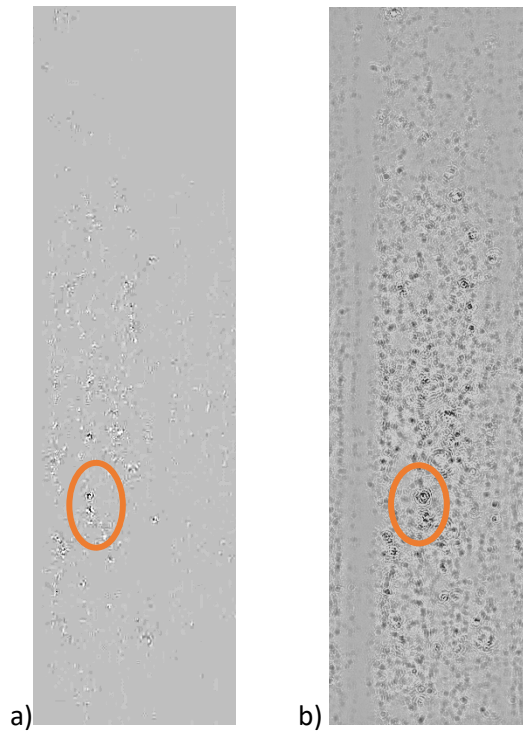


Figura 25: visualización de las microgotas. a) restando el holograma consecutivo y b) propagación de la resta.

En la figura 26, se muestra el promedio de los diámetros de las microgotas para los distintos caudales. Se presentan los resultados de los tres aceites. Se observa un aumento progresivo del diámetro al incrementar el caudal. Estos promedios se han calculado a partir de unas 8 partículas, que son las que se encuentran en cada serie de 200 hologramas. Este aumento concuerda con lo esperado según la bibliografía.⁹

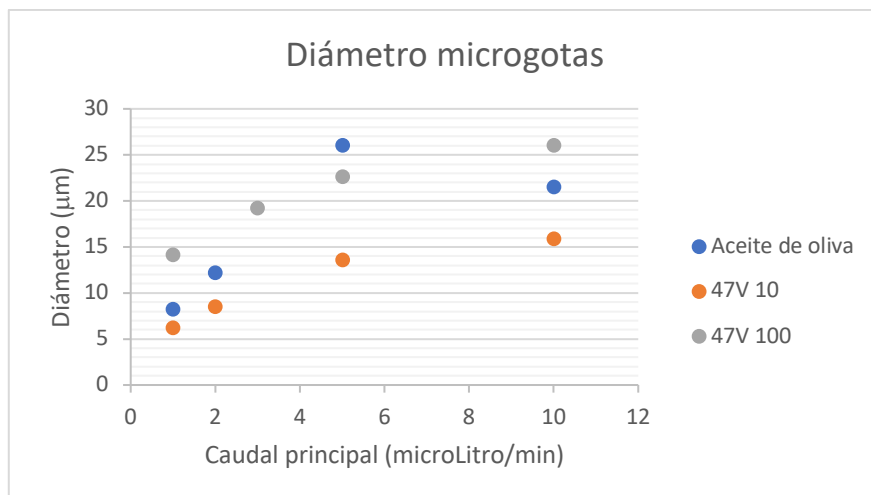


Figura 26: estudio de los tamaños de las microgotas según el caudal principal.

El comportamiento del aceite de oliva es mas errático, en especial, entorno a los 5 µL/min. Por lo que será nuestra última opción en futuros estudios. Dado el bajo número de partículas utilizadas en el estudio estadístico, consideramos que no podemos afirmar que la tendencia sea lineal.

5.2.2. Microscopia holográfica fuera de eje

Para poder medir tanto el tamaño como la posición de las microgotas con mayor precisión se van a registrar series de hologramas fuera de eje. Utilizar este sistema de microscopia fuera de eje nos permite hacer un seguimiento temporal de las microgotas obteniendo su traza a lo largo de varios hologramas. Para ello, el holograma se somete a varias etapas de análisis. La primera es eliminar la imagen virtual y el término central seleccionando una imagen de la apertura en la Transformada de Fourier del holograma (figura 4c) y realizando la Transformada de Fourier inversa obtener la amplitud compleja del objeto registrado. La segunda etapa consiste en eliminar del ruido de fondo debido a la estructura del microcapilar. Para ello se le resta ruido de fondo promedio, que se calcula promediando las amplitudes complejas obtenidas del proceso anterior, corregidas de forma que la fase del fondo coincida en todas las contribuciones antes de promediar.¹⁰⁻¹¹ La tercera etapa es la propagación de la amplitud compleja resultante para encontrar el plano de mejor enfoque de cada microgota. Por último, se suman los hologramas propagados obteniendo así la traza de la partícula. Se muestran a continuación los resultados obtenidos en cada uno de los tres aceites. El caudal principal utilizado en todos los experimentos se encuentra en el régimen de bajos caudales.

- **Aceite de silicona 47V 100:**

En la figura 25 se muestra la zona del holograma registrado que corresponde al capilar (figura 25a), la amplitud de la onda objeto reconstruida en el plano de la cámara (figura 25b) y propagada al plano de mejor enfoque de una de las partículas (figura 25c). El caudal principal es de $3 \mu\text{L}/\text{min}$ y con un tiempo de exposición de 10 ns.

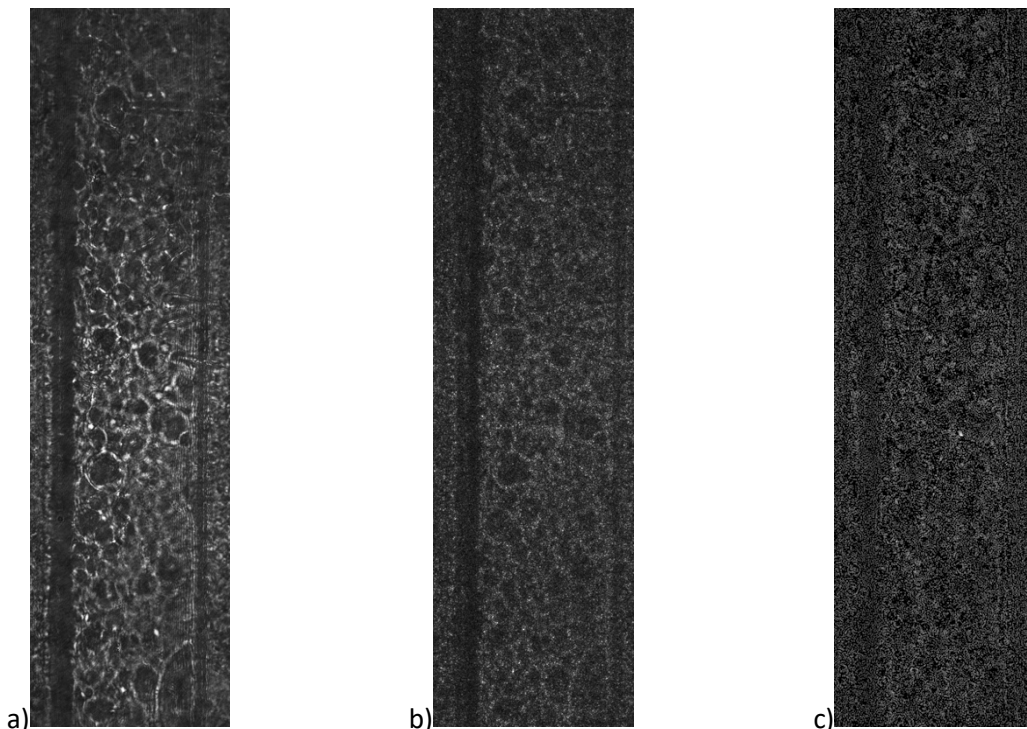


Figura 25: proceso de reconstrucción y propagación fuera de eje. a) holograma registrado, b) holograma reconstruido eliminando ruido y c) holograma propagado.

En esta serie de hologramas encontramos una microgota que se encuentra a $130 \mu\text{m}$ del plano de enfoque de la cámara. En la figura 26, se muestra la traza utilizando la parte real (nos

permite visualizar mejor su focalización) y utilizando la intensidad. Como se ha demostrado antes, se utiliza la resta de hologramas consecutivos para una mejor eliminación de ruido y resaltar mejor el desplazamiento de la microgota. Para el desplazamiento a lo largo del tiempo, es mejor sumar la contribución de los hologramas pares y restar la de los impares. El único problema es que en la parte real tendremos una microgota en blanco y su desplazamiento en negro, dificultando su visualización como se aprecia en la figura 26b. La traza tiene una longitud que supera las 300 μm .

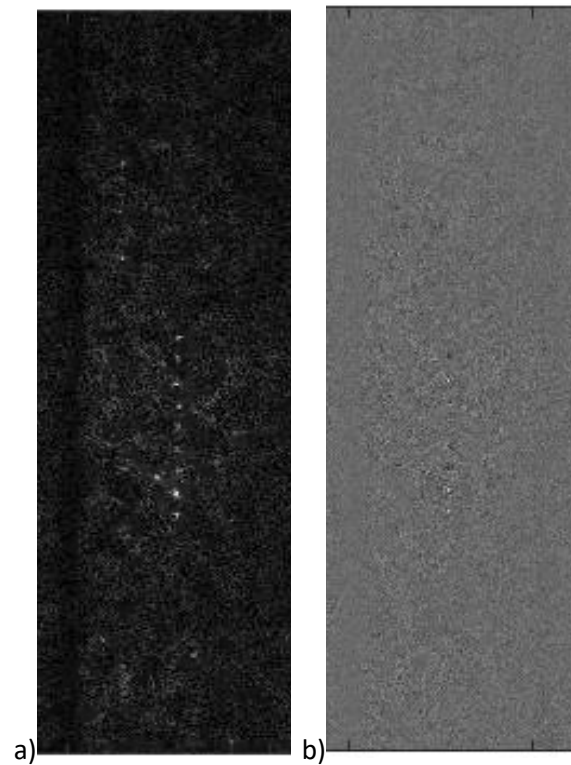


Figura 26: Traza o en el plano situado a 130 μm del plano de enfoque. a) trabajamos con la intensidad y b) trabajamos con la parte real.

- **Aceite de silicona 47V 10:**

Se repite el proceso para el aceite de silicona 47V 10 manteniendo idénticos el resto de los parámetros experimentales. Como se ha comentado, la diferencia con el caso anterior es únicamente la viscosidad del aceite. Con este líquido, trabajamos con un caudal de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ y con un tiempo de exposición de 10 ns. El plano dónde mejor se visualiza la microgota se encuentra a -200 μm .

En la figura 27, se puede apreciar la traza de la microgota. En la figura 27a, dónde trabajamos con la intensidad se aprecia mejor una línea blanca (de máximo valor) que representa la posición de las partículas en cada instante de tiempo. En la figura 27b, tenemos más problema para identificarla debido a que no hemos eliminado suficiente ruido. El tamaño de la traza es de 80 μm de longitud.

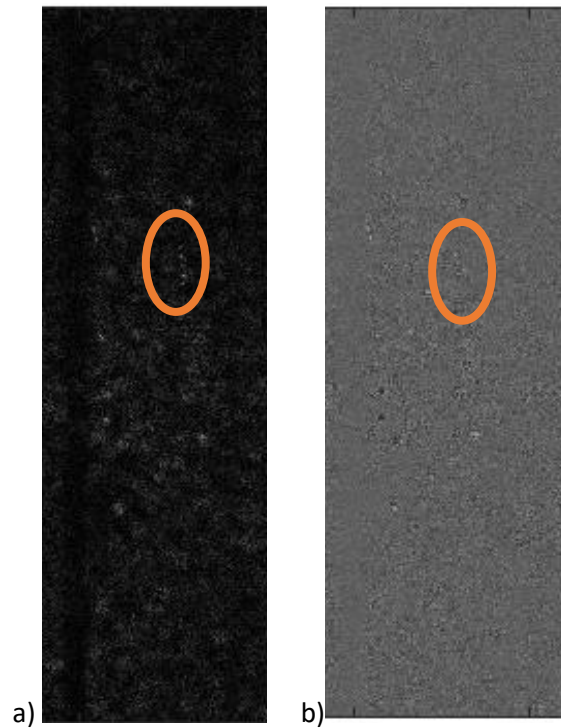


Figura 27: Trazas en el plano situado a $-200\ \mu\text{m}$ del plano de enfoque. a) trabajamos con la intensidad y b) trabajamos con la parte real.

- **Aceite de oliva:**

El caudal principal en este experimento es de $1\ \mu\text{L}/\text{min}$. La traza de la microgota es más pequeña que las anteriores, tal y como se muestra en la figura 28a donde se representa la intensidad y en la figura 28b donde se muestra la parte real.

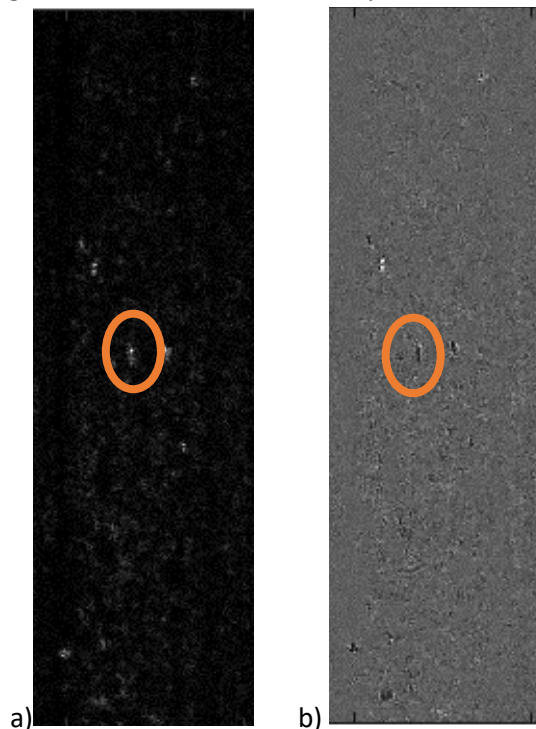


Figura 28: Trazas en el plano situado a $50\ \mu\text{m}$ del plano de enfoque. a) trabajamos con la intensidad y b) trabajamos con la parte real.

El tamaño de la traza es de unas 40 μm . Se rodea con un círculo naranja la traza de la partícula que estudiamos ya que en esta serie encontramos varias microgotas a la vez y se aprecian las trazas desenfocadas de las otras microgotas.

Con las trazas observadas y el estudio de los diámetros realizados, podemos decir que las trazas con un caudal principal bajo (1 $\mu\text{L}/\text{min}$) dentro del régimen de caudales bajos utilizados se aprecian peor al ser más pequeñas y no poder eliminar de manera tan eficiente el ruido.

6. Conclusiones

En este trabajo se ha diseñado y se ha puesto a punto un sistema de microfluídica que nos permite crear microgotas dentro de un microcanal y un sistema de holografía digital, con el objetivo de registrar y medir el tamaño de las microgotas junto con su desplazamiento temporal.

En primer lugar, se implementa un sistema de holografía digital de plano imagen con iluminación en línea que nos permite utilizar dos tipos de registro: en línea y fuera de eje. La holografía en línea se ha usado para visualizar la interacción entre los dos líquidos en tiempo real. Esto ha permitido concretar el rango correcto de caudales y los fluidos más adecuados para la consecución de las microgotas.

La holografía fuera de eje permite eliminar mejor el ruido y separar la imagen real y virtual del objeto. Por este motivo se ha usado para medir el tamaño y desplazamiento de las microgotas.

En segundo lugar, se han diseñado dos configuraciones para la inserción del flujo secundario que da lugar a las micropartículas. Se han utilizado un microcanal en forma de T o de silla, diseñado específicamente para la generación de microgotas, y un microcanal recto.

De estos experimentos, se concluye que el microcanal en forma de silla, no permite la generación de gotas con un rango de caudales necesario para el estudio del flujo en los microcanales, que simule el torrente sanguíneo. Sin embargo, con el microcanal recto, se ha conseguido generar micropartículas para el rango de caudales adecuado diseñando un sistema de inyección directamente a la entrada del microcanal con la aguja de la jeringuilla controlada por la bomba.

Finalmente, se ha medido el tamaño de las microgotas y la influencia del caudal principal en dicho tamaño. Los hologramas fuera de eje han permitido encontrar la traza de varias partículas a lo largo de varias exposiciones para microgotas del orden de $10\ \mu\text{m}$, que pueden servir como trazadores flexibles que simulen los glóbulos rojos en modelos de vasos sanguíneos.

7. Bibliografía

1. Hwang M, Gyun Kim S, Sang Lee H and Muller S, "Generation and characterization of monodisperse deformable alginate and pNIPAM microparticles with a wide range of shear moduli", *Soft Matter* (2017) 13, 5785-5794.
2. Amini H, Sollier E, Weaver W and Carlo D, "Intrinsic particle-induced lateral transport in microchannels", *PNAS* (2012) 109:29, 11593_11598.
3. Wang X, Liu G, Wang K and Luo G, "Measurement of internal flow field during droplet formation process accompanied with mass transfer", *Microfluidic Nanofluid* (2015) 19:757-766.
4. Trabajo fin de grado de Adrián Subías Martín, "Aplicación de la holografía digital en un flujo giratorio", facultad de ciencias, Universidad de Zaragoza.
5. Trabajo fin de grado de Juan Gracia García-Lisbona, "Application of holographic microscopy in microchannels", facultad de ciencias, Universidad de Zaragoza.
6. Li W, Zhang L, Ge X, Xu B, Zhang W, Qu L, Choi C, Xu J, Zhang A, Lee, H and Weitz D, "Microfluidic fabrication of microparticles for biomedical applications", *Chemical Society reviews* (2018), ID: CS-SYN-04-2017-000263.R2.
7. Chinaud M, Rompea E and Panagiota A, "Studies of plug formation in microchannel liquid-liquid flows using advanced particle image velocimetry techniques", *Experimental Thermal and Fluid Science* (2015) 99-110.
8. Moreira A, Carneiro J, Campos J.B.L.M and Miranda J.M, "Production of hidrogel microparticles in microfluidic devices: a review", *Microfluidics and Nanofluidics* (2021) 25:10.
9. Chu T, Leclerc E, Salsac A, Barthes-Biesel D, Griscom L and Edwards_levy F, "Online fabrication and characterization of capsule populations with a flow-focusing microfluidic system", 3rd Micro and Nano Flows Conference, Thessaloniki, Greece, 22-24 August 2011.
10. Palero V, Lobera J, Andrés N y Arroyo M.P, "Shifted knife-edge aperture digital in-line holography for fluid velocimetry", *Optics Letters*, Vol. 39, Issue 11, (2014) 3356-3359.
11. Palero V, Lobera J, y Arroyo M.P, "Three-component velocity field measurement in confined liquid flows with high-speed digital image plane holography", *Experiments in Fluids* 49, 471-483 (2010).