

# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

## **DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

### **DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y MATERIALES**

**“Fabricación y caracterización de microesferas de PLGA y PBS por dos métodos: emulsión simple y emulsión doble, y desarrollo de un dispositivo microfluídico con potencial utilidad para preparar microesferas poliméricas”**

**Tesis**

**Para obtener el grado de  
Maestro en Ciencia de Materiales**

**Presenta:**

**Analila Luna Valenzuela**

**Asesor**

**Dr. Amir Darío Maldonado Arce**

**Co-asesor**

**Dra. María Elisa Martínez Barbosa**

**Hermosillo, Sonora México, octubre 2018**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

*“La buena vida es una vida inspirada por el amor y guiada por el conocimiento”  
-Bertrand Russell-*

*Para mi familia*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la universidad de Sonora (UNISON).

Al departamento de investigaciones en polímeros y materiales (DIPM) de la universidad de Sonora, por el apoyo que siempre brinda a sus estudiantes.

Al CONACYT por permitirme continuar con el desarrollo de este proyecto por medio de su asignación de beca durante toda la maestría y beca mixta para estancias internacionales.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (ICTP), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid, España.

Al proyecto CONACYT 271189 (infraestructura) y 256753 (Ciencia Básica)

Al proyecto Unison USO0005772.

Le agradezco la confianza, apoyo y dedicación de tiempo a mi director de tesis, Dr. Amir Maldonado y co-directora la Dra. Elisa Martínez. Gracias por haber compartido conmigo sus conocimientos. Gracias por sus valiosas observaciones y consejos en el desarrollo de este trabajo.

Al comité de tesis: Dra. Judith Tanori, Dra. Juana Alvarado, Dr. Sergio Galindo.

A las doctoras: Rebeca Hernandez y Carmen Mijangos del ICTP, por haberme permitido desarrollar parte de la tesis en una estancia de investigación en el ICTP en Madrid, lo cual me dio la oportunidad de crecer profesionalmente. Gracias por esas conversaciones y consejos en la hora del café.

A Emiliano, por haberme apoyado en las buenas y en las malas, sobre todo por su paciencia y amor incondicional. T. A Em.

A Andrea y Daniel por haber sido unos excelentes compañeros de tesis, laboratorio y amigos. Gracias por motivarme a seguir adelante en los momentos de desesperación y ayudarme en todo momento.

A mis Roomies: Liz, Sophi, Caree, Andrea, Alexa por ser parte significativa de mi vida, y por haber hecho el papel de una familia verdadera en todo momento.

A mis amigos de generación Cayetano y Rudbel. Gracias por los días de estudio de las primeras asignaturas, por esos días sin beca que lo que comía uno lo compartía con todos, por preocuparse porque aprendiera, porque llegara a casa con bien después de largas horas de estudio, pero sobretodo por demostrarme en todo momento lo que hace un amigo verdadero.

A mis compañeros de laboratorio del ICTP por siempre responder mis dudas, escucharme, esperarme para comer y siempre hacer un ambiente de trabajo agradable. Jimena, Emilio, Andrea.

## **VOTOS APROBATORIOS**

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de maestría de Analila Luna Valenzuela, han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias de Materiales otorgado por la universidad de Sonora.

---

Dr. Amir Darío Maldonado Arce  
Presidente

---

Dra. María Elisa Martínez Barbosa  
Secretaria

---

Dra. Judith Tánori Córdova  
Sinodal

---

Dra. Juana Alvarado Ibarra  
Sinodal

---

Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez  
Sinodal externo

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTA DE ABREVIACIONES</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>12</b>
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
HIPÓTESIS.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	15
OBJETIVOS.....	16
<i>Objetivo general</i> .....	16
<i>Objetivos particulares</i> .....	16
INTRODUCCIÓN.....	17
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>19</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>19</b>
2.1 POLÍMEROS.....	19
2.2 POLÍMEROS BIODEGRADABLES.....	22
2.3 MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	25
2.4 SOLVENTES.....	30
2.5 SURFACTANTES O TENSOACTIVOS.....	31
2.6 POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CON-GLICÓLICO) (PLGA).....	35
2.7 POLI (SUCCINATO DE BUTILENO) (PBS).....	36
2.8 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	38
<b>2.8.1 Emulsión</b> .....	38
<b>2.8.2 Técnicas microfluídicas</b> .....	41
2.9 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN UTILIZADAS EN EL PRESENTE TRABAJO.....	44
<b>2.9.1 Microscópio electrónico de barrido (SEM)</b> .....	44
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>45</b>
<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>45</b>
<b>3.1 SÍNTESIS DE MICROESFERAS BIOCOMPATIBLES DE LOS POLÍMEROS POLI (ÁCIDO LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) (PLGA) Y POLI (SUCCINATO DE BUTILENO) (PBS) POR LAS TÉCNICAS DE EMULSIÓN SIMPLE Y EMULSIÓN DOBLE</b> .....	45
<b>3.1.1 Materiales</b> .....	45
<b>3.1.2 Procedimiento experimental para las microesferas de PLGA y PBS</b> .....	46
<b>3.1.3 Caracterización</b> .....	53
<b>3.2 EXPERIMENTOS MICROFLUÍDICOS</b> .....	54
<b>3.2.1 Materiales</b> .....	54
<b>3.2.2 Fabricación del dispositivo microfluídico</b> .....	55
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>61</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>61</b>
4.1 FABRICACIÓN DE MICROESFERAS DE PLGA.....	61
<b>4.1.1 Efecto del tipo de surfactante</b> .....	61
<b>4.1.2 Efecto del método de preparación</b> .....	64
<b>4.1.3 Efecto de la relación polímero/surfactante</b> .....	66

<b>4.2 FABRICACIÓN DE MICROESFERAS DE PBS</b> .....	67
<b>4.2.1 Efecto del tipo de surfactante</b> .....	67
<b>4.2.2 Efecto del método de preparación</b> .....	69
<b>4.2.3 Efecto de la relación polímero/surfactante</b> .....	70
<b>4.3. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO CON POSIBILIDADES PARA SER APLICADO EN LA PREPARACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE PLGA.</b> .....	73
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>81</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>81</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	<b>83</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>84</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>95</b>

## LISTA DE ABREVIACIONES

**PLGA:** Poli (ácido láctico-co-glicólico)

**PBS:** Poli (succinato de butileno)

**PVA:** Poly (vinyl alcohol)

**PAA:** Ácido poli (acrílico)

**Alg:** Alginato

**Rpm:** Revoluciones por minuto

**O/W:** Aceite-en-agua

**W/O/W:** Agua-en-aceite-en-agua

**A:** Concentración alta de surfactante (2% m/v)

**B:** Concentración baja de surfactante (1% m/v)

**ES:** Emulsión simple

**ED:** Emulsión doble

**MS:** Microesferas

**SEM:** Microscopía electrónica de barrido

**MF:** Microfluídico

**Si:** Silicio

**PDMS:** Polidimetilsiloxano

**UV:** Radiación ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química del polímero PLGA; n= monómero del ácido láctico y m=monómero del ácido glicólico. ....	35
<b>Figura 2.</b> Estructura química del monómero que forma al polímero PBS .....	38
<b>Figura 3.</b> Esquema de la técnica de emulsión simple agua / aceite. ....	40
<b>Figura 4.</b> Esquema de la técnica de emulsión doble agua / aceite / agua. ....	41
<b>Figura 5.</b> Cinco diseños microfluídicos diferentes que se utilizan para obtener micro y nanopartículas poliméricas [90]. ....	44
<b>Figura 6.</b> Imagen del sistema de agitación Ultraturrax para la preparación de las emulsiones. ....	52
<b>Figura 7.</b> Diagrama de flujo para la fabricación de las micropartículas poliméricas. ....	53
<b>Figura 8.</b> Oblea de silicio sometida a limpieza con etanol. ....	55
<b>Figura 9.</b> Diseño MF impreso a alta resolución en una máscara o negativo con canales mayores de 75 $\mu\text{m}$ . ....	56
<b>Figura 10.</b> Diseño MF impreso por fotolitografía suave en la oblea de Silicio. ....	57
<b>Figura 11.</b> Proceso para verter el PDMS y hornear el dispositivo MF. ....	58
<b>Figura 12.</b> Dispositivo MF listo para ser utilizado en el experimento. ....	59
<b>Figura 13.</b> Esquema del controlador de flujos conectado al dispositivo MF y computador. ....	60
<b>Figura 14.</b> Esquema general del proceso de fotolitografía suave para la fabricación del dispositivo MF. ....	60
<b>Figura 15.</b> Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido: (a) PLGA/PVA <sub>B ES</sub> y (b) PLGA/PAA <sub>B ES</sub> . ....	62
<b>Figura 16.</b> Distribución de tamaño de partícula obtenido a partir de la micrografía de la muestra PLGA/PVA <sub>B ES</sub> con un diámetro medio de $1.5 \pm 0.68\mu\text{m}$ . ....	62
<b>Figura 17.</b> Imagen con algunos tamaños medidos en SEM para el sistema PLGA/PAA <sub>B</sub> . ....	63
<b>Figura 18.</b> Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido: (a) PLGA/PVA <sub>B ES</sub> y (b) PLGA/PVA <sub>B ED</sub> . ....	64
<b>Figura 19.</b> Distribución de tamaño de partícula obtenido a partir de la micrografía de la muestra PLGA/PVA <sub>B ED</sub> con un diámetro medio de $1.5 \pm 0.68\mu\text{m}$ . ....	65
<b>Figura 20.</b> Distribución de tamaño de partícula obtenido a partir de la micrografía de la muestra PLGA/PVA <sub>A ED</sub> con un diámetro medio de $1.04 \pm 0.32\mu\text{m}$ . ....	65
<b>Figura 21.</b> Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido: (a) PLGA/PVA <sub>B ED</sub> y (b) PLGA/PVA <sub>A ED</sub> . ....	66
<b>Figura 22.</b> Micrografía típica y distribución de tamaño de partícula de la muestra PLGA/PVA <sub>A ED</sub> con un diámetro medio de $0.99 \pm 0.32 \mu\text{m}$ . ....	67
<b>Figura 23.</b> Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido: (a) PBS/PVA <sub>B ES</sub> y (b) PBS/Alg <sub>B ES</sub> . ....	68
<b>Figura 24.</b> Imágenes de SEM para el sistema (a) PBS/PVA <sub>B ES</sub> . Los diámetros de algunas partículas han sido señalados en la imagen de la derecha. ....	68

<b>Figura 25.</b> Imágenes con tamaños medidos en SEM para el sistema (b) PBS/Alg <sub>B</sub> ES.....	69
<b>Figura 26.</b> Imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido: (a) PBS/Alg <sub>B</sub> ES y (b) PBS/Alg <sub>B</sub> ED. ....	70
<b>Figura 27.</b> Imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido: (a) PBS/Alg <sub>B</sub> ED y (b) PBS/Alg <sub>A</sub> ED. ....	71
<b>Figura 28.</b> Imágenes de SEM para el sistema (b) PBS/Alg <sub>A</sub> ED donde se observa la morfología rugosa y algunos poros.....	72
<b>Figura 29.</b> Distribución de tamaño de partícula obtenido a partir de la micrografía de la muestra PBS/Alg <sub>A</sub> ED con un diámetro de $12.90 \pm 3.57 \mu\text{m}$ .....	72
<b>Figura 30.</b> Efecto de humectación de gotas aceite en agua en un canal de PDMS. (a) Superficie del canal de PDMS sin tratar. (b) Superficie del canal de PDMS tratada con PVA [115]. ....	75
<b>Figura 31.</b> Diseño del dispositivo microfluídico en forma de “Y”; se muestran las dimensiones específicas de los canales construidos. La parte encerrada en línea punteada se ha amplificado a la derecha. ....	75
<b>Figura 32.</b> Diseño de enfoque de flujo en forma de “Y” del dispositivo de microfluídica. Se señalan además los líquidos de entrada y salida en cada canal. La zona ampliada muestra la cintura en la zona de confluencia de los canales de entrada.....	76
<b>Figura 33.</b> Esquema de la formación de las gotas de emulsión y del crecimiento subsiguiente de las microesferas en el dispositivo de microfluídica. ....	77
<b>Figura 34.</b> Dispositivos microfluídicos fabricados en el laboratorio.....	77
<b>Figura 35.</b> Imágenes de microscopía óptica tomadas durante la prueba del dispositivo microfluídico con tres colorantes orgánicos. Nótese los diferentes colores en los flujos de entrada: rosa (canal vertical superior), amarillo (canal vertical inferior) y azul (canal horizontal). ....	78
<b>Figura 36.</b> Imagen donde se observa el flujo de la fase orgánica al pasar por la cintura del dispositivo; las soluciones utilizadas contienen PLGA al 0.2% de PLGA y PVA al 1%. Nótese que hay una gota en formación en el extremo derecho del hilo de flujo.....	79
<b>Figura 37.</b> Imagen donde se observa la formación de gotas de emulsión. Las soluciones fueron las mismas que en la figura 36. ....	80

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Parámetros generales utilizados para la preparación de los diferentes sistemas microparticulados.....	46
<b>Tabla 2.</b> Parámetros específicos utilizados para la preparación de los diferentes sistemas microparticulados por el método de emulsión simple.....	47
<b>Tabla 3.</b> Parámetros específicos utilizados para la preparación de los diferentes sistemas microparticulados por el método de emulsión doble. ....	47

## CAPÍTULO I

### RESUMEN

En este trabajo se fabricaron microesferas de dos polímeros sintéticos biocompatibles, el ácido poli (láctico-co-glicólico), PLGA, y el poli (succinato de butileno), PBS. La síntesis de las microesferas se llevó a cabo por dos métodos convencionales: la técnica de emulsión simple y la técnica de emulsión doble, para obtener micropartículas con aplicaciones biomédicas potenciales, como acarreadores de fármacos. Mediante microscopía electrónica de barrido se estudiaron las propiedades de las partículas: forma, tamaños, morfología, como una primera evaluación del efecto del método de preparación, de los dos tipos de polímero utilizados, así como de las concentraciones de polímero y surfactantes. Los resultados muestran que es posible sintetizar microesferas de ambos polímeros a distintas concentraciones relativas de polímero/surfactante entre 0.2% de ácido poli (láctico-co-glicólico) PLGA y 1 % de poly (vinyl alcohol) PVA; 5% de PLGA y 2 % de Alginato con sus respectivas combinaciones. Los análisis de las imágenes de microscopía electrónica muestran diferencias morfológicas para cada tipo de polímero. El diámetro de las microesferas obtenidas está en la escala de micrómetros. Finalmente, no se encontraron diferencias significativas en el tamaño de las microesferas obtenidas con cada método y polímero utilizado.

Este trabajo también ofrece una descripción detallada de la fabricación de dispositivos microfluídicos por el método de fotolitografía suave. Fue probada la continuidad de los flujos por los canales microfluídicos y se aseguró una exitosa fabricación del dispositivo. Se probó la formación de gotitas emulsificantes en el interior de estos canales para futuras aplicaciones en la obtención de microesferas de PLGA y PBS.

## ABSTRACT

In this work, microspheres were made of two biocompatible synthetic polymers, poly (lactic-co-glycolic acid), PLGA, and poly (butylene succinate), PBS. The synthesis of the microspheres was carried out by two conventional methods: the simple emulsion technique and the double emulsion technique, to obtain microparticles with potential biomedical applications, as drug carriers. The properties of the particles were studied by scanning electron microscopy: shape, size, morphology, to begin to elucidate the effect of the preparation method, of the two types of polymer used, as well as polymer and surfactant concentrations. The results show that it is possible to synthesize microspheres of both polymers at different polymer / surfactant relative concentrations between 0.2% poly (lactic-co-glycolic acid) PLGA and 1% poly (vinyl alcohol) PVA; 5% PLGA and 2% Alginate with their respective combinations. The analysis of electron microscopy images shows morphological differences for each type of polymer. The diameter of the obtained microspheres is in the micrometer scale. Finally, no significant differences were found in the size of the microspheres obtained with each method and polymer used.

This work also offers a detailed description of the microfluidic devices by the soft photolithography method. The continuity of the flows through the microfluidic channels was proven and the successful manufacture of the device was ensured. The formation of emulsifying droplets inside these channels was tested for future applications in PLGA and PBS microspheres.

## HIPÓTESIS

Es posible preparar, mediante los métodos de emulsión simple (ES) y emulsión doble (ED), microesferas a base de los polímeros biocompatibles poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y poli (succinato de butileno) (PBS); es posible que las propiedades de las partículas obtenidas dependan de los parámetros del método de preparación. Por otro lado, es posible diseñar y construir un dispositivo de microfluídica con posibilidades de ser utilizado para la preparación de microesferas de PLGA y/o PBS.

## JUSTIFICACIÓN

Diversas aplicaciones tecnológicas en industrias como la farmacéutica o de cosméticos requieren el suministro de microesferas poliméricas que se utilizan con diferentes fines. Por esta razón es necesario poner a punto métodos de preparación de tales sistemas que permitan obtenerlos con facilidad, controlando propiedades como la distribución de tamaños o la morfología superficial. Adicionalmente, el uso de polímeros en estas aplicaciones es un factor de contaminación ambiental que es deseable eliminar o minimizar. En este contexto, este trabajo explora la preparación de microesferas de dos polímeros biodegradables: poli-(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y poli-(succinato de butileno) (PBS). Los métodos de preparación estudiados fueron el de emulsión simple y el de emulsión doble. Dado que es necesario conocer las condiciones óptimas de preparación para obtener microesferas con características deseables (tamaño pequeño, baja polidispersidad, etc.), en el trabajo estudiamos el efecto de modificar algunos parámetros en los métodos de preparación sobre los resultados obtenidos. Finalmente, ante la necesidad de contar con diferentes métodos de preparación, en el trabajo se plantea la fabricación de un dispositivo microfluídico para futuras aplicaciones de síntesis de los sistemas estudiados.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Preparar y caracterizar microesferas de dos polímeros biodegradables: poli-(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y poli-(succinato de butileno) (PBS) mediante las técnicas de emulsión simple (ES) y emulsión doble (ED), así como diseñar y construir un dispositivo microfluídico potencialmente útil para preparar el mismo tipo de partículas.

### **Objetivos particulares**

- Preparar microesferas de PLGA y PBS mediante las técnicas de emulsión simple (ES) y emulsión doble (ED).
- Caracterizar las microesferas obtenidas por la técnica de microscopía electrónica de barrido.
- Estudiar el efecto de algunos parámetros de los métodos de preparación ES y ED sobre el tamaño de las microesferas de PLGA y PBS.
- Diseñar y construir un dispositivo de microfluídica con posibilidades de utilizarse para la preparación de microesferas de PLGA y PBS.

## INTRODUCCIÓN

La ciencia de materiales es un campo multidisciplinario que estudia las propiedades físicas y químicas de la materia para desarrollar aplicaciones que llegan a convertirse en productos necesarios o requeridos por la sociedad. Esta área del conocimiento incluye elementos de biología, química, medicina, física, mecánica, ciencias ambientales, entre otras áreas.

Independientemente de los grandes progresos en el conocimiento y en el desarrollo en este campo, en los últimos años, el permanente desafío tecnológico requiere materiales cada vez más sofisticados y especializados.

Una de las áreas con mayor impacto por los avances en la nanotecnología es la medicina. Las aplicaciones biomédicas requieren el desarrollo de nuevos materiales para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, así como para el monitoreo y control de diversos procesos biológicos [1]. En este sentido se han desarrollado o utilizado una serie de sistemas a escalas nanométricas como: liposomas, micelas, puntos cuánticos, dendrímeros, microcápsulas, lipoproteínas, etc.

En este contexto, los biomateriales adquieren una importancia destacada en el campo de la nanomedicina. Existen varias definiciones de biomaterial, probablemente la más actualizada es: "Un biomaterial es una sustancia que ha sido diseñada para tomar una forma que, sola o como parte de un sistema complejo, se usa para dirigir, mediante el control de las interacciones con los componentes de los sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico, en medicina humana o veterinaria [2].

Los polímeros son los biomateriales más estudiados porque, gracias a la combinación de diferentes monómeros, se puede preparar fácilmente un amplio espectro de nuevos materiales con un comportamiento físico-mecánico completamente diverso. Para ser utilizados en contacto con células y cuerpos humanos, los materiales poliméricos deben cumplir requisitos muy estrictos y, sobre todo, deben ser biocompatibles. La biocompatibilidad se ha definido recientemente como "la capacidad de un biomaterial para realizar su función deseada sin provocar ningún efecto local o sistémico indeseable en el receptor "[3].

Además, otra característica importante que hay que mencionar de los biomateriales es el grado de toxicidad ya que no solo el biomaterial, sino también los productos de degradación deben resultar no tóxicos para el huésped [4].

En este trabajo nos hemos propuesto preparar microesferas poliméricas con potenciales aplicaciones farmacéuticas. Para ello se seleccionaron dos biopoliésteres: poli-(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y el poli-(succinato de butileno) (PBS).

El PLGA es un copolímero de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA) [5]. Esta macromolécula tiene varias propiedades interesantes tales como que es un polímero biocompatible, biodegradable y administrable con seguridad, aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) y EMA (European Medicines Agency) [6].

Por otro lado, el PBS se utiliza principalmente en envases biodegradables, pero recientemente ha atraído la atención en el campo biomédico, debido a sus interesantes propiedades termomecánicas y su probada capacidad para biodegradarse, aunado a sus bajos costos de producción. Además, los reactivos empleados en la síntesis se pueden obtener también a partir de recursos renovables, lo que hace que PBS sea un polímero completamente biodegradable y sostenible [7].

En este trabajo estudiamos la fabricación de microesferas biodegradables de PLGA y PBS por las técnicas de emulsión simple y de emulsión doble. Usamos dos surfactantes diferentes: PVA y alginato. Las microesferas se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido, técnica con la cual se obtuvo su tamaño, distribución de tamaños y morfología. Finalmente, en el trabajo diseñamos y construimos un dispositivo microfluídico, el cual proponemos como alternativa potencialmente útil para preparar microesferas poliméricas.

## **CAPÍTULO II**

### **ANTECEDENTES**

#### **2.1 Polímeros**

El sufijo mero significa una “unidad”. En este contexto el término mero se refiere a un grupo unitario de átomos o moléculas que define un arreglo característico para un polímero. Un polímero es un material constituido al combinar varios meros o unidades. Los polímeros son materiales que consisten en moléculas gigantes o macromoléculas en cadena con pesos moleculares promedio de 10 000 a más de 1000 000 g/mol y que se forman al unir muchas unidades mediante enlaces químicos. Se define el peso molecular como la suma de las masas atómicas en cada molécula. La mayoría de los polímeros, sólidos o líquidos, son compuestos orgánicos basados en el carbono; sin embargo, también pueden ser inorgánicos (por ejemplo, siliconas basadas en una red de Si-O).

La polimerización es el proceso mediante el cual pequeñas moléculas de una sola unidad (conocidas como monómeras) o de unas cuantas unidades (oligómeros) se unen químicamente para crear moléculas gigantes. Por lo común, la polimerización comienza con la producción de largas cadenas en las cuales los átomos están fuertemente unidos mediante un enlace covalente.

De manera similar al concepto de las soluciones sólidas o de la idea de los materiales compuestos, las cadenas lineales por adición compuestas de dos o más tipos de moléculas pueden organizarse para formar copolímeros. Esta es una forma muy poderosa de combinar las propiedades de los polímeros. El arreglo de los monómeros dentro del copolímero puede asumir varias formas. Estas formas incluyen copolímeros alternados, aleatorios, en bloques e injertados.

Los polímeros se clasifican de varias formas distintas: según la síntesis de sus moléculas, según su estructura molecular o de acuerdo con la familia química a la

que pertenecen. Una manera de clasificar a los polímeros es establecer si se trata de un polímero lineal o de un polímero ramificado. Un polímero lineal está formado de cadenas moleculares en forma de espagueti. En un polímero ramificado hay cadenas primarias de polímero y cadenas más pequeñas secundarias (ramalees) que nacen de las cadenas principales. Observe que, aun cuando decimos “lineales”, en realidad las cadenas no tienen forma de líneas rectas.

Los materiales poliméricos naturales como la goma laca, el ámbar y el caucho natural han estado en uso durante siglos. Los biopolímeros como las proteínas y los ácidos nucleicos desempeñan un papel crucial en los procesos biológicos. Existe una variedad de otros polímeros naturales, como la celulosa, que es el componente principal de la madera y el papel.

La lista de polímeros sintéticos incluye caucho sintético, baquelita, neopreno, nylon, PVC, poliestireno, polietileno, polipropileno, poliacrilonitrilo, PVB, silicona y muchos más.

Los polímeros se estudian en los campos de la química de polímeros, la física de polímeros y la ciencia de polímeros.

Comenzando en 1811, Henri Braconnot hizo un trabajo pionero en derivados de compuestos de celulosa, quizás el primer trabajo importante en la ciencia de los polímeros. El desarrollo de la vulcanización a finales del siglo XIX mejoró la durabilidad del caucho polimérico natural, lo que significa el primer polímero semisintético popularizado. En 1907, Leo Baekeland creó el primer polímero completamente sintético, la baquelita, mediante la reacción de fenol y formaldehído a una temperatura y presión controlada con precisión. La baquelita fue luego presentada públicamente en 1909.

A pesar de los avances significativos en la síntesis y caracterización de polímeros, una comprensión correcta de la estructura molecular del polímero no surgió hasta la década de 1920. Antes de eso, los científicos creían que los polímeros eran grupos de moléculas pequeñas (llamadas coloides), sin pesos moleculares definidos, unidos por una fuerza desconocida, un concepto conocido como teoría de la asociación. En 1922, Hermann Staudinger propuso que los polímeros consistían en largas cadenas de átomos unidos por enlaces covalentes, una idea

que no obtuvo amplia aceptación durante más de una década y por la cual Staudinger finalmente recibió el Premio Nobel. El trabajo de Wallace Carothers en la década de 1920 también demostró que los polímeros podían sintetizarse racionalmente a partir de sus monómeros constituyentes. Una contribución importante a la ciencia de polímeros sintéticos fue hecha por el químico italiano Giulio Natta y el químico alemán Karl Ziegler, quien ganó el Premio Nobel de Química en 1963 por el desarrollo del catalizador Ziegler-Natta. Un reconocimiento adicional de la importancia de los polímeros vino con la concesión del Premio Nobel de Química en 1974 a Paul Flory, cuyo extenso trabajo en polímeros incluía la cinética de la polimerización por crecimiento escalonado y de la polimerización por adición, transferencia de cadena.

Los materiales poliméricos sintéticos como el nylon, el polietileno, el teflón y la silicona han formado la base de una floreciente industria de polímeros. Estos años también han mostrado desarrollos significativos en la síntesis racional de polímeros. La mayoría de los polímeros comercialmente importantes en la actualidad son completamente sintéticos y se producen en grandes volúmenes con técnicas de síntesis orgánica a escala apropiada. Los polímeros sintéticos hoy en día encuentran aplicación en casi todas las industrias y áreas de la vida. Los polímeros son ampliamente utilizados como adhesivos y lubricantes, así como componentes estructurales para productos que van desde juguetes para niños hasta aviones. Han sido empleados en una variedad de aplicaciones biomédicas que van desde dispositivos implantables hasta la administración controlada de medicamentos. Los polímeros tales como el poli- (metacrilato de metilo) encuentran aplicación como materiales fotoprotectores utilizados en la fabricación de semiconductores y dieléctricos para su uso en microprocesadores de alto rendimiento. Recientemente, los polímeros también se han empleado como sustratos flexibles en el desarrollo de diodos orgánicos emisores de luz para pantallas electrónicas. [8]

## 2.2 Polímeros biodegradables

Las últimas dos décadas del siglo XX vieron un cambio de paradigma de biomateriales biestables a biomateriales biodegradables (hidrolíticamente y enzimáticamente degradables) para aplicaciones médicas y relacionadas [9-11].

A pesar de que las aplicaciones biomédicas de polímeros naturales enzimáticamente degradables como el colágeno se remontan a miles de años, la aplicación de polímeros biodegradables sintéticos comenzó solo en la segunda mitad de la década de 1960 [12].

Sin embargo, en las últimas dos décadas se desarrolló una gama de polímeros sintéticos biodegradables de nueva generación y polímeros naturales análogos específicamente desarrollados para aplicaciones biomédicas. La fuerza impulsora se debe, en parte, al surgimiento de nuevas tecnologías biomédicas que incluyen: ingeniería de tejidos, medicina regenerativa, terapia génica, administración controlada de fármacos y bionanotecnología, todas las cuales requieren materiales de plataformas biodegradables sobre las cuales construir. Algunas de las propiedades importantes de un material biodegradable se pueden resumir de la siguiente manera [13]:

- El material no debe provocar una respuesta inflamatoria o tóxica sostenida después de la implantación en el cuerpo.
- El material debe tener una vida útil aceptable.
- El tiempo de degradación del material debería emparejar el proceso de curación o regeneración.
- El material debe tener las propiedades mecánicas apropiadas para la aplicación indicada y la variación en las propiedades mecánicas con la degradación debe ser compatible con el proceso de curación o regeneración.
- Los productos de degradación no deben ser tóxicos, y deben metabolizarse y eliminarse del cuerpo.

- El material debe tener una permeabilidad apropiada y procesabilidad para la aplicación prevista.

Algunas de las propiedades inherentes de los biomateriales poliméricos que pueden afectar su biocompatibilidad incluyen: química de materiales, peso molecular, solubilidad, forma y estructura del implante, hidrofiliicidad / hidrofobicidad, lubricidad, energía superficial, absorción de agua, mecanismo de degradación y erosión. Dada la complejidad y la gama de aplicaciones que se utilizan actualmente en los biomateriales poliméricos, no hay solo un sistema polimérico disponible que pueda considerarse como un biomaterial ideal. Esto subraya la necesidad de desarrollar una amplia gama de materiales biodegradables disponibles para la fabricación de implantes que puedan coincidir de forma adecuada con los requisitos específicos y únicos de cada aplicación médica individual [14].

Los materiales poliméricos biodegradables están siendo investigados en el desarrollo de dispositivos terapéuticos tales como prótesis temporales, estructuras porosas tridimensionales como andamios para la ingeniería de tejidos y para aplicaciones farmacológicas, tales como la administración de fármacos (sistemas localizados y de focalización). Algunas de las aplicaciones biomédicas actuales de materiales poliméricos biodegradables incluyen: (1) implantes grandes, como tornillos óseos, placas óseas y reservorios anticonceptivos, (2) implantes pequeños, como grapas, suturas y vehículos de administración de fármacos de tamaño nano o micrométrico, (3) membranas simples para la regeneración guiada de tejidos y (4) mallas de multifilamentos o estructuras porosas para ingeniería de tejidos [15].

Se requieren materiales poliméricos con una amplia gama de propiedades mecánicas y de degradación para imitar las propiedades de diversos tejidos. En la administración controlada de fármacos, los agentes bioactivos están atrapados dentro de una matriz polimérica biodegradable de la cual se liberan de una manera controlada por erosión o difusión o una combinación de ambos. Las características de liberación de los agentes bioactivos pueden modularse de manera efectiva

mediante la ingeniería adecuada de los parámetros de la matriz [14].

La degradación de biomateriales poliméricos implica la ruptura de enlaces hidrolíticamente o enzimáticamente sensibles en el polímero que conducen a la erosión del polímero [16]. Dependiendo del modo de degradación, los biomateriales poliméricos pueden clasificarse adicionalmente en polímeros hidrolíticamente degradables y polímeros enzimáticamente degradables. La mayoría de los polímeros presentes en la naturaleza sufren degradación enzimática. Los polímeros naturales se pueden considerarse como los primeros biomateriales biodegradables utilizados clínicamente. Sin embargo, la tasa de degradación *in vivo* de polímeros enzimáticamente degradables varía significativamente con el sitio de implantación dependiendo de la disponibilidad y concentración de las enzimas. La modificación química de estos polímeros también puede afectar significativamente su velocidad de degradación. Los polímeros naturales poseen varias ventajas inherentes tales como la bioactividad, la capacidad de presentar ligandos que se unen al receptor de las células, la susceptibilidad a la degradación proteolítica desencadenada por las células y la remodelación natural. La bioactividad inherente de estos polímeros naturales tiene sus propios inconvenientes. Estos incluyen una fuerte respuesta inmunogénica asociada con la mayoría de los polímeros, las complejidades asociadas con su purificación y la posibilidad de transmisión de alguna enfermedad [14].

Por otra parte, los biomateriales sintéticos son generalmente biológicamente inertes, tienen propiedades más predecibles y uniformidad de lote a lote y tienen la ventaja única de tener perfiles de propiedad adaptados para aplicaciones específicas, desprovistos de muchos de los inconvenientes de los polímeros naturales. Los polímeros hidrolíticamente degradables generalmente se prefieren como implantes debido a sus mínimas variaciones de sitio a sitio y paciente a paciente en comparación con los polímeros degradable enzimáticamente [16]. El exitoso rendimiento del primer sistema de sutura basado en poli (ácido glicólico) sintético durante la década de 1960 condujo al diseño y desarrollo de una nueva

gama de polímeros biodegradables como implantes transitorios para aplicaciones médicas ortopédicas y relacionadas. Desde entonces, se han llevado a cabo extensas investigaciones para diseñar sistemas poliméricos biodegradables personalizados con una cinética de erosión predecible como vehículos de entrega de fármacos / genes o como andamios para la ingeniería de tejidos.

### 2.3 Micropartículas poliméricas

Durante las últimas décadas el gran interés por las partículas poliméricas por parte de biólogos, químicos, médicos, e ingenieros ha crecido constantemente debido a la amplia gama de partículas que se pueden obtener debido a sus propiedades físicas y químicas, que estas varían dependiendo de las características particulares del tipo de material que se utilice. Para ser aplicadas en resolver problemas que la ciencia expone debido a las necesidades de la vida diaria.

Las aplicaciones que puedan tener las micropartículas de polímero están determinadas por sus propiedades físicas, su tamaño y morfología interna y superficial. Todos estos factores pueden ser modificados según el método de elaboración de micropartículas que usemos.

Las micropartículas poliméricas tienen uso en un gran número de aplicaciones como funcionalización de superficies, adhesivos, sistemas de liberación de fármacos, células orgánicas fotovoltaicas, memorias o dispositivos nanomecánicos, entre otros [17].

Las micropartículas poliméricas fueron introducidas a mediados de 1970. Son partículas esféricas sin una distinción entre cubierta y núcleo de estructura monolítica.

Existen diversos tipos de partículas poliméricas empleadas en la administración controlada de fármacos. En función de su tamaño, se pueden clasificar en micro y nanopartículas. Las micropartículas son partículas poliméricas esféricas con tamaños que oscilan desde 1 a 250 micrómetros. Dentro de este grupo se incluyen las microcápsulas, que son sistemas vesiculares en los que el fármaco está

confinado en una cavidad rodeada de una única membrana polimérica; y las microesferas que son sistemas matrices en los que el fármaco está disperso en la partícula. Las nanopartículas son sistemas poliméricos submicrónicos menores a una micra. De acuerdo con el proceso empleado para preparar nanopartículas, pueden obtenerse nanocápsulas o nanoesferas, éstas son las equivalentes morfológicas de las microcápsulas y de las microesferas, respectivamente [18].

Enfocándonos en el suministro controlado de fármacos, éste puede haberse originado sin saberlo cuando las sustancias medicinales se incorporaron a las sustancias grasas para su aplicación en la piel. Varios miles de años transcurrieron antes de que se realizara un esfuerzo concertado para controlar la liberación del fármaco de una manera predecible para la vía tópica, oral o cualquier otra vía de dosificación. Ahora, a través de la microencapsulación con polímeros seleccionados e inclusive específicamente diseñados, es posible tener cierto control sobre el sitio de liberación, el inicio, la intensidad y la duración de la acción de un fármaco. Aunque la liberación controlada a menudo se logra con dispositivos tales como tabletas recubiertas o tabletas de matriz, existen incentivos para el desarrollo de sistemas de micropartículas a pesar de la mayor dificultad y gasto para su producción. Estos incentivos incluyen la necesidad de suspensión líquida y formas de dosificación inyectables, así como un mejor control de las características de liberación, robustez y tasa de carga.

El control de la difusión del fármaco, desde la forma de dosificación, es un enfoque lógico para los fármacos que requieren una administración frecuente para mantener niveles terapéuticos en el cuerpo. Sin embargo, se imponen limitaciones importantes para mantener el suministro controlado de fármacos mediante los procesos fisiológicos normales del cuerpo, y por la cantidad de medicamento que se puede encerrar convenientemente en una sola forma de dosificación. Por ejemplo, el retraso de la difusión puede usarse para extender la duración de la liberación de un fármaco desde una forma de dosificación oral más allá de su tiempo de tránsito en el tracto gastrointestinal. Para los medicamentos que requieren grandes dosis, pocos pacientes se verían obligados a tragar una tableta o cápsula

de 5 o 10 g, o incluso varias tabletas o cápsulas más pequeñas a la vez. Los fármacos que experimentan un amplio metabolismo de primer paso también son malos candidatos para el desarrollo de una forma de dosificación de liberación controlada.

Los polímeros pueden usarse para modular la difusión de fármacos al (1) controlar la velocidad con que las moléculas de fármaco se mueven a través de la matriz molecular del polímero o (2) controlar el movimiento de moléculas de fármaco disueltas a través de canales o poros en una matriz impregnada por el medio de disolución. En el primer caso, la velocidad de difusión depende de la solubilidad del fármaco en la matriz del polímero, el tamaño de las moléculas del fármaco y el impedimento del movimiento por la estructura de la matriz. En el segundo caso, la velocidad de difusión depende de la disponibilidad, longitud y tortuosidad de los poros; la solubilidad del fármaco en el medio penetrante; y la viscosidad del medio. En las microesferas el grado de contribución de cada mecanismo dependerá de la naturaleza del fármaco, el polímero, otros parámetros de la microcapsulación y el entorno de disolución. El control de la liberación del fármaco con un polímero también se puede lograr mediante la erosión del polímero para liberar el fármaco, o mediante una combinación de difusión del fármaco y erosión del polímero [19].

### **Propiedades fisicoquímicas de las microesferas**

Las propiedades fisicoquímicas requeridas para las microesferas están gobernadas por el tipo de fármaco y la aplicación *in vivo* para la que se van a emplear.

**-Tamaño de partícula.** Es un factor importante, ya que la ruta de administración determinará el tamaño requerido para las microesferas.

- **Área superficial/porosidad.** Las matrices de porosidad variable facilitan la modulación de la liberación del fármaco. Las microesferas porosas son esenciales para la liberación de sustancias de elevado peso molecular que no pueden difundir desde una matriz no-porosa; también son útiles para liberar sustancias que presentan elevada afinidad hacia el polímero y que no se liberan a menos que la

matriz se degrade. La degradación del polímero puede ser controlada alterando la porosidad de la matriz, y de este modo también se controla la liberación del fármaco [21],

- **Contenido de fármaco/liberación del fármaco.** Estas dos variables dependen de la dosis que se trate de alcanzar y la velocidad de dosificación del fármaco en cada tratamiento particular. Los medicamentos de baja potencia deben proporcionarse en dosis elevadas de modo que las microesferas deben estar muy cargadas de fármaco. El contenido de fármaco también depende de la cantidad de este que es capaz de aceptar la ruta de administración para la que ha sido diseñado.

- **Tiempos de biodegradación.** El tiempo requerido para degradar las microesferas completamente viene gobernado por la ruta de administración y la frecuencia de las dosis. Por ejemplo, en las rutas por inhalación generalmente empleadas para terapias crónicas se requiere una rápida biodegradación para evitar acumulaciones en el sistema, así como en la liberación intravenosa, mientras que la liberación subcutánea o intramuscular puede tolerar cierta acumulación de partículas con degradaciones más lentas [21].

### **Aplicaciones de las microesferas**

Una de las aplicaciones farmacéuticas más importantes de las microesferas es en la liberación de medicamentos. La investigación actual en farmacología está enfocada en dos áreas diferentes pero complementarias: sistemas de liberación controlada y vectorización. El perfil de liberación depende de numerosos parámetros: tamaño, distribución, porosidad, degradabilidad, permeabilidad del polímero, etc.

La vía de administración más ventajosa en principio para sistemas microencapsulados poliméricos de liberación controlada es la parenteral, es decir, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular. Una vez suministradas, las microesferas pueden actuar como pequeños sistemas de reserva liberando lentamente el fármaco.

Los materiales más adecuados para esta vía de administración son los biodegradables ya que van a ser eliminados por el organismo a través de productos de degradación biocompatibles que se transforman en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O por las vías metabólicas usuales.

La gran ventaja de estos sistemas microparticulados frente a soluciones alternativas como implantes es que, debido a su pequeño tamaño, pueden ser inyectados con una jeringa convencional, no necesitando, por tanto, intervención quirúrgica. Por otro lado, y aunque resulte paradójico, puede ser más fácil para una microesfera introducirse en una célula que para el fármaco libre, ya que una nano o macropartícula de tamaño adecuado es incorporada fácilmente como vacuola por fagocitosis.

Son sistemas muy interesantes como transportadores de fármacos que no puedan administrarse con garantía por vía oral, como son los nuevos fármacos producto de la revolución biotecnológica, proteínas, péptidos, hormonas o enzimas, los cuales son degradados fácilmente por las enzimas del tracto gastrointestinal. Además, se han descrito y ensayado clínicamente sistemas microparticulados poliméricos que incorporan anticancerígenos [21].

La otra vía de investigación mencionada anteriormente de gran interés en este campo es la vectorización "*targeting*". La administración de un fármaco libre vía oral, intravenosa, etc., normalmente da lugar a una distribución sistémica del compuesto activo, cuando lo que está afectado es sólo un tejido, un área local o un tipo de células. Desde esta perspectiva tendría mucho más sentido conseguir una acción vectorizada del fármaco, sobre todo para aquellos compuestos de alta toxicidad (como los anticancerígenos) o para aquellos con un bajo índice terapéutico. Por ejemplo, la administración mediante estos sistemas de liberación (microesferas, etc.) supone una mejora en la administración de los agentes anestésicos, reduciendo el número de dosis necesarias, evitando efectos tóxicos sistémicos y aumentando su concentración en el lugar deseado [21]

## 2.4 Solventes

Un solvente es un componente clave en una transformación química y medio de reacción, controla las interacciones entre los sustratos de reacción a través de la transferencia de calor y las fuerzas intermoleculares, y forma una capa de solvato alrededor del soluto. Su interacción con el soluto juega un papel fundamental para lograr la conversión y la selectividad [20].

La selección del solvente orgánico es crítica para desarrollar una formulación de micro y nano partículas poliméricas biodegradables. La miscibilidad del solvente con el agua y su capacidad para disolver el polímero y el fármaco tiene un impacto en el tamaño de partícula y la encapsulación eficiente. En general, el solvente orgánico debe tener baja solubilidad en agua para producir una emulsión más estable que finalmente conduce a micropartículas de alta calidad. Otro aspecto para considerar durante la selección de un solvente es su toxicidad, [21] porque siempre habrá pequeñas cantidades de solvente en la formulación final, independientemente del método de purificación adoptado.

La selección de solventes depende del método de preparación adoptado. Los métodos de emulsión evaporación usan un solvente orgánico inmisible en agua, tal como cloruro de metileno o cloroformo; mientras que los métodos de emulsión difusión y desplazamiento del disolvente utilizan un solvente parcialmente soluble en agua, como el alcohol bencílico [22].

### - **Cloroformo $\text{CHCl}_3$**

El triclorometano o tricloruro de metilo, es un compuesto químico que puede obtenerse por cloración como derivado del metano o del alcohol etílico o, más habitualmente en la industria farmacéutica, utilizando hierro y ácido sobre tetracloruro de carbono.

A temperatura ambiente, es un líquido volátil, no inflamable, incoloro, de olor penetrante, es un reactivo químico útil debido a la polarización de sus enlaces C-Cl, por lo que es una herramienta apreciada en síntesis orgánica, al proporcionar el grupo C-Cl<sub>2</sub>.

Además, debido a que es usualmente estable y miscible con la mayoría de los compuestos orgánicos lipídicos y saponificables, es comúnmente utilizado como disolvente. No obstante, debido a la toxicidad del cloroformo, actualmente la tendencia es sustituir su uso en la medida de lo posible por cloruro de metileno (un haloalcano similar al cloroformo) y otros disolventes menos tóxicos [23-24].

## 2.5 Surfactantes o tensoactivos

Un surfactante, o tensoactivo, es un término general usado para describir moléculas que interactúan con una interfaz. Estos consisten en dos partes, una de las cuales es altamente soluble en una de las fases mientras que la otra no. Son moléculas móviles pequeñas que se usan ampliamente en sistemas coloidales. Por ejemplo, se usan como jabones, detergentes, dispersantes, agentes humectantes y germicidas. Sus estructuras consisten en una cola hidrofóbica que generalmente es un hidrocarburo, aunque se pueden usar cadenas de fluorocarbono y dimetilsiloxano, con un grupo de cabeza hidrofílica polar que puede ser iónica o no iónica. Este tipo de estructura molecular da lugar a la no idealidad de las soluciones de tensoactivos y su comportamiento de fase.

Los tensoactivos se usan tanto en sistemas acuosos como no acuosos y, aunque normalmente pensamos en los materiales sintéticos que se fabrican en grandes cantidades, existen algunos de origen natural muy importantes. Por ejemplo, los surfactantes presentes en nuestros pulmones son vitales para su funcionamiento, al igual que las sales biliares producidas por el páncreas, que actúan para dispersar la grasa dietética en gotas de tamaño coloidal (o quilomicina) que pasan al torrente sanguíneo donde serán utilizadas por el cuerpo. La lecitina (fosfolípido) es un constituyente de las membranas celulares. Los ácidos grasos también son surfactantes y forman la fuente de jabones, cuya fabricación consiste básicamente en producir la sal de sodio en una fase de alta concentración que puede manejarse de forma conveniente [36].

Se requiere un estabilizador para evitar la coalescencia y la formación de aglomerados durante y después del proceso de emulsificación de partículas. La gran tensión interfacial de pequeñas gotas impulsa el sistema a la coalescencia. La adsorción de estabilizadores en el interfaz impide esta coalescencia al disminuir la tensión interfacial y la energía del sistema. El tipo y la concentración del estabilizante utilizado pueden influir en el tamaño de partícula y propiedades de las partículas tales como el potencial Z y la mucoadhesión. Tanto el tamaño de partícula como el potencial Z son propiedades fisicoquímicas importantes porque determinan la estabilidad física y las propiedades biofarmacéuticas de las nanopartículas, influyendo en la velocidad de liberación del fármaco, biodistribución, mucoadhesión y captación celular [27].

Algunos de los surfactantes más empleados para estabilizar sistemas coloidales con aplicaciones biomédicas son:

- **Alcohol polivinílico PVA**

El poli (alcohol vinílico) es un polímero hidrofílico, sintético, soluble en agua. Tiene la fórmula idealizada  $[\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})]_n$  [32].

Alcohol polivinílico es un polímero sintético soluble en agua. El PVA es resistente al aceite, grasas y disolventes. Es inodoro, no tóxico, biocompatible, con buenas propiedades mecánicas y muy estable durante largos periodos en temperaturas y pH diferentes. Tiene alta resistencia al oxígeno y a los diferentes aromas, también posee gran flexibilidad. Sin embargo, estas propiedades dependen de la humedad. El agua, que actúa como un plastificante, reducirá su resistencia a la tracción, pero aumentan su elongación y resistencia al desgarro.

El alcohol polivinílico se presenta en forma de gránulos o polvo blanco. Comercialmente se encuentra disponible en diferentes grados que difieren en peso molecular o en el contenido de acetato, tiene color estable hasta 140 °C. El PVA forma un coloide reversible en agua caliente, es insoluble en agua

fría. En agua a 20 °C y con un contenido máximo de 10% de acetato se hincha, es soluble entre un 10% y un 38%, forma un gel fino entre 38% y 75% y contenidos mayores lo hacen insoluble.

El PVA es un polímero hidrosoluble, útil en trastornos oculares que presentan deficiente flujo lagrimal. Contiene diferentes residuos de grupos acetatos, lo cual explica su viscosidad.

El PVA y sus análogos se han usado en medicamentos de liberación controlada. A pesar de su alto contenido de agua los hidrogeles de PVA son útiles tanto para fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos. También se ha utilizado para la liberación de polipéptidos, para liberación de teofilina, y últimamente en microesferas cargadas con sulfato de bario y metilotalamato como marcadores de embolización endovascular. [29]

#### - **Alginato**

El alginato es un polímero aniónico de origen natural comercialmente disponible y se extrae típicamente de algas pardas (Phaeophyceae), incluyendo *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera* [30], por tratamiento con soluciones alcalinas acuosas, típicamente con NaOH [31]. El extracto se filtra y se agrega cloruro de sodio o calcio al filtrado para precipitar el alginato. La ruta de la biosíntesis de alginato se divide generalmente en (i) síntesis de sustrato precursor, (ii) polimerización y transferencia de membrana citoplásmica, (iii) transferencia y modificación periplásmica, y (iv) exportación a través de la membrana externa [36]. Los pesos moleculares de alginatos de sodio comercialmente disponibles oscilan entre 32,000 y 400,000 g / mol. Los parámetros de la relación Mark-Houwink para alginato de sodio en solución de NaCl 0.1 M a 25 ° C son  $K = 2 \times 10^{-3}$  y  $a = 0.97$ , donde  $[\eta]$  es viscosidad intrínseca (mL / g) y  $M_v$  es el peso molecular promedio en viscosidad (g / mol) [33]. La viscosidad de las soluciones de alginato aumenta a medida que el pH disminuye, y alcanza un máximo alrededor de pH 3-3.5,

a medida que los grupos carboxilato en la cadena principal de alginato se protonan y forman enlaces de hidrógeno. El aumento del peso molecular del alginato puede mejorar las propiedades físicas de los geles resultantes. Sin embargo, una solución de alginato formada a partir de un polímero de alto peso molecular se vuelve muy viscosa, lo que a menudo es indeseable en el procesamiento [34].

- **Poloxámero**

Los poloxómeros se describen con mayor precisión como surfactantes de copolímeros de bloque porque comprenden tres segmentos o bloques y se derivan de la polimerización secuencial de óxidos de propileno y etileno. Los poloxómeros son solo una de las pocas series de tensioactivos de copolímeros de bloque en los que el hidrofóbico consiste en un bloque de óxido de propileno y el hidrófilo está constituido por bloques de óxido de etileno. También se puede formar un segmento mediante la polimerización simultánea de una mezcla de dos o más óxidos de alquileo, en cuyo caso se denomina heterópico [35]. La adición de un grupo acrililo polimerizable a cada extremo de la molécula de poloxámero permite que estos compuestos formen una red reticulada tridimensional en solución libre después de la reacción iniciada por un iniciador de radicales libres [36].

- **Acido poli(acrílico) (PAA)**

El ácido poli (acrílico) (PAA) es el nombre genérico para el polímero sintético de alto peso molecular del ácido acrílico. Puede ser homopolímero, o entrecruzado con otros alquenos. En una disolución de agua a pH neutro, el PAA es un polímero aniónico, es decir, muchas de las cadenas laterales del PAA perderán sus protones y adquirirán una carga negativa. Esto le confiere capacidad de absorber y retener agua, así como de hincharse hasta muchas veces su volumen original, por lo que actúa como un hidrogel. Además, el ácido poliacrílico exhibe el típico comportamiento de un polielectrolito, debido a que cuando se disuelve en agua, como ya se ha

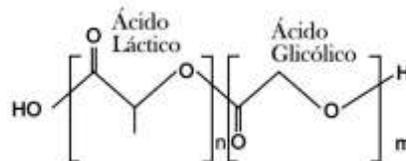
explicado, los grupos carboxilo que posee a lo largo de la cadena del polímero se ionizan (perdiendo un protón). En virtud de esta solubilidad e ionización, y a la viscosidad de las disoluciones de este polímero, se usa sobre todo como un buen agente adhesivo. Su uso como plástico es muy limitado [37].

El ácido poliacrílico se sintetiza por polimerización radicalaria en presencia de un peróxido, un azocompuesto u otros radicales como iniciadores radicalarios de la polimerización por radicales libres [37].

El ácido poliacrílico y sus derivados se usan como agentes dispersantes, resinas de intercambio iónico y adhesivos. También son populares como agentes espesantes, dispersantes y emulsionantes en fármacos, cosméticos y pinturas[38].

## 2.6 Poli (ácido láctico-con-glicólico) (PLGA)

El poliéster PLGA es un copolímero de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA) (Fig.1). En términos de diseño y rendimiento, PLGA es el mejor candidato como biomaterial para la administración de medicamentos. Aquí, PLGA denota ácido poli-D, L-láctico-co-glicólico, donde las formas de ácido D- y L-láctico están presentes en una relación fija [39].



**Figura 1.** Estructura química del polímero PLGA; n= monómero del ácido láctico y m=monómero del ácido glicólico.

### Propiedades de PLGA

El PLGA se sintetiza por copolimerización aleatoria de anillo abierto de dos monómeros diferentes, ácido glicólico y ácido láctico, en presencia de estaño (II) 2-etilhexanote, estaño (II) alcóxidos o isopropóxido de aluminio como catalizador. Las

unidades de ácido glicólico y láctico se unen consecutivamente a través de enlaces éster durante la polimerización, dando como resultado la formación de PLGA.

Se pueden obtener diferentes formas de PLGA variando la relación de láctida a glicólida durante la reacción de polimerización, por ejemplo, PLGA 50:50 (se refiere a un copolímero compuesto por 50% de ácido láctico y 50% de ácido glicólico), PLGA 75:25, PLGA 80:20, etc. Dependiendo del peso molecular y la relación de láctida a copolímero de glicólida, el tiempo de deterioro del polímero puede variar de varios meses a varios años [40,41].

Los polímeros de bajo peso molecular con mayor contenido de glicólidos son más hidrófilos y amorfos, y por lo tanto tienen un tiempo de degradación más corto. Esto se debe a que el ácido glicólico es más hidrófilo y, por lo tanto, tiende a absorber una gran cantidad de agua. Por el contrario, los polímeros con un mayor contenido de ácido láctico son más hidrófobos, absorben menos cantidad de agua y se degradan de forma más gradual [42].

El PLGA se puede procesar en casi cualquier tipo de configuración y se puede usar para encapsular una gran variedad de moléculas. Los polímeros de PLGA son miscibles en diversos disolventes orgánicos volátiles tales como tetrahidrofurano, acetona, diclorometano, cloroformo y acetato de etilo. Se sabe que las propiedades físicas tales como el peso molecular, el índice de Polidispersidad, la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) y el grado de cristalinidad afectan el comportamiento de hinchamiento, la velocidad de biodegradación y la resistencia mecánica del polímero [43].

## 2.7 Poli (succinato de butileno) (PBS)

El succinato de polibutileno (PBS) es un poliéster alifático biodegradable. Es un polímero conformado por la repetición de unidades de butileno succinato (Fig.2). Tiene interesantes propiedades termomecánicas y probada biodegradabilidad, combinado con una materia prima aceptable y costos de producción. Además, los reactivos empleados en la síntesis se pueden obtener también a partir de recursos renovables, lo que hace que PBS sea un polímero completamente biodegradable y sostenible. Aunque su comercialización está principalmente dedicada a los envases

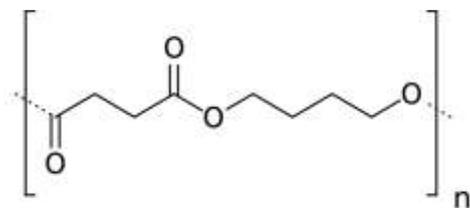
biodegradables, el uso de PBS en el campo biomédico recientemente ha atraído considerable atención. Las estrategias sintéticas adoptadas y las propiedades de estado sólido, junto con los datos sobre la tasa de biodegradación y biocompatibilidad de esta clase de poliésteres. [44].

### **Propiedades de PBS**

El PBS se sintetiza comúnmente mediante policondensación en dos pasos: en el primero, se producen reacciones de esterificación (o transesterificación en el caso del dimetilsuccinato, DMS) con eliminación de agua (o metanol), mientras que, en el segundo, se realiza a temperatura más alta y bajo presión para eliminar BD (generalmente se usa un exceso de glicol de aproximadamente 10-20%), se obtiene PBS de alto peso molecular [45].

El éxito de PBS como material termoplástico está estrechamente relacionado con sus propiedades. De hecho, PBS es un polímero semicristalino con alta capacidad de cristalización ( $v_c = 35-45\%$ ) [46] y su temperatura de fusión es una de las más altas entre los policarboxilatos de alquileno [47,48]. La temperatura de transición vítrea es muy inferior a la temperatura ambiente, por lo tanto, PBS posee un amplio rango de trabajabilidad que permite su procesamiento a través de extrusión, moldeo por inyección y termoformación [49-51].

El análisis de la literatura muestra que la aplicación biomédica más estudiada de PBS y copolímeros basados en PBS es la ingeniería de tejidos, donde estos polímeros se han empleado tanto en forma de películas [52-55], electrospinning [56-57] o extrusión [58,59]. En algunos casos, también se informó la realización de microesferas [60-62] o nanovehículos [63,64] como sistemas de administración de fármacos.



**Figura 2.** Estructura química del monómero que forma al polímero PBS

## 2.8 Métodos de preparación de micropartículas poliméricas

Existen varias técnicas utilizadas para la preparación de micro y nanopartículas poliméricas. Estas técnicas pueden clasificarse en cuatro categorías. La Categoría 1 consisten en métodos tradicionales basados en emulsiones que son: emulsión simple, doble emulsión y emulsiones múltiples. La Categoría 2 comprende los métodos basados en la precipitación que incluye: nanoprecipitación, expansión rápida de fluido supercrítico en líquido, salificación y diálisis. La categoría 3 comprende métodos de composición directa, tales como técnicas de fusión, secado por pulverización, fluido supercrítico y micropartículas que se forman *in situ*. Finalmente, la categoría 4 comprende nuevos enfoques que incluyen la técnica de microfluídos y la técnica basada en plantillas o moldes. [65-68].

Dependiendo del proceso de preparación, la estructuración del micro o las nanopartículas puede variar. Las partículas de PLGA biodegradable se preparan generalmente dispersando el polímero. En realidad, se forman en el paso inicial, que es común para todas las técnicas, en las que se prepara un sistema de emulsificación [69].

### 2.8.1 Emulsión

Las emulsiones son un ejemplo de coloides metaestables. Por lo general, están hechas de dos fluidos inmiscibles, uno disperso en el otro, en presencia de agentes tensioactivos. Se obtienen cortando dos fluidos inmiscibles, lo que lleva a la fragmentación de una fase en la otra. Las gotitas de emulsión exhiben todos los comportamientos clásicos de los coloides metaestables: movimiento browniano, transiciones de fase reversibles como resultado de interacciones de gotitas y transiciones irreversibles que generalmente implican la destrucción de la emulsión.

La fracción de volumen de gota puede variar de cero a casi uno: las emulsiones densas a veces se denominan espumas bilíquidas ya que su estructura es muy similar a la estructura celular de las espumas aire-líquido cuya fase continua es muy pequeña. Desde emulsiones diluidas a altamente concentradas, presentan dinámicas internas y propiedades mecánicas muy diferentes. Cuando la emulsión se diluye fuertemente, las gotitas se agitan por el movimiento browniano [70,71], y la emulsión se comporta como un fluido newtoniano viscoso. Cuando la emulsión se concentra, es decir, por encima de la fracción de volumen de empaquetamiento al azar, que es del 64% para las gotas monodispersas, la dinámica interna está severamente restringida y la emulsión se comporta como un sólido viscoelástico [72,73]. Las emulsiones directas simples están compuestas de gotitas de aceite dispersas en agua (O / W), mientras que las emulsiones inversas están compuestas de gotitas de agua dispersas en una fase continua de aceite (W / O). Las emulsiones están hechas en general de dos fases inmiscibles para las cuales la tensión superficial es distinta de cero, y en principio puede implicar otros fluidos similares a hidrófilos o lipófilos en presencia de especies tensioactivas adecuadas, cada fase posiblemente compuesta de numerosos componentes. Como ejemplo, las emulsiones simples también pueden contener pequeñas gotas de la fase continúa dispersada dentro de cada gota de la fase dispersa. Dichos sistemas se denominan emulsiones dobles W/O/W o emulsiones múltiples [74].

Las emulsiones se usan ampliamente en una variedad de aplicaciones debido a su capacidad para transportar o solubilizar sustancias hidrófobas en una fase continua de agua.

Las emulsiones pueden ser de los siguientes tipos:

**Emulsiones simples** son aquellas en las que la fase dispersa es una sustancia lipofílica (grasa o aceite) y la fase continua es hidrofílica (normalmente agua). Estas emulsiones suelen denominarse aceite en agua y por la primera letra del término usado en inglés O/W (oil/ water).

**Emulsiones inversas** por el contrario son las que la fase dispersa es una sustancia hidrofílica y la fase continua es lipofílica. Estas emulsiones suelen denominarse con la abreviatura W/O (water/oil).

**Emulsiones dobles** son las que como fase dispersa contiene una emulsión inversa y la fase continua es un líquido acuoso. Estas emulsiones se conocen como W/O/W (water/oil/water).

### **2.8.1.1 Técnica de emulsión simple**

Este es el método más comúnmente utilizado para preparar micro y nanopartículas de PLGA. La emulsificación O/W generalmente se usa cuando el encapsulado (la molécula que va dentro de la capsula) es hidrófobo o poco soluble en agua [75].

Para preparar una fase orgánica, una cantidad apropiada del polímero se disuelve inicialmente en un disolvente orgánico volátil tal como diclorometano, cloroformo o acetato de etilo. Luego, el medicamento o el encapsulado se agregan a esta solución, lo que da como resultado la dispersión. Posteriormente, la dispersión que contiene el polímero y el fármaco se agrega a una solución acuosa en agitación continua con tensoactivos tales como alcohol polivinílico, polisorbato 80, poloxámero 188 y vitamina E TPGS (succinato de polietilenglicol de d- $\alpha$ -tocoferol), generando así una emulsión estable. El disolvente orgánico se deja evaporar por agitación magnética o manteniendo una presión reducida. [76]



**Figura 3.** Esquema de la técnica de emulsión simple agua / aceite.

### 2.8.1.2 Técnica de doble emulsión

El método de doble emulsión también se conoce como el método W / O / W. La eficacia de la encapsulación y el tamaño de partícula se ven afectados principalmente por el tipo de disolvente y la velocidad de agitación. Se disuelve una cantidad apropiada del fármaco en una fase acuosa (preparada en agua desionizada) seguido de la adición simultánea de la solución del fármaco a una fase orgánica en agitación vigorosa (compuesta de PLGA disueltos en disolventes orgánicos volátiles tales como etilcetato, cloroformo o diclorometano.) Por lo tanto, se forma una emulsión primaria de agua en aceite. Se consigue una emulsificación adicional añadiendo la emulsión primaria a una solución acuosa, seguido de una agitación simultánea y, posteriormente, permitiendo que el disolvente orgánico se evapore [77].

Ambas técnicas son óptimas para la síntesis de laboratorio; a gran escala, sin embargo, son aplicables solo a fármacos liposolubles y requieren un exceso de energía durante la homogeneización. Sin embargo, se ha informado que cualquier alteración en los parámetros del proceso, por ejemplo, la velocidad de agitación y la temperatura, ayuda a superar los inconvenientes de estas técnicas [78].



**Figura 4.** Esquema de la técnica de emulsión doble agua / aceite / agua.

### 2.8.2 Técnicas microfluídicas

La manipulación de fluidos en canales con dimensiones en el rango de decenas a cientos de micrómetros (microfluidos) ha surgido recientemente como una nueva área de ciencia y tecnología. La microfluídica tiene aplicaciones que abarcan campos de química analítica, síntesis orgánica e inorgánica, biología celular, óptica y tecnología de la información. Muchas de estas aplicaciones se han demostrado

en las últimas dos décadas. Durante los últimos seis o siete años, la síntesis de microfluidos ha mostrado aplicaciones muy prometedoras en la producción continua de materiales de alto valor, que incluyen nanopartículas inorgánicas, polímeros, compuestos orgánicos para la tomografía por emisión de positrones y partículas de polímero. La síntesis microfluídica de microesferas de polímero de tamaño micrométrico con dimensiones controladas con precisión y una variedad de composiciones, formas y morfologías, ha atraído rápidamente gran interés de científicos y tecnólogos con antecedentes y ocupaciones muy diferentes, desde coloides de polímeros hasta biología celular y administración de fármacos [79]. Las partículas uniformes pueden permitir sistemas de liberación controlada precisamente porque el tamaño de las partículas es un determinante primario de la cinética de liberación del fármaco [80].

La microfluídica trata con gotitas discretas que tienen un volumen y una composición controlados con precisión, una dispersión restringida, que son plantillas ideales para la fabricación de partículas complejas. Se han desarrollado varios enfoques de microfluidos y se usan ampliamente para fabricar emulsiones de una sola emulsión, dobles o múltiples. Las micropartículas poliméricas generalmente se obtienen fabricando emulsiones O / W en dispositivos microfluídicos, donde los polímeros se disuelven en un solvente orgánico (fase oleosa), mediante solidificación de gotas a través de la evaporación, difusión o extracción del solvente. La solución de polímero en el disolvente orgánico se llena en un dispositivo microfluídico de unión en T o en Y luego se expulsa a una gran cantidad de solución estabilizante. El disolvente se difunde de las gotitas a la fase acuosa, y luego las gotas se solidifican en microesferas debido a la solubilidad relativamente diferente del disolvente en agua [81,-84].

Cuando las gotitas de la solución de polímero se expulsan a la solución estabilizadora, el tamaño de las partículas se determina por las propiedades de las soluciones (densidad y viscosidad), la velocidad de flujo de la solución de polímero, el diámetro de la boquilla y la tensión interfacial entre la solución de polímero y la

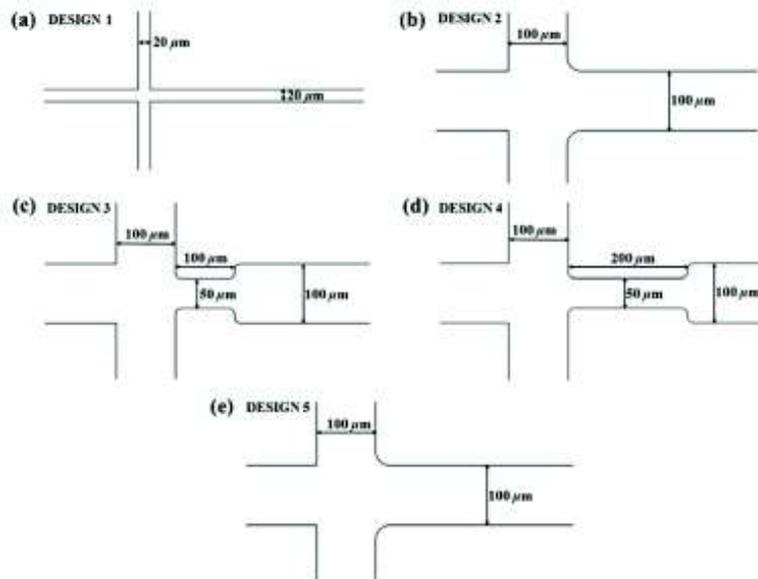
punta de la boquilla. Existen limitaciones similares a las de otros métodos que utilizan dispositivos físicos, como una boquilla, un canal, una plantilla y un molde. La fabricación de nanopartículas aparentemente requeriría una boquilla o canales más pequeños [89-85].

Las aplicaciones de micropartículas basadas en microfluidos están creciendo rápidamente para el desarrollo de sistemas controlados de administración de fármacos. Han sido útiles para sistemas de administración de fármacos complejos y multifuncionales como micropartículas multi-core-shell [83].

Con el desarrollo adicional de técnicas de microfluidos y procesos de fabricación, se pueden preparar micropartículas con la cinética de carga y liberación del fármaco deseada. Además, el bajo costo y la alta reproducibilidad hacen que esta tecnología sea prometedora para la producción en masa de sistemas de administración de fármacos específicos [83,86].

Las partículas de PLA en un amplio rango de tamaño se fabricaron a partir de emulsión w / o / w producida en un dispositivo capilar de vidrio de enfoque de flujo tridimensional (3D). El tamaño de la gota generalmente se controla mediante la velocidad del fluido y el tamaño del orificio. Además, se desarrolló un modelo numérico de generación de caídas en un dispositivo de enfoque de flujo 3D para comprender el mecanismo de generación de caídas en el régimen de goteo [87].

La técnica de microfluidos se utilizó para producir micropartículas poliméricas de dos tamaños diferentes (11 y 41  $\mu\text{m}$ ) para estudiar el perfil de liberación *in vitro* de bupivacaína. Las partículas monodispersas preparadas usando microfluídicos liberaron el fármaco más lentamente que las partículas de tamaño similar preparadas usando un método convencional tal como el método de emulsión [-88]. Si bien el método de fabricación de micropartículas es un parámetro que afecta la cinética de liberación del fármaco, es importante darse cuenta de que otros factores también contribuyen significativamente al perfil de liberación del fármaco [89].



**Figura 5.** Cinco diseños microfluídicos diferentes que se utilizan para obtener micro y nanopartículas poliméricas [90].

## 2.9 Técnicas de caracterización utilizadas en el presente trabajo

### 2.9.1 Microscópio electrónico de barrido (SEM)

El SEM es la forma más utilizada de microscopio electrónico en el campo de las ciencias de los materiales. Se usan dos haces de electrones simultáneamente. Uno golpea la muestra para ser examinada, el otro golpea un tubo de rayos catódicos (CRT) visto por el operador. Como resultado del impacto del rayo incidente sobre la muestra, se produce una variedad de emisiones de electrones y fotones. La señal elegida se recoge, detecta, amplifica y utiliza para modular el brillo del segundo haz de electrones de modo que una gran señal leída produce una mancha brillante en el CRT mientras que una pequeña señal produce un punto más oscuro. Los dos haces se escanean sincrónicamente de modo que para cada punto escaneado en la muestra hay un punto correspondiente en el CRT. Por lo general, los rayos escanean patrones cuadrados tanto en la muestra como en el CRT. Por lo tanto, se produce un mapa o imagen ampliada de la muestra sin la necesidad de lentes de imagen [9].

## CAPÍTULO III

### DESARROLLO EXPERIMENTAL

#### **Materiales y Métodos**

En esta sección se describen los procedimientos experimentales realizados en el presente trabajo, así como los materiales y equipos empleados en la síntesis y caracterización de las muestras para los experimentos por métodos de emulsión simple y emulsión doble. Además, se detallan los experimentos para la elaboración del dispositivo microfluídico.

#### **3.1 Síntesis de Microesferas biocompatibles de los polímeros Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y Poli (succinato de butileno) (PBS) por las técnicas de emulsión simple y emulsión doble.**

##### **3.1.1 Materiales**

Poli (ácido láctico-co-glicólico) PLGA, Resomer RG 504, formula lineal  $[C_3H_4O_2]_x [C_2H_2O_2]_y$  y con una proporción de copolímeros de 50:50 (% de ácido láctico y glicólico), peso molecular 38,000-54,000, con viscosidad 0.45-0.60 dL/g, 0.1 % (w/v). Sigma Aldrich. Poli (alcohol vinílico) PVA, formula lineal  $[-CH_2CHOH-]_n$ , peso molecular 31,000-50,000, 98-99% hidrolizado. Densidad 1.19-1.31 g / cm<sup>3</sup>, Punto de fusión 200 ° C (392 ° F; 473 K), Punto de ebullición 228 °C (442 ° F; 501 K), Índice de refracción 1.477. Sigma Aldrich. Ácido poliacrílico PAA, 50% solución en agua, peso molecular 5,000. Poli (1,4-butileno succinato) PBS, extendido con 1,6-diisocianato hexano. Densidad 1.31 g / cm<sup>3</sup>. Sigma Aldrich. Cloroformo, grado reactivo, ACS, ISO, estabilizado con etanol. Formula lineal CHCL 3, peso molecular 119.38, densidad 1.47 g/ cm<sup>3</sup>. Scharlau. Alginato. Agua Mili-Q (Express 40, 0.22 μm).

### 3.1.2 Procedimiento experimental para las microesferas de PLGA y PBS

En la Tabla 1 se resumen los parámetros utilizados para los diferentes sistemas microparticulados preparados. Cada muestra será identificada de la siguiente manera: polímero/surfactante concentración de surfactante método de preparación. Dónde: A = concentración alta de surfactante (2% m/v), B = concentración baja de surfactante (1% m/v), ES= emulsión simple y, ED = emulsión doble.

**Tabla 1.** Parámetros generales utilizados para la preparación de los diferentes sistemas microparticulados.

Muestra	Surfactante	Técnica	Concentración Fase orgánica	Concentración fase acuosa
PLGA/PVA B ES	PVA	Emulsión simple	0.2% PLGA (0.01 g)	1% PVA (0.5g)
PLGA/PAA B ES	PVA	Emulsión simple	0.2% PBS (0.01 g)	1% PVA (0.5g)
PLGA/PVA B ED	PVA	Emulsión doble	0.2% PBS (0.01 g)	1% ALG (0.5g)
PLGA/PVA A ED	PVA	Emulsión doble	5%PLGA (0.25g)	2% ALG (0.4g)
PBS/PVA <sub>B</sub> ES	PVA	Emulsión simple	0.2% PLGA (0.01 g)	1% ALG (0.5g)
PBS/Alg <sub>B</sub> ES	Alg	Emulsión simple	0.2% PLGA (0.01 g)	1% PVA (0.5g)
PBS/Alg <sub>B</sub> ED	Alg	Emulsión doble	0.2% PLGA (0.01 g)	1% PVA (0.5g)
PBS/Alg <sub>A</sub> ED	Alg	Emulsión doble	1.25%PLGA (0.25g)	2% PVA (0.4g)

**Tabla 2.** Parámetros específicos utilizados para la preparación de los diferentes sistemas microparticulados por el método de emulsión simple.

<b>Fase orgánica</b>	<b>Fase acuosa</b>
0.2% PLGA (0.01g) en 5 ml de cloroformo. (PLGA/PVA <sub>B ES</sub> )	1 % PVA (0.5g) en 50 ml de Agua
0.2% PLGA (0.01g) en 5 ml de cloroformo. (PLGA/PAA <sub>B ES</sub> )	1 % PAA (0.5g) en 50 ml de Agua
0.2% PBS (0.01g) en 5 ml de cloroformo. (PBS/PVA <sub>B ES</sub> )	1 % PVA (0.5g) en 50 ml de Agua
0.2% PBS (0.01g) en 5 ml de cloroformo. (PBS/Alg <sub>B E</sub> )	1 % Alg (0.5g) en 50 ml de Agua

**Tabla 3.** Parámetros específicos utilizados para la preparación de los diferentes sistemas microparticulados por el método de emulsión doble.

<b>Emulsión primaria</b>		<b>Emulsión secundaria</b>	<b>Emulsión Estabilizadora</b>
<b>Fase orgánica</b>	<b>Fase acuosa</b>	<b>Fase acuosa</b>	<b>Fase acuosa</b>
0.2% PLGA (0.01g) en 5 mL de cloroformo.	2 mL de agua	1 % PVA (0.5g) en 50 mL de Agua	0.1% PVA (0.1 g) en 100 mL de agua
5% PLGA (0.25g) en 5 mL de cloroformo.	2 mL de agua	2 % Alg (0.4g) en 20 mL de Agua	0.2% Alg (0.4 g) en 200 mL de agua
0.2% PBS (0.01g) en 5 mL de cloroformo.	2 mL de agua	1 % PVA (0.5g) en 50 mL de Agua	0.1% PVA (0.20 g) en 100 mL de agua
5% PBS (0.25g) en 5 mL de cloroformo. (PBS/Alg <sub>A ED</sub> )	2 mL de agua	2 % PVA (0.4g) en 20 mL de Agua	0.2% PVA (0.4 g) en 200 mL de agua

### **3.1.2.1 Microesferas de PLGA por la técnica de emulsión simple**

#### **PVA como surfactante a una concentración baja PLGA/PVA<sub>BES</sub>**

Las microesferas de PLGA fueron preparadas por la técnica de emulsión simple (aceite en agua). Para ello, se prepararon dos disoluciones, la primera de PLGA al 0.2% (m/v) disuelta en cloroformo. (Fase orgánica 0.01 gramos de PLGA en 5 mL de cloroformo) y la segunda una disolución de PVA como surfactante al 1% (m/v). (Fase acuosa 0.5 gramos de PVA en 50 mL de agua). Para llevar a cabo la emulsión se utilizó un decantador para agregar la fase orgánica a un matraz que contenía la fase acuosa, los cuales estaban conectados al sistema Ultraturax (IKA T25 Digital) a una velocidad de agitación de 10,000 rpm.

Posteriormente la emulsión se mantuvo a temperatura ambiente, bajo campana, en agitación magnética a 800 rpm durante 24 horas evaporando el disolvente orgánico. Después, las partículas fueron recolectadas por centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se sometieron a dos procesos de lavado en 20 mL de agua Milli Q (Express 40, 0.22  $\mu\text{m}$ ). Finalmente, las muestras fueron congeladas y liofilizadas.

#### **PAA como surfactante a una concentración baja PLGA/PAA<sub>BES</sub>**

Las partículas de PLGA fueron preparadas por la técnica de emulsión simple (aceite en agua). Se prepararon dos disoluciones, la primera de PLGA al 0.2% (m/v) disuelta en cloroformo (Fase orgánica 0.01 gramos de PLGA en 5 mL de cloroformo) y la segunda una disolución de PAA como surfactante al 1% (m/v). (Fase acuosa 0.5 gramos de PAA en 50 mL de agua). Para llevar a cabo la emulsión se utilizó un decantador para agregar la fase orgánica a un matraz que contenía la fase acuosa, los cuales estaban conectados al sistema Ultraturax (IKA T25 Digital) a una velocidad de agitación de 10,000 rpm.

Posteriormente la emulsión se mantuvo a temperatura ambiente, bajo campana, en agitación magnética a 800 rpm durante 24 horas evaporando el disolvente orgánico. Después, las partículas fueron recolectadas por centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se sometieron a dos procesos de lavado en

20 mL de agua Milli Q (Express 40, 0.22  $\mu\text{m}$ ). Finalmente, las muestras fueron congeladas y liofilizadas.

### **3.1.2.2 Microesferas de PLGA por la técnica de emulsión doble**

#### **PVA como surfactante a una concentración baja PLGA/PVA<sub>B ED</sub>**

Las partículas de PLGA fueron preparadas por la técnica de doble emulsión (agua/aceite/agua). Se preparó una disolución de PLGA al 0.2% (m/v) en cloroformo (Fase orgánica 0.01 gramos de PLGA en 5 mL de cloroformo), con dos horas de agitación magnética a 800 rpm. Esta disolución fue emulsionada con 2 mL de agua Milli Q (Express 40, 0.22  $\mu\text{m}$ ) con el sistema de agitación Ultraturax (IKA T25 Digital) a 10,000 rpm durante 15 minutos. La emulsión resultante se mezcló con 50 mL de una disolución de PVA como surfactante al 1% (m/v) (Fase acuosa 0.5 gramos de PVA en 50 mL de agua), durante 30 minutos, con el sistema de agitación Ultraturax (IKA T25 Digital) a 10,000 rpm.

Para la evaporación del disolvente la segunda emulsión se transfirió a una disolución de PVA como surfactante al 0.1% (m/v). (Fase acuosa 0.20 gramos de PVA en 200 mL de agua). Agitándose magnéticamente a 800 rpm, bajo campana, durante 24 horas. Después, las partículas obtenidas se recogieron por centrifugación a 4500 rpm durante 20 minutos, se retiró el sobrenadante y se lavaron cuatro veces con agua Milli Q (Express 40, 0.22  $\mu\text{m}$ ). Finalmente, las muestras fueron congeladas y liofilizadas.

#### **PVA como surfactante a una concentración alta PLGA/PVA<sub>A ED</sub>**

Las partículas de PLGA fueron preparadas por la técnica de doble emulsión (agua/aceite/agua). Se preparó una disolución de PLGA al 5% (m/v) disuelta en cloroformo (Fase orgánica 0.25 gramos de PLGA en 5 mL de cloroformo), con dos horas de agitación magnética a 800 rpm. Esta disolución fue emulsionada con 2 mL de agua Milli Q (Express 40, 0.22  $\mu\text{m}$ ) con el sistema de agitación Ultraturax (IKA T25 Digital) a 10,000 rpm durante 15 minutos. La emulsión resultante se mezcló con una disolución de PVA como surfactante al 2% (m/v) (Fase acuosa 0.4 gramos de

PVA en 20 mL de agua), durante 30 minutos, con el sistema de agitación Ultraturrax (IKA T25 Digital) a 10,000 rpm.

Para la evaporación del disolvente la segunda emulsión se transfirió a una disolución de PVA como surfactante al 0.2% (m/v) (Fase acuosa 0.4 gramos de PVA en 200 mL de agua). Agitándose magnéticamente a 800 rpm, bajo campana, durante 24 horas. Después, las partículas obtenidas se recogieron por centrifugación a 4500 rpm durante 20 minutos, se retiró el sobrenadante y se lavaron cuatro veces con agua Milli Q (Express 40, 0.22  $\mu\text{m}$ ). Finalmente, las muestras fueron congeladas y liofilizadas.

### ***3.1.2.3 Microesferas de PBS por técnica de emulsión simple***

#### **PVA como surfactante a una concentración baja PBS/PVA<sub>BES</sub>**

Las partículas de PBS fueron preparadas por la técnica de emulsión simple (aceite en agua). Se prepararon dos disoluciones, la primera de PBS al 0.2% (m/v) disuelto en cloroformo (Fase orgánica 0.01 gramos de PBS en 5 mL de cloroformo) y la segunda una disolución de PVA como surfactante al 1% (m/v) (Fase acuosa 0.5 gramos de PVA en 50 mL de agua). Para llevar a cabo la emulsión se utilizó un decantador para agregar la fase orgánica a un matraz que contenía la fase acuosa, estos conectados al sistema Ultraturrax (IKA T25 Digital) a una velocidad de agitación de 10,000 rpm.

Posteriormente, la emulsión se mantuvo a temperatura ambiente, bajo campana, en agitación magnética a 800 rpm durante 24 horas evaporando el disolvente orgánico. Después, las partículas fueron recolectadas por centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se sometieron a dos procesos de lavado en 20 mL de agua Milli Q (Express 40, 0.22  $\mu\text{m}$ ). Finalmente, las muestras fueron congeladas y liofilizadas.

#### **Alginato como surfactante a una concentración baja PBS/Alg<sub>BES</sub>**

Las partículas de PBS fueron preparadas por la técnica de emulsión simple (aceite en agua). Se prepararon dos disoluciones, la primera de PBS al 0.2% (m/v) disuelto en cloroformo (Fase orgánica 0.01 gramos de PBS en 5 mL de cloroformo) y la

segunda una disolución de Alginato como surfactante al 1% (m/v) (Fase acuosa 0.5 gramos de Alginato en 50 mL de agua). Para llevar a cabo la emulsión se utilizó un decantador para agregar la fase orgánica a un matraz que contenía la fase acuosa, estos conectados al sistema Ultraturax (IKA T25 Digital) a una velocidad de agitación de 10,000 rpm.

Posteriormente la emulsión se mantuvo a temperatura ambiente, bajo campana, en agitación magnética a 800 rpm durante 24 horas evaporando el disolvente orgánico. Después, las partículas fueron recolectadas por centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se sometieron a dos procesos de lavado en 20 mL de agua Milli Q (Express 40, 0.22  $\mu\text{m}$ ). Finalmente, las muestras fueron congeladas y liofilizadas. Estas microesferas precipitaron a las tres horas de la evaporación del disolvente.

### **3.1.2.4 Microesferas de PBS por técnica de emulsión doble**

#### **Alginato como surfactante a una concentración baja PBS/Alg<sub>BE</sub>D**

Las partículas de PBS fueron preparadas por la técnica de doble emulsión (agua/aceite/agua). Se preparó una disolución de PBS al 0.2% (m/v) disuelto en cloroformo (Fase orgánica 0.01 gramos de PBS en 5 mL de cloroformo), con dos horas de agitación magnética a 800 rpm. Esta disolución fue emulsionada con 2 mL de agua Milli Q (Express 40, 0.22  $\mu\text{m}$ ) con el sistema de agitación Ultraturax (IKA T25 Digital) a 10,000 rpm durante 15 minutos. La emulsión resultante se mezcló con una disolución de alginato como surfactante al 1% (m/v) (Fase acuosa 0.5 gramos de alginato en 50 mL de agua), durante 30 minutos, con el sistema de agitación Ultraturax (IKA T25 Digital) a 10,000 rpm.

Para la evaporación del disolvente la segunda emulsión se transfirió a una disolución de alginato como surfactante al 0.1% (m/v) (Fase acuosa 0.20 gramos de alginato en 200 mL de agua). Agitándose magnéticamente a 800 rpm, bajo campana, durante 24 horas. Después, las partículas obtenidas se recogieron por centrifugación a 4500 rpm durante 20 minutos, se retiró el sobrenadante y se lavaron cuatro veces con agua Milli Q (Express 40, 0.22  $\mu\text{m}$ ). Finalmente, las muestras

fueron congeladas y liofilizadas. Estas microesferas precipitaron a las tres horas de la evaporación del disolvente.

### **Alginato como surfactante a una concentración alta PBS/Alg<sub>A</sub>ED**

Las partículas de PBS fueron preparadas por la técnica de doble emulsión (agua/aceite/agua). Se preparó una disolución de PBS al 5% (m/v) disuelto en cloroformo (Fase orgánica 0.25 gramos de PBS en 5 mL de cloroformo), con dos horas de agitación magnética a 800 rpm. Esta disolución fue emulsionada con 2 mL de agua Milli Q (Express 40, 0.22  $\mu\text{m}$ ) con el sistema de agitación Ultraturrax (IKA T25 Digital) a 10,000 rpm durante 15 minutos. La emulsión resultante se mezcló con una disolución de alginato como surfactante al 2% (m/v) (Fase acuosa 0.4 gramos de Alg en 20 mL de agua), durante 30 minutos, con el sistema de agitación Ultraturrax (IKA T25 Digital) a 10,000 rpm.

Para la evaporación del disolvente la segunda emulsión se transfirió a una disolución de Alginato como surfactante al 0.2% (m/v) (Fase acuosa 0.4 gramos de Algitano en 200 mL de agua). Agitándose magnéticamente a 800 rpm, bajo campana, durante 24 horas. Después, las partículas obtenidas se recogieron por centrifugación a 4500 rpm durante 20 minutos, se retiró el sobrenadante y se lavaron cuatro veces con agua Milli Q (Express 40, 0.22  $\mu\text{m}$ ). Finalmente, las muestras fueron congeladas y liofilizadas.



**Figura 6.** Imagen del sistema de agitación Ultraturrax para la preparación de las emulsiones.



**Figura 7.** Diagrama de flujo para la fabricación de las micropartículas poliméricas.

### 3.1.3 Caracterización

#### 3.1.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de las partículas de PLGA y PBS fue analizada por microscopía electrónica de barrido (PHILIPS Modelo XL30). Cada muestra fue dispersada en agua mili-Q a una relación de 0.1 mg/mL. Una gota fue depositada sobre un portaobjetos especial para muestras de SEM a temperatura ambiente por 24 horas para que se secase por evaporación del agua. Después del secado de la gota se somete a un proceso de metalización ultrafina de oro sobre la muestra mediante metalización a alto vacío. Al momento de depositar las muestras en el Microscopio para el análisis se les adhiere un pedazo de cinta conductora de cobre para tener mejor resultados de imagen.

## **Análisis de imagen con el programa ImageJ**

Con el software de imageJ se realizó el conteo de partículas a partir de una micrografía de las muestras de SEM. En este análisis se ajusta la escala de la imagen, se marca el área de cada una de las partículas de la micrografía y en automático va realizando el conteo. Después se representa las poblaciones de tamaños como una distribución en un histograma.

## **3.2 Experimentos microfluídicos**

### **3.2.1 Materiales**

Poli (ácido láctico-co-glicólico) PLGA, Resomer RG 504, formula lineal  $[C_3H_4O_2]_x [C_2H_2O_2]_y$  y con una proporción de copolímeros de 50:50 (% de ácido láctico y glicólico), peso molecular 38,000-54,000, con viscosidad 0.45-0.60 dL/g, 0.1 % (w/v). Sigma Aldrich. Carbonato de dimetilo (DMC), formula lineal  $(CH_3O)_2CO$ , anhídrido  $\geq 99\%$ , peso molecular 90.08 g/mol, punto de ebullición de 90 °C, densidad 1.07 g/cm<sup>3</sup>, solubilidad del DMC en agua 12.6 % en peso. Sigma Aldrich. Poli (alcohol vinílico) PVA, formula lineal  $[-CH_2CHOH-]_n$ , peso molecular 31,000-50,000, 98-99% hidrolizado. Densidad 1.19-1.31 g / cm<sup>3</sup>, Punto de fusión 200 ° C (392 ° F; 473 K), Punto de ebullición 228 °C (442 ° F; 501 K), Índice de refracción 1.477. Sigma Aldrich. Agua Mili-Q.

### 3.2.2 Fabricación del dispositivo microfluídico

#### 3.2.2.1 Obleas de silicio

Las obleas de silicio se usan para hacer moldes para litografía suave. La orientación de la oblea de silicio y el dopaje no tienen importancia en este tipo de litografía.



**Figura 8.** Oblea de silicio sometida a limpieza con etanol.

#### 3.2.2.2 Fotorresina SU8-2025

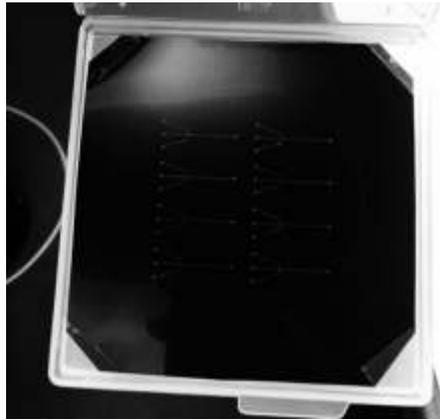
Los fotorresina es un compuesto sensible a la luz que se usa para generar patrones identificables a través de fotolitografía. Hay dos categorías principales de fotorresinas, positivas y negativas. Las fotorresinas positivas son compuestos que se hacen móviles mediante radiación UV, lo que da como resultado un patrón que es el mismo que el de la máscara utilizada (es decir, positiva) después del desarrollo. Las fotorresistencias negativas se inmovilizan mediante radiación UV y generan patrones que son opuestos a los de la máscara (es decir, negativos).

SU8 es una fotorresina negativa basada en epoxi. SU8 ha ganado gran popularidad en la comunidad de microfluídos, debido a su capacidad para mantener altas proporciones de aspecto y características gruesas. Se han informado alturas de características de 2 mm con una relación de aspecto de 20. SU8 tiene un máximo de absorbanza a 365 nm y la exposición conduce a la reticulación de las moléculas de resistencia. SU8 tiene buenas propiedades mecánicas y puede usarse directamente como componentes estructurales y mecánicos. Hay muchas series de

SU8 con diferentes viscosidades, optimizadas para diferentes relaciones de aspecto y altura de las características. [92]

### **3.2.2.3 Máscaras**

Las máscaras para fotolitografía se diseñaron utilizando el software AutoCAD. Las máscaras fueron impresas en hojas de transparencias en una imprenta local de la ciudad de Hermosillo la imprenta garantizó una resolución de 50  $\mu\text{m}$  en adelante.



**Figura 9.** Diseño MF impreso a alta resolución en una máscara o negativo con canales mayores de 75  $\mu\text{m}$ .

### **3.2.2.4 Litografía suave**

Se prepararon moldes para litografía suave a partir de obleas de Si y fotorresistencia SU8 usando métodos estándar de fotolitografía, antes de la fabricación del molde, las obleas Si se limpiaron a fondo.

SU8-2025 se depositó sobre las obleas mediante recubrimiento por rotación. La velocidad de rotación se modificó para obtener la altura de característica deseada. Una velocidad de rotación de 1224 rpm proporcionó una altura estándar de 50  $\mu\text{m}$  para la oblea. La oblea se horneó a 65 ° C durante 2 minutos. La oblea con SU8 depositado se expusieron a radiación UV de 365 nm (17 mW / cm<sup>2</sup>) durante 13 segundos mediante máscaras de proximidad que contenían el diseño del dispositivo. La cocción de exposición posterior se estableció en 5 minutos a 95°C. Después del desarrollo del SU8, las obleas se hornearon a 90 ° C durante 2 horas para eliminar las grietas, suavizar y reducir el tamaño de las características.

**Clorotrimetilsilano**, pureza,  $\geq 99.0\%$  (GC), fórmula lineal  $(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$ , peso molecular 108.64 g/mol, densidad 0.856 g/mL. Este es un paso muy importante a la hora de tener impreso nuestro diseño en la oblea nos permite hacer hidrófoba la superficie de las obleas, para que no se peguen a la hora de verter el PDMS. La aplicación se realiza colocando gotas con una jeringa de insulina directamente sobre las orillas de la caja Petri que contiene a la oblea de silicio, se tapa y se deja reposar por 15 minutos. Finalmente se quita la tapa y dejamos abierta la caja Petri por 5 minutos para que el clorotrimetilsilano se volatilice.



**Figura 10.** Diseño MF impreso por fotolitografía suave en la oblea de Silicio.

### **3.2.2.5 Moldeado PDMS**

El PDMS es un polímero elastomérico hidrofóbico con alta transparencia óptica y baja autofluorescencia. El PDMS nativo tiene una baja energía interfacial libre, lo que resulta en una baja humectabilidad del agua y una buena humectabilidad del aceite. A pesar de la enorme popularidad de PDMS como material para el prototipito rápido y la litografía blanda, tiene varias limitaciones. PDMS es altamente elastomérico y se deforma fácilmente como resultado de cambios de presión u otras tensiones mecánicas. El PDMS también se hincha considerablemente al absorber muchos disolventes orgánicos comunes, lo que provoca cambios transitorios en las dimensiones del canal. Las propiedades elastoméricas también limitan la relación de aspecto máxima, la separación a menudo conduce al colapso de las características altas y delgadas. En canales muy amplios, es probable que el techo del canal colapse debido a la falta de soporte mecánico [93].

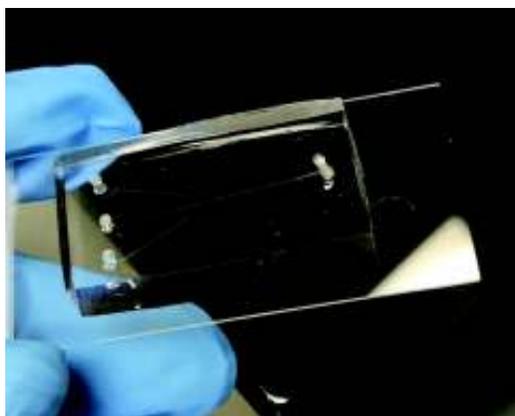
El Polímero polimetilsiloxano (PDMS), de densidad  $965 \text{ kg/m}^3$  se utilizó para crear todos los dispositivos de mi experimentación. Se hace una mezcla de PDMS con relación 10:1 con su elastómero correspondiente y se agita hasta que cambie de color (de cristalino a blanco). Esta mezcla se introduce a una cámara de vacío para eliminar las burbujas que se formaron. Una vez que la mezcla esta lista (sin burbujas) se vierte sobre una caja Petri que contiene la oblea de silicio con el diseño obtenido por litografía y se introduce en el horno por dos horas.



**Figura 11.** Proceso para verter el PDMS y hornear el dispositivo MF.

### **3.2.2.6 Obtención del dispositivo**

Se cortó con un bisturí el PDMS curado que contenía los diseños del dispositivo de los moldes de silicio y se unió a un portaobjetos de vidrio, usando un plasma cleaner. El plasma cleaner funciona a una presión de 300 mTorr durante 2 minutos para activar el PDMS y superficies de vidrio. La activación se produce al oxidar las superficies y reemplazar los grupos metilo por grupos hidroxilo que pueden participar en la formación de enlaces de silanol entre la superficie del portaobjetos de vidrio y el dispositivo que contiene PDMS. El enlace formado es así covalente y el tratamiento térmico aumenta la resistencia de unión aumentando el rendimiento y la velocidad de la reacción de condensación [94].



**Figura 12.** Dispositivo MF listo para ser utilizado en el experimento.

### ***3.2.2.7 Tratamiento de superficie***

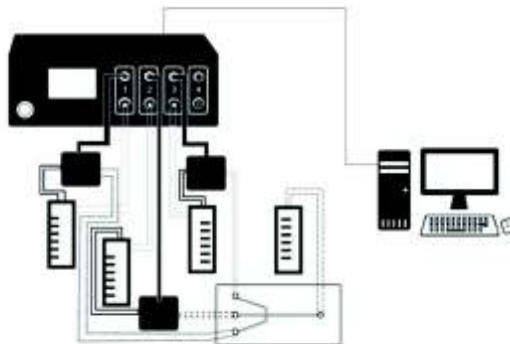
Para adaptar las propiedades de humectación de los canales de PDMS, se utilizó la modificación de la superficie mediante deposición pasiva. El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero hidrofílico que se adsorbe fácilmente a las superficies de PDMS, dando como resultado un cambio drástico en la hidrofiliidad de la superficie. Las superficies tratadas se humedecen fácilmente mediante fases acuosas, pero no con la mayoría de los disolventes orgánicos. Se hizo fluir una solución de 0.1% de PVA en agua a través del canal destinado al tratamiento aplicando una pequeña gota de solución a la entrada del canal y succionándolo a través del dispositivo aplicando un ligero vacío a la salida. La capa de PVA se fija tratando el dispositivo durante 5 minutos a 100 ° C [95].

### ***3.2.2.8 Montaje del equipo MF y manejo del Software***

Se realiza cuidadosamente la conexión de las mangueritas en los tubos falcón y estas conectadas a las tres entradas del dispositivo MF y una cuarta que es la salida de las partículas donde se va colectando las muestras. Se monta el microscopio óptico en el equipo a medida que el objetivo quede justamente sobre el dispositivo microfluídico. Se verifica que la caja negra de presiones este correctamente conectada al compresor. En cada uno de los tubos falcón se depositan las soluciones, por los extremos van las fases acuosas (PVA) y en el centro la solución de la fase orgánica (PLGA). Se habré el software en la computadora y se configura

la opción de control de flujo con las presiones y flujos correspondientes con los que se trabajara.

Posteriormente dejamos que el equipo se estabilice hasta que observemos por el microscopio óptico que las soluciones estén fluyendo correctamente por los tres canales de entrada. Finalmente se realiza el muestreo cada tiempo determinado.



**Figura 13.** Esquema del controlador de flujos conectado al dispositivo MF y computador.



**Figura 14.** Esquema general del proceso de fotolitografía suave para la fabricación del dispositivo MF.

## Capítulo IV

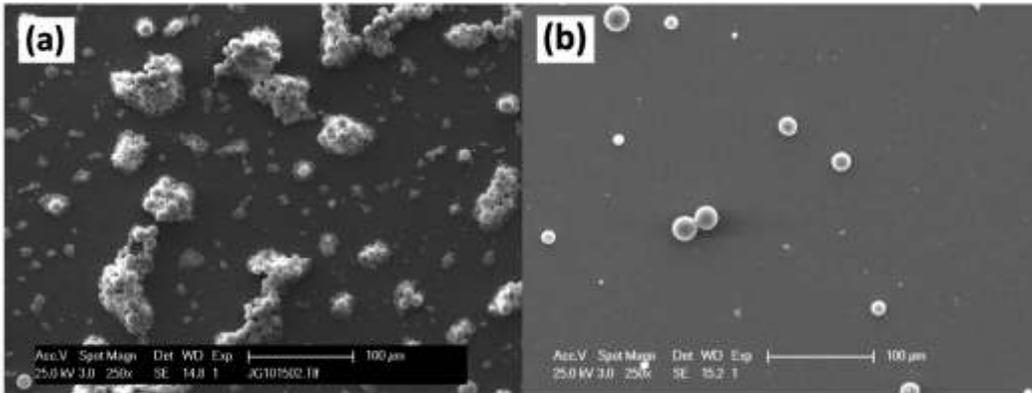
### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Fabricación de Microesferas de PLGA

En esta sección se presentan y analizan los resultados obtenidos para la fabricación de microesferas de PLGA utilizando PVA o PAA como surfactante, por el método de emulsión simple y emulsión doble. Dividiremos la presentación en tres subsecciones, las cuales abordan: el efecto del tipo de surfactante, el efecto del método de preparación y el efecto de la relación entre las concentraciones de polímero y surfactante.

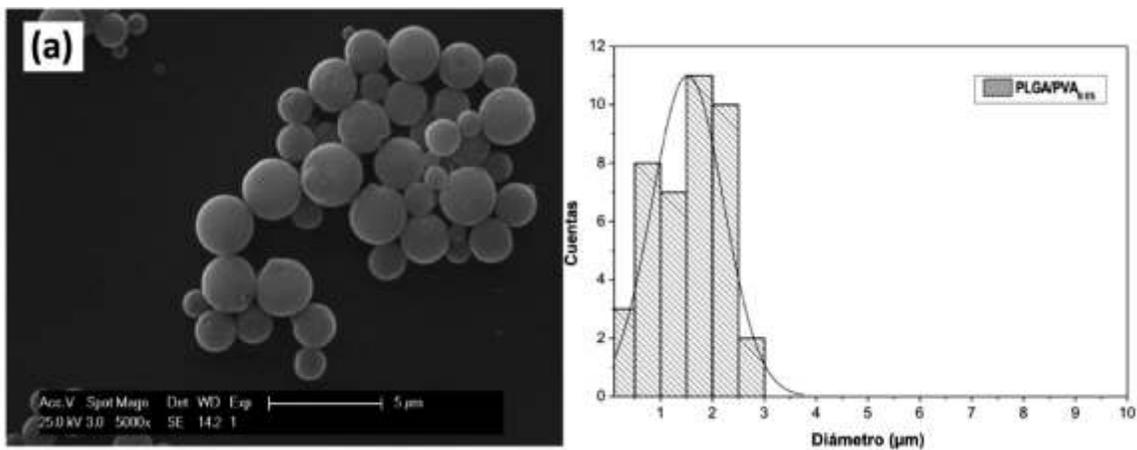
##### 4.1.1 Efecto del tipo de surfactante

Como explicamos en la sección experimental, preparamos las partículas de PLGA utilizando dos surfactantes (PVA y PAA). En ambos casos obtuvimos partículas. En la Figura 15 se muestran micrografías de SEM de ambos sistemas. Se puede observar que en los dos casos se obtienen partículas de forma esférica, de tamaños bastante menores que  $100\ \mu\text{m}$ , tal como ha sido reportado en la literatura [96]. Una diferencia notable a simple vista es que las partículas preparadas utilizando PVA aparecen en mayor número y se aglomeran formando una especie de racimos microscópicos, aunque cada partícula retiene su forma esférica. En cambio, las partículas preparadas con PAA retienen su individualidad.



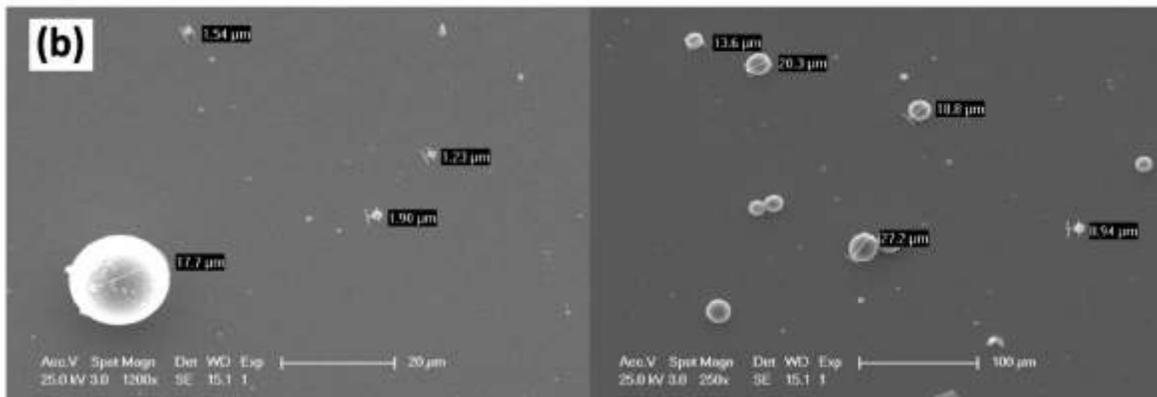
**Figura 15.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido: (a) PLGA/PVA<sub>B ES</sub> y (b) PLGA/PAA<sub>B ES</sub>

Realizamos un análisis de la distribución de tamaños de la población de partículas observadas. En la figura 16 presentamos una micrografía de las partículas preparadas utilizando PVA, así como un histograma obtenido con un conteo de 45 partículas utilizando el software de image J. El radio medio de las partículas es de  $1.5 \pm 0.68 \mu\text{m}$ .



**Figura 16.** Distribución de tamaño de partícula obtenido a partir de la micrografía de la muestra PLGA/PVA<sub>B ES</sub> con un diámetro medio de  $1.5 \pm 0.68 \mu\text{m}$ .

En cuanto a las partículas preparadas utilizando el surfactante PAA, se aprecia en la figura 15 que la cantidad de partículas en la muestra (al menos en el campo de observación del SEM) es mucho menor que cuando se utilizó PVA. Por esta razón no puede realizarse una estadística significativa. En lugar de ello, en la en la figura 17 se presentan los resultados de algunas mediciones típicas realizadas por SEM sobre el sistema PLGA/PAA<sub>B</sub> ES. Podemos apreciar que en esta muestra hay partículas con diámetros que van desde una hasta al menos 30 micras. Estas observaciones ponen en evidencia que la población de partículas en este segundo caso es más polidispersa. Esta puede ser una razón que explica por qué se ven tan pocas partículas en el campo de observación del SEM (figuras 15 y 17). En efecto, dado que la masa de una partícula de densidad  $\rho$  depende del cubo de su radio ( $m = \frac{4\pi}{3}\rho R^3$ ), en muestras polidispersas las partículas de radio más grande requieren más masa que las partículas de radio pequeño. Entonces unas pocas de partículas grandes pueden ocupar prácticamente toda la masa disponible.

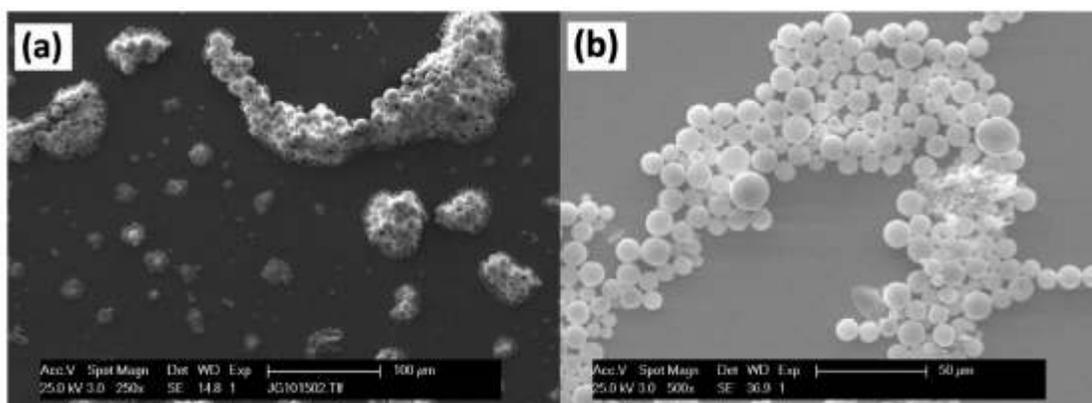


**Figura 17.** Imagen con algunos tamaños medidos en SEM para el sistema PLGA/PAA<sub>B</sub>.

De estos resultados se puede decir que se obtienen microesferas utilizando ambos surfactantes. Sin embargo, el PVA permite la obtención de una mayor cantidad de microesferas, con población más monodispersa. En el caso del PAA es necesario estudiar más el sistema para tratar de optimizar las condiciones de preparación.

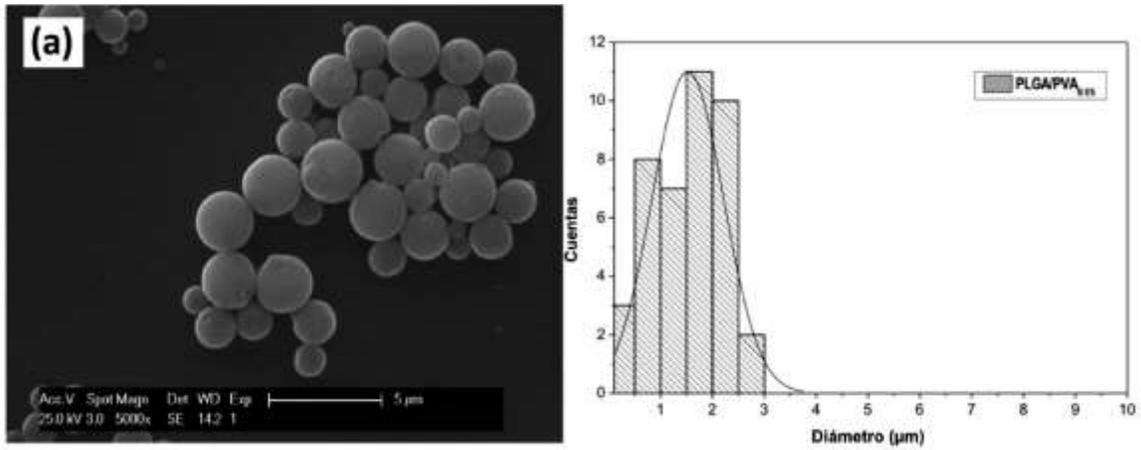
#### 4.1.2 Efecto del método de preparación

Como hemos dicho anteriormente, en este trabajo abordamos la preparación de microesferas poliméricas por dos métodos: emulsión simple y emulsión doble. En la Figura 18 se muestran micrografías de SEM de nanoesferas de PLGA con PVA al 1 % preparadas por ambos métodos. La figura de la izquierda corresponde al método de emulsión simple (PLGA/PVA<sub>B ES</sub>) y la de la derecha al método de emulsión doble (PLGA/PVA<sub>B ED</sub>). Nótese que la amplificación en cada figura es diferente. La barra de escala es 100  $\mu\text{m}$  para el método de emulsión simple y 50  $\mu\text{m}$  para emulsión doble.



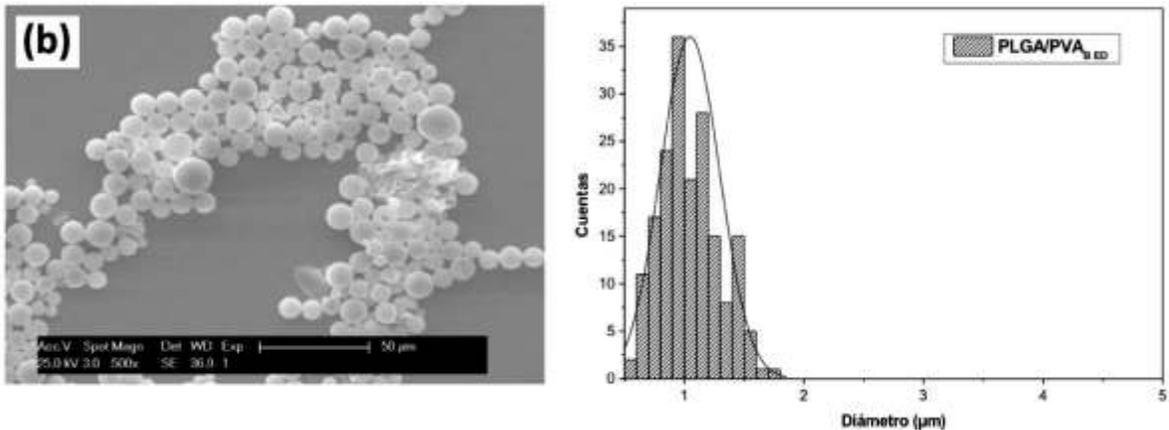
**Figura 18.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido: (a) PLGA/PVA<sub>B ES</sub> y (b) PLGA/PVA<sub>B ED</sub>.

En la figura 18 podemos observar que por ambos métodos se obtienen microesferas bien definidas, con tamaños muy similares. En la figura 19 presentamos otra micrografía del sistema de emulsión simple (PLGA/PVA<sub>B ES</sub>); además, mostramos la distribución de tamaño de partículas obtenidas al contar 45 de ellas. El diámetro medio obtenido fue de  $1.5 \pm 0.68 \mu\text{m}$ .



**Figura 19.** Distribución de tamaño de partícula obtenido a partir de la micrografía de la muestra PLGA/PVA<sub>B ED</sub> con un diámetro medio de  $1.5 \pm 0.68 \mu\text{m}$ .

Por otra parte, en la figura 20 presentamos otra micrografía de las microesferas del sistema de emulsión doble (PLGA/PVA<sub>B ED</sub>) junto con un histograma de su distribución de tamaños. El diámetro promedio obtenido al contar 185 partículas fue de  $1.04 \pm 0.32 \mu\text{m}$ .



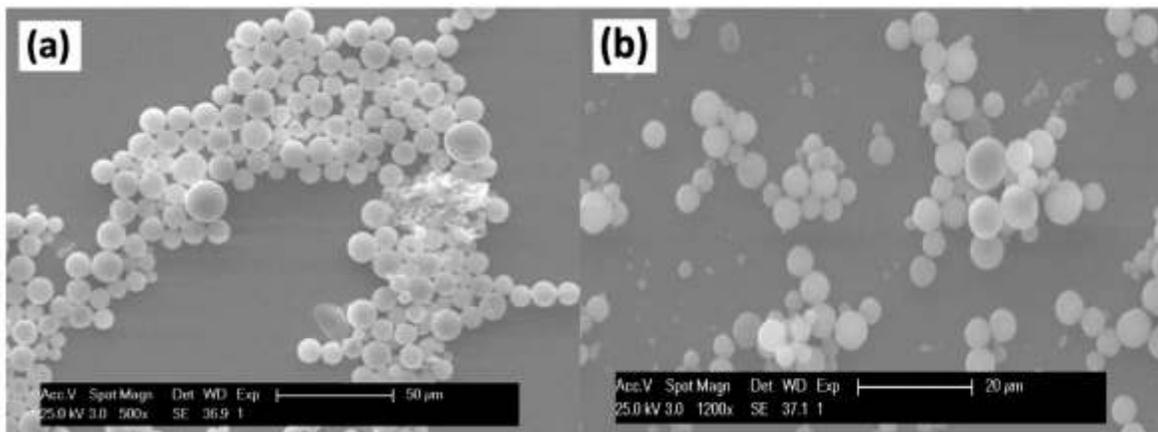
**Figura 20.** Distribución de tamaño de partícula obtenido a partir de la micrografía de la muestra PLGA/PVA<sub>A ED</sub> con un diámetro medio de  $1.04 \pm 0.32 \mu\text{m}$ .

Notamos en las figuras 19 y 20 que las distribuciones de tamaños son relativamente similares, aunque las partículas preparadas por emulsión doble son ligeramente mayores en general.

Por lo tanto, dado que las poblaciones son parecidas en tamaño, al menos para los parámetros estudiados en este trabajo se puede optar por preparar las partículas por el método de emulsión simple ya que es más sencillo.

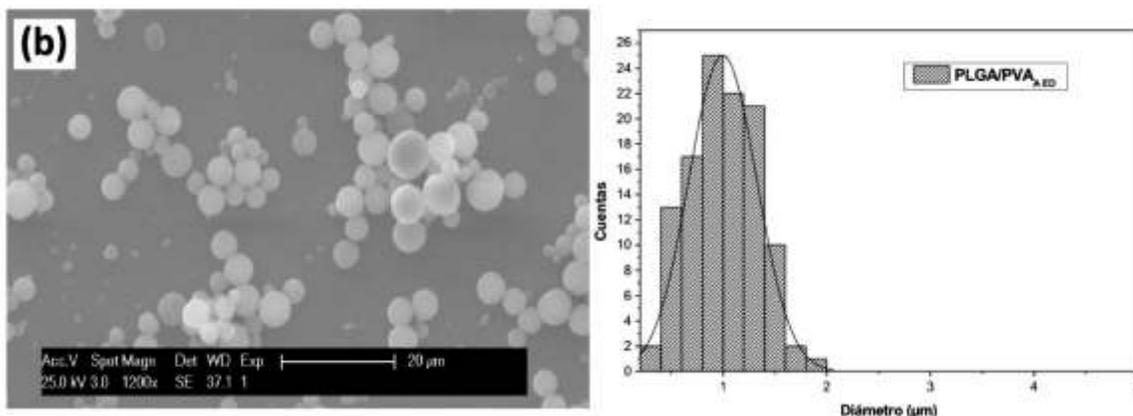
#### 4.1.3 Efecto de la relación polímero/surfactante

Pasamos ahora a analizar el efecto sobre la forma y tamaño de las partículas de la relación molar entre polímero y surfactante. En la figura 21 se muestran micrográficas de SEM de las microsferas de PLGA preparadas por el método de emulsión doble a dos relaciones polímero/surfactante: m/m 1:50 y 1:1.6 (0.2% PLGA/PVA al 1% y 5% PLGA/PVA al 2%) respectivamente.



**Figura 21.** Imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido: (a) PLGA/PVA<sub>B ED</sub> y (b) PLGA/PVA<sub>A ED</sub>.

Por otro lado, en la figura 22 presentamos resultados para el sistema PLGA/PVA<sub>A ED</sub>; el tamaño medio de un conteo de 113 partículas es  $0.99 \pm 0.32 \mu\text{m}$ . La diferencia de tamaños entre ambos sistemas no es significativa según los histogramas de ambos sistemas. Los tamaños están entre cero hasta dos micrómetros para ambas muestras de emulsión doble. Por lo que podemos decir que no se observa una variación del tamaño medio de las esferas con respecto a la relación polímero/surfactante que estamos comparando.



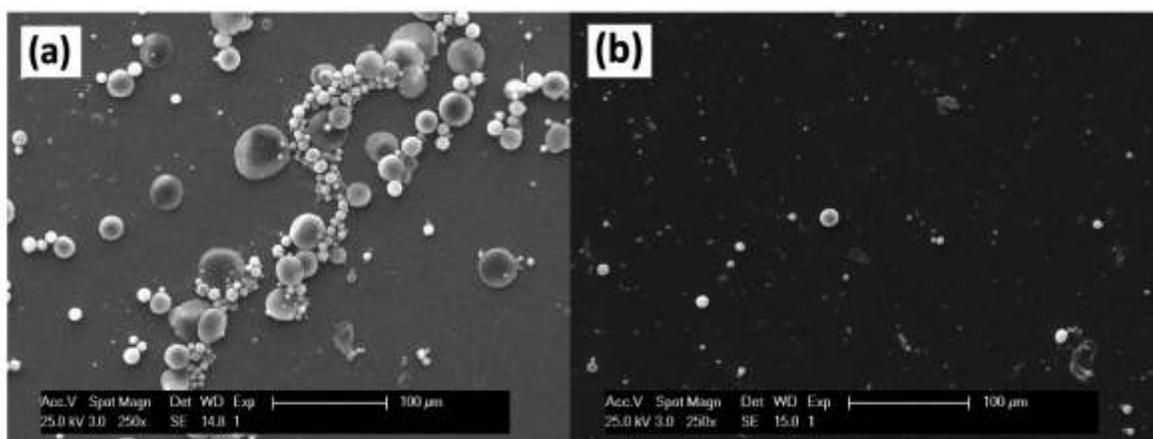
**Figura 22.** Micrografía típica y distribución de tamaño de partícula de la muestra PLGA/PVA<sub>A,ED</sub> con un diámetro medio de  $0.99 \pm 0.32 \mu\text{m}$ .

## 4.2 Fabricación de Microesferas de PBS

En esta sección se presentan y analizan los resultados obtenidos para la fabricación de microesferas de PBS utilizando PVA o alginato como surfactante, por el método de emulsión simple y emulsión doble. Dividiremos la presentación en tres subsecciones, las cuales abordan: el efecto del tipo de surfactante, el efecto del método de preparación y el efecto de la relación entre las concentraciones de polímero y surfactante.

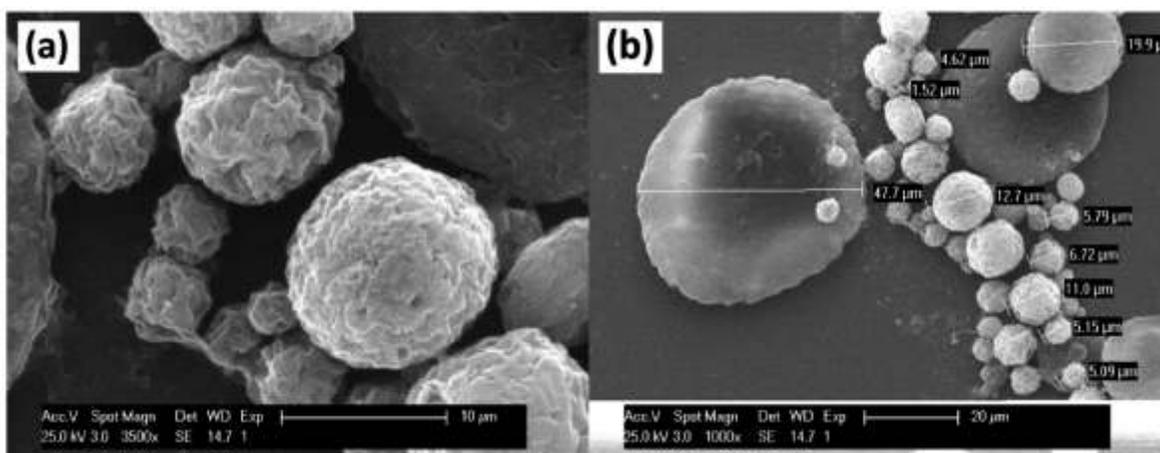
### 4.2.1 Efecto del tipo de surfactante

En la Figura 23 se muestran micrografías para los dos sistemas de PBS utilizando PVA y alginato como surfactante. Se pueden observar en la Figura 23 (a) (sistema PBS/PVA<sub>B,ES</sub>) microesferas con una distribución de tamaños amplia; se aprecian partículas con tamaños en el intervalo entre 10 y 50  $\mu\text{m}$ , aproximadamente. En cambio, para la muestra PBS/Alg<sub>B,ES</sub> observamos muy pocas partículas en la micrografía (Figura 23-(b)). Explicaremos la razón de esto en párrafos posteriores.



**Figura 23.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido: (a) PBS/PVA<sub>B ES</sub> y (b) PBS/Alg<sub>B ES</sub>.

Antes de eso, en la figura 24 presentamos micrografías de SEM para el sistema PBS/PVA<sub>B ES</sub>, en una escala que permite apreciar de mejor manera la textura superficial de las partículas. En las imágenes se puede ver claramente que la morfología de las microesferas para este sistema presenta una superficie rugosa; el tamaño de las partículas es de hasta 48 micrómetros.

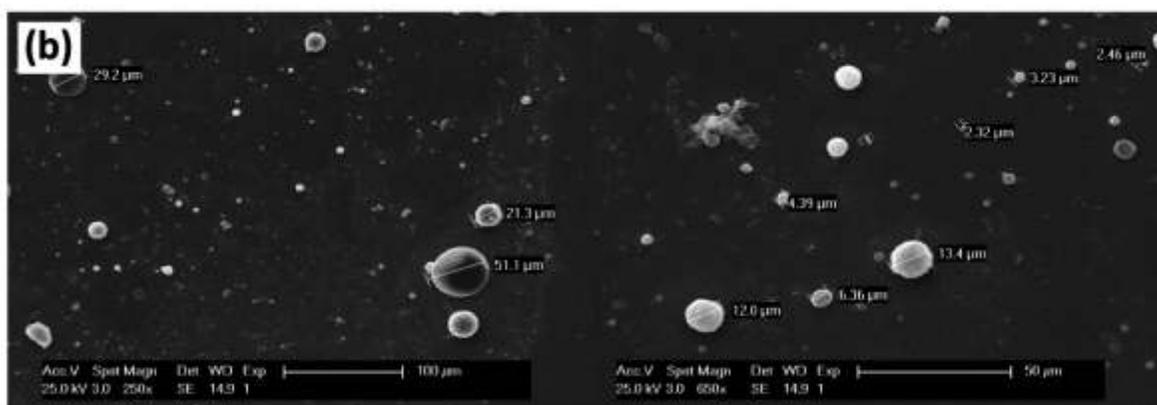


**Figura 24.** Imágenes de SEM para el sistema (a) PBS/PVA<sub>B ES</sub>. Los diámetros de algunas partículas han sido señalados en la imagen de la derecha.

Regresando al sistema PBS/Alg<sub>B ES</sub>, la razón de observar tan pocas partículas en la figura 23-(b) tiene que ver con la aglomeración y precipitación de las microesferas. En efecto, en este sistema de emulsión simple, las microesferas precipitaron en el

proceso de la evaporación del disolvente, aproximadamente después de transcurrir una hora de iniciado el procedimiento. Se siguió el proceso mencionado en la metodología para la recolección de las microesferas sólidas, pero no se pudieron resuspender en agua los grandes agregados del precipitado. Aún así, las muestras fueron analizadas por SEM; los resultados son las micrografías que se muestran en la figura 23-(b) PBS/Alg<sub>B</sub> ES.

Por mediciones realizadas por SEM para este sistema (figura 25) podemos decir que se obtuvieron microesferas con diámetros de hasta 52 micrómetros. La poca cantidad de esferas observadas se debe a que este sistema no es estable con respecto del tiempo de preparación; las partículas precipitan y no es posible suspenderlas de nuevo, al menos con el procedimiento empleado en este trabajo.



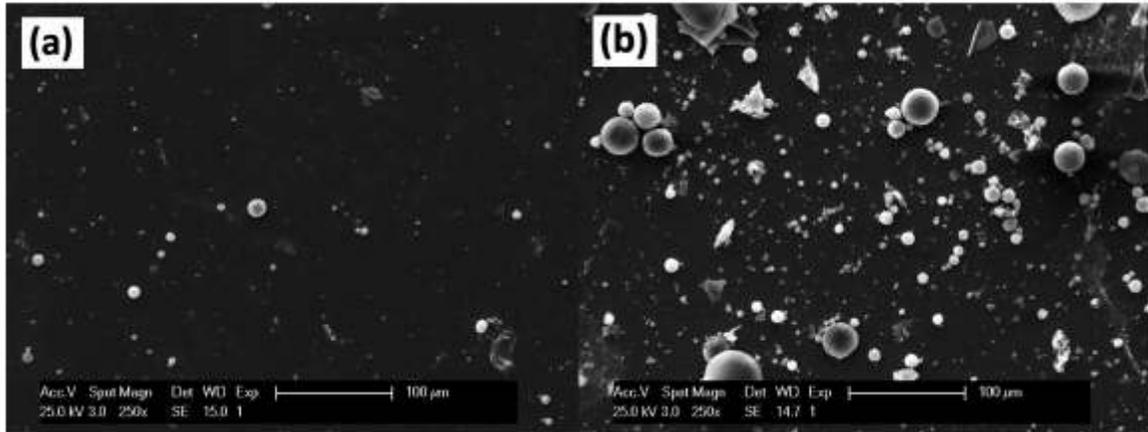
**Figura 25.** Imágenes con tamaños medidos en SEM para el sistema (b) PBS/Alg<sub>B</sub> ES.

De los resultados presentados podemos concluir que con los primeros sistemas de la figura 23 (PBS/PVA<sub>B</sub> ES y PBS/Alg<sub>B</sub> ES) se logró la obtención de las microesferas esperadas.

#### 4.2.2 Efecto del método de preparación

En la Figura 26 se muestra la micrografía de SEM de las microesferas de PBS con alginato a concentraciones bajas (1% m/v) preparadas por emulsión simple y emulsión doble.

Como se puede observar en la Figura 26 se obtienen más microesferas por el método de emulsión doble para el sistema PBS/Alg<sub>B</sub> ED, (Fig 26-(b)) sin embargo las microesferas también precipitaron en este caso para ambos sistemas.

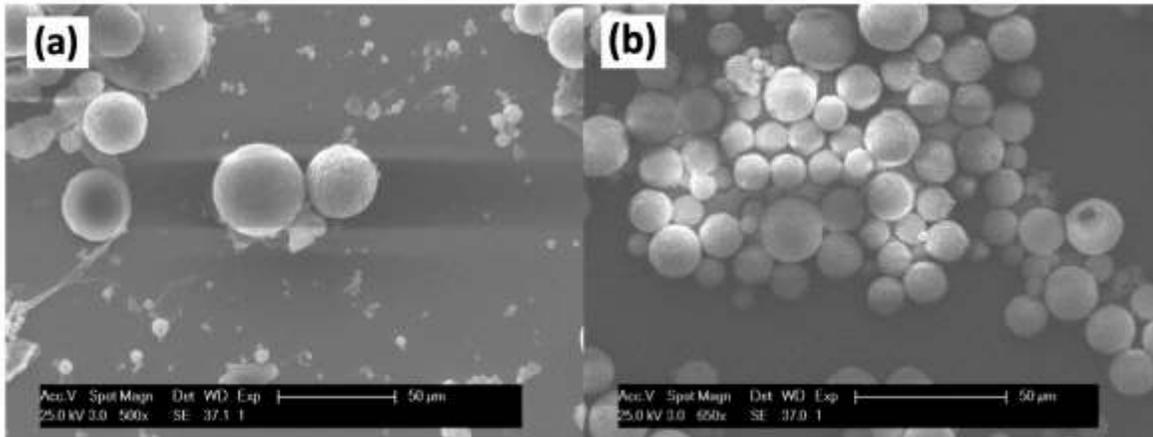


**Figura 26.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido: (a) PBS/Alg<sub>B</sub> ES y (b) PBS/Alg<sub>B</sub> ED.

#### 4.2.3 Efecto de la relación polímero/surfactante

En la Figura 25 se muestra la micrografía de SEM de las microesferas de PBS preparadas por el método de emulsión doble a dos relaciones polímero/surfactante m/m 1:50 y 1:1.6 (0.2% PBS/alginato al 1% y 5% PBS/alginato al 2%) respectivamente.

En las micrografías de la figura 25 se observan microesferas de morfología esférica y rugosa para los dos sistemas PBS/Alg<sub>B</sub> ED (Fig. 27-(a)) y PBS/Alg<sub>A</sub> ED (Fig 27-(b)). Además, se puede observar que algunas microesferas para el sistema PBS/Alg<sub>A</sub> ED presentan poros, los cuales pueden observarse mejor en la figura 28.

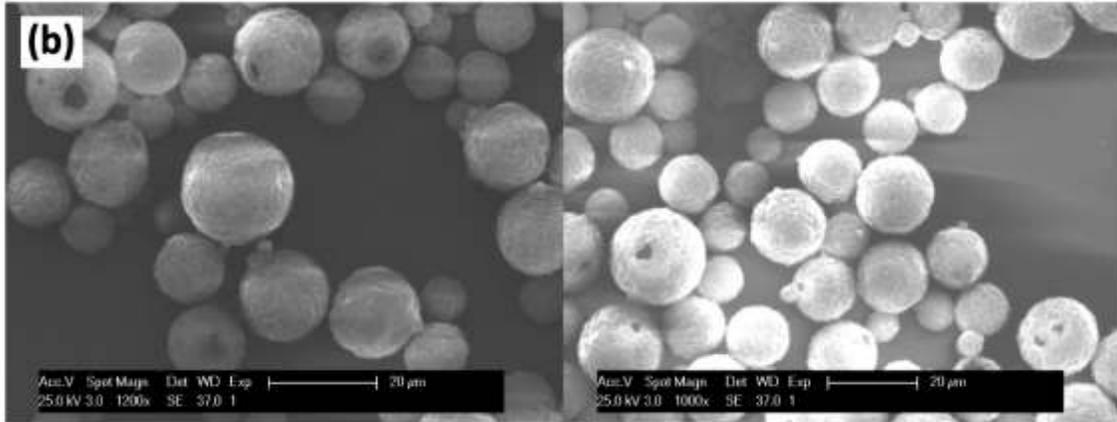


**Figura 27.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido: (a) PBS/Alg<sub>B</sub> ED y (b) PBS/Alg<sub>A</sub> ED.

Cabe señalar que el sistema PBS/Alg<sub>B</sub> ED precipitó durante la etapa de evaporación del solvente. Por lo que a altas concentraciones de surfactante (sistema PBS/Alg<sub>A</sub> ED) es donde se obtiene un sistema estable.

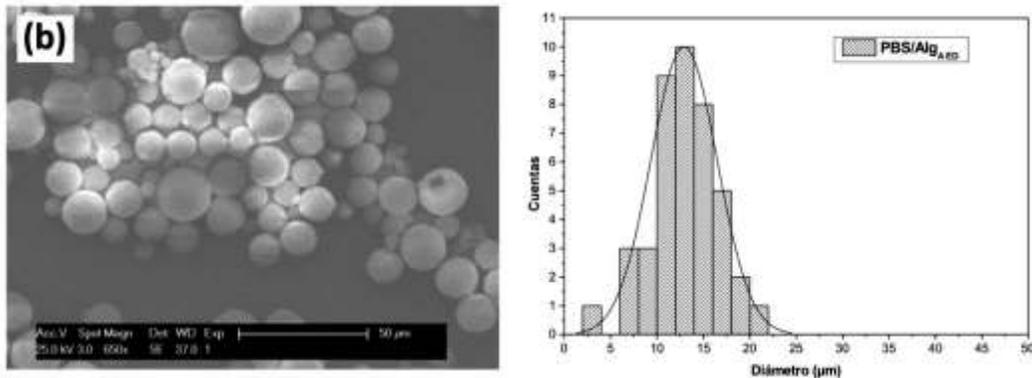
De acuerdo con la literatura morfologías porosas como en la Figura 27-(a) podrían tener aplicaciones interesantes en ingeniería tisular para ser usadas como portadores de fármacos o células, siempre que esos poros sean lo suficientemente grandes para permitir la infiltración celular. Por ejemplo, Kim et al. informaron que las microesferas de PLGA altamente porosas con el tamaño medio de poro de la superficie (aps: a 20  $\mu\text{m}$ ) se encontraron para permitir la infiltración celular y el cultivo [97].

Del mismo modo, los portadores de células con los poros de superficie más grandes que un tamaño de célula (es decir, 10  $\mu\text{m}$ ) [98], como las microesferas de quitosano (aps: 35–60  $\mu\text{m}$ ) [105], se propusieron como portadores de células adecuados para aumentar la unión celular, la proliferación, la diseminación y la protección de las células contra el estrés cortante.



**Figura 28.** Imágenes de SEM para el sistema (b) PBS/Alg<sub>A</sub>ED donde se observa la morfología rugosa y algunos poros.

Con los resultados del sistema de la Figura 28-(b) fue posible hacer un análisis de conteo de 42 partículas usando el software image J, los cuales se presentan en la Figura 29; el diámetro de las microesferas es  $12.90 \pm 3.57\mu\text{m}$ .



**Figura 29.** Distribución de tamaño de partícula obtenido a partir de la micrografía de la muestra PBS/Alg<sub>A</sub>ED con un diámetro de  $12.90 \pm 3.57\mu\text{m}$ .

En la literatura se ha reportado, en el caso de microesferas de PBS usando PVA como surfactante, que un aumento en la relación polímero/surfactante puede modificar el tamaño y la morfología de las microesferas. Es decir, a concentraciones altas de polímero se observa un aumento en la rugosidad y tamaño de las partículas [100].

Esto es debido al hecho de que a medida que la solución de polímero se vuelve más viscosa al aumentar la concentración, se necesita más energía para desintegrar los agregados grandes y crear gotas pequeñas. Por eso la población de microesferas tiende a tener tamaños más grandes. Un aumento similar del tamaño, con la consiguiente modificación en la distribución del tamaño, con el aumento de las concentraciones de polímeros se ha reportado anteriormente [101, 102,].

En el caso del surfactante PVA se reportan estudios donde el aumento de su concentración proporciona condiciones para obtener gotas de emulsión más pequeñas que dan como resultado la formación de microesferas más pequeñas. De manera similar, se demostró que una disminución del tamaño de las nanopartículas de PLGA y las nanocápsulas de poli (hidroxibutirato-covalerato) (PHBV) resultaron del aumento de la concentración de PVA en el medio de emulsificación [103,101].

También se ha demostrado recientemente que la concentración de PVA en las fases acuosas puede cambiar considerablemente la morfología de las partículas, como la relación de aspecto de micropartículas esféricas de PLGA y micropartículas de poli (hidroxibutirato) de una manera no lineal [104,105].

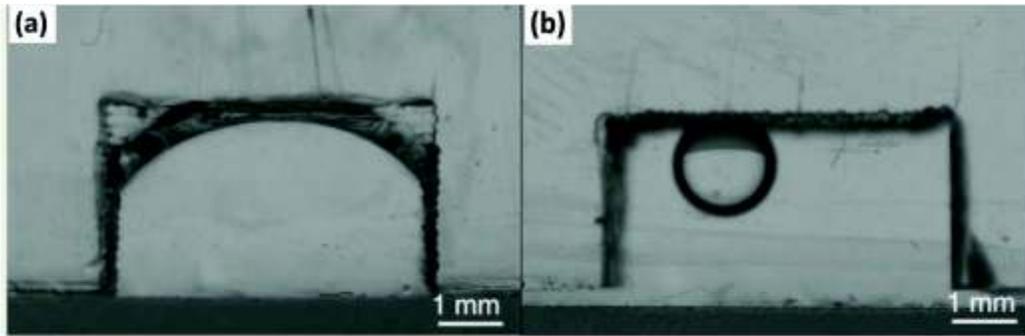
#### **4.3. Diseño y construcción de un dispositivo microfluídico con posibilidades para ser aplicado en la preparación de micropartículas de PLGA.**

En la parte final del trabajo hemos diseñado y construido un dispositivo microfluídico para la preparación de microesferas a través de la formación de gotas de emulsión. El dispositivo es una propuesta para obtener un mejor control sobre las formas, morfologías y distribución de las microesferas poliméricas de PLGA, en comparación con los métodos de emulsión simple y emulsión doble. Cabe señalar la importancia de controlar el tamaño de partícula y la distribución en usos farmacéuticos tales como la encapsulación de fármacos [106] y la administración controlada de fármacos [107].

La formación de microesferas poliméricas por emulsión utilizando un dispositivo microfluídico puede ocurrir aprovechando diferentes mecanismos que dependen de la geometría del dispositivo, las propiedades macroscópicas de los líquidos y los

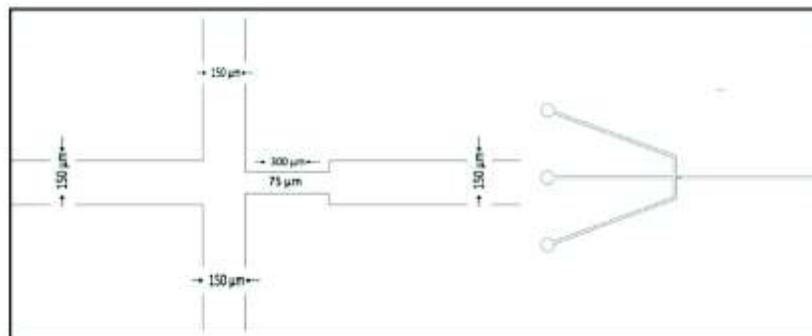
flujos de estos.

Los dispositivos microfluídicos más comúnmente utilizados incluyen las uniones en “T” [116-108, 117-109], los dispositivos de enfoque de flujo [110,108], y los dispositivos en los que los hilos líquidos se rompen en los microcanales [109, 110]. En los dispositivos desarrollados para la emulsificación microfluídica se ha empleado ampliamente la geometría de enfoque de flujo [110, 111, 112]. La idea general de esta geometría consiste en enfocar una corriente de un fluido usando el flujo de otro fluido inmiscible. De esta manera, la corriente central está rodeada por los flujos de las corrientes laterales, evitando por ejemplo el efecto humectante [113]. El efecto humectante o mojabilidad es la capacidad que tiene un líquido de extenderse y dejar una traza sobre un sólido. Depende de las interacciones moleculares entre las moléculas superficiales de ambas sustancias. Se puede determinar a partir del ángulo que el líquido forma en la superficie de contacto con el sólido, denominado ángulo de contacto; a menor ángulo de contacto, es mayor el efecto humectante [114]. El efecto de humectación aparece cuando las superficies de los canales de PDMS están impropriadamente adaptadas ya sea hidrofóbica o hidrofílicamente; el resultado es que se logra un mal control sobre la generación de gotas. Por ejemplo, en la figura 30-(a) observamos un canal de PDMS sin tratar. Tenga en cuenta la fuerte humectación de la fase de aceite en las paredes del canal. Mientras que en la figura 30-(b) los canales de PDMS fueron tratados con PVA mediante la oxidación con plasma (100 W durante 1 min). Tenga en cuenta la falta de humectación por la gota de aceite en la superficie del canal hidrófilo [115].



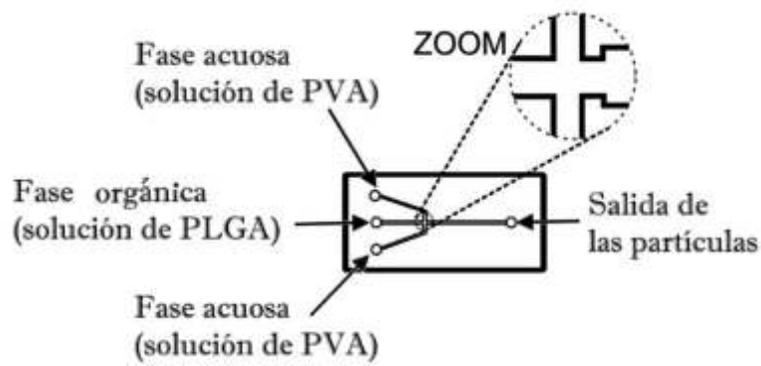
**Figura 30.** Efecto de humectación de gotas aceite en agua en un canal de PDMS. (a) Superficie del canal de PDMS sin tratar. (b) Superficie del canal de PDMS tratada con PVA [115].

En otro estudio se ha demostrado que se pueden producir emulsiones monodispersas y polidispersas [110] utilizando una configuración centrada en el flujo integrada en microcanales fabricados con la técnica de litografía blanda [116]. Los autores observaron que las gotas producidas pueden ser mucho más pequeñas que el radio del orificio; en este caso el tamaño de la gota depende de los flujos. Basándonos en los estudios previos mencionados, la configuración que se propuso en nuestro trabajo consiste en un dispositivo en forma de “Y” (Fig. 31). La geometría en forma de “Y” considera tres canales de entrada, para suministrar los materiales para la preparación de las partículas. Los canales de entrada confluyen en un único canal de salida. Además, se agregó una pequeña cintura en la zona de confluencia de los canales de entrada (Fig. 31).



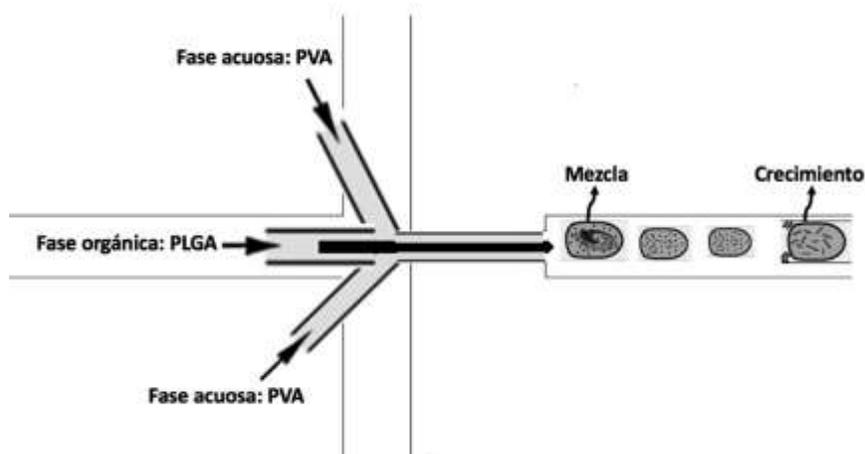
**Figura 31.** Diseño del dispositivo microfluídico en forma de “Y”; se muestran las dimensiones específicas de los canales construidos. La parte encerrada en línea punteada se ha amplificado a la derecha.

La geometría del dispositivo propuesto está concebida para fabricar microesferas poliméricas. Se espera que este proceso ocurra por el siguiente mecanismo: la solución (en solvente orgánico) de polímero, en nuestro caso PLGA, llega por la entrada central (figura 32). Al mismo tiempo, por las entradas laterales se hace fluir una solución del surfactante (PVA). El efecto de la fuerza de corte de ambos flujos laterales es envolver el flujo central, el cual se “enfoca” para entrar al lugar donde se ha dispuesto la cintura estrecha en el canal de salida. Como los flujos son laminares debido al bajo número de Reynolds, el flujo central adopta la forma de un hilo o cilindro continuo.



**Figura 32.** Diseño de enfoque de flujo en forma de “Y” del dispositivo de microfluídica. Se señalan además los líquidos de entrada y salida en cada canal. La zona ampliada muestra la cintura en la zona de confluencia de los canales de entrada.

Debido a la fuerza impuesta por la estrechez de la cintura, en este tipo de geometrías ocurre una ruptura altamente periódica del hilo de la fase enfocada, lo cual produce gotas de emulsión (la fase orgánica dispersa en la fase acuosa con el surfactante en la interfaz) con distribución estrecha de tamaños [109, 110]. En la figura 33 mostramos un esquema de la formación de dichas gotas. El desprendimiento de las gotas ocurre en un punto fijo debido al cambio brusco de velocidad creado por la geometría de la pequeña cintura. La fuerza de corte más alta ocurre en el punto más estrecho permitiendo así la formación de gotas continuamente (Fig. 33). Dado que el polímero queda confinado en las gotas de la fase orgánica, ahí ocurre el proceso que lleva al crecimiento de las microesferas deseadas.



**Figura 33.** Esquema de la formación de las gotas de emulsión y del crecimiento subsiguiente de las microesferas en el dispositivo de microfluídica.

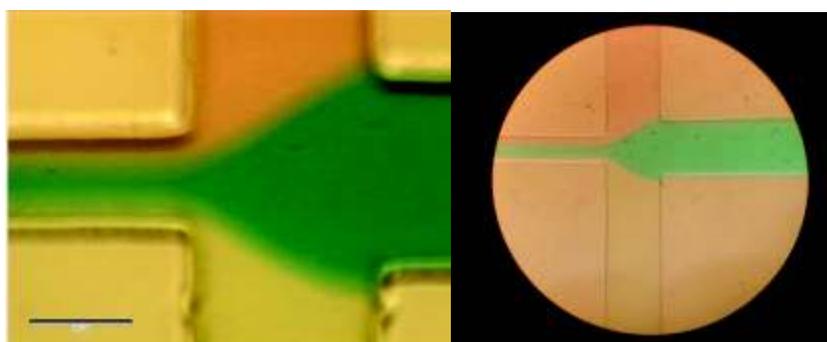
Para fabricar el dispositivo concebido según los principios anteriormente descritos, se realizó su dibujo con el *software* AutoCAD. El diseño se imprimió con alta calidad en una imprenta de la ciudad de Hermosillo. El dispositivo tiene las siguientes dimensiones externas: tres centímetros de largo, dos centímetros de ancho y 5 milímetros de altura. Cada canal tiene un ancho de 150 micrómetros; el ancho de la cintura de enfoque del flujo es de 75 micrómetros (Fig. 31).

En la figura 34 se muestran cuatro dispositivos microfluídicos fabricados según nuestro diseño y siguiendo la metodología descrita en la sección 3.2.



**Figura 34.** Dispositivos microfluídicos fabricados en el laboratorio.

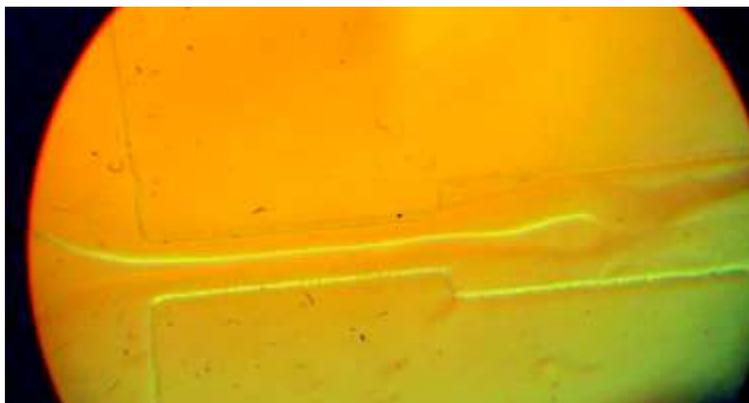
Para probar la continuidad interna de los flujos en nuestros dispositivos, estos fueron utilizados haciendo fluir soluciones de tres colorantes orgánicos; el comportamiento fue observado en un microscopio óptico. Podemos decir que los resultados fueron exitosos: nuestros dispositivos presentan continuidad a los diferentes flujos, es decir, no existen fugas u obstáculos a los mismos. En la figura 35 mostramos fotografías tomadas de las observaciones con el microscopio óptico donde se observan los diferentes colorantes orgánicos: rosa y amarillo para los canales laterales y para el canal central el colorante orgánico es de color azul.



**Figura 35.** Imágenes de microscopía óptica tomadas durante la prueba del dispositivo microfluídico con tres colorantes orgánicos. Nótese los diferentes colores en los flujos de entrada: rosa (canal vertical superior), amarillo (canal vertical inferior) y azul (canal horizontal).

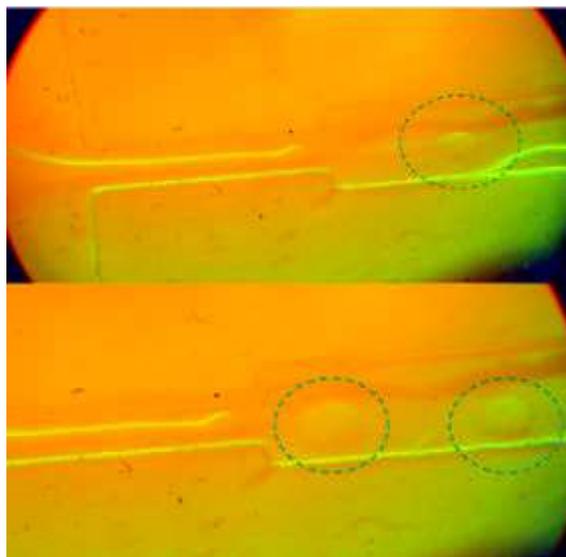
Una vez verificada la continuidad de los flujos en nuestro dispositivo, procedimos a realizar experimentos preliminares con el objetivo de verificar que se obtienen gotas de emulsión, como una primera etapa en la formación de las esferas poliméricas. Las tres entradas del dispositivo de microfluídica fueron concebidas para suministrar el material necesario para la preparación de las partículas. Como se observa en la figura 33, por las dos entradas de laterales llega la solución acuosa de PVA al 1% (m/v) en 50 mL de agua mili Q. La entrada central lleva la fase orgánica del polímero PLGA al 0.2% (m/v) en 5 mL de Carbonato de dimetilo (DMC). El dispositivo cuenta con una salida para recolectar las muestras obtenidas. Se espera que las partículas se formen al unirse los flujos que llevan los materiales de entrada. Las observaciones en el microscopio óptico nos permiten decir que el dispositivo

construido tiene el comportamiento esperado, al menos en lo que se refiere a los flujos y a la formación de gotas. Por ejemplo, en la figura 36 se puede apreciar cómo se observan los flujos al pasar por la región de la cintura del dispositivo.



**Figura 36.** Imagen donde se observa el flujo de la fase orgánica al pasar por la cintura del dispositivo; las soluciones utilizadas contienen PLGA al 0.2% de PLGA y PVA al 1%. Nótese que hay una gota en formación en el extremo derecho del hilo de flujo.

En la figura 37 se muestran imágenes donde se aprecia claramente la formación de las gotas de emulsión. Podemos observar entonces que nuestro dispositivo funcionó apropiadamente, al menos hasta la etapa de formación de gotas de emulsión. Queda para una etapa posterior del trabajo determinar las características de las partículas poliméricas formadas en dichas gotas.



**Figura 37.** Imagen donde se observa la formación de gotas de emulsión. Las soluciones fueron las mismas que en la figura 36.

Cabe mencionar que, debido a condiciones inherentes al equipo utilizado, durante los experimentos no se pudo controlar completamente el caudal o la presión en el flujo: hubo fluctuaciones en ambos valores, atribuibles al tipo de instrumentos utilizados. Por tal razón no se pudo estudiar si existe una dependencia del tamaño de las gotas de emulsión con estos parámetros, tal como se ha reportado en la literatura [111, 117, 118].

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

En la primera parte de nuestro trabajo se prepararon microesferas de dos polímeros biodegradables (PLGA y PBS) con los métodos de emulsión simple y emulsión doble con el fin de comparar los resultados en cuanto a tamaños y morfologías de las partículas.

Las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) confirmaron que en ambos casos se obtuvieron micropartículas de forma esférica. Los análisis de SEM mostraron que las microesferas de ambos materiales presentan diferente morfología superficial: en el caso del PLGA la superficie es lisa mientras que en el caso del PBS la textura es rugosa. Las microesferas obtenidas con PBS utilizando PVA como surfactante presentaron tamaños homogéneos.

El diámetro de las microesferas fue medido con el software de image J. En el caso de microesferas del sistema PLGA/PVA<sub>B</sub> ES el resultado fue  $1.5 \pm 0.59 \mu\text{m}$  para el método de emulsión simple y  $1.04 \pm 0.32 \mu\text{m}$  para el sistema de emulsión doble de MS PLGA/PVA<sub>B</sub> ED. De lo cual se puede concluir que el tamaño de la microesfera no se ve afectado por el método de preparación. Por lo tanto, concluimos que se puede proponer el método más sencillo (emulsión simple) para la preparación de estos sistemas.

Tras el estudio en función del tipo de surfactante para las microesferas de PLGA comprobamos que, usando otro surfactante, el PAA, es posible también obtener las esferas con tamaños del mismo orden de magnitud. No obstante, sería necesario encontrar condiciones más idóneas para trabajar con el surfactante PAA, si se quieren obtener mejores rendimientos.

Para preparar microesferas de PBS se estudiaron tres tipos de sistemas: *PBS/Alg<sub>B</sub> ES*, *PBS/Alg<sub>B</sub> ED* y *PBS/Alg<sub>A</sub> ED*. Los dos primeros sistemas fueron fabricados con dos métodos diferentes, pero a concentraciones iguales. De los resultados podemos

concluir que a relaciones de polímero/surfactante m/m 1:50 (0.2% PBS/alginato al 1%) se consiguió la formación de microesferas; sin embargo, estos sistemas no son estables durante la evaporación del solvente.

Cuando se prepararon partículas por el método de emulsión doble con el sistema *PBS/Alg<sub>AED</sub>* a concentraciones altas y con una relación de polímero/surfactante m/m 1:1.6 (5% PBS/alginato al 2%) se logró obtener microesferas de un diámetro de  $12.90 \pm 3.57 \mu\text{m}$ . En este caso, el sistema es estable con el tiempo: no precipita.

En la segunda parte del trabajo propusimos, en base a la revisión bibliográfica y a nuestras condiciones experimentales, un diseño de un dispositivo microfluídico. El dispositivo fue construido exitosamente utilizando el proceso de fotolitografía suave.

Varios dispositivos de microfluídica fabricados según nuestro diseño fueron probados con colorantes orgánicos y se verificó la continuidad de los flujos por los canales.

Con dichos dispositivos se realizaron experimentos preliminares, siguiendo los primeros pasos para la obtención de microesferas de PLGA. Fue posible observar por microscopía óptica el flujo de la fase orgánica (solución de PLGA) y su comportamiento en un tiempo determinado. Además, se corroboró la formación de gotas durante el proceso de emulsificación microfluídica. Con lo cual concluimos que la microfluídica proporciona una alternativa para producir emulsiones simples, fabricando con precisión una gota a la vez.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Uno de los trabajos futuros será mejorar las condiciones de procesado para la preparación de esferas de PLGA usando el PAA como surfactante para conseguir mayor rendimiento de producción. Para ello pueden variar algunos de los parámetros experimentales, tal como se hizo en el caso de las microesferas de PBS/Alg.

De igual forma, una vez mostrado que se obtienen microesferas por los métodos desarrollados en esta tesis, sería deseable profundizar en la caracterización de las partículas, así como estudiar con más detalle y en otros intervalos de valores, el efecto de cambiar los parámetros en la preparación.

Una continuación natural del trabajo sería obtener y caracterizar las microesferas de ambos polímeros por el método de síntesis microfluídica, utilizando el dispositivo diseñado y construido en esta tesis.

## REFERENCIAS

- [1] Vladimir Torchilin, Recent Approaches to Intracellular Delivery of Drugs and DNA and Organelle Targeting, (2006) doi: 10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095735
- [2] D.F. Williams, On the nature of biomaterials, *Biomaterials* 30 (2009) 5897–5909.
- [3] D.F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility, *Biomaterials* 29 (2008) 2941–2953.
- [4] B.D. Ulery, L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biomedical applications of biodegradable polymers, *J. Polym. Sci. Polym. Phys.* 49 (2011) 832–864.
- [5] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier, *Polymers (Basel)* 3 (2011) 1377–1397.
- [6] Shweta Sharma, Ankush Parmar, Shivpoojan Kori, Rajat Sandhir, PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications, *Trends in Analytical Chemistry*, 80 (2016) 30-40
- [7] Matteo Gigli, Martina Fabbri, Nadia Lotti, Rita Gamberini, Bianca Rimini, Andrea Munari, Poly (butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review, *European Polymer Journal* 75 (2016) 431–460
- [8] Donald Askeland, Pradeep P. Phule-Ciencia e ingenieria de los materiales-Thomson International (2004).
- [9] Shalaby SW, Burg KJL, editors. *Absorbable and biodegradable polymers (advances in polymeric materials)*. Boca Raton: CRC press; 2003.
- [10] Domb AJ, Wiseman DM, editors. *Handbook of Biodegradable Polymers*. Boca Raton: CRC Press; 1998.
- [11] Piskin E. Biodegradable polymers as biomaterials. *J Biomat Sci Polym Ed* 1995 ; 6 :775–95.
- [12] Barbucci R, editor. *Integrated biomaterial science*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002.
- [13] Lloyd AW. Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility. *Med Device Technol* 2002; 13:18–21.
- [14] Lakshmi S. Naira, Cato T. Laurencina, Biodegradable polymers as biomaterials, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 762–798.

- [15] Vert M. Aliphatic polyesters: great degradable polymers that cannot do everything. *Biomacromolecules* 2005; 6:538–46.
- [16] Katti DS, Lakshmi S, Langer R, Laurencin CT. Toxicity, biodegradation and elimination of polyanhydrides. *AdvDrug Deliv Rev* 2002; 54:933–61.
- [17] <http://www.softmatpol.iem.csic.es/index.html>
- [18] Virginia Sáez, Estíbaliz Hernáez, Leire López e Issa Katime, “LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS. MICROPARTÍCULAS”, *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 4(3)*, septiembre 2003.
- [19] *Polymers for controlled drug delivery*/editor, Peter J. Tarcha.
- [20] Schäffner B, Schäffner F, Verevkin SP: Organic carbonates as solvents in synthesis and catalysis. *Chem. Rev.* 2010, 110: 4554 – 4581.
- [21] Birnbaum DT, Kosmala JD, Henthorn DB, Brannon-Peppas L. Controlled release of beta-estradiol from PLAGA microparticles: the effect of organic phase solvent on encapsulation and release. *J Control Release* 2000; 65:375–387.
- [22] Jeon HJ, Jeong Y, Jang MK, Park YH, Nah JW. Effect of solvent on the preparation of surfactant-free poly(-lactide-co-glycolide) nanoparticles and norfloxacin release
- [23] Mellor, J. W. *Química inorgánica moderna*. Librería y Editorial El Ateneo. Buenos Aires, 1947.
- [24] *Cloroformo. Documentación toxicología*. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (2007). España.
- [24] «Hoja de seguridad VII. Cloroformo». Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [36] *Colloids and Interfaces with Surfactants and Polymers – An Introduction* J. W. Goodwinß 2004 John Wiley & Sons, Ltd ISBN: 0-470-84142-7 (HB) ISBN: 0-470-84143-5 (PB).
- [27] Vandervoort J, Ludwig A. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. *Int J Pharm* 2002; 238:77–92.
- [28]. Manfred L. Hallensleben "Polyvinyl Compounds, Others" in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2000, Wiley-VCH, Weinheim. doi:10.1002/14356007.a21\_743.

- [29] Efrén Hernández B., Rodolfo Cruz R., Fanny Robledo S. y Lucrecia Santo M., “Caracterización del alcohol polivinílico usado en recubrimientos de base acuosa”, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 2007, ISSN: 1870-0195.
- [30] Smidsrod O, Skjak-Bræk G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trend Biotechnol* 1990; 8:71–8.
- [31] Clark DE, Green HC. Alginic acid and process of making same. US Patent 2036922; 1936.
- [32] Remminghorst U, Rehm BHA. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol Lett* 2006; 28:1701–12.
- [33] Rinaudo M. On the abnormal exponents and  $aD$  in Mark–Houwink type equations for wormlike chain polysaccharides. *Polym Bull* 1992; 27:585–9.
- [34] LeRoux MA, Guilak F, Setton LA. Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration. *J Biomed Mater Res* 1999; 47:46–53.
- [35]. 4. Schmolka, I. R., Polyalkylene oxide block copolymers, in *Nonionic Surfactants*, Schick, M. J., Ed., Marcel Dekker, New York, 1967, chap. 10.
- [36]. LawTK, WhateleyTL, FlorenceAT(1984) *InteAT(1984)IntJPharm*21:227
- [37] V R Gowariker, Vasant R. Gowariker, N. V. Viswanathan, Jayadev Sreedhar. *Polymer Science*. p. 232. ISBN 0-85226-307-4.
- [38] Orwoll, Robert A.; Yong, Chong S. (1999). «Poly (acrylic acid) ». En James E., Mark. *Polymer Data Handbook*. Oxford University Press, Inc. pp. 252-253. ISBN 978-0195107890.
- [39] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier, *Polymers (Basel)* 3 (2011) 1377–1397
- [40] F. Danhier, E. Ansorena, J.M. Silva, R. Coco, A. Le, V. Breton, et al., based nanoparticles: an overview of biomedical applications, *J. Control. Release* 161 (2012) 505–522.
- [41] A. Prokop, J.M. Davidson, Nanovehicular intracellular delivery systems, *J.Pharm. Sci.* 97 (2008) 3518–3590.

- [42] G. Schliecker, C. Schmidt, S. Fuchs, T. Kissel, Characterization of a homologous series of D,L-lactic acid oligomers; a mechanistic study on the degradation kinetics in vitro, *Biomaterials* 24 (2003) 3835–3844.
- [43] S.J. Siegel, J.B. Kahn, K. Metzger, K.I. Winey, K. Werner, N. Dan, Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 64 (2006) 287–293.
- [44] Matteo Gigli, Martina Fabbri, Nadia Lotti, Rita Gamberini, Bianca Rimini, Andrea Munari, Poly (butylene succinate)-based polyesters for biomedical applications: A review, *European Polymer Journal* 75 (2016) 431–460.
- [45] M. Gigli, N. Lotti, M. Gazzano, L. Finelli, A. Munari, Novel eco-friendly random copolyesters of poly (butylene succinate) containing ether-linkages, *React. Funct. Polym.* 72 (2012) 303–310.
- [46] M. Soccio, N. Lotti, L. Finelli, M. Gazzano, A. Munari, Influence of transesterification reactions on the miscibility and thermal properties of poly (butylene/diethylene succinate) copolymers, *Eur. Polym. J.* 44 (2008) 1722–1732.
- [47] E.S. Yoo, S.S. Im, Melting behaviour of poly (butylene succinate) during heating scan by DSC, *J. Polym. Sci. Polym. Phys.* 37 (1999) 1357–1366.
- [48] J. Xu, B.H. Guo, Poly (butylene succinate) and its copolymers: research, development and industrialization, *Biotechnol. J.* 5 (2010) 1149–1163.
- [49] T. Miyata, T. Masuko, Crystallization behaviour of poly (tetramethylene succinate), *Polymer* 39 (1998) 1399–1404.
- [50] G.Z. Papageorgiou, D.N. Bikiaris, Crystallization and melting behavior of three biodegradable poly (alkylene succinates). A comparative study, *PolymeR46* (2005) 12081–12092.
- [51] M. Fabbri, M. Gigli, R. Gamberini, N. Lotti, M. Gazzano, B. Rimini, A. Munari, Hydrolysable PBS-based poly (ester urethane) s thermoplastic elastomers, *Polym. Degrad. Stab.* 108 (2014) 223–231.
- [52] F. Wu, C.L. Huang, J.B. Zeng, S.L. Li, Y.Z. Wang, Synthesis and characterization of segmented poly (butylene succinate) urethane ionenes containing secondary amine cation, *Polymer* 55 (2014) 4358–4368.

- [53] H. Wang, J. Ji, W. Zhang, J. Jiang, Z. Wu, S. Pu, P.K. Chu, Biocompatibility and bioactivity of plasma-treated biodegradable poly (butylene succinate), *Acta Biomater.* 5 (2009) 279–287.
- [54] T. Fujimaki, Processability and properties of aliphatic polyesters, 'BIONOLLE', synthesized by polycondensation reaction, *Polym. Degrad. Stab.* 59 (1998) 209–214.
- [55] C.S. Wu, Y.C. Hsu, H.T. Liao, F.S. Yen, C.Y. Wang, C.T. Hsu, Characterization and biocompatibility of chestnut shell fiber-based composites with polyester, *J. Appl. Polym. Sci.* 131 (2014). 40730 (1–10).
- [56] J.X. Tang, Q.Y. Wu, Mesenchymal stem cellular adhesion and cytotoxicity study of random biopolyester scaffolds for tissue engineering, *J. Mater. Sci. – Mater. Med.* 17 (2006) 627–632.
- [57] M. Tallawi, D.C. Zebrowski, R. Rai, J.A. Roether, D.W. Schubert, M. El Fray, F.B. Engel, K.E. Aifantis, A.R. Boccaccini, Poly (glycerol sebacate)/poly (butylene succinate-dilinoleate) (PGS/PBS–DLA) fibrous scaffolds for cardiac tissue engineering, *Tissue Eng. Pt. C Methods* 20 (2014) 412–422.
- [58] A.R. Costa-Pinto, A.M. Martins, M.J. Castellhano-Carlos, V.M. Correlo, P.C. Sol, A. Longatto-Filho, R.L. Reis, N.M. Neves, In vitro degradation and in vivobiocompatibility of chitosan poly (butylene succinate) fiber mesh scaffolds, *J. Bioact. Compat. Polym.* 29 (2014) 137–151.
- [59] V.P. Ribeiro, A.S. Ribeiro, C.J. Silva, N.F. Durães, G. Bonifácio, V.M. Correlo, A.P. Marques, R.A. Sousa, A.L. Oliveira, R.L. Reis, Evaluation of Novel 3D architectures based on knitting technologies for engineering biological tissues, *J. Donghua Univ.* 5 (2013) 421–426.
- [60] S.J. Park, Y.M. Lee, S.K. Hong, Release behaviors of porous poly (butylene succinate)/poly(e-caprolactone) microcapsules containing indomethacin, *Colloid Surf., B* 47 (2006) 211–215.
- [61] J. Liu, Z. Jiang, S. Zhang, W.M. Saltzman, Poly(x-pentadecalactone-co-butylene-co-succinate) nanoparticles as biodegradable carriers for camptothecin delivery, *Biomaterials* 30 (2009) 5707–5719.

- [62] P. Meesap, P. Uppanan, B. Thavornnyutikarn, W. Kosorn, W. Janvikul, Surface hydrolysed poly (butylene succinate) microspheres incorporated carboxymethylchitosan scaffolds for cartilage tissue engineering, *J. Met. Mater. Miner.* 20 (2010) 107–111.
- [63] A. Jager, D. Gromadzki, E. Jager, F.C. Giacomelli, A. Kozłowska, L. Kobera, J. Brus, B. Rihova, M. El Fray, K. Ulbrich, P. Stepanek, Novel “soft” biodegradable nanoparticles prepared from aliphatic based monomers as a potential drug delivery system, *Soft Matter* 8 (2012) 4343–4354.
- [64] E. Jager, A. Jager, P. Chytril, T. Etrych, B. Rihova, F.C. Giacomelli, P. Stepanek, K. Ulbrich, Combination chemotherapy using core–shell nanoparticles through the self-assembly of HPM-based copolymers and degradable polyester, *J. Control. Release* 165 (2013) 153–161.
- [65] J.-S. Choi, K. Seo, J.-W. Yoo, Recent advances in PLGA particulate systems for drug delivery, *J. Pharm. Investig.* 42 (2012) 155–163.
- [66] S. Mao, J. Xu, C. Cai, O. Germershaus, A. Schaper, T. Kissel, Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres, *Int. J. Pharm.* 334 (2007) 137–148.
- [67] G. Mittal, D.K. Sahana, V. Bhardwaj, M.N. Ravi Kumar, Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo, *J. Control. Release* 119 (2007) 77–85.
- [68] M. Garinot, V. Fievez, V. Pourcelle, F. Stoffelbach, A. des Rieux, L. Plapied, et al., PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination, *J. Control. Release* 120 (2007) 195–204.
- [69] F.S.T. Mirakabad, K. Nejati-Koshki, A. Akbarzadeh, M.R. Yamchi, M. Milani, N. Zarghami, et al., PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15 (2014) 517–535.
- [70] S.Y. Soon, J. Harbidge, N.J. Titchener-Hooker, and P.A. Shamlou: “Prediction of Drop Breakage in an Ultra Velocity Jet Homogenizer.” *J. Chem. Eng. Jpn.* 34, 640 (2001).

- [71] S. Mohan and G. Narsimham: "Coalescence of Protein-Stabilized Emulsions in a High-Pressure Homogenizer." *J. Colloid Interface Sci.* 192, 1 (1997).
- [72] P. Paquin: "Technological Properties of High-Pressure Homogenizers: The Effect of Fat Globules, Milk Proteins, and Polysachharides." *Int. Dairy J.* 9, 329 (1999).
- [73] S. Broßel and H. Schubert: "Investigation of the Role of Surfactants in Mechanical Emulsification Using a High-Pressure Homogenizer with an Orifice Valve." *Chem. Eng. Process.* 38, 533 (1999).
- [74] G. Narsimham and P. Goel: "Drop Coalescence During Emulsion Formation in a High-Pressure Homogenizer for Tetradecane-in-Water Emulsion Stabilized by Sodium Dodecyl Sulfate." *J. Colloid Interface Sci.* 238, 420 (2001).
- [75] R.A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials* 21 (2000) 2475–2490.
- [76] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly Lactic-co-Glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier, *Polymers (Basel)* 3 (2011) 1377–1397.
- [77] S. Mao, J. Xu, C. Cai, O. Germershaus, A. Schaper, T. Kissel, Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres, *Int. J. Pharm.* 334 (2007) 137–148.
- [78] F.S.T. Mirakabad, K. Nejati-Koshki, A. Akbarzadeh, M.R. Yamchi, M. Milani, N. Zarghami, et al., PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15 (2014) 517–535.
- [79] "Microfluidic Reactors for Polymer Particles", Book Author(s): Eugenia Kumacheva Piotr Garstecki, First published: 22 February 2011, <https://doi.org/10.1002/9780470979228.index>
- [80] S. Freiberg, X.X. Zhu, Polymer microspheres for controlled drug release, *Int. J. Pharm.* 282 (2004) 1–18.
- [81] N. Kamaly, Z. Xiao, P.M. Valencia, A.F. Radovic-Moreno, O.C. Farokhzad, Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 2971–3010.

- [82] C.-X. Zhao, Multiphase flow microfluidics for the production of single or multiple emulsions for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65 (2013) 1420–1446.
- [83] T. Watanabe, T. Ono, Y. Kimura, Continuous fabrication of monodisperse polylactide microspheres by droplet-to-particle technology using microfluidic emulsification and emulsion-solvent diffusion, *Soft Matter* 7 (2011) 9894–9897.
- [84] C.Y. Liao, Y.C. Su, Formation of biodegradable microcapsules utilizing 3D, selective- ly surface-modified PDMS microfluidic devices, *Biomed. Microdevices* 12 (2010) 125–133.
- [85] S. Freitas, H.P. Merkle, B. Gander, Microencapsulation by solvent extraction/ evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology, *J. Control. Release* 102 (2005) 313–332.
- [86] N.V. Jyothi, P.M. Prasanna, S.N. Sakarkar, K.S. Prabha, P.S. Ramaiah, G.Y. Srawan, Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency, *J. Microencapsul.* 27 (2010) 187–197.
- [87] G.T. Vladislavljević, H. Shahmohamadi, D.B. Das, E.E. Ekanem, Z. Tauanov, L. Sharma, Glass capillary microfluidics for production of monodispersed poly (dl-lactic acid) and polycaprolactone microparticles: experiments and numerical simulations, *J. Colloid Interface Sci.* 418 (2014) 163–170.
- [88] Q. Xu, M. Hashimoto, T.T. Dang, T. Hoare, D.S. Kohane, G.M. Whitesides, R. Langer, D.G. Anderson, Preparation of monodisperse biodegradable polymer microparticles using a microfluidic flow-focusing device for controlled drug delivery, *Small* 5 (2009) 1575–1581.
- [89] Byung Kook Lee, Yeonhee Yun, Kinam Park, PLA micro- and nano-particles *Advanced Drug Delivery Reviews* 107 (2016) 176–191
- [90] Thejus Baby, Yun Liu, Anton P.J. Middelberg, Chun-Xia Zhao, “Fundamental studies on throughput capacities of hydrodynamic flow-focusing microfluidics for producing monodisperse polymer nanoparticles”, *Chemical Engineering Science* 169 (2017) 128–139.
- [91] Cahn, R. W.; Haasen, P.; Kramer, E. J. -- *Materials Science and Technology* “Scanning Electron Microscopy”, [doi 10.1002%2F9783527603978.mst0012].

- [92] J Liu, B Cai, J Zhu, G Ding, X Zhao, C Yang, and D Chen. Process research of high aspect ratio microstructure using SU-8 resist. *Microsystem Technologies*, 10(4):265–268, May 2004.
- [93] NT Nguyen. *Fundamentals and applications of microfluidics*, 2002.
- [94] A. belkind and S. Gershman. *Plasma cleaning of Surfaces*. *Vacuum Technology & Coating* 2008.
- [95] Aurora Perez, Rebeca Hernández, Diego Velasco, Dan Voicu, Carmen Mijangos. . Poly (lactic-co-glycolic acid) particles prepared by microfluidics and conventional methods. Modulated particle size and rheology. *Journal of Colloid and Interface Science* 441 (2015) 90–97.
- [96] Rescignano N, Tarpani L, Tiribuzi R, Montesano S, Martino S, Latterini L, Kenny JM, Armentano I (2013) Protein encapsulation in biodegradable polymeric nanoparticles: morphology, fluorescence behaviour and stem cell uptake. *Macromol Biosci* 13:1204–1212.
- [97] T.K. Kim, J.J. Yoon, D.S. Lee, T.G. Park, *Biomaterials* 27 (2006) 152.
- [104-98] M. Matsumura, T. Yamamoto, P.C. Wang, K. Shinabe, K. Yasuda, *Water Res.* 31 (1997) 1027.
- [99] L. Guangyuan, Z. Lin, K. Lijun, Z. Ling, G. Yandao, Z. Nanming, Z. Xiufang, *Tsinghua Sci. Technol.* 11 (2006) 427.
- [100] C. T. Brunner, E. T. Baran, E. D. Pinho, R. L. Reis, N. M. Neves. Performance of biodegradable microcapsules of poly (butylene succinate), poly (butylene succinate-co-adipate) and poly (butylene terephthalate-co-adipate) as drug encapsulation systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 84 (2011) 498–507
- [101] E.T. Baran, N. Özer, V. Hasırcı, J., Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) nanocapsules as enzyme carriers for cancer therapy: an in vitro study, *J Microencapsul.* 19 (2002) 363
- [102] A. Lamprecht, N. Ubrich, P.M. Hombreiro, C.M. Lehr, M. Hoffman, P. Maincent, *Int. J. Pharm.* 196 (2000) 177. [109] M.A. Benoit, B. Baras, J. Gillard, *Int. J. Pharm.* 184 (1999) 73.
- [103] P.D. Scholes, A.G.A. Coombes, L. Illum, S.S. Davis, M.Vert, M.C.Davies, J.Control.

- Release 25 (1993) 145. [111] D. Lemoine, V. Preat, J. Control. Release 54 (1998) 15.
- [104] M.J. Heslinga, E.M. Mastria, O. Eniola-Adefeso, J. Control. Release 138 (2009) 235.
- [105] Y.-L. Zhao, F. Tian, C.-J. Liu, F. Li, N. Xing, J. Appl. Polym. Sci. 110 (2008) 3826.
- [106] Morra, M.; Occhiello, E.; Marola, R.; Garbassi, F.; Humphrey, P.; Johnson, D., On the aging of oxygen plasma-treated polydimethylsiloxane surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **1990**, 137 (1), 11-24.
- [107] Kim, J.; Chaudhury, M. K.; Owen, M. J., Hydrophobic Recovery of Polydimethylsiloxane Elastomer Exposed to Partial Electrical Discharge. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, 226 (2), 231-236.
- [108] Wu, D.; Luo, Y.; Zhou, X.; Dai, Z.; Lin, B., Multilayer poly (vinyl alcohol)-adsorbed coating on poly(dimethylsiloxane) microfluidic chips for biopolymer separation. *Electrophoresis* **2005**, 26 (1), 211-218.
- [109] Kozlov, M.; Quarmyne, M.; Chen, W.; McCarthy, T. J., Adsorption of Poly (vinyl alcohol) onto Hydrophobic Substrates. A General Approach for Hydrophilizing and Chemically Activating Surfaces.
- [110] Barrett, D. A.; Hartshorne, M. S.; Hussain, M. A.; Shaw, P. N.; Davies, M. C., Resistance to nonspecific protein adsorption by poly (vinyl alcohol) thin films adsorbed to a poly(styrene) support matrix studied using surface plasmon resonance. *Analytical Chemistry* **2001**, 73 (21), 5232-5239.
- [109] Okushima, S.; Nisisako, T.; Torii, T.; Higuchi, T., Controlled Production of Monodisperse Double Emulsions by Two-Step Droplet Breakup in Microfluidic Devices. *Langmuir* **2004**, 20 (23), 9905-9908.
- [110] Christopher, G. F.; Anna, S. L., Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *Journal of Physics D: Applied Physics* **2007**, 40 (19), R319-R336.
- [111] Nie, Z.; Seo, M.; Xu, S.; Lewis, P.; Mok, M.; Kumacheva, E.; Whitesides, G.; Garstecki, P.; Stone, H., Emulsification in a microfluidic flow-focusing device: effect of the viscosities of the liquids. *Microfluidics and Nanofluidics* **2008**, 5 (5), 585-594.

[112] Garstecki, P.; Gitlin, I.; Diluzio, W.; Whitesides, G. M.; Kumacheva, E.; Stone, H. A., Formation of monodisperse bubbles in a microfluidic flow-focusing device. *Applied Physics Letters* **2004**, *85* (13), 2649-2651.

[113] Owen, M. J.; Smith, P. J., Plasma treatment of polydimethylsiloxane. *Journal of Adhesion Science and Technology* **1994**, *8* (10), 1063-1075.

[114] Lévy, Élie (1993). Diccionario de física AKAL. p. 537. ISBN 9788446001447.

[115] Tatiana Trantidou, Yuval Elani, Edward Parsons, Oscar Ces.

Hydrophilic surface modification of PDMS for droplet microfluidics using a simple, quick, and robust method via PVA deposition. *Microsystems & Nanoengineering* (2017) 3, 16091; doi:10.1038/micronano.2016.91

Robert Graham, and Eugenia Kumacheva. Continuous Microfluidic Reactors for Polymer Particles. *Langmuir* **2005**, *21*, 11614-11622

[116] Anna, S. L.; Bontoux, N.; Stone, H. A., Formation of dispersions using "flow focusing" in microchannels. *Applied Physics Letters* **2003**, *82* (3), 364-366.

[117] Eley, J. G.; Pujari, V. D.; McLane, J., Poly (Lactide-co-Glycolide) Nanoparticles Containing Coumarin-6 for Suppository Delivery: In Vitro Release Profile and In Vivo Tissue Distribution. *Drug Delivery* **2004**, *11* (4), 255-261.

[118] Julienne, M. C.; Alonso, M. J.; Gómez Amoza, J. L.; Benoit, J. P., Preparation of Poly (D, L-Lactide/Glycolide) Nanoparticles of Controlled Particle Size Distribution: Application of Experimental Designs. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1992**, *18* (10), 1063-1077.

## ANEXOS

**A. Luna**, A. Choza, A. Maldonado, E. Martinez, J. Tánori. “preparation and characterization of PLGA nanoparticles by nanoprecipitation”, XII Coloquio Bienal, Hermosillo, Sonora (México), poster, 2017.

**A. Luna**, A. Maldonado, D. Berrelez, E. Martinez “Fabricación de chips de PDMS y síntesis de micropartículas de PLGA por microfluídica”, Reunión Universitaria de Investigación en Materiales 2017, Hermosillo, Sonora (México), poster, 2017.

Capacitación de Microfluidica por el laboratorio BlackHole en USON-Hermosillo-México.

Estancia de investigación en el ICTP Madrid-España bajo el proyecto titulado Micropartículas biodegradables obtenidas a partir de Biopoliésteres.

Capacitación de Microfluidica y microfabricación en los laboratorios BlackHole en Paris-Francia.