



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Física y Matemáticas

Formación de microcápsulas para envío de fármacos a partir de emulsiones usando dispositivos microfluídicos

Tesis

que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias en el área de Física

presenta

José Luis Méndez Montes de Oca

Morelia, Michoacán. Agosto del 2018

Director de tesis:
Dr. Gabriel Espinosa Pérez

Instituto de Física y Matemáticas,
UMSNH.

Agradecimientos

A Citlali y Mariana, por tanto amor y paciencia durante estos cuatro años. Sin ustedes nada de esto tendría sentido.

A mi madre y hermana, por su apoyo sin condiciones y sin reservas.

A mi padre, por todo el apoyo y confianza depositada en mi.

A mis compañeros de generación, Albino y Ulices, por todas las charlas científicas y no científicas que compartimos.

A los compañeros de laboratorio: Alberto, Ana, Dra. Padma, Abigail, Erick y Andrea.

Gracias por todo lo que aprendí de ustedes

En especial agradezco a Maricela Rodriguez y Alberto Luviano , por que el trabajo es más ameno y la carga más ligera cuando se está en compañía.

A todos los profesores que contribuyeron a mi formación, en especial a los sinodales que dieron seguimiento a esta tesis y cuyas correcciones y sugerencias hicieron del presente un mejor trabajo. Muy en especial, agradezco al Dr. Gabriel Espinosa y al Dr. Pablo Genaro López, quienes impartieron sus conocimientos siempre de forma generosa.

Índice general

| | |
|---|-----------|
| Contenido | I |
| Colaboraciones | 2 |
| Introducción | 4 |
| 1. Conceptos Fundamentales | 9 |
| 1.1. Tensión interfacial y capilaridad. | 9 |
| 1.2. Emulsiones. | 16 |
| 1.2.1. Estado coloidal | 16 |
| 1.2.2. Emulsiones y microemulsiones | 17 |
| 1.2.3. Emulsiones múltiples. | 20 |
| 1.2.4. Formación de microcápsulas y vesículas a partir de emulsiones dobles. | 20 |
| 1.3. Hidrodinámica. | 22 |
| 1.3.1. Descripciones euleriana y lagrangiana, derivada material | 22 |
| 1.3.2. Números adimensionales. | 25 |
| 1.3.3. Esfera en un flujo laminar estacionario. | 27 |
| 1.4. Microfluídica. | 27 |
| 1.4.1. Tipos de dispositivos microfluídicos. | 29 |
| 1.4.2. Leyes físicas en los microcanales. | 32 |
| 1.4.3. Proceso de emulsificación con microfluidos. | 33 |
| 2. Materiales y métodos | 39 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.1. | Microfluídica de coflujo. | 39 |
| 2.2. | Microfluídica de flujo enfocado. | 41 |
| 2.3. | Proceso de fabricación de los dispositivos. | 42 |
| 2.3.1. | Materiales y equipo utilizados. | 42 |
| 2.3.2. | Tratamiento previo de los capilares. | 44 |
| 2.3.3. | Montaje del dispositivo. | 49 |
| 2.4. | Operación del dispositivo. | 50 |
| 2.4.1. | Microfluídica de coflujo para formación de vesículas y dendri- mersomas. | 50 |
| 2.4.2. | Microfluídica de flujo enfocado para formación de microcápsulas. | 52 |
| 2.5. | Realización de los experimentos. | 52 |
| 2.6. | Importancia de un ambiente limpio. | 53 |
| 2.7. | Materiales estructurales y encapsulados. | 53 |
| 2.7.1. | Lípidos | 54 |
| 2.7.2. | Dendrímeros | 59 |
| 3. | Vesículas lipídicas para aplicaciones de envío controlado de medicamentos. | 61 |
| 3.1. | Introducción. | 61 |
| 3.2. | Materiales y métodos. | 62 |
| 3.2.1. | Producción y colecta de emulsiones dobles. | 62 |
| 3.2.2. | Obtención y análisis de imágenes. | 63 |
| 3.3. | Resultados. | 63 |
| 3.3.1. | Vesículas de mezcla lipídica DPPC/DOPC/Colesterol. | 63 |
| 3.3.2. | Vesículas de DPPC. | 74 |
| 3.4. | Conclusiones. | 76 |
| 4. | Microcápsulas poliméricas para el envío activado con pH de metabolitos pro- bióticos. Aplicación hacia tratamiento gastrointestinal. | 79 |
| 4.1. | Introducción | 80 |
| 4.2. | Materiales y métodos | 81 |
| 4.2.1. | Crecimiento de probióticos y extracción de sus metabolitos. | 81 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.2.2. | Caracterización de los metabolitos de probióticos. | 81 |
| 4.2.3. | Formación de microcápsulas conteniendo metabolitos de probióticos | 82 |
| 4.2.4. | Microscopía confocal. | 83 |
| 4.2.5. | Análisis de imágenes. | 83 |
| 4.2.6. | Absorbancia de UV-vis | 83 |
| 4.3. | Resultados y discusión | 84 |
| 4.3.1. | Fabricación de microcápsulas conteniendo metabolitos de probióticos. | 84 |
| 4.3.2. | Estabilidad de las microcápsulas a pH ácido. | 85 |
| 4.3.3. | Estabilidad de las microcápsulas y liberación en un ambiente alcalino. | 86 |
| 4.3.4. | Conclusiones | 93 |
| 5. | Ensamblado de dendrímeros Jano Anfílicos en dendrimerosomas usando microfluídica. | 95 |
| 5.1. | Introducción. | 95 |
| 5.2. | Materiales y Métodos. | 96 |
| 5.2.1. | Materiales. | 96 |
| 5.2.2. | Síntesis de los dendrímeros. | 97 |
| 5.2.3. | Formación de agregados por el método de hidratación de <i>films</i> . . . | 97 |
| 5.2.4. | Gotas de emulsión doble tipo W/O/W como plantillas para la formación de dendrimerosomas. | 97 |
| 5.2.5. | Análisis de datos y software | 99 |
| 5.3. | Resultados y discusión. | 99 |
| 5.3.1. | Síntesis y caracterización de dendrímeros. | 99 |
| 5.3.2. | Ensamblado de estructuras a base de dendrímeros Jano mediante hidratación de films | 100 |
| 5.3.3. | Uso de los microfluídos para la formación de dendrimerosomas. . | 101 |
| 5.3.4. | Capacidad de encapsulado de los dendrimerosomas. | 105 |
| 5.4. | Conclusión. | 106 |

| | |
|---|------------|
| 6. Propiedades interfaciales en el equilibrio de monocapas de puntos cuánticos de Oxido de Zinc en la interfaz aire/agua. Estudio dirigido a aplicaciones de estabilización de espumas y emulsiones. | 109 |
| 6.1. Introducción. | 110 |
| 6.2. Materiales y Métodos. | 111 |
| 6.2.1. Síntesis controlada de puntos cuánticos de oxido de zinc. | 111 |
| 6.2.2. Preparación de los nanocompositos de ZnO@ODS. | 112 |
| 6.2.3. Caracterización de los puntos cuánticos de ZnO. | 112 |
| 6.2.4. Preparación y caracterización de las monocapas formadas por nanopartículas ZnO@ODS en la interfaz aire/agua. | 113 |
| 6.3. Resultados y discusión. | 114 |
| 6.3.1. Estructura cristalina y tamaño de los puntos cuánticos de ZnO. | 114 |
| 6.3.2. Propiedades superficiales de las nanopartículas de ZnO@ODS en la interfaz aire/agua. | 115 |
| 6.4. Conclusión. | 120 |
| 7. Conclusiones | 121 |

Abstract

In this thesis, the study and development of different kind of microcapsules is presented. Microcapsules were formed using the method of microfluidics. As the structural elements to form the microcapsules, the following molecules were used: phospholipids, polymers and dendrimers. It was shown the possibility to reach the encapsulation of different hydrophilic agents inside the microcapsules, as probiotic metabolites, nanoparticles and a fluorescent dye. In each case, different physical and physicochemical aspects were studied, depending on the interest for the study of each system, as the diffusion of the encapsulated material from the microcapsules, the hydrodynamics of the emulsification process and the stability of the emulsions and microcapsules, explained from the mechanisms at the molecular level. The obtained results shown that the microfluidic method has a high efficiency in the production of microcapsules and in the encapsulation of hydrophilic agents. The results also shown that these kinds of microcapsules are good candidates to be used in drug delivery applications. It was also shown the possibility to assembly vesicle like structures using molecules whose spontaneous conformation is different.

Keywords: Microfluidics, microcapsules, double emulsions, drug delivery, interfacial science.

Resumen

En el presente trabajo de tesis, se desarrollaron y estudiaron diferentes tipos de microcápsulas, formadas a partir de emulsiones mediante el método de microfluidos. Se utilizaron como elementos estructurales de las microcápsulas las siguientes moléculas: fosfolípidos, polímeros y dendrímeros. Se mostró la posibilidad de encapsular diferentes agentes hidrofílicos en el interior de las microcápsulas, tales como metabolitos de probióticos, nanopartículas y moléculas fluorescentes. En cada caso se estudiaron diferentes aspectos físicos y físico-químicos de interés para cada sistema, como son: difusión del material encapsulado hacia el exterior de las microcápsulas, hidrodinámica de la formación de las emulsiones, y estabilidad de las emulsiones y microcápsulas a partir de consideraciones a nivel molecular. Los resultados obtenidos muestran que el método de microfluidos tiene una alta eficiencia en la producción de microcápsulas y en el encapsulado de agentes hidrofílicos y que este tipo de microcápsulas son buenas candidatas para ser usadas en el envío de fármacos. También se mostró la posibilidad de ensamblar estructuras tipo vesícula utilizando moléculas cuya organización espontánea es diferente.

Palabras clave: Microfluidos, microcápsulas, emulsiones dobles, envío de fármacos, ciencia de interfases.

Colaboraciones

La mayoría del trabajo presentado en esta tesis fue el producto de valiosas colaboraciones entre diferentes instituciones del país y del extranjero, sin las cuales hubiera sido imposible lograr un trabajo interdisciplinar como el presentado aquí. En esta sección está dedicada a dar crédito y agradecer a quienes colaboraron conmigo y contribuyeron a mi formación.

- Mi Agradecimiento al profesor David Weitz del *Experimental Soft Condensed Matter Group, Harvard School of Engineering and Applied Sciences, Department of Physics* por las facilidades prestadas al permitirme realizar una estancia en su laboratorio y agradecimiento especial a la Dra. Laura R. Arriaga y a la estudiante de doctorado Tina Yuting Huang, por todo el tiempo invertido en enseñarme la técnica de microfluídica con capilares estirados y por su gran paciencia.
- En referencia al trabajo descrito en la sección 3.3.1, donde se realizó el encapsulado de metabolitos probióticos, agradezco a las estudiantes Fabiola y Reyna de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Facultad de Biología y de Químico Biólogo Parasitólogo, respectivamente), quienes nos proporcionaron los probióticos y mediante una estancia realizada en el IFM colaboraron activamente en el trabajo del encapsulado de los mismo. Agradezco también al Dr. Jorge Luis Menchaca Arredondo y la Dra. María Porfiria Barrón Gonzáles, quienes colaboraron en la dirección del proyecto.
- El trabajo que se presenta en la sección 3.3.2, donde se encapsularon nanopartículas super paramagnéticas fue parte de una colaboración con el grupo de trabajo del Dr. Said Eduardo Aranda Espinoza, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (IF-UASLP), quienes nos proporcionaron las nanopartículas.

El trabajo reportado en el capítulo 5, sobre la formación de dendrimerosomas, se realizó en colaboración con un grupo de trabajo de la Escuela de Ingeniería y Ciencias de Instituto Tecnológico de Monterrey, en particular, con la doctora Mariana Elizondo García, en aquel entonces estudiante de doctorado, quien trabajó bajo la dirección del Dr. Jesús A. Valencia Gallegos, quienes se encargaron de la síntesis de

los dendrímeros utilizados y quienes han contribuido activamente en la redacción de los manuscritos para la publicación de los resultados.

Introducción

El tratamiento de enfermedades mediante el uso de medicamentos es un procedimiento que el ser humano ha llevado a cabo posiblemente desde tiempos prehistóricos. Las técnicas utilizadas para este propósito han sido mejoradas a través de la historia. Hoy en día tenemos la posibilidad de administrar medicamentos de forma oral, transdérmica (a través de la piel, pero absorbida por el tejido bajo ella), cutánea (absorbido por la piel), intravenosa, transmucosal (nasal, ocular, rectal, sublingual, etc.) y por inhalación. La vía de administración oral, es considerada como la ruta más atractiva y preferible para los pacientes, dado que presenta un alto control y flexibilidad en las dosis proporcionadas, al mismo tiempo que se presenta como un medio de fácil administración. Más del 60% de los medicamentos comerciales son de administración oral. Sin embargo, muchas drogas convencionales exhiben una baja biodisponibilidad¹ cuando son administradas por vía oral, siendo menor al 1% para muchas drogas, especialmente medicinas a base de proteínas y péptidos [1]. En el caso de medicinas anticancerígenas tales como doxorubicin, docetaxel, paclitaxel y tamoxifen, se encuentran en un rango de biodisponibilidad del 5 a 20% [2]. En la vía de administración oral, los fármacos administrados deben sobrevivir a una ruta de alrededor de 6 metros de longitud, distancia que recorren a lo largo del tracto gastrointestinal, desde la boca, hasta el intestino delgado, lugar en que son absorbidos la mayoría de medicamentos y nutrientes, incluyendo proteínas, minerales, carbohidratos, grasas, vitaminas, e incluso, el agua [1]. En esta trayectoria, los medicamentos deben pasar a través de superficies mucosas, membranas biológicas, sobrevivir a las condiciones acídicas del estómago y a la degradación por sales biliares [3].

En el caso del envío cutáneo, se tiene una mayor eficacia, puesto que los medicamentos son aplicados en la región externa de la epidermis de la zona afectada y no tienen que sobrevivir a un trayecto tan largo como en el caso de los administrados oralmente. Sin embargo, el envío de fármacos por esta vía tiene también sus limitaciones, puesto que la piel es una barrera impermeable, que provee una fuerte protección ante sustancias

¹La razón de la droga que es capaz de producir efecto, respecto del total de droga suministrada.

externas, tales como bacterias, hongos, virus, polvo, alérgenos² y moléculas grandes. Por tanto, el mayor reto en el envío de fármacos por la vía cutánea consiste en superar la fuerte barrera de la piel, la cual, produce una baja penetración de la droga y, por tanto, una falta de precisión en la dosis que realmente alcanza el tejido diana [3].

Una forma de aumentar la cantidad de medicamento aprovechado por el organismo del paciente consiste en dirigirlo hacia la zona donde habrá de ser absorbido o asimilado a la vez de protegerlo durante su tránsito por el cuerpo desde el momento de ser administrado hasta el momento que llega a la zona deseada, un paradigma conocido como envío dirigido o “inteligente”[3, 4].

Para proteger los medicamentos de interés durante su tránsito por el organismo y lograr el envío controlado e inteligente del mismo, se recurre al encapsulado del mismo, es decir, se confina dentro de algún material capaz de realizar las funciones mencionadas de protección y liberación. El encapsulado consiste en proveer una barrera física capaz de proteger a la droga de interés, evitando así, que entre en contacto con las condiciones del ambiente externo, tales como acidez, calor, evaporación y oxidación [3].

Aunque es común observar actualmente el suministro de cápsulas macroscópicas por vía oral, existe también la posibilidad de hacer microcápsulas, agentes de confinamiento y envío de medicamentos del orden de decenas de micras. Cuando los medicamentos se administran de forma microencapsulada, se reduce la irritación gastrointestinal, la toxicidad potencial y los efectos secundarios de las drogas originales [3]. Las microcápsulas también pueden proteger a la droga de la luz y humedad a que está expuesta antes de ser administrada al paciente. La microencapsulación, además de aumentar la biodisponibilidad y compatibilidad del medicamento, puede aumentar su absorción en alguna zona de interés, y aumentar el tiempo de vida media del medicamento suministrado³, que de otra forma, se vería reducido por la degradación enzimática. Cuando los medicamentos se administran de forma microencapsulada, se reduce la irritación gastrointestinal, la toxicidad potencial y los efectos secundarios de las drogas originales [3]. Incluso es posible funcionalizar las microcápsulas para que interactúen con algún tipo particular de célula o para que envíen algún agente dentro de la célula [3, 4].

²Moléculas capaces de ocasionar reacciones alérgicas.

³Tiempo necesario para que la cantidad de droga suministrada, presente en el cuerpo, se reduzca a la mitad.

El microencapsulado de medicamentos puede hacerse por métodos químicos, fisicoquímicos y procesos mecánicos. Los métodos químicos consisten en provocar la polimerización (organización o agregación de moléculas, mediante reacciones químicas) del material que constituye la pared de las microcápsulas. Los métodos fisicoquímicos incluyen separaciones de fases, y el uso de emulsiones (gotas de un líquido dispersas en otro líquido inmiscible al primero). Finalmente los métodos mecánicos consisten en la preparación de sprays que al secar conducen a la formación de las microcápsulas [5]. En este trabajo en particular se utiliza el método de evaporación de solventes de emulsiones múltiples tipo agua-en-aceite-en-agua, que conduce a la formación de microcápsulas posterior a la evaporación de la fase aceite [6]. El método tradicional de obtener estas emulsiones dobles requiere de la agitación manual de las mismas, produciendo emulsiones con distribuciones de tamaños de gotas anchas (polidispersas), donde la cantidad de material encapsulado es diferente en cada gota y la eficiencia es baja, es decir, sólo una poca fracción del material utilizado es encapsulado correctamente [6].

Las recientes tecnologías de miniaturización han hecho posible la fabricación controlada de microcápsulas a partir de emulsiones dobles [7–9]. En particular, la técnica de microfluídica, que utiliza las ventajas de la miniaturización para confinar el flujo en microcanales (canales del orden de micrómetros) abrió la posibilidad de realizar el encapsulado de fármacos en cápsulas de tamaño micrométrico bajo condiciones altamente controladas, a saber: permite tener control sobre la cantidad de material encapsulado y sobre la composición química del material que constituye la microcápsula, permitiendo así una fácil funcionalización y nuevas posibilidades de envío controlado. Además de las ventajas mencionadas, la técnica de microfluídica constituye un procedimiento con alta repetibilidad, susceptible de ser adaptado a procesos industriales [10].

Existen diferentes tipos de dispositivos microfluídicos, los cuales, pueden ser clasificados en función de la técnica y materiales empleados para fabricarlos; existen por ejemplo, dispositivos muy resistentes donde los microcanales son impresos en vidrio mediante una técnica de litografía [11]. Existen también dispositivos donde la impresión de los microcanales se realiza sobre un polímero suave llamado Polydimetilsiloxano (PDMS) que permite una fácil conexión del dispositivo y cuya fabricación es más simple que en la litografía sobre vidrio [11]. En este trabajo se utilizó un método de fabricación que consiste en utilizar capilares de vidrio estirados montados de forma coaxial, desarrollado originalmente por Cramer *et al.* [12] para el estudio de la formación de gotas de agua-en-aceite. Este montaje coaxial permite obtener perfiles de flujo realmente axialsimétricos, condición necesaria para la formación de emulsiones múltiples [7]. En particular, se utiliza una geometría donde a los líquidos involucrados se les hace fluir en una misma dirección

(un método llamado microfluídica de coflujo) y que permite la formación de emulsiones dobles tipo agua-en-aceite-en-agua cuya fase intermedia, formada por aceites es muy delgada, presentando grosores sub micrométricos, del orden de cientos de nanómetros, implementada originalmente por *Kim et. al.* [13]. Esta última característica es de gran utilidad para la formación de microcápsulas tipo vesícula, donde la pared de la microcápsula está constituida por un arreglo ordenado de dos moléculas de espesor [7, 13, 14].

La presente tesis constituye un trabajo experimental en donde se exploran diferentes posibilidades de encapsulado de agentes hidrofílicos (moléculas capaces de formar enlaces con las moléculas de agua y por tanto, de gran solubilidad en este medio) dentro de microcápsulas. Se exploraron también diferentes materiales estructurales para la formación de las microcápsulas, comenzando con el uso de fosfolípidos, con los que se formaron vesículas, posteriormente se presenta un trabajo donde el material utilizado fue un polímero, con el que es posible formar microcápsulas sólidas. Finalmente se presenta un trabajo donde se formaron emulsiones y microcápsulas utilizando dendrímeros, un tipo especial de moléculas cuyas características son intermedias entre las de los lípidos y los polímeros. En cada trabajo incluido en esta tesis se analizan diferentes aspectos físicos y físico-químicos involucrados en los procesos de encapsulado y en la posterior estabilidad de las estructuras ensambladas.

La estructura de la tesis es la siguiente: el primer capítulo hace una revisión de los conceptos fundamentales de la física de los microcanales, así como de las técnicas de fabricación de dispositivos microfluídicos. También se tratan algunas definiciones de físico-química, en especial de la clasificación, preparación y estabilidad de emulsiones. El segundo capítulo, de materiales y métodos, explica detalladamente el procedimiento de fabricación de los dispositivos microfluídicos usados y los materiales que se utilizaron. Los siguientes tres capítulos son de resultados y cada uno concierne al estudio de un sistema diferente. Así, un capítulo trata de la formación de vesículas lipídicas (liposomas) y los diferentes encapsulados que se hicieron con este tipo de moléculas: metabolitos de probióticos, nanopartículas y una molécula fluorescente; así como un trabajo enfocado en la fabricación de liposomas de tamaño menor a las que usualmente se producen con el método empleado sin la adición de moléculas que cambien las propiedades de la interfaz. Otro capítulo está dedicado a la fabricación de microcápsulas formadas con polímeros, moléculas sintéticas formadas por “eslabones” que se repiten; las que se usaron en este caso particular cambian su organización al estar expuestas a diferente pH. En estas microcápsulas poliméricas se logró el encapsulado de metabolitos de probióticos y se estudió la cinética la difusión de éstos desde las microcápsulas hacia el exterior. Se presenta también un capítulo sobre los trabajos realizados con los dendrímeros, arriba menciona-

dos, donde se evalúa la posibilidad de formar microcápsulas con estructuras ordenadas (tipo vesículas) con estas moléculas. Se presenta también un capítulo donde se estudian las propiedades mecánicas de membranas formadas por nanopartículas de ZnO, dicho trabajo está es un paso preliminar para la formación de microcápsulas cuyos elementos estructurales sean dichas nanopartículas. El último capítulo de esta tesis presenta las conclusiones generales del trabajo de doctorado, sin embargo, cada capítulo de resultados cuenta con una sección de conclusiones, donde también se comentan algunas perspectivas a futuro.

Objetivo general.

Producir microcápsulas, mediante microfluídica, utilizando diferentes moléculas como elemento estructural de las mismas y encapsular en ellas diferentes materiales hidrofílicos.

Objetivos específicos.

- Fabricar dispositivos microfluídicos que produzcan emulsiones dobles de forma eficiente para formar microcápsulas.
- Determinar las condiciones óptimas de las razones de flujo que permitan la producción estable de emulsiones dobles con los diferentes líquidos usados.
- Determinar las concentraciones óptimas para formar microcápsulas estables con las diferentes moléculas a utilizar como elementos estructurales de las mismas.
- Lograr el encapsulado estable de diferentes moléculas hidrofílicas de interés.
- Explorar materiales nuevos que sean susceptibles de ser utilizados como elementos estructurales para la estabilización de microcápsulas, emulsiones dobles, o en un panorama más general, de algún caso particular de estado coloidal.
- Proponer perspectivas de trabajo futuro para los distintos sistemas estudiados.

Capítulo 1

Conceptos Fundamentales

En este capítulo se presentan los conceptos que es necesario conocer para comprender los procesos involucrados en los métodos usados en este trabajo de tesis, así como para comprender a detalle las discusiones que se hacen en base a los resultados presentados. Tal como se mencionó en la introducción, la presente tesis trata de la formación de microcápsulas a partir de emulsiones dobles usando dispositivos microfluídicos. El concepto de tensión superficial se menciona al inicio de este capítulo y es el más importante en este trabajo puesto que está presente en la estabilidad de las emulsiones, y por su gran influencia en la hidrodinámica de los flujos en microcanales durante la formación de emulsiones. Posteriormente se definen y describen las emulsiones, ubicándolas dentro de un panorama más amplio, conocido como estado coloidal. En seguida se presenta un apartado sobre hidrodinámica, donde se derivan de forma resumida las ecuaciones que gobiernan los flujos en movimiento y se da una solución a ellas que será importante en este trabajo, dado que las gotas emulsificadas son esféricas: el flujo alrededor de una esfera en un flujo laminar estacionario. Finalmente, se da un apartado de microfluídica, donde se describe brevemente los tipos de dispositivos que actualmente se utilizan y se describe a detalle el método particular que se utilizó en este trabajo para la fabricación de los dispositivos, para finalmente mostrar cómo ocurre el proceso de formación de emulsiones utilizando dispositivos microfluídicos.

1.1. Tensión interfacial y capilaridad.

El concepto de capilaridad trata de aquellos fenómenos que ocurren en los líquidos debidos a su tensión superficial o interfacial, es decir, debido a la energía que posee su superficie (interfaz líquido/aire) o su interfaz con otro líquido. Algunos de estos fenómenos pueden ser despreciados en el estudio de la dinámica de fluidos en canales macroscópicos, sin embargo, en microcanales la contribución de las fuerzas capilares puede ser aún

mayor a la de las fuerzas viscosas. Esto es debido a la energía interfacial que se origina en las interacciones entre las moléculas de los líquidos, lo cual se aborda en el presente capítulo.

Con fines de explicación, consideraremos primero a la interfaz aire/líquido y luego a la interfaz entre dos líquidos, que es el caso que más nos interesa. En el bulto del líquido, cada molécula siente una atracción ¹ hacia sus moléculas vecinas, experimentando fuerzas hacia todas direcciones. El resultado es que la fuerza neta en cada molécula es nula, se encuentran en equilibrio mecánico (ver figura 1.1a). En contraste, en la interfaz aire/líquido las moléculas que se encuentran en la superficie del líquido experimentan un desequilibrio de fuerzas debido a que no son atraídas con la misma fuerza hacia todas direcciones, sino que tienen mayor atracción hacia la región líquida que hacia la región gaseosa, en la cual, las moléculas están muy separadas unas de otras y su interacción con ellas es más débil [16]. El caso de la interfaz líquida es muy similar; puesto que las moléculas a ambos lados de la interfaz ejercen interacciones diferentes, aquellas que se encuentren justo en la interfaz estarán sujetas a una fuerza no nula. En consecuencia, las moléculas en la interfaz tendrán una energía mayor que las que se encuentran en el bulto y la creación de la interfaz tendrá un costo energético en el sistema. El resultado macroscópico de lo anterior es una fuerza que tiende a contraer la interfaz (figura 1.1b). Considerando que esta fuerza sea uniforme en una región de la superficie, es conveniente definir una *densidad de fuerza por unidad de longitud* γ . Esta densidad de fuerza es lo que se conoce como tensión superficial. En el caso de la interfaz aire/líquido la fuerza neta atractiva estará dirigida preferentemente hacia la fase líquida, la interfaz adoptará la geometría que le permita minimizar su área (y por tanto su energía), por esta razón las gotas adoptan la forma esférica. En el caso de la interfaz entre dos líquidos, la tensión provocará que la interfaz se curve hacia la fase cuya atracción intermolecular sea mayor.

Tension interfacial: punto de vista termodinámico.

El siguiente ejemplo será útil para comprender el efecto macroscópico de la tensión superficial y su relación con el trabajo mecánico: consideremos una película de jabón estirada sobre un marco delgado con un lado móvil (figura 1.2).

¹Aquí la palabra *atracción* se refiere a las interacciones del tipo de potencial a pares $w(r)$, que son principalmente de naturaleza electrodinámica (interacción carga-carga, carga-dipolo, dipolo-dipolo) y cuántica (enlaces covalentes). En el caso del agua, juegan un papel importante los efectos entrópicos. Todas estas interacciones se discuten ampliamente en la referencia [15]

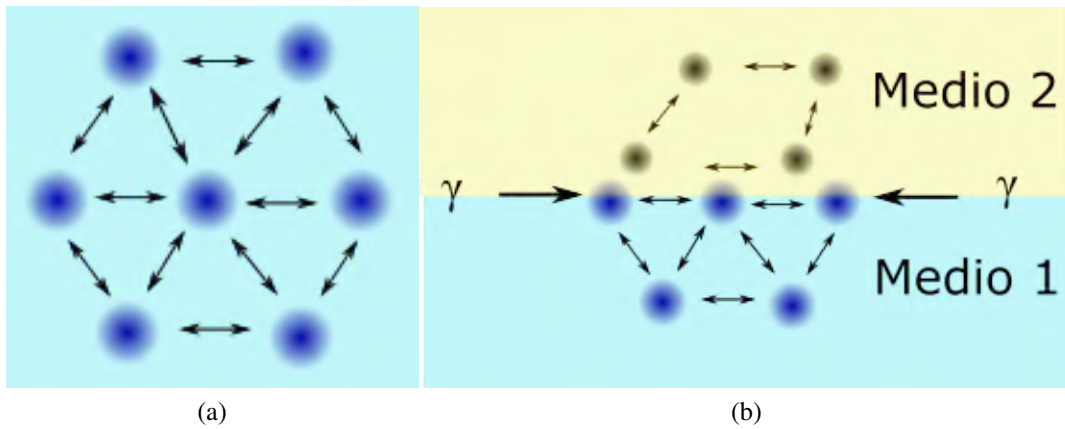


Figura 1.1: (a) Las moléculas inmersas en el bulto del líquido se encuentran en equilibrio mecánico. (b) Tensión interfacial entre dos medios con diferentes interacciones intermoleculares. Se observa cómo las moléculas en la interfaz experimentan mayor atracción hacia la fase fluida (medio 1) que hacia la fase gaseosa (medio 2), debido a que con ésta última la cantidad de moléculas para interactuar es menor y la interacción con ellas es más débil.

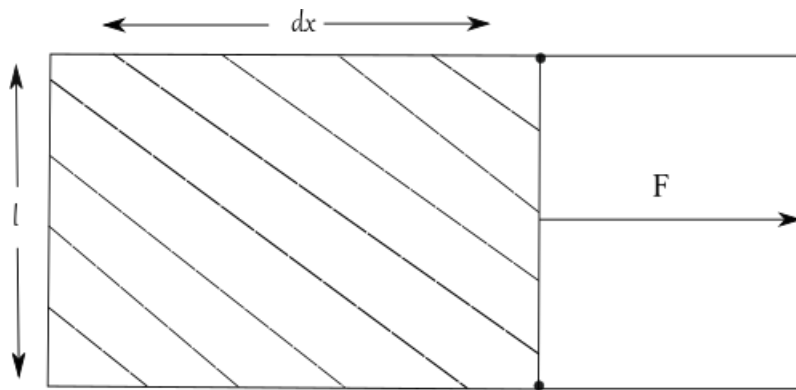


Figura 1.2: Una película de jabón estirada a través de un marco delgado con un lado móvil.

Experimentalmente se observa que una fuerza actúa en el lado móvil en dirección opuesta a la flecha del diagrama. Si γ es la fuerza por unidad de longitud, entonces la fuerza que actúa en el móvil es $F = \gamma l$ y el trabajo hecho para extender el lado móvil una distancia dx en dirección de la flecha del diagrama es:

$$\begin{aligned}
 dW &= \gamma dx \\
 &= \gamma dA.
 \end{aligned}
 \tag{1.1}$$

Con $dA = ldx$ el cambio en el área. De esta manera, una segunda formulación de la tensión superficial consiste en tratarla como una energía por unidad de área. Notemos que conceptualmente esta es una energía mecánica. Las unidades usuales de γ son $\frac{J}{m^2}$ o bien $\frac{N}{m}$ [16, 17]. Existe otra forma de derivar la tensión superficial dentro del contexto termodinámico. Esta conexión se hace posible mediante el concepto de energía libre del sistema. Para entender esto, pensemos en otro sistema hipotético, consistente en un líquido que llene por completo un recipiente. Consideremos que este recipiente tiene una tapa deslizante y el material es tal, que la tensión interfacial entre el líquido y la tapa es cero (figura 1.3).

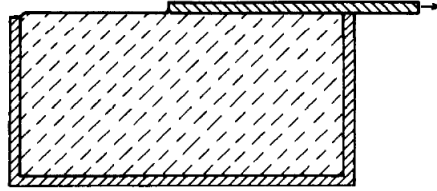


Figura 1.3: Creación ideal de una superficie. Figura adaptada de [17]

Si la tapa se desliza de manera que descubra una cantidad de superficie dA de forma cuasi-estática², el trabajo requerido para hacerlo será $dW = \gamma dA$. El cual es un trabajo reversible. Estableceremos las siguientes hipótesis: el proceso se realiza a temperatura y presión constante y el número de moles de las sustancias que componen el líquido no cambia. Ahora bien, recordemos que por definición, la energía libre de Gibbs (G) es:

$$G = u + PV - TS, \quad (1.2)$$

con u la energía total del sistema y con P , V , T y S ; presión, volumen, temperatura y entropía. Luego, la diferencial dG es:

$$dG = du + VdP + PdV - SdT - TdS, \quad (1.3)$$

y la energía total del sistema es, de manera general; con μ^i y n_i el potencial químico y el número de moles, respectivamente de la i -ésima sustancia en el sistema:

$$du = TdS - PdV + \sum \mu^i dn_i + dW_{util}, \quad (1.4)$$

²En termodinámica, una transformación es cuasi-estática si los cambios ocurren tan lentamente que cualquier momento del sistema puede considerarse como un estado de equilibrio, donde el término equilibrio se refiere al estado termodinámico en el cual, el sistema no cambia en el tiempo [18].

donde TdS es el cambio de calor debido a la naturaleza reversible de nuestro proceso y dW_{util} es una cantidad de trabajo no expansivo ni químico [19] (dW_{util} es pues el trabajo que hicimos sobre el sistema para crear la superficie). Sustituyendo du en dG , tenemos:

$$dG = \sum \mu^i dn_i + dW_{util} + VdP - SdT. \quad (1.5)$$

Puesto que el proceso se ha efectuado a temperatura y presión constantes, y el número de moles se mantiene también constante, tenemos que

$$dG = dW_{util}. \quad (1.6)$$

Es decir, que el trabajo requerido para crear la superficie resulta ser igual en magnitud a la energía libre de Gibbs [19]. Así, nos es posible escribir:

$$dG = \gamma dA. \quad (1.7)$$

De esta manera podemos definir la tensión superficial como una energía libre de la superficie:

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial A} \right)_{T,P} = G^\sigma. \quad (1.8)$$

Donde σ denota el carácter superficial del potencial de Gibbs (G^σ), acorde con nuestra notación previa. De forma similar, partiendo de la definición de la energía libre de Helmholtz [19]

$$F = u - TS. \quad (1.9)$$

Tenemos

$$\begin{aligned} dF &= du - SdT - TdS \\ &= dW_{util} - SdT - PdV + \sum \mu^i dn_i. \end{aligned} \quad (1.10)$$

Finalmente:

$$\gamma = \left(\frac{\partial F}{\partial A} \right)_{T,V} = F^\sigma. \quad (1.11)$$

De forma análoga, el cambio en la energía libre de Helmholtz es igual (la igualdad se cumple sólo cuando los procesos son reversibles) en magnitud al trabajo hecho sobre el sistema durante una transformación bajo las siguientes condiciones: que la transformación se realice a T constante, siendo T la temperatura del ambiente y que el sistema intercambie calor sólo con el ambiente [19]. Bajo estas dos condiciones, tenemos que

$$W = \Delta F^\sigma = \gamma A, \quad (1.12)$$

donde σ denota el carácter superficial. Como F es una función potencial, podemos simplemente escribir

$$F^\sigma = \gamma A, \quad (1.13)$$

obteniendo

$$\gamma = \frac{F^\sigma}{A}. \quad (1.14)$$

Nótese que, dadas las hipótesis hechas para encontrar esta ecuación, sólo es válida cuando un líquido puro está en equilibrio con su vapor saturado en la interfaz plana. Las dos formulaciones de la tensión superficial ya discutidas (en términos de trabajo mecánico y de los potenciales termodinámicos) son útiles tanto conceptual como experimentalmente.

Ecuación de Young-Laplace.

La derivación matemática de la ecuación que describe las interfases curvas en equilibrio, puede obtenerse también partiendo de principios termodinámicos. Consideremos el sistema de dos líquidos divididos por una superficie libre. La energía de Gibbs total del sistema será la suma de varias contribuciones energéticas G_i tales como la energía libre de cada líquido y la energía libre de la superficie. Supongamos que la energía libre superficial está dada en términos de alguna variable ξ (tal como forma geométrica, volumen o posición) y que tenemos condiciones de equilibrio, es decir, que la energía total de Gibbs está, por definición, en un mínimo. Entonces, cualquier variación pequeña de ξ con respecto al valor de equilibrio, debe resultar en una variación nula de la energía de Gibbs. Esto lo expresamos matemáticamente como [20]:

$$\delta G \sum_i (\partial_\xi G_i) = 0. \quad (1.15)$$

Consideremos ahora la superficie curva en equilibrio de la figura 1.4, donde R_1 y R_2 son los radios de curvatura local de la superficie en dos direcciones ortogonales que llamaremos x e y . El elemento de área de la superficie está dado por $A = \delta x \delta y$. Al expandir el volumen a través de un pequeño desplazamiento δz , en dirección del vector normal a la superficie, éste se incrementará por $\delta z \delta A$. El incremento en el área, será, despreciando los términos cuadráticos en δz :

$$\delta A \approx \int \left(\frac{\delta z}{R_1} + \frac{\delta z}{R_2} \right) \delta A. \quad (1.16)$$

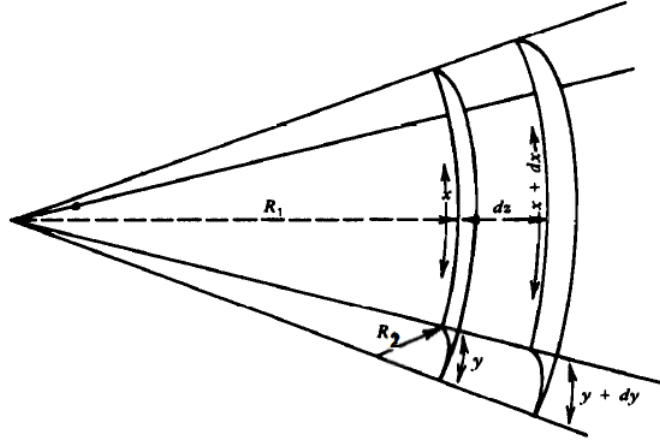


Figura 1.4: Desplazamiento dz de una superficie curva de área $A = \delta x \delta y$. Figura adaptada de referencia [17]

Ahora bien, el trabajo necesario para llevar a cabo este desplazamiento, estará dado por la diferencia de presión entre los dos medios por el volumen incrementado, esto es:

$$\delta G_{pv} = \int (p_2 - p_1) \delta A \delta z = - \int (p_1 - p_2) \delta A \delta z. \quad (1.17)$$

Donde p_1 y p_2 son la presión en los dos medios. La otra contribución a la energía de Gibbs, proviene del incremento en la tensión superficial debido al incremento de área: $\delta G_{surf} = \gamma \delta A$. Por tanto, la variación total de la energía de Gibbs será:

$$\delta G = \delta G_{surf} + G_{pv} = \gamma \delta A - \int (p_1 - p_2) \delta A \delta z. \quad (1.18)$$

En el equilibrio la energía de Gibbs debe ser un mínimo, entonces, la variación de ésta debe ser nula. Así, tenemos, sustituyendo la expresión para δA :

$$\int \delta A \left\{ (p_1 - p_2) - \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \right\} \delta z = 0. \quad (1.19)$$

Puesto que esta condición se debe satisfacer para cualquier desplazamiento infinitesimal δz de la superficie, la expresión entre corchetes debe ser idénticamente cero. Por tanto [21]:

$$(p_1 - p_2) = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right). \quad (1.20)$$

La ecuación anterior se conoce como ecuación de Young-Laplace y es considerada como la ecuación fundamental que describe los fenómenos relacionados a la capilaridad. De acuerdo a la convención utilizada aquí, el medio con mayor presión es aquel donde la curvatura es positiva, es decir, donde se encuentran los centros de los radios de curvatura.

Desde el punto de vista de la dinámica de fluidos, la ecuación de Young-Laplace aparece como una condición de frontera al utilizar las ecuaciones de Navier-Stokes para describir el flujo de dos fluidos inmiscibles. Siendo \hat{n} la dirección normal a la superficie, se tiene una expresión para la diferencia entre los esfuerzos $\sigma^{(1)}$ y $\sigma^{(2)}$, de los medios 1 y 2, respectivamente:

$$-\left(p^{(1)} - p^{(2)}\right) n_i + \left(\sigma_{ik}^{(1)} - \sigma_{ik}^{(2)}\right) n_k = \gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2}\right). \quad (1.21)$$

1.2. Emulsiones.

El encapsulado de agentes farmacéuticos tanto con microfluidica como con los métodos convencionales, está en estrecha relación con la formación de emulsiones y con el estudio de su estabilidad, siendo este proceso, el primer paso a realizar para cualquier encapsulado. En esta sección se definirán las emulsiones, microemulsiones y emulsiones múltiples. Se dará la definición de emulsión como un caso particular del estado coloidal y se mencionarán algunos detalles respecto a su estabilidad. Finalmente, se mencionarán los mecanismos por los que es posible obtener microcápsulas y vesículas a partir de emulsiones dobles.

1.2.1. Estado coloidal

En general, una dispersión coloidal comprende una colección de pequeñas partículas, gotas o burbujas de una fase dispersada en una segunda fase o medio continuo, los tipos de estados coloidales que se pueden obtener en diferentes medios se presentan en la tabla 1.1, aunque también existen formas más complejas, en las que coexisten más de dos tipos de fases. La definición clásica del estado coloidal, considera que la dimensión de las partículas suspendidas está comprendida en el rango de 1nm-1 μ m, sin embargo, en la práctica, existen dispersiones coloidales con partículas de hasta decenas o cientos de micrómetros. Alguna de las dos fases o ambas, pueden estar en estado líquido, gaseoso, sólido o en estados intermedios (estados de fase supercríticos) [22]. Existen dos distinciones principales de suspensiones coloidales. En primer lugar mencionaremos las suspensiones liofóbicas, aquellas que no se forman espontáneamente al poner en contacto las fases puesto que su estado coloidal es termodinámicamente inestable comparado con

el estado en el que las fases están separadas; estas dispersiones pueden formarse mediante energía mecánica en forma de agitación, la cual contribuye al mezclado y posterior formación del estado coloidal. En el caso del presente trabajo, la energía se suministra al sistema en forma de inyección de flujo, que contribuye directamente a la formación de gotas. Este tipo de estado coloidal es considerado, desde el punto de vista termodinámico, un estado metaestable³. Ejemplos de estas dispersiones son las emulsiones y las espumas. El otro tipo de suspensiones existentes son las liofílicas, que son termodinámicamente estables, estos coloides se forman espontáneamente cuando las dos fases son puestas en contacto, ya que la dispersión es termodinámicamente más estable que el estado en el que las fases están separadas. Ejemplos de estas dispersiones son las micelas formadas con tensoactivos o las suspensiones de partículas con propiedad superficial hidrofílica en agua [22].

Tabla 1.1: Tipos de dispersiones coloidales. Adaptada de [22].

| Fase Dispersa | Medio Continuo | Nombre |
|----------------------|-----------------------|-------------------|
| Líquido | Gas | Aerosol líquido |
| Sólido | Gas | Aerosol sólido |
| Gas | Líquido | Espuma |
| Líquido | Líquido | Emulsión |
| Sólido | Líquido | Suspensión |
| Gas | Sólido | Espuma sólida |
| Líquido | Sólido | Emulsión sólida |
| Sólido | Sólido | Suspensión sólida |

1.2.2. Emulsiones y microemulsiones

Emulsiones

Las emulsiones son dispersiones coloidales, en las cuales, gotas de una fase líquida (fase dispersada o interna) se encuentran dispersas en una segunda fase líquida de diferente composición (fase externa o continua). El tamaño de las gotas dispersadas puede llegar

³Decimos que un sistema termodinámico presenta un estado metaestable cuando se encuentra en un estado de equilibrio *parcial*, es decir, que puede permanecer sin cambios durante tiempos largos (comparados con los tiempos de observación o de medición de las propiedades del sistema), pero que en algún tiempo posterior cambiará hacia un estado diferente. Esto sucede porque los estados metaestables no son estados de menor energía del sistema [23].

a ser de decenas o hasta cientos de micrómetros. En la mayoría de emulsiones, uno de los líquidos es una solución acuosa y el otro es un aceite, es decir, un compuesto o mezcla de hidrocarburos cuyas temperaturas de fusión y vaporización permitan que se encuentre en estado líquido a temperatura ambiente. De acuerdo al tipo de líquido que forme la fase continua y la fase dispersada, podemos distinguir dos tipos de emulsiones simples: las de gotas de aceite dispersadas en agua, denominadas aceite-en-agua (O/W por sus siglas en inglés) y las de agua-en-aceite (W/O) [22], conocidas también como emulsiones inversas. Es posible formar emulsiones más complejas que involucran más de dos fases líquidas, llamadas emulsiones múltiples, las cuales se tratarán en una sección aparte.

Estabilidad

Es importante recordar que las emulsiones se encuentran en un estado coloidal liofóbico, cuya estabilidad temporal depende de múltiples factores, siendo los más importantes la viscosidad y tensión interfaciales, repulsión o atracción entre partículas, razón de volumen entre la fase dispersada y la continua, tamaño de las gotas, diferencia de densidades entre las fases y viscosidad de bulto. Es muy común el uso de moléculas tensoactivas como estabilizadoras de emulsiones, debido a que al formar una membrana en la interfaz que envuelve las gotas de la fase dispersada, contribuyen a disminuir la tensión interfacial entre los líquidos involucrados, y también sus regiones polares pueden crear repulsión entre las gotas suspendidas. Una forma de asegurar que la concentración de tensoactivo utilizada es la suficiente para formar una membrana en la interfaz, es utilizar la concentración micelar crítica (CMC): al agregar moléculas tensoactivas a una fase acuosa, algunas se difundirán en el bulto (dependiendo su solubilidad), mientras otras se quedarán en la superficie, produciendo una disminución en la tensión superficial; a mayor concentración, se seguirá saturando la superficie y la tensión superficial decaerá, a la vez que las moléculas en el bulto comenzarán a agregarse en estructuras micelares; una vez alcanzada la CMC, la interfaz estará completamente saturada (habrá una membrana de moléculas tensoactivas) y la adición de concentración sólo resultará en un incremento en la cantidad de estructuras micelares en el bulto del líquido. Cuando se alcanza la CMC, la tensión superficial deja disminuir. Este punto coincide con un abrupto incremento de la luz dispersada por la solución, a la vez que se observa disminución en la conductividad/mol (en caso de que haya electrolitos presentes), disminución de la cantidad de moléculas tensoactivas libres y un cambio de comportamiento en la densidad del líquido [17].

La formación de las micelas y, en general, de las estructuras autoensambladas de tensoactivos es debida a la doble afinidad de dichas moléculas: las moléculas de agua presentan una fuerte inclinación a formar enlaces hidrógeno⁴ entre sí, formando configu-

⁴El enlace hidrógeno es una interacción electrostática que surge entre moléculas de carbono y oxígeno,

raciones ordenadas. Cuando se introducen moléculas no polares, éstas son incapaces de formar enlaces hidrógeno (*e.g.* alcanos), la configuración más favorable desde el punto de vista energético es la de conservar los enlaces hidrógeno entre las moléculas de agua, formando una estructura alrededor de las moléculas de soluto. En el caso de las moléculas anfífilas pueden formarse estructuras tales como micelas, bicapas, o fases más complicadas como las eponjas [15].

Existen también emulsiones estabilizadas con partículas sólidas, en lugar de tensoactivos, llamadas emulsiones Pickering [17, 22]. Las partículas sólidas presentan la ventaja de poder reemplazar a las moléculas tensoactivas en situaciones en donde éstas no pueden usarse, por ejemplo, ante altas temperaturas [24].

De entre los diferentes mecanismos por los que ocurre la desestabilización de las emulsiones, dos de ellos serán de nuestro interés:

- **Coalescencia.** Es cuando dos o más gotas se fusionan para formar una gota de mayor tamaño lo cual disminuye el área total superficial [22] y por lo tanto, representa una disminución de la energía (recordemos que la energía interfacial proviene de que la interfaz tiende a minimizar su área).
- **Maduración de Ostwald.** Ocurre debido a la diferencia de presión que existe entre gotas de tamaños diferentes. La ecuación de Young Laplace (ecuación 1.1), nos dice que las gotas pequeñas tendrán una mayor presión debido a que su curvatura es grande mientras que gotas de mayor tamaño tendrán una menor presión [17]. Cuando dos gotas de tamaño muy diferente entran en contacto, las gotas pequeñas tenderán a incorporarse a las gotas grandes, de modo que después de cierto tiempo de formada una emulsión, las gotas pequeñas habrán desaparecido y habrá muchas gotas de gran tamaño. [22].

A tiempos largos, ambos efectos son indistinguibles, pues producen el mismo efecto de formación de gotas de gran tamaño, que finalmente tiende a la separación de las fases [22].

Microemulsiones.

Existe un caso particular de emulsiones que son consideradas liofílicas y poseen una gran estabilidad. Estas se obtienen cuando la fase dispersada se encuentra encapsulada en estructuras micelares, usualmente del orden de 10-100 nm de diámetro. Es común que para la formación espontánea de estas emulsiones se añada un segundo tensoactivo al

cuando la distancia molecular entre ellas es menor a dos radios de Van der Waals pero mayor a la que hay en un enlace covalente.

sistema, llamado co-tensoactivo, que ayude a disminuir la tensión interfacial a valores del orden de $10^{-3} - 10^{-4}$ mN/m [17, 22].

1.2.3. Emulsiones múltiples.

Existen emulsiones más complejas que pueden ser del tipo O/W/O o W/O/W, como la que se esquematiza en la figura 1.5. Una forma tradicional de generar una emulsión del tipo W/O/W, por ejemplo, consiste en hacer una emulsión primaria, estable, tipo W/O, mediante agitación y con el uso de algún tensoactivo que estabilice la emulsión; y posteriormente reemulsificar esta primera emulsión en una segunda fase acuosa, con la adición de otro tensoactivo, resultando en una emulsión estable tipo W/O/W [25].

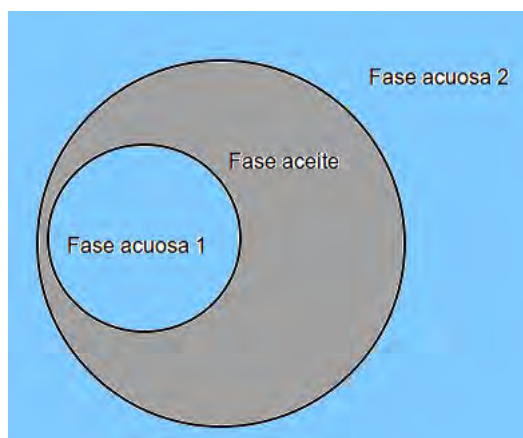


Figura 1.5: Dibujo esquemático de una emulsión doble tipo W/O/W.

1.2.4. Formación de microcápsulas y vesículas a partir de emulsiones dobles.

La característica de las emulsiones, tanto simples como múltiples, que más nos interesa en el presente trabajo, es su capacidad de encapsular agentes de interés farmacéutico o biológico en su interior. Poniendo como ejemplo una emulsión simple tipo W/O, vemos que es posible encapsular algún compuesto hidrofílico en el interior de las gotas acuosas, siendo la fase aceite el medio en el que es enviado el compuesto. En este contexto, las emulsiones dobles son una herramienta poderosa para la formación de microcápsulas, capaces de contener un activo de interés en su núcleo, y mantenerse estables en una fase externa afín a la de su núcleo. Cuando el grosor de la pared de la microcápsula es de sólo dos moléculas de espesor (bicapa), se dice que tiene estructura de vesícula (ver

figura 1.6), que puede ser de tipo polimérica (polimerosoma) [26], lipídica (liposoma) [25], o incluso puede estar formada a base de partículas (coloidosoma) [27].

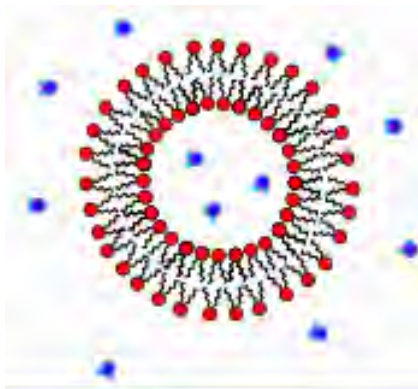


Figura 1.6: Dibujo esquemático de la estructura transversal de una vesícula formada con moléculas tensoactivas. Los círculos rojos representan la región hidrofílica de las moléculas y las colas representan la región hidrofóbica.

Los liposomas merecen especial atención, como acarreadores de fármacos, debido a que presentan grandes ventajas. Al ser formados por moléculas lipídicas, al igual que las membranas celulares, los liposomas son estructuras biocompatibles que proveen la oportunidad única de enviar fármacos dentro de las células o incluso en los compartimentos internos de la célula. También es posible funcionalizar su membrana de manera que sea reconocida por otras células, pueden, por ejemplo, ser fagocitados por una bacteria patógena y liberar su fármaco en el interior de ésta [28]. Sin embargo, los liposomas presentan la desventaja de que la gama de lípidos a utilizar es limitada. En cuanto a la velocidad de liberación, las vesículas, al ser permeables permiten un envío prolongado de los componentes activos al exterior.

Es posible también, a partir de emulsiones dobles, formar microcápsulas con paredes polimerizadas, esto es, que en lugar de tener sólo dos moléculas de espesor en una configuración ordenada, como en el caso de las vesículas; tienen un entramado de moléculas poliméricas (copolímeros anfifílicos), formando paredes impermeables. Los polimerosomas y las microcápsulas tienen la ventaja de ser mecánicamente más estables que los liposomas y de que su estructura química puede variarse en base a un amplio rango de monómeros disponibles comercialmente, permitiendo también la preparación de estructuras capaces de responder a estímulos específicos del medio. Estas estructuras presentan la desventaja de que los copolímeros anfifílicos poseen una polidispersidad inherente, por lo tanto, forman microcápsulas inhomogéneas y están conceptualmente lejos de ser estructuras bio-inspiradas, como las vesículas lipídicas. Las microcápsulas con paredes

impermeables son usadas en productos donde es necesario aislar las sustancias activas, para después enviarlas rápidamente hacia alguna zona de interés. Un ejemplo de este tipo de comportamiento se dará en el capítulo 4.

En la última década, se ha hecho uso de moléculas anfifílicas con estructura ramificada llamadas Dendrímeros Jano (en alusión al dios bifronte romano de los inicios y las puertas) con los que es posible formar estructuras tipo vesículas, llamadas dendrimerosomas. Éstas combinan las ventajas de las propiedades de las vesículas lipídicas y de los polimerosomas. Los dendrímeros tienen un peso molecular bien definido, esto significa que son monodispersos en tamaño y por tanto, forman vesículas homogéneas, así que también son considerados modelos bio-inspirados de membranas biológicas o células artificiales. Son estables en periodos de tiempo prolongados, como las vesículas poliméricas y menos permeables que los liposomas. Finalmente, se tiene la ventaja de que es posible sintetizar dendrímeros a partir de una amplia gama de moléculas precursoras, tantas como ofrece la química orgánica [29].

1.3. Hidrodinámica.

El primer concepto que debemos conocer para describir las ecuaciones de la dinámica de fluidos es el de *elemento de fluido*. Consideraremos como elemento de fluido un volumen que sea lo suficientemente grande para conservar las propiedades macroscópicas (del orden de 0.3 nm en líquidos y 3 nm en gases [20]), esto es, lo suficientemente grande para que su densidad no tenga variaciones bruscas ante cambios de volumen y podamos definirla con precisión *en ese punto*, junto con sus demás propiedades de fluido como temperatura y velocidad [30]. Algunas veces es útil considerar al elemento de fluido como un elemento poseedor de volumen y forma para analizar sus esfuerzos internos al deslizarse respecto a otros elementos de fluido; y otras veces, será más útil considerarlo un elemento puntual, para analizar su dinámica.

1.3.1. Descripciones euleriana y lagrangiana, derivada material

Para estudiar la dinámica de un fluido en movimiento, siempre será necesario expresar sus cantidades como presión, velocidad y densidad en función de la posición y habrá que describir cómo éstas cambian en el tiempo, esto significa que algunas de las cantidades involucradas serán descritas en términos de campos⁵. Para esta finalidad existen dos

⁵Las variables de campo pueden ser tensores, como en el caso del tensor de momento y del gradiente de velocidades; vectores, como en el caso de la velocidad y el gradiente de la presión; o escalares, como la densidad, viscosidad, presión, y otras variables termodinámicas.

formulaciones; en la formulación euleriana, el observador se sitúa en un punto fijo \vec{r} en el espacio y observa la evolución temporal de los campos vectoriales en ese punto, por lo tanto, en esta descripción la posición \vec{r} y el tiempo t son variables independientes y los campos vectoriales que definen al fluido serán de la forma $\vec{F}(\vec{r}, t)$ [20].

Por otra parte, en la descripción lagrangiana, uno sigue la historia de las partículas de fluido individuales conforme éstas se mueven, de manera que el sistema coordenado $\vec{r}_i(t)$ de cada partícula depende del tiempo. En esta descripción los campos vectoriales serán de la forma $\vec{F}(\vec{r}_i(t), t)$ [20].

Al derivar las ecuaciones de la dinámica de fluidos, la diferencia (desde el punto de vista operacional) entre las formulaciones euleriana y lagrangiana se verá reflejada cuando se tomen las derivadas en el tiempo de las cantidades físicas. A continuación definiremos la *derivada material*, la cual es un operador que, en su forma general generará un campo tensorial y que establece un nexo entre las descripciones euleriana y lagrangiana de la deformación del medio continuo. La derivada material describe la razón del cambio en el tiempo de cierta cantidad física ζ , expresada en la formulación lagrangiana ($\vec{\zeta} = \vec{\zeta}(\vec{r}, t)$), para un cierto elemento de material, sujeto a un campo de velocidades; tal que [20, 30]:

$$\frac{D\zeta}{Dt} = \frac{\partial \vec{\zeta}(\vec{r}, t)}{\partial t} + \frac{\partial \vec{r}}{\partial t} \cdot \vec{\nabla} \vec{\zeta}(\vec{r}, t) = \frac{\partial \vec{\zeta}(\vec{r}, t)}{\partial t} + \vec{v} \cdot \vec{\nabla} \vec{\zeta}(\vec{r}, t), \quad (1.22)$$

Donde \vec{v} es el flujo de velocidades. El primer término describe la variación local de ζ debido a los cambios temporales en la posición \vec{r} , independientemente del flujo; mientras que el segundo término, llamado término convectivo, describe la razón de cambio $\vec{v} \cdot \vec{\nabla} \vec{\zeta}(\vec{r}, t)$ debido al transporte del elemento a una posición diferente, es decir, debido al flujo [30].

La formulación euleriana es conocida también como formulación conservativa, puesto que permite escribir las ecuaciones del transporte de materia precisamente de forma conservativa y dichas ecuaciones pueden ser derivadas de los principios de conservación de masa, momento y energía. En general, una formulación conservativa hace referencia a una ecuación o sistema de ecuaciones, en las que una cierta propiedad extensiva ζ es conservada [30]. Las ecuaciones en una formulación conservativa toman la forma:

$$\frac{d\zeta}{dt} + \vec{\nabla} \cdot f(\zeta) = 0, \quad (1.23)$$

para una cantidad conservada cualquiera ζ con una adecuada función f . Dicho con palabras, esta ecuación establece que la propiedad física ζ en una cierta región se incrementa cuando una cantidad adicional ζ fluye hacia el interior de la región a través de su superficie y decrece cuando la cantidad ζ fluye hacia el exterior, no habiendo otra forma en que

la propiedad ζ pueda variar en dicha región.

Leyes de conservación.

Así, asumiendo el principio de conservación de la masa, se obtiene la llamada ecuación de continuidad [11]:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot (\rho \vec{v}) = 0, \quad (1.24)$$

donde ρ es la densidad del elemento de fluido y \vec{v} el campo de velocidades. Al término $\rho \vec{v}$ se le conoce como razón de flujo. De forma similar, partiendo de la conservación de momento, se obtiene la relación [11, 20]:

$$\rho \frac{D\vec{v}}{Dt} = \vec{F} + \vec{\nabla} \sigma, \quad (1.25)$$

donde \vec{F} es una fuerza externa aplicada sobre el elemento de volumen y σ es un tensor de segundo orden que describe los esfuerzos internos generados en el elemento de material debido a presión p ejercida sobre el elemento de fluido o a la fricción con elementos de material vecinos y tiene la forma [20]:

$$\sigma_{ik} \equiv -p\delta_{ik} + \sigma'_{ik}, \quad (1.26)$$

donde σ'_{ik} es denotado como el tensor de esfuerzo viscoso, y representa la i -ésima componente de la fuerza de fricción por área actuando sobre un elemento de superficie, el cual es definido de tal forma que la superficie sea perpendicular a un vector unitario \hat{e}_k . De manera que la fuerza de fricción se puede expresar como [20]:

$$(dF_{visc})_i = \sigma'_{ik} n_k da, \quad (1.27)$$

y la fuerza total externa, debido a la presión:

$$(dF_{pres})_i = -p\delta_{ik} n_k da. \quad (1.28)$$

La expresión más general que se puede obtener para el tensor σ'_{ik} , es:

$$\sigma'_{ik} = \mu \left(\partial_k v_i + \partial_i v_k - \frac{2}{3} \delta_{ik} \partial_j v_j \right) + \xi \delta_{ik} \partial_j v_j. \quad (1.29)$$

Donde los coeficientes μ y ξ representan la viscosidad de cizallamiento y la dilatacional, respectivamente, conocidos también como primera y segunda viscosidad. El coeficiente

μ es conocido también como viscosidad dinámica del fluido. Introduciendo esta información en la ecuación 1.25 y tomando en cuenta que $\vec{F} = \vec{F}_{visc} + \vec{F}_{pres}$, se obtienen las ecuaciones de Navier-Stokes (N-S) [11, 20, 30]:

$$\rho \frac{D\vec{v}}{Dt} = -\nabla p + \mu \nabla^2 \vec{v} + \left(\frac{1}{3}\mu + \xi\right) \nabla(\nabla \cdot \vec{v}) + F_{ext}, \quad (1.30)$$

donde F_{ext} toma en cuenta fuerzas externas que actúan a través del cuerpo total del fluido, ejemplos de estas fuerzas podrían ser la gravedad o los campos eléctricos. En el caso de fluidos incompresibles las ecuaciones de Navier-Stokes se reducen a:

$$\rho \frac{D\vec{v}}{Dt} = -\nabla p + \mu \nabla^2 \vec{v} + F_{ext}. \quad (1.31)$$

Es importante notar que el término del lado izquierdo, llamado término convectivo o inercial es no lineal en la velocidad. Esto puede verse fácilmente al desarrollarlo en la forma euleriana:

$$\frac{D\vec{v}}{Dt} = \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \vec{v} \cdot \nabla \vec{v}. \quad (1.32)$$

El primer término de la derecha representa una variación de la velocidad en el tiempo, una aceleración, característica de flujos no estacionarios, mientras que el segundo término, no lineal, al ser cuadrático en la velocidad conduce a soluciones no lineales. Los flujos turbulentos son un ejemplo en donde ambas partes del término convectivo tienen una contribución importante, conduciendo a flujos dependientes del tiempo y caóticos (altamente sensibles a las condiciones iniciales).

1.3.2. Números adimensionales.

Una práctica común en la descripción de la dinámica de fluidos, es el uso de números adimensionales que provienen de establecer razones entre parámetros físicos o geométricos. Es un hecho experimental, que flujos con diferentes escalas de tamaños o velocidades mantienen un mismo comportamiento siempre y cuando las razones entre sus parámetros se mantengan invariantes o en un valor cercano. Landau llamó a este fenómeno Ley de similitud en su famoso curso de física teórica. Su definición se cita textualmente a continuación [21]:

”Flujos que cumplen una misma relación entre ciertos parámetros geométricos y físicos, se comportarán igual al cambiar las escalas, siempre que se mantenga la misma relación entre parámetros.”

El más importante de los números adimensionales es el número de Reynolds, representa la razón entre las magnitudes características involucradas en los términos convectivo $\frac{D\vec{v}}{Dt}$ y de viscosidad $\mu \nabla^2 \vec{v}$ en las ecuaciones de N-S, para un perfil de flujo dado:

$$Re = \frac{\rho UL}{\mu}, \quad (1.33)$$

donde U y L son respectivamente, la velocidad y longitud características del sistema y μ la viscosidad dinámica.

Cuando $Re \ll 1$, el término inercial en las ecuaciones de N-S puede ser despreciado y las ecuaciones que describen la dinámica del fluido se reducen a la ecuación de Stokes:

$$-\frac{1}{\rho}\nabla p + \frac{1}{\rho}\mu\nabla^2\vec{v} + \frac{1}{\rho}F_{ext} = 0. \quad (1.34)$$

En ausencia de superficies libres o interfaces, la solución a esta ecuación (y por lo tanto, el perfil de flujo que predicen) posee las propiedades de linealidad, reversibilidad, unicidad y reciprocidad [11].

En el estudio de los flujos en microcanales, los números adimensionales que proporcionan mayor información son aquellos que toman en cuenta los efectos debidos a la capilaridad. Así, en este trabajo será importante el llamado número capilar, que establece la relación entre fuerzas viscosas y tensión interfacial:

$$Ca = \frac{\mu U}{\gamma} \quad (1.35)$$

Así como el número de Weber, que muestra la razón entre la inercia del fluido y la tensión interfacial):

$$We = \frac{\rho U^2 L}{\gamma} \quad (1.36)$$

Nótese que, tanto el número capilar como el número de Weber muestran la relación entre la viscosidad y la capilaridad, sólo que el primero establece una relación entre fuerzas y el segundo, una relación entre energías. Para el ejemplo de la formación de una gota en un microcanal de la figura 1.7, habrá una competencia de fuerzas; por una parte, la fuerza viscosa o de arrastre, debido a la propia velocidad del líquido fluyendo hacia fuera de la punta cónica y por otro lado la fuerza debida a la tensión superficial, que busca disminuir el área de la interfaz [31].

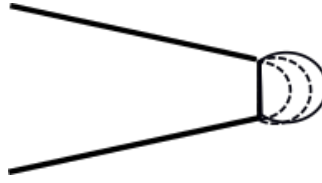


Figura 1.7: Formación de una gota que crece esféricamente debido a la tensión interfacial.

Finalmente, los efectos de la gravedad, pueden ser cuantificados mediante el número de Bond, el cual compara la gravedad con la tensión interfacial:

$$Bo = \frac{\Delta\rho g l^2}{\gamma_0} \quad (1.37)$$

Donde $\Delta\rho$ es la diferencia de densidades entre los fluidos involucrados, g es la aceleración de la gravedad y l es una escala de longitud característica.

1.3.3. Esfera en un flujo laminar estacionario.

Existen pocas soluciones exactas de las ecuaciones de Navier-Stokes, dada la dificultad para resolverlas. En particular, nos será de utilidad la solución al problema de encontrar la fuerza ejercida sobre una esfera rígida de radio a y estacionaria en un fluido de viscosidad dinámica η fluyendo a velocidad constante v_0 . Utilizando la ecuación de continuidad 1.24 y las ecuaciones de N-S con la simplificación dada por $Re \ll 1$ se obtiene que la fuerza total de arrastre ejercida por el fluido es [20]

$$F_{drag} = 6\pi\eta a v_0. \quad (1.38)$$

La anterior es conocida como fórmula de Stokes. En el caso en que la esfera rígida tenga una velocidad no nula u , en un fluido cuya velocidad en zonas lejanas a la esfera es v , se obtiene:

$$F_{drag} = 6\pi\eta a (v - u). \quad (1.39)$$

1.4. Microfluídica.

Durante la década de los 80's, surgió un nuevo campo tecnológico enfocado a la miniaturización de procesos con aplicaciones químicas, biológicas y biomédicas. Estos

sistemas fueron denominados como MEMS (microelectro-mechanical systems, por sus siglas en inglés). La fabricación de MEMS tuvo un amplio desarrollo durante la década de los 90's y estos dispositivos fueron utilizados en aplicaciones cada vez más diversas e interdisciplinarias, uno de estos nuevos desarrollos, consistió en la creación de dispositivos capaces de operar con flujos controlados en su interior, generando así, una nueva disciplina conocida como *microfluídica*. Paralelo al desarrollo de los campos de miniaturización y microfluídica, surge el concepto lab-on-a-chip (laboratorio en un chip)⁶, cuya finalidad es la de llevar a cabo procesos químicos o fisicoquímicos, que usualmente requieren del uso de varios equipos, varias etapas de trabajo o incluso de varios laboratorios. El concepto lab-on-a-chip busca realizar este tipo de procesos de forma integrada, en un solo dispositivo miniaturizado [11]. Esto puede llevarse a cabo gracias a que en los dispositivos MEMS y microfluídicos surgen efectos que usualmente son despreciables en la escala macroscópica y que pueden ayudar en la eficiencia de los procesos. Un ejemplo de estos efectos es el movimiento browniano, usualmente despreciable en escalas macroscópicas y bajo ciertas condiciones de velocidades de flujo, pero cuya presencia es importante a pequeña escala además de que depende de la temperatura del sistema. Otro efecto que cobra gran importancia es la interacción entre los fluidos utilizados y las superficies en las que estén confinados. En la microescala serán también de gran importancia los efectos relacionados con la capilaridad, concepto que trataremos extensamente en secciones posteriores. Existen también interacciones que usualmente debemos considerar en la escala macroscópica, y que se vuelven despreciables en la microescala, un ejemplo de ello, quizá el más sorprendente, es la poca contribución de la gravedad en los flujos confinados en microcanales. En la microescala, es más importante la contribución de las fuerzas debidas a la capilaridad que la fuerza debida a la gravedad.

Incluso cuando el concepto de microfluídica es muy reciente, es posible encontrar algunas definiciones en la literatura actual, en la referencia [20] se da una definición desde un punto de vista físico: "Microfluídica es el estudio del movimiento de fluidos en micro-sistemas", mientras que en la referencia [11] encontramos una definición más enfocada al desarrollo tecnológico: "Microfluídica es el estudio de flujos, que pueden ser simples o complejos, de un solo tipo de líquido o multifásicos, los cuales circulan en microsistemas artificiales, cuya fabricación hace uso de nuevas tecnologías". Esta segunda definición considera el tipo de técnica de fabricación utilizado y la complejidad que usualmente está presente en las aplicaciones de la microfluídica, aunque el concepto podría ser ampliado un poco más, puesto que la microfluídica es un campo multidisciplinario, y el sólo estudio del "movimiento de los flujos" no provee una descripción completa de esta disciplina. Una mejor definición podría ser como sigue: La microfluídica es el estudio de la dinámica de fluidos confinados en microcanales artificiales, y el efecto de los fenómenos físicos y químicos, no despreciables, que determinan dicha dinámica.

⁶Se ha usado el nombre original en inglés de este concepto dado lo amplio de su uso en el lenguaje común de los dispositivos MEMS y microfluídicos.

Además del concepto de microfluídica, es importante, intentar hacer un acercamiento a una definición de *dispositivo microfluídico*. Siguiendo la revisión histórica que se presenta en la referencia [11], es posible resumir el concepto de la siguiente manera:

Un dispositivo microfluídico {

- Cumple la finalidad de llevar a cabo un proceso físico o químico en una pequeña escala de longitud.
- En él, los flujos están confinados en canales del orden de 10^1 - $10^3 \mu m$.
- Es una herramienta tecnológica, pero puede resolver problemas científicos y conducir al planteamiento de nuevas preguntas.

1.4.1. Tipos de dispositivos microfluídicos.

Existen diversas formas de fabricar dispositivos microfluídicos; atendiendo a las necesidades particulares del experimento, en cuanto a precisión, tamaño, resistencia química etc.; las técnicas para crear microcanales pueden llegar a ser muy particulares e incluso tan inusuales como la creación de canales con cinta adhesiva sobre portaobjetos de vidrio. En este trabajo se mencionarán sólo las técnicas más utilizadas y se expondrán las razones por las que se eligió una en particular para el desarrollo de esta tesis. A continuación se presentan las principales técnicas de fabricación de dispositivos microfluídicos.

Dispositivos hechos con litografía en sustrato de sílica o vidrio.

Esta tecnología permite la fabricación de microcanales con alta precisión, reportada en alrededor de 20 nm. Estos materiales poseen propiedades que pueden ser utilizadas en la fabricación de dispositivos microfluídicos entre las que figuran: buena conducción de calor, con pequeños coeficientes de expansión térmica a temperatura ambiente, del orden de $10^{-6} \text{ } ^\circ C^{-1}$. Respecto a sus propiedades eléctricas, el silicón sin dopar es aislante a temperatura ambiente y posee propiedades piezoeléctricas débiles, esto es, presenta poca variación en su resistividad ante deformaciones. En cuanto a sus propiedades mecánicas, tanto el silicón como el vidrio son materiales frágiles, es decir, que su respuesta a la deformación carece de región de comportamiento plástico; justo después de su límite de deformación, se encuentra la región de ruptura mecánica, a un esfuerzo de 7GPa [11].

En cuanto a la fabricación de dichos dispositivos, se realizan mediante el método de litografía, en donde, mediante procesos químicos o fisico-químicos se lleva a cabo el grabado de los microcanales, usualmente con la acción de un ácido. En forma resumida, se requiere de los siguientes pasos:

1. Deposición de una capa de cromo que funciona como máscara ante el ácido. Las zonas donde esta capa esté presente, no estarán expuestas a la acción del ácido.
2. Definición del ancho del canal mediante litografía. Los canales trazados en la máscara de cromo marcarán las zonas donde actúe el ácido, creando el grabado.
3. El proceso de grabado se hace con ácido, usualmente ácido fluorhídrico.
4. Adhesión anódica de una oblea de silicón a manera de tapa, previamente perforada para la inyección de fluidos mediante el método de grabado de iones reactivos profundos (DRIE por sus siglas en inglés).

Dispositivos hechos con litografía suave.

Otra de las técnicas ampliamente utilizadas en la fabricación de dispositivos microfluidicos es la litografía suave en PDMS (polidimetilsiloxano), un polímero que pertenece a una clasificación más amplia de aceites a base de silicón, cuya fórmula química es $(-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}-)$. Este polímero forma un elastómero ⁷ cuando se le agrega un agente reticulante (que lo induce a formar redes) y es expuesto a una temperatura mayor a su denominada temperatura de polimerización (del orden de 70°C).

Este material, una vez polimerizado presenta las siguientes propiedades que son ventajosas para su empleo: Permite una buena visualización de los flujos con microscopía óptica, por ser transparente; se puede tener cierto control sobre su módulo de Young, con base en la razón utilizada de PDMS/reticulante y, su elasticidad permite una fácil conexión del dispositivo con el entubado para alimentar sus flujos. Sin embargo, este material presenta la desventaja de que sus propiedades no son estables respecto al tiempo, siendo difícil de predecir los efectos del envejecimiento en él. Otra desventaja es que el material es originalmente hidrofóbico y puede funcionalizarse sólo temporalmente.

El método de fabricación consiste en hacer moldes de un material rígido, depositar la mezcla de PDMS y el reticulante para luego exponerlo a una temperatura de alrededor de 70°C. Después de esto, el elastómero es retirado del molde. La precisión obtenida

⁷Un elastómero es un material polimérico con propiedades elásticas.

con esta técnica permite hacer microcanales de entre $5\mu\text{m}$ y $500\mu\text{m}$, sin embargo, debido a que es un material suave, se tiene la limitante de que la razón alto/ancho de las dimensiones del microcanal no puede ser mayor a 1/10 [11].

Dispositivos hechos con capilares estirados.

El método utilizado en este trabajo para la fabricación de dispositivos microfluídicos es menos común que los presentados al inicio de esta sección, sin embargo, presenta ciertas ventajas. La primer implementación de este método en el contexto de los microfluidos, fue hecha por Cramer *et al.* [12]. El método consiste en utilizar capilares de vidrio estirados, los cuales constituyen los microcanales por los que se hacen pasar los fluidos. Dichos capilares de vidrio se montan de manera coaxial; con este propósito, los diámetros de los capilares son elegidos de manera que el diámetro exterior de los capilares internos, sea ligeramente menor que el diámetro interior del capilar externo. De esta forma se asegura que los dispositivos mantengan una simetría axial, tal como es muestra en la figura 1.8. Ésta es una de las características más importantes del método, pues a diferencia de como ocurre en los canales hechos con litografía, los flujos a través de capilares arreglados coaxialmente son realmente 3-dimensionales [7]. Usualmente, el capilar externo está constituido por un capilar cuadrado, que facilita el montaje y la observación de los flujos con microscopía óptica y, dado que el tamaño de los lados del capilar externo es mucho mayor que las puntas estiradas de los capilares internos, se considera que el flujo posee simetría axial. En el presente trabajo, se utilizaron capilares externos circulares, que si bien presentan mayor dificultad al momento del armado y visualización, mantienen realmente la simetría axial del flujo.

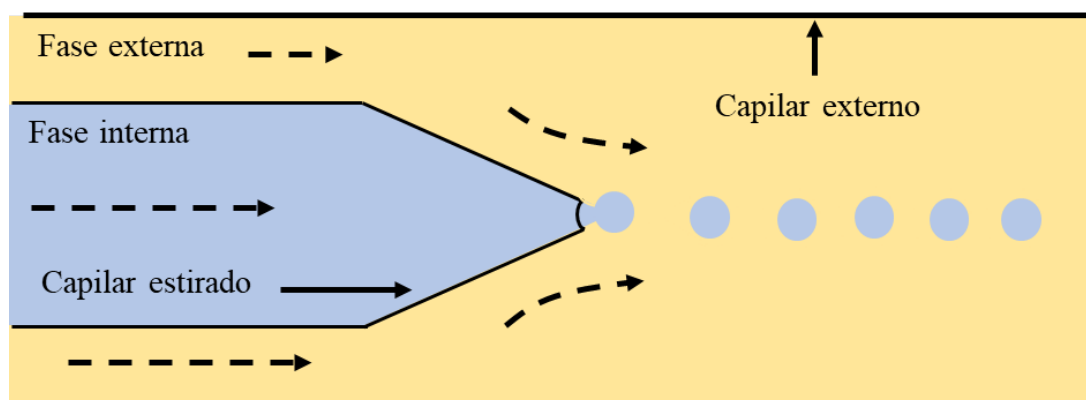


Figura 1.8: Representación esquemática de la formación de gotas en un dispositivo microfluídico hecho a base de capilares estirados.

Otra de las ventajas principales de este método es la de ser modular; es posible repetir el procedimiento de introducir capilares dentro de capilares, en más de un paso, formando así, emulsiones o encapsulados más complejos de forma controlada. El esquema de la figura 1.9 muestra un sistema similar al de la figura 1.8, pero con la adición de una nueva fase interna. Ese sistema permite la formación de emulsiones dobles. Junto con las ventajas geométricas que ofrece este método, se tienen las ventajas antes mencionadas acerca del uso de vidrio en dispositivos microfluídicos. Desde un punto de vista práctico, no sólo resulta fácil la funcionalización de las propiedades superficiales de los microcanales por ser éstos de vidrio; también con este método es particularmente fácil hacer la funcionalización de los capilares, dado que éstos se pueden funcionalizar antes de ser montados. De forma un tanto similar a como ocurre en los dispositivos hechos con PDMS, la conexión del entubado de los dispositivos es bastante fácil y elegante con este método, puesto que esto se realiza mediante puntas de inyección, cuidando que su diámetro coincida con el diámetro de los tubos utilizados.

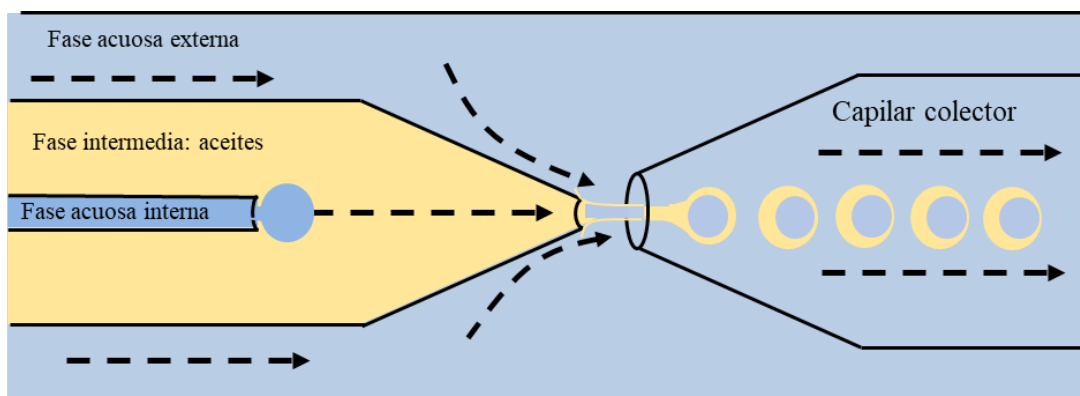


Figura 1.9: Representación esquemática de la formación de una emulsión doble en un dispositivo microfluídico hecho a base de capilares estirados.

1.4.2. Leyes físicas en los microcanales.

Al inicio de la sección anterior, se mencionó que la integración y la miniaturización de procesos en dispositivos microfluídicos, son posibles gracias a que son aprovechadas las propiedades físicas que surgen en la microescala. En esta sección trataremos más a fondo este fenómeno, y se estudiarán en particular las propiedades y leyes físicas que son necesarias para una mejor comprensión del trabajo desarrollado en esta tesis.

Antes de mencionar los efectos importantes y necesarios a tomar en cuenta, es preciso poner en claro también, aquellos procesos que se consideraron *no* necesarios en nuestro caso particular y exponer las razones para despreciarlos. Puesto que la microfluidica trabaja con canales del orden de micrómetros, nos encontramos, en una mesoescala:

- El orden de magnitud es lo suficientemente grande⁸ como para despreciar la identidad de átomos, y fluctuaciones termodinámicas, por lo que es posible adoptar la descripción macroscópica del transporte de materia (ecuaciones de hidrodinámica), del electromagnetismo, termodinámica, etc.
- El orden de magnitud es suficientemente pequeño para que debamos considerar algunos objetos como entes individuales, tal es el caso de las gotas producidas para formar emulsiones o vesículas, lo mismo ocurre si se realiza algún proceso con células o bacterias, estos objetos, del orden de micrómetros, dejarán de ser considerados como parte del bulto (al menos mientras estén dentro de los microcanales), y serán considerados como objetos micromanipulados por flujos.

Como ya se ha mencionado, la gravedad será un elemento casi siempre despreciable en los flujos en microcanales, y las fuerzas superficiales serán responsables de gran parte de los fenómenos que serán observados, como son la capilaridad, adhesión y mojado.

Cuando se trata con canales cuyo tamaño es del orden de nanómetros, ya no es posible suponer la hipótesis del continuo y las ecuaciones físicas deben modificarse. Los dispositivos que operan en este orden de magnitud se conocen como nanofluidicos y aquí sólo se mencionan por completez, pero no nos concierne por el momento, saber tanto acerca de su funcionamiento. La hipótesis del continuo también debe abandonarse cuando se describa el transporte de moléculas a través de membranas porosas, como ocurre en vesículas y polimersomas.

1.4.3. Proceso de emulsificación con microfluidos.

En la sección 1.2, se mencionó que para lograr la emulsificación, que es un estado metaestable, es necesario suministrar una cantidad de energía al sistema. Mientras que en los métodos tradicionales para la formación de emulsiones se les suministra energía

⁸En un cubo de 10 nm por lado, hay alrededor de 3.3×10^4 moléculas, considerando que cada molécula ocupa un volumen de 0.027 nm^3 . Una partícula fluida de este volumen exhibe un número de fluctuaciones del orden de 0.5% [20]. Para suponer la validez de la hipótesis del continuo, la cual establece que las propiedades macroscópicas de un fluido son las de un material continuo en estructura, en lugar de uno constituido por moléculas, como en realidad es [20, 30], las cantidades físicas como la masa, el momento y la energía, asociadas a un pequeño elemento de fluido están definidas como los valores promedio con pequeñas fluctuaciones estadísticas [20].

mecánica por agitación, de forma poco controlada, con el uso de la técnica de microfluidos ésta energía es dada por la velocidad controlada de los flujos en microcanales, que a su vez, permiten la formación de gotas con tamaño y composición química controlada.

Existen tres regímenes posibles para la formación de gotas en microcanales, de goteo (dripping), de chorro (jetting) y de chorro ensanchado (widening jetting) (figura 1.10). Cada régimen es descrito por diferentes mecanismos físicos.

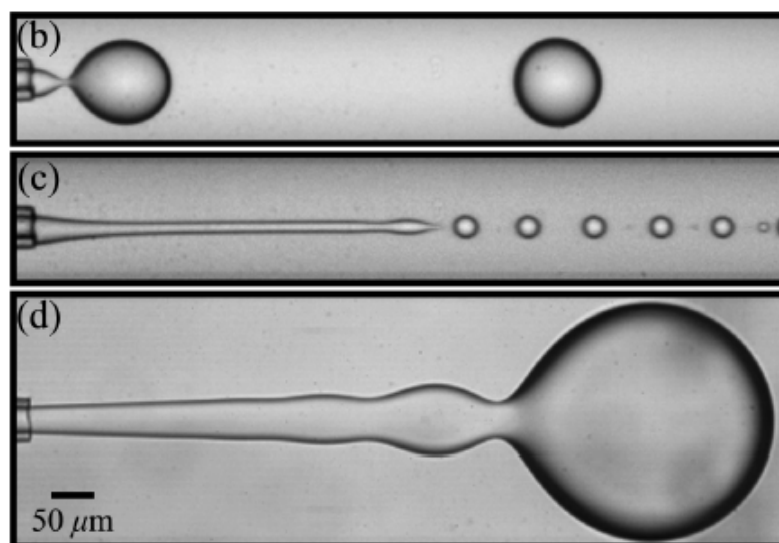


Figura 1.10: Imágenes de microscopía de campo claro de (a) régimen de goteo, (b) régimen de chorro generado por el incremento en la velocidad de la fase interna y (c) Régimen de chorro ensanchado generado por el incremento en la velocidad de la fase externa. Figura adaptada de [9].

Régimen de goteo.

Es el modo de operación en el que se tiene más control sobre el sistema y produce gotas con una mayor monodispersidad. El tamaño de la polidispersidad en este régimen, definida como la desviación estándar de la distribución dividida por el tamaño promedio de gota, es de 1-3% [32]. En éste régimen, donde ambos fluidos, tanto de la fase interna como de la externa fluyen con baja velocidad, la gota comienza a formarse en la punta del capilar interno e incrementa su volúmen en el tiempo manteniendo una forma esférica. Sin embargo, se mantiene en su lugar debido a la fuerza de la tensión interfacial $\pi d_i \gamma$,

donde d_i es diámetro interno del capilar. Por otra parte, la fuerza de arrastre debida al movimiento de los fluidos es, en caso de un número de Reynolds bajo (con $Re = dv\rho_c/\eta_c$, donde el subíndice c denota la fase continua): $3\pi\eta_c(d - d_o)(v - v_d)$, donde η_c , v y ρ_c son la viscosidad dinámica, velocidad y densidad de la fase continua, respectivamente y d_o es el diámetro exterior del capilar, d es el diámetro de la gota y v la componente de la velocidad de la gota creciente, dirigida en el sentido del flujo externo. Esta velocidad se puede escribir en términos de la razón de flujo q como: $v_d \approx q/\pi d$. La anterior es una versión modificada de la fórmula de Stokes presentada por Umbanhowar *et. al.* [31], que toma en cuenta que la punta del capilar ocasiona una reducción de la fuerza de arrastre de la fase externa. La separación de la gota se produce cuando la fuerza de arrastre supera a la tensión interfacial. Es importante mencionar que este balance de fuerzas es una aproximación, que resulta útil en la predicción del tamaño de gotas [31] a razones de flujo pequeñas, aunque los detalles que conlleva el fenómeno de la separación de la gota y del rompimiento de la interfaz es más complicado [33].

Régimen de chorro

Este régimen ocurre cuando la velocidad de la fase externa es incrementada. Conforme ésta aumenta, las gotas que se forman en la punta del capilar son más pequeñas, y su rompimiento ocurre en una zona cada vez más alejada de la punta y comienza a observarse el perfil bien definido de un chorro coaxial en la dirección del flujo externo [9]. La descripción de este régimen se basa en un principio físico distinto al de goteo, conocido como inestabilidad de Rayleigh-Plateau. En 1879 Lord Rayleigh estudió la estabilidad de los chorros en un sistema bifásico de fluidos inmiscibles ante pequeñas perturbaciones sinusoidales del tipo:

$$r = a_0 + \alpha_n \cos(n\theta) \cos(kz), \quad (1.40)$$

donde a_0 es el radio del chorro sin perturbar, $\alpha_n \cos(n\theta)$ es el coeficiente de una serie de Fourier que suma sobre n , que cumple $\{n \mid n \in \mathbb{Z}^+\}$ y z está orientado a lo largo del eje del chorro (ver figura 1.11), los chorros son estables cuando la longitud de onda de la perturbación $\lambda = 2\pi/k$ es menor al radio del chorro y se tornan inestables cuando $\lambda > a_0$.

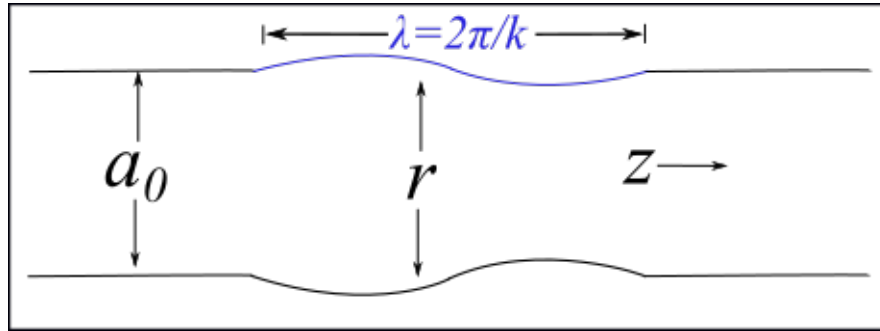


Figura 1.11: Chorro cilíndrico de fluidos coaxiales inmiscibles ante una perturbación de longitud de onda λ

Este tipo de perturbaciones en el chorro resultan en el adelgazamiento de una región del mismo, generando un incremento en la presión de Laplace, debido a la curvatura de la interfaz. Esta gran presión empuja el fluido hacia fuera de la región delgada causando que ésta se haga aún más estrecha hasta que finalmente, el chorro se rompa en gotas [7]. En este régimen, conforme el chorro se adelgaza, el esfuerzo por viscosidad de cizallamiento en la gota es balanceado por la tensión superficial. Este balance de fuerzas viene dado por el número capilar externo:

$$Ca_{out} = \frac{\eta_{out} v_{out}}{\gamma}. \quad (1.41)$$

Cuando Ca_{out} es pequeño, domina la tensión interfacial, forzando al sistema al goteo. En contraste, cuando $Ca_{out} > 1$ el esfuerzo por cizallamiento en la gota es lo suficientemente grande como para superar a la tensión interfacial, propiciando la formación del chorro [9].

Régimen de chorro anchado.

Este régimen se presenta cuando la velocidad de la fase interna es mucho mayor que la velocidad promedio de la fase externa. Esta diferencia de velocidades produce grandes esfuerzos de cizallamiento en la interfaz, lo cual, desacelera el chorro, causando que éste se ensanche en su extremo. En este régimen, donde el chorro se vuelve cada vez más ancho, las fuerzas inerciales del fluido interno están en balance con la tensión interfacial. Este balance está dado por el número de Weber interno:

$$We_{in} = \frac{\rho_{in} d_{tip} u_{in}}{\gamma}. \quad (1.42)$$

Cuando We_{in} es pequeño, la tensión interfacial es la fuerza dominante, conduciendo al sistema de goteo. En contraste, cuando $We_{in} > 1$ la fuerza inercial es lo suficientemente grande como para superar a la tensión interfacial, produciendo el régimen de chorro

anchado [9]. En este régimen, se tiene menos control sobre el tamaño de las gotas producidas, por lo que se obtienen emulsiones con más polidispersidad que en los regímenes de goteo y de chorro.

Desde un punto de vista más general, se tiene que el régimen de goteo ocurre cuando

$$Ca_{out} + We_{in} \leq 1 \quad (1.43)$$

y la transición ocurre cuando se cumple la igualdad. Este resultado fue obtenido experimentalmente por Utada *et. al.* [9] en con un $7 < Re < 50$. La ecuación 1.4.3 nos dice que la transición hacia los dos regímenes depende de la habilidad de las fuerzas inerciales para deformar la gota de líquido que va emergiendo, de su forma esférica (dictada por la tensión superficial) a una forma de chorro. Desde el punto de vista matemático, la formación de gotas es un fenómeno descrito por ecuaciones no-lineales, evidencia de esto es el hecho de que la transición entre regímenes sea muy sensible a las condiciones iniciales [32], en este caso, las razones de flujo. Inclusive, cuando nuestros parámetros se encuentran justo en la transición, es posible observar algunas veces un régimen de comportamiento y algunas veces otro, bajo las mismas condiciones de flujo.

Capítulo 2

Materiales y métodos

Es posible obtener emulsiones dobles utilizando dispositivos microfluídicos a base de capilares de vidrio mediante dos métodos distintos que son microfluídica de coflujo y microfluídica de flujo enfocado. La elaboración de los dispositivos y el funcionamiento es muy similar para ambos casos. Éstos procedimientos se describen a continuación.

2.1. Microfluídica de coflujo.

El dispositivo que más ampliamente se utilizó en esta tesis es el de coflujo, el cual tiene por objetivo la formación de emulsiones dobles de agua en aceite en agua (W/O/W), que al evaporar la fase intermedia conduzca a la formación de vesículas. Este dispositivo en particular tiene la característica de producir emulsiones dobles cuya fase intermedia es muy delgada. La alimentación del dispositivo se esquematiza en la figura 2.1.

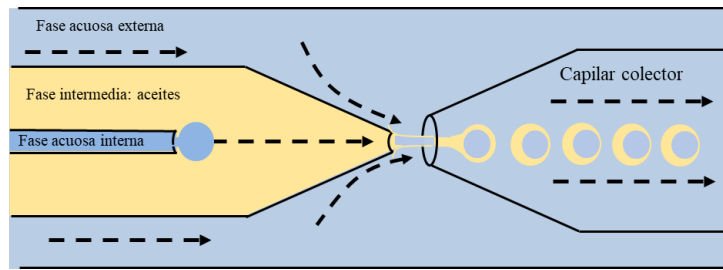
El dispositivo funciona en dos pasos:

- Emulsificación inversa. Cuando se alimenta con una fase acuosa la entrada interna del dispositivo, y esta fase entra coaxialmente en la fase intermedia hecha con aceites, se forma una emulsión de agua en aceite (W/O). Esto se conoce como emulsión inversa, debido a que cuando se hacen emulsiones de agua y aceite es más amplio el umbral de condiciones en que el sistema tiende a emulsificar aceite en agua (O/W).
- Emulsificación doble. Cuando estas gotas de agua en aceite son introducidas coaxialmente en la fase acuosa externa se forma la emulsión doble deseada de gotas de agua en aceite, suspendidas en otra fase acuosa (W/O/W).

En la mayoría de los experimentos realizados, la emulsión doble se obtuvo en forma discontinua, esto es debido a que en el primer paso del funcionamiento del dispositivo

se tiene la formación de gotas de agua en la fase intermedia dentro del capilar inyector, tal como se esquematiza en la figura 2.1. Éstas gotas son reemulsificadas en la punta del capilar de inyección, resultando en la formación de gotas de emulsión doble durante un intervalo de tiempo. Sin embargo, el exceso de aceite en la fase intermedia también se emulsifica al llegar a la punta del capilar inyector, formando gotas de aceite durante un segundo intervalo de tiempo. Es posible obtener un modo de funcionamiento continuo si la velocidad de la fase interna es incrementada hasta que se forme un chorro continuo en el capilar inyector, sin embargo eso sólo es posible cuando la tensión interfacial entre las fases es baja, es decir, cuando se añade un surfactante cuyo tiempo de difusión sea menor al tiempo que toma la formación de las gotas. El régimen discontinuo, si bien es menos eficiente que su contraparte continua, permite la formación de emulsiones dobles con una fase aceite ultra-delgada (de orden menor a un micrómetro), gracias a que todo el aceite que se emulsifica por separado, no se añade a las gotas de emulsión doble, como sucede en la versión continua.

En el presente trabajo, se usaron fosfolípidos como moléculas estabilizadoras, y como los bloques estructurales para la formación de vesículas, los cuales tienen un tiempo de difusión menor al tiempo de la formación de las gotas. Por esta razón, los lípidos no contribuyen a disminuir la tensión interfacial de la interfaz y no es posible obtener un régimen de funcionamiento continuo a menos que se añada algún cosurfactante. La imposibilidad de obtener un régimen contínuo fue verificada experimentalmente.



(a)

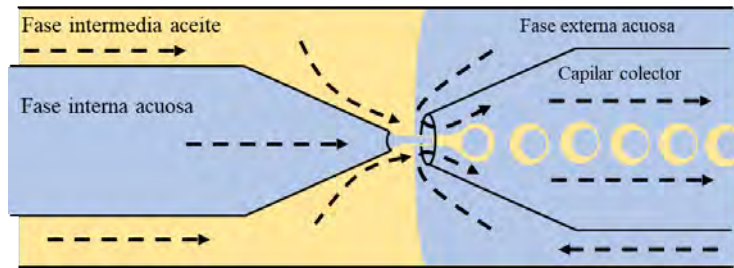


(b)

Figura 2.1: (a) Ilustración esquemática de un dispositivo de microcanales de coflujo para la creación de emulsión doble W/O/W. (b) Micrografía óptica de la producción de la emulsión doble por el método de coflujo.

2.2. Microfluídica de flujo enfocado.

Es posible usar también un método alternativo para generar gotas, que consiste en enfocar el flujo de la fase externa hacia la fase interna, tal como se muestra en la figura 2.2. En esta configuración, las fases interna e intermedia son alimentadas en la dirección usual, mientras que la fase externa se hace fluir en dirección contraria a las dos primeras, en los intersticios entre el capilar inyector y el capilar externo. La mayor ventaja de éste método es la de producir gotas más pequeñas en el método de coflujo, menores al diámetro del capilar inyector. Puesto que con este método las gotas de emulsión doble tienen un espesor mayor de la fase aceite, es un sistema útil para la formación de microcápsulas hechas a base de algún polímero, pero no es apropiado para la formación de vesículas. Con este método, las emulsiones se formaron con las siguientes razones de flujo: 200, 400 y 600 $\mu\text{L/h}$ para las fases interna, intermedia y externa respectivamente.



(a)



(b)

Figura 2.2: (a) Ilustración esquemática de un dispositivo de microcanales de flujo enfocado para la creación de emulsión doble W/O/W. (b) Micrografía óptica de la producción de la emulsión doble por el método de flujo enfocado.

2.3. Proceso de fabricación de los dispositivos.

2.3.1. Materiales y equipo utilizados.

A continuación se enlistan los materiales necesarios para la fabricación de dispositivos microfluídicos hechos a partir de capilares de vidrio estirados.

Para los capilares inyector y colector:

- Capilar cilíndrico 1mm OD., 0.58 mm I.D. y 15mm de longitud (Sutter Instrument).

Para los capilares externos:

- Capilar cilíndrico 2mm O.D., 1.5 mm I.D. y 15mm de longitud (Sutter Instrument).

Para la funcionalizar la superficie de los capilares:

- Trimetoxy(octadecil)silano(silano hidrofóbico) (Sigma)
- (3-Mercaptopropil)trimetoxy-silano(silano hidrofílico) (Sigma)

Para el ensamblado y alimentación del dispositivo:

- Pegamento epóxico de secado en 5 minutos (Devcon o J-B Weld).
- Portaobjetos de 25x76.2 mm (1"x3") de 1-1.2 mm. de grosor (Pearl).
- Puntas de Inyección de calibre 20GA (1/32") (Nordson).
- Tubo de PTFE calibre(1/32") (Cole-Parmer).
- Jeringas de 5 para las fases interna y de 10 mL para la fase externa (Becton-Dickinson).
- Jeringa de vidrio (Hamilton) de 5ml para la fase intermedia.
- Filtros para jeringas, de porosidad de $5\mu\text{m}$ para las fases acuosas tipo Versapor[®] (Sigma).
- Filtros para jeringas, de porosidad de $0.45\mu\text{m}$ para la fase aceite tipo GHP (Sigma).

La producción de las gotas de emulsión doble en los dispositivos microfluídicos fue monitoreada usando un objetivo de 10x en un microscopio invertido (Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen, Alemania) equipado con una cámara rápida (Phantom MiroEX2-2048MM, Vision Research, Wayne, EUA). El lijado de los capilares de vidrio y parte del proceso de ensamblado (alineado) de los dispositivos también fue realizado con ayuda de este equipo de microscopía.

Aquellos experimentos en donde se menciona la caracterización de las microcápsulas Y por métodos de microscopía de fluorescencia, fueron también hechos en el microscopio Axio Observer Z1, equipado con el sistema COLIBRI.2 (Zeiss, Göttingen, Alemania).

Para suministrar las diferentes fases líquidas a los dispositivos microfluídicos, se utilizaron bombas de infusión (Kent Scientific), las cuales permiten dosificar razones líquidas contenidos en jeringas en condiciones de flujo controladas. En el caso particular de los experimentos realizados para esta tesis, se utilizaron siempre razones de flujo constantes.

También se empleó equipo de laboratorio de uso general, como son: balanza analítica, parrillas, horno de secado, baño sonicador (utilizado para desgasificar las soluciones

acuosas), cristalería y equipo de purificación de agua para obtener agua des-ionizada (RiOs 8, Millipore) y agua ultrapura (Simplicity UV, Millipore). Fue necesario también el diseño de algunas piezas en impresión 3D (Cubex) como ayuda en el armado y alineación de los dispositivos.

2.3.2. Tratamiento previo de los capilares.

Estiramiento de capilares en el Pipette Puller P-30 (Sutter Instrument).



Figura 2.3: Estirador de pipetas Pipette Puller P-30.

El estiramiento de los capilares es un paso crucial en la fabricación de los dispositivos. Se ha dedicado una sección especial al respecto, debido a que, para poder adquirir control en este proceso, es necesario comprender los mecanismos por los cuales se estiran las puntas.

El objetivo es obtener capilares estirados con puntas de $20\ \mu\text{m}$ de diámetro destinados a usarse como capilares inyector y colector. Estas puntas serán lijadas hasta obtener los diámetros necesarios para los dispositivos de microfluídica. Es importante mencionar que este diámetro de $20\ \mu\text{m}$ es grande en comparación con los diámetros usados en las aplicaciones biológicas comunes.

El funcionamiento básico de los equipos para estirar capilares consiste en calentar el capilar mediante un filamento de platino que rodea al capilar al mismo tiempo que ejerce una fuerza de estiramiento que termina por dividir al capilar en dos. El calor suministrado

aumenta la viscosidad del vidrio, al tiempo que disminuye su dureza; esto permite que el capilar pueda ser estirado. De esta forma, la zona central donde se dividió el capilar y que fue calentado concluye con una punta estirada, cuyas características dependen del calor suministrado y fuerza aplicada. En algunos equipos es posible, además, controlar la velocidad en que se realiza el estiramiento y el tiempo de enfriado entre ciclos de calor. Las características geométricas de nuestro interés son el diámetro de la punta y la disminución gradual del diámetro (figura 2.4):

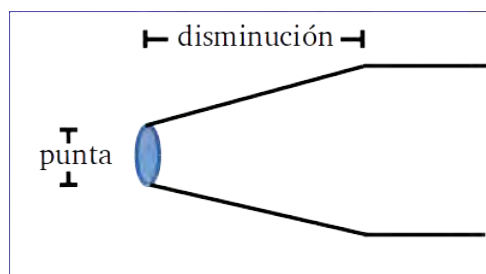


Figura 2.4: Ilustración esquemática de una punta estirada. El control sobre los parámetros físicos de calor y fuerza de estrado influyen en el diámetro final del capilar y la disminución gradual del diámetro.

Para tener una mejor idea de estos parámetros, es bueno tener en cuenta la siguiente “regla general”: un incremento en el calor y en la fuerza del estiramiento producirá puntas más pequeñas y afiladas (la disminución gradual del diámetro será de mayor longitud). La siguiente tabla es una guía general para estirar pipetas de forma controlada, una versión más completa puede consultarse en el manual Pipette Cookbook de la compañía Sutter Instruments, el cual se puede descargar en https://www.sutter.com/PDFs/pipette_cookbook.pdf.

| Parámetro | Incremento | Disminución |
|-----------|---|---|
| Calor | Disminución de diámetro grande. | Disminución de diámetro corta. |
| Fuerza | Puntas más pequeñas y disminución de diámetro grande. | Puntas más grandes y disminución de diámetro corta. |

De acuerdo a dicho manual, los parámetros para la obtención de puntas de alrededor de $20\ \mu\text{m}$ y disminución de 6-8 mm son de 500 y 600 (unidades arbitrarias) para calor y fuerza, respectivamente, en unidades arbitrarias. Sin embargo, estos parámetros resultaron demasiado pequeños en la práctica, y no eran suficientes para el rompimiento del capilar. Por tanto, se realizaron pruebas para conocer la mínima fuerza y calor a partir de la cual los capilares comenzaban a separarse y estirarse correctamente. Partiendo de ahí

se hicieron pruebas para conocer las condiciones óptimas para obtener una punta de 20 μm de diámetro y que fuera resistente al lijado obteniendo la gráfica de la figura 2.5.

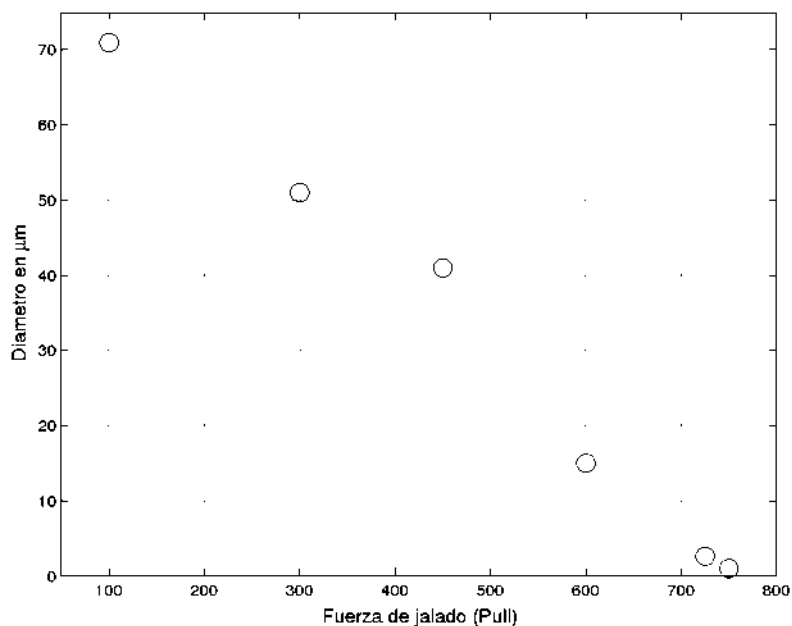


Figura 2.5: Gráfica de diámetro obtenido VS fuerza de jalado manteniendo el calor constante a 650 en el Pipette Puller P-30.

Como puede observarse, el fuerza de jalado ideal para obtener puntas de 20 μm de diámetro es de 600. Finalmente, es importante remarcar que el tiempo para que el capilar se rompa será mayor al esperado para la mayoría de aplicaciones, en las que bastan unos 15 segundos y se obtienen puntas muy delgadas (de 5 μm o menores); el equipo tarda alrededor de un minuto. La figura 2.6 muestra un capilar de vidrio estirado con este método.

Lijado y funcionalización.

En la figura 2.6 Se observa una punta irregular con bordes abruptos. Es por esta razón que se hace necesario el posterior lijado de los capilares, el cual, se realiza de forma transversal (con lija “de agua” de número 200), hasta obtener el diámetro deseado. La

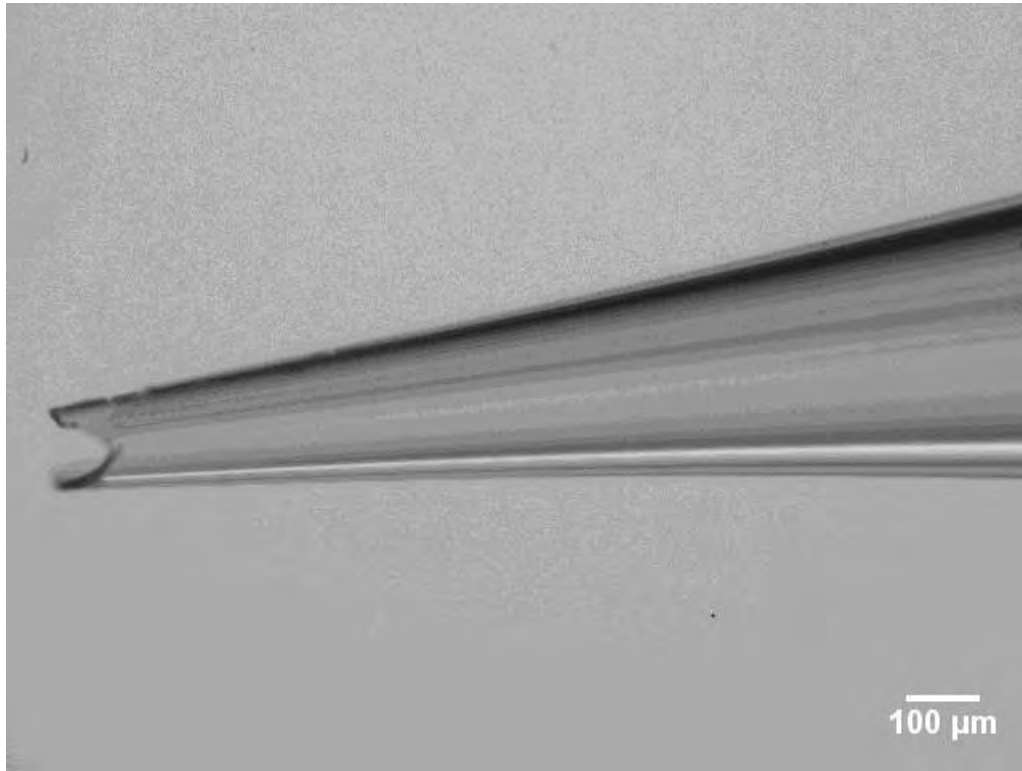


Figura 2.6: Micrografía óptica de un capilar de vidrio estirado con el Pipette Puller P-30.

figura 2.7 muestra un capilar ya lijado, sin bordes abruptos que puedan causar el rompimiento de las gotas de doble emulsión o un funcionamiento hidrodinámico impredecible. El tamaño final de los capilares para los dispositivos que producen emulsión doble hechos en esta tesis fue:

- Para dispositivo de coflujo: 60-80 μm para el capilar inyector y de 120-160 μm para el capilar colector.
- Para dispositivo de flujo enfocado: 40-60 μm para el capilar inyector y de 120-140 μm para el capilar colector.

Posterior al proceso de lijado, los capilares fueron liberados de polvo con aire comprimido y enjuagados con agua ultra-pura. Una vez secos, se procedió a la funcionalización de su superficie mediante un proceso conocido como silanización hidrolítica. Con esta técnica es posible hacer que la superficie de los capilares se torne hidrofóbica o hidrofílica a conveniencia para el buen funcionamiento del dispositivo. Para comprender

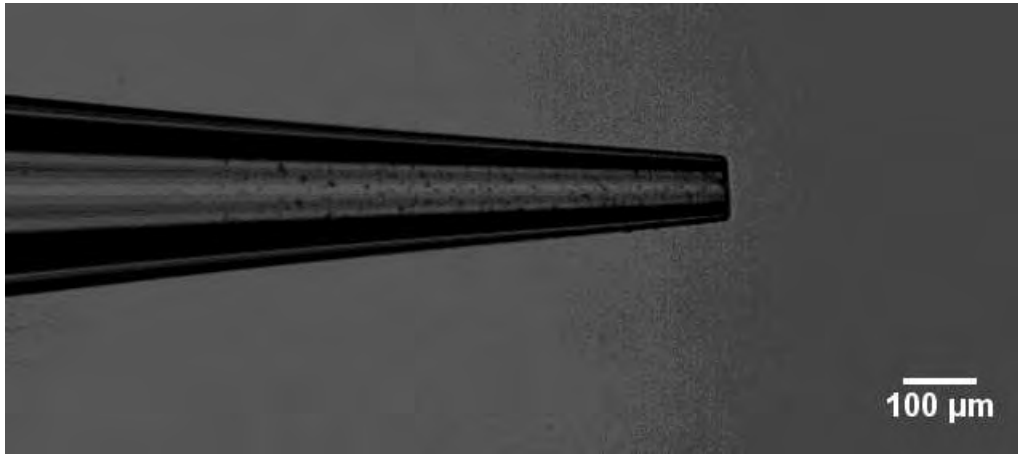


Figura 2.7: Micrografía óptica de un capilar de vidrio estirado y lijado hasta obtener el diámetro deseado.

Lo crucial de este paso, es necesario recordar el funcionamiento de los dispositivos microfluídicos utilizados; en el caso del método de coflujo, el dispositivo forma primero una emulsión tipo W/O, la cual, requeriría una concentración alta de surfactante para su estabilización. Sin embargo, es posible conducir a su formación usando capilares cuyas paredes sean hidrofóbicas, de tal forma que las gotas de agua no tengan adhesión a dichas paredes, obligándolas así, a permanecer suspendidas dentro de la fase aceite con una poca cantidad de tensoactivo. Por otra parte, las gotas de emulsión doble ya formadas, deben sobrevivir al paso por el capilar colector. Para este efecto, es conveniente aumentar la hidrofobicidad de su superficie, evitando así, la adhesión de la fase aceite de las gotas a las paredes del capilar. Es necesario hacer notar, que el uso de poca cantidad de surfactante en la formación de la emulsión doble, permitió estudiar la formación de vesículas únicamente en base al tipo de molécula usada como bloque estructural, que fueron lípidos, polímeros y dendrímeros. En el caso del método de flujo enfocado, también es conveniente hacer hidrofóbico el capilar inyector para evitar la adhesión (o "mojado") de la fase acuosa a la zona exterior del capilar. Al interior, el flujo de un aceite en un capilar hidrofóbico crea una condición de no deslizamiento que produce un flujo tipo poiseuille (con perfil parabólico) en el régimen de $Re < 1$ [30].

El proceso de silanización hidrolítica consiste en poner la superficie a funcionalizar en contacto con el silano, el cual, forma enlaces hidrógeno con la superficie ayudado por moléculas de agua circundantes (que toma de la atmósfera). Esto se hizo sumergiendo los capilares durante una hora en su correspondiente silano. Posteriormente, es necesario dejar secar la superficie, pues al evaporar hidrógenos se forma un enlace covalente entre las moléculas de silano y el sustrato. Esto se realizó en los capilares con aire comprimido y posteriormente con aire suministrado con una jeringa usando tubos de calibre similar a

los capilares.

2.3.3. Montaje del dispositivo.

El montaje del dispositivo se realiza de forma modular sobre un portaobjetos, primero se fija el capilar externo, de 1 mm de diámetro interior, con gotas de resina epóxica. Una vez que se ha secado, se introducen los capilares inyector y colector de manera que sus puntas se encuentren en el centro del capilar externo. Éstos capilares deben estar alineados coaxialmente y separados por una distancia similar a la del capilar inyector. Su alineación se realiza con ayuda del microscopio. Una vez alineados, se fijan también con pegamento epóxico, teniendo cuidado de no moverlos.

En el caso de microfluídica de coflujo, se introduce un capilar más, dentro del capilar inyector, el cual será el encargado de suministrar la fase acuosa interna. Este último capilar se estira a mano con ayuda de un mechero, y no requiere tratamiento previo. Una vez terminado el montaje de los capilares, se colocan las puntas de inyección en donde se insertarán los tubos que conectan al dispositivo con las jeringas. Para la colocación de las puntas de inyección es necesario hacer una pequeña muesca en ellas a fin de que embonen correctamente, librando el grosor de los capilares. Luego de verificar que todas las puntas embonan correctamente, se pegan con pegamento epóxico, añadido gota a gota, sin ejercer presión sobre las puntas.



Figura 2.8: Montaje de los capilares sobre el portaobjetos para la fabricación del dispositivo microfluidico. Los círculos representan las zonas donde se colocan las puntas de infusión. El color rojo indica entrada de líquido y el azul, salida.

En la mayoría de los casos, se realizaron ciclos de fabricación de 4 dispositivos de forma paralela.

Eficiencia en el montaje del dispositivo, mejoras realizadas.

La fabricación de los dispositivos conlleva varios pasos en los cuales es posible cometer errores tales como: un lijado deficiente, una mala cobertura de los silanos, una mala alineación del dispositivo, que los microcanales se tapen por exceso de pegamento y cualquiera de estos errores puede impedir la formación de las emulsiones dobles. Además, el tiempo de vida de los dispositivos es corto, debido a que el pegamento con que se fabrican es puesto en contacto con solventes orgánicos al momento de utilizarlo, de tal forma que los primeros dispositivos hechos durante este trabajo sólo tuvieron duración suficiente para verificar su funcionamiento y realizar uno o dos experimentos. Por esta razón, se buscó mejorar el rendimiento de los dispositivos. La primer mejora consistió en el uso de pegamento epóxico tipo plastiacero (Devcon), añadido luego de haber secado el pegamento de 5 min. La resina tipo plastiacero es más resistente a los solventes orgánicos, por lo que los dispositivos así reforzados tuvieron duración para unos cuatro experimentos aproximadamente. Otra mejora realizada fue el uso de un micromanipulador para el alineado de los capilares, lo cual redujo significativamente el tiempo de elaboración de los dispositivos. El alineado a mano podía tomar hasta 40 min de tiempo por cada dispositivo, mientras que con el uso del manipulador, se realizó en menos de 1 min.

2.4. Operación del dispositivo.

Esta sección se dividió en dos partes, dado que la operación de los dispositivos es diferente con cada uno de los métodos, coflujo y flujo enfocado.

2.4.1. Microfluídica de coflujo para formación de vesículas y dendrimeromas.

El capilar interno (el que es estirado a mano) provee la entrada para la fase acuosa interna. Esta fase se compone de la disolución de 8% w/w poli(etilenglicol) (PEG, Mw = 6 kDa, Sigma) y 2% w/w poli(vinil alcohol) (PVA, Mw = 13–23 kDa, Sigma) previamente hidrolizado al 87-89% en agua ultrapura (Millipore, resistividad de 18.2 M Ω /cm). Se usó una fase intermedia compuesta por una solución de la molécula estructural a usar (lípidos o dendrímeros a concentración de 5 mg/ml en ambos casos), en una mezcla de 36

vol% cloroformo y 64 vol% hexano; La evaporación de esta mezcla de solventes resulta en la formación de las microcápsulas. La fase aceite obtenida a partir de esta mezcla, fue inyectada en el capilar intermedio, en la misma dirección que la fase interna acuosa. La fase acuosa externa, compuesta por una solución de 10% w/w PVA fue inyectada en los intersticios entre el capilar intermedio y el capilar externo, con un flujo dirigido en la misma dirección que las fases interna e intermedia. El PVA de la fase externa aumenta su viscosidad y mejora la estabilidad de las gotas de doble emulsión. En cuanto a la fase interna, el PVA favorece la formación de la emulsión inversa W/O dentro del capilar inyector y el PEG aumenta la viscosidad de esta fase, si no se agregara, sería necesario disminuir mucho la velocidad interna (la viscosidad hace que transmita menos el movimiento) o bien, aumentar mucho la fase externa. Las razones de flujo usadas para formar la emulsión doble con este sistema son de $500 \mu\text{L/h}$ para las fases interna e intermedia y de $3000 \mu\text{L/h}$ para la fase externa. Las fotografías de la figura 2.9 muestran el montaje experimental completo.

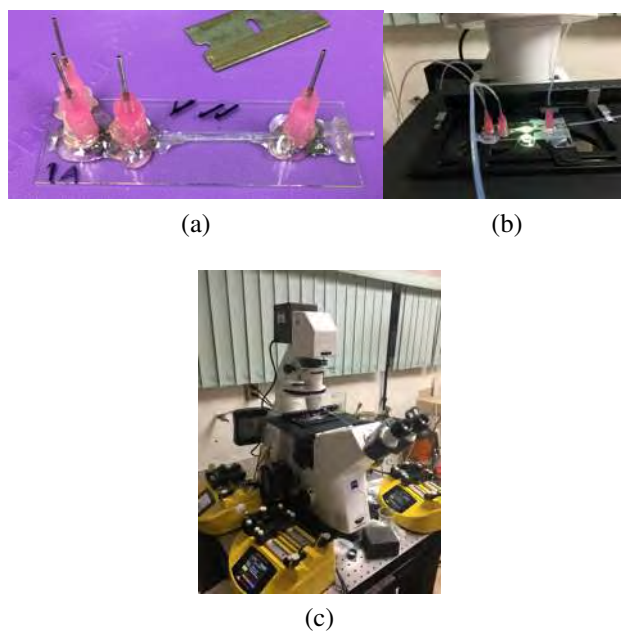


Figura 2.9: (a) Dispositivo de microfluídica de coflujo para la creación de emulsión doble W/O/W terminado. (b) Dispositivo conectado. (c) Montaje experimental completo.

2.4.2. Microfluídica de flujo enfocado para formación de microcápsulas.

La principal diferencia de este método con el de coflujo es que la fase externa se inyecta en sentido contrario a las fases interna e intermedia. Para el trabajo realizado en la formación de microcápsulas, cuya estabilidad depende del pH reportado en el capítulo 4, se usó como molécula estructural un copolímero de ácido poli-acrílico y polimetilmetacrilato (PAA-b-PMMA) en cuya nomenclatura, -b- representa la unión entre los dos grupos mencionados. El copolímero fue disuelto en una mezcla de 70 % vol cloroformo y 30 % vol tetrahidrofuran (THF), que constituyó la fase aceite (intermedia). La fase interna, acuosa, consistió de una solución con 5 % wt polyvinyl alcohol (PVA, Mw 13 – 23 kDa, hidrolizado a 87-89 %) y la fase externa, también acuosa, fue una solución de 10 % wt PVA y 15 % wt THF. El THF es un buen solvente para el polímero, sin embargo, es muy soluble en agua y no es posible formar emulsiones dobles tipo W/THF/W. En lugar de eso, se disuelve el polímero en la mezcla de aceites ya mencionada, que contiene cloroformo, puesto que éste último es menos soluble en agua que el THF, y facilita la formación de gotas de doble emulsión tipo W/O/W. La presencia de THF en la fase externa disminuye la difusión del THF que se encuentra inicialmente presente en la membrana de la doble emulsión hacia la fase externa. En este trabajo, se encapsularon factores extracelulares de probióticos, de cuatro diferentes cepas, los cuales se suspendieron en la fase interna a la concentración dada por la dosis letal media que presentó cada cepa en contra de la línea celular HT29 de cáncer de colon.

2.5. Realización de los experimentos.

Una vez terminada la fabricación de los dispositivos, se procede a hacer los experimentos en el siguiente orden:

- Comprobar que los microcanales no estén bloqueados, inyectando agua ultrapura en las puntas de inyección.
- Correr un experimento de prueba para verificar que el dispositivo realmente forma la emulsión doble con todas las fases necesarias, pero **sin la molécula estructural** (lípidos, dendrímeros, etc). Esto para no desperdiciar el material valioso.
- Realizar el experimento de interés, una vez que se tengan **al menos dos dispositivos que sí formen emulsiones dobles**.

Antes de conectar los tubos que conectan al dispositivo microfluídico con las bombas de inyección que dosifican el líquido, para correr el experimento, se debe llenar el

dispositivo completamente con agua, para que cuando las fases a utilizar entren en el dispositivo, éste ya no tenga nada de aire y el comportamiento hidrodinámico se establezca. De igual forma, antes de conectar al dispositivo, las mangueras deben estar llenas de líquido, para no introducir burbujas. Si hay polvo o burbujas, éste puede ser removido aumentando la velocidad de los líquidos, lo cual, se puede hacer generando cambios en la presión (un resultado de la ecuación de Stokes $\nabla p = \mu \nabla^2 \vec{v}$). Para ello, se aumenta la razón de flujo de la fase a limpiar y se deja abierta la salida alterna. En el caso del método de flujo enfocado, no existe una salida alterna de líquido, así que en caso de observarse partículas de polvo de tamaño mayor al capilar colector, que no puedan salir por ahí, será necesario desconectar el dispositivo, limpiarlo con agua y volver a comenzar. El dispositivo tarda alrededor de media hora en estabilizar su comportamiento hidrodinámico y comenzar a formar las emulsiones dobles. Una forma de optimizar este tiempo es comenzar suministrando las fases interna e intermedia a 1500 $\mu\text{L/h}$ y una vez que ambas fases han llenado el dispositivo se disminuyen a la velocidad deseada (500 $\mu\text{L/h}$ en el caso de microfluidica de coflujo).

2.6. Importancia de un ambiente limpio.

Las partículas de polvo comunes, son de tamaño micrométrico y tienden a adsorberse en las superficies. Si consideramos las escalas de longitud de los microcanales, es clara la importancia de trabajar en un ambiente libre de polvo, tanto al momento de la fabricación de los dispositivos como durante su funcionamiento. Una partícula puede ser lo suficientemente grande como para quedar atascada dentro de los capilares y terminar con el tiempo útil del dispositivo. En el mejor de los casos, habrá que desmontar el experimento para limpiar el dispositivo con agua ultrapura o desionizada y volver a empezar. La presencia de partículas de polvo adheridas a las paredes del capilar puede ser causante de cambios imprevistos en la hidrodinámica del dispositivo, aún cuando no sean lo suficientemente grandes para impedir el flujo.

2.7. Materiales estructurales y encapsulados.

En este trabajo de doctorado se hicieron diversos tipos de microcápsulas y se encapsularon diferentes moléculas, se presenta a continuación una tabla donde se resumen los materiales encapsulados y las moléculas utilizadas como elemento estructural de las microcápsulas.

| Molécula estructural | Material encapsulado | Estructura formada |
|-----------------------|----------------------|--------------------|
| Mezcla lipídica | Probióticos, FSS* | Liposomas |
| Lípido DPPC | Magmita 1 %,5 % | Liposomas |
| Dendrimeros | FSS, Rojo Nilo** | Dendrimerosomas |
| Copolímero PAA-b-PMMA | Probióticos | Microcápsulas |

Donde el acrónimo DPPC hace referencia al fosfolípido dipalmitoil fosfatidilcolina, cuya estructura se detalla más adelante. La mezcla lipídica que se menciona está conformada por DPPC, colesterol y por otro fosfolípido llamado dioleoil fosfatidilcolina (DOPC).

Notas:

* Fluoresceína sal sódica, usada como marcador fluorescente de fase acuosa.

** Rojo Nilo, usado como marcador fluorescente de fase hidrofóbica.

2.7.1. Lípidos

En los primeros experimentos realizados, se utilizó una mezcla de lípidos con el fin de reproducir el trabajo reportado previamente por Arriaga *et. al.* [14], en donde se usó por vez primera la técnica de microfluídica de coflujo para obtener vesículas lipídicas a partir de emulsiones dobles. Previo a ello, la técnica se había usado para obtener vesículas de surfactantes sintéticos y de ácido poliacrílico[13]. Los lípidos usados en dicha mezcla y las concentraciones se enlistan a continuación:

- DPPC 35 % mol.
- DOPC 35 % mol.
- Colesterol 30 % mol.

Estos lípidos fueron en cloroformo (ya mezclados) a una concentración de 15mg/mL, de tal forma que la concentración final de lípido en la mezcla hexano/cloroformo fue de 5mg/mL. A continuación se da una descripción detallada del significado de la nomenclatura de cada lípido y de su estructura junto con algunas propiedades físicas de interés tales como punto de fusión y capacidad de formar micelas.

Estructura química del DPPC y DOPC.

Ácidos grasos

La región hidrofóbica de estos lípidos está formada por dos cadenas de hidrocarburos. Los enlaces entre los átomos de carbono que forman estas cadenas pueden ser enlaces

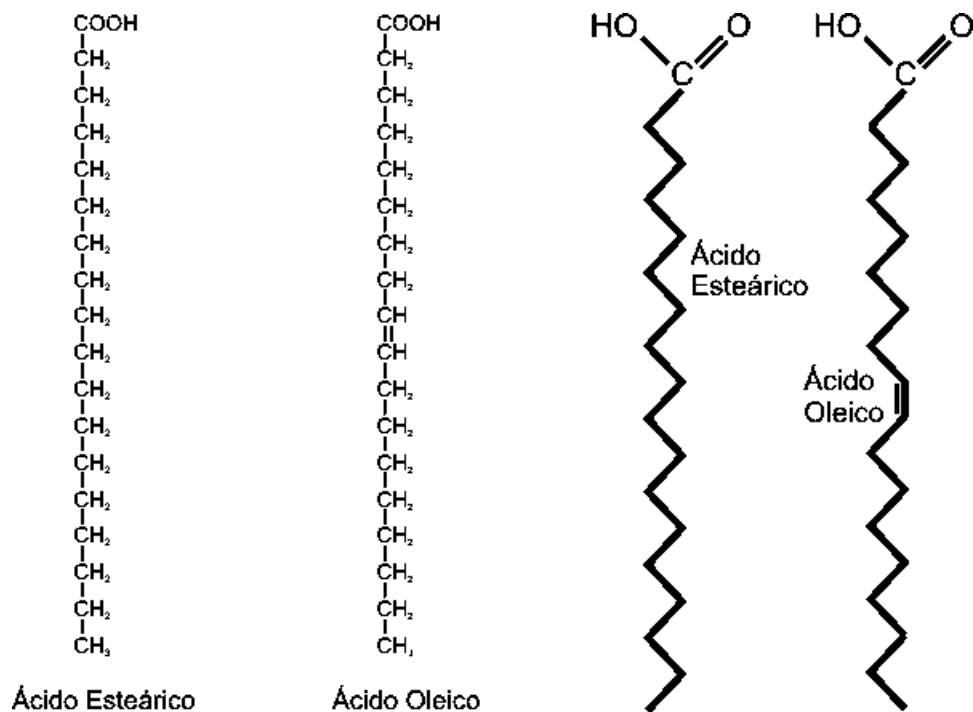


Figura 2.10: Ácidos grasos en dos representaciones comunes.

simples (saturados, *e.g.* los alcanos) o enlaces dobles (insaturados, *e.g.* los alquenos). Una cadena de hidrocarburos puede convertirse en un *ácido graso* uniendo¹ un grupo carboxilo (-COOH) en uno de sus extremos. En la Figura 2.10 se muestra a manera de ejemplo, la constitución de dos ácidos grasos, saturado e insaturado en dos representaciones comunes.

El grupo carboxilo (COOH) es hidrofílico, por tanto, los ácidos grasos pueden disolverse más fácilmente en agua que los alcanos o alquenos puros. La manera más simple de clasificar a los ácidos grasos es escribir el número de átomos de carbono seguido por el número de enlaces dobles. Es necesario además, especificar el número de carbono en el cual se presentan los enlaces dobles, esto se representa con una Δ etiquetando el enlace doble. En la tabla 2.1 se enlistan, bajo esta nomenclatura los ácidos grasos que conforman los lípidos usados en el presente trabajo. También se muestra su fórmula química y su punto de fusión.

¹Como es sabido en química, la forma en que un hidrocarburo se convierte en un ácido es mediante una reacción (o una serie de reacciones) de oxidación pero aquí el único fin es tener una comprensión estructural.

Tabla 2.1: Ácidos grasos y sus representación. Datos obtenidos de [34].

| Nombre | Nomenclatura | Estructura | Punto de Fusión (°C) |
|-----------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| Ácido palmítico | 16 : 0 | $CH_3(CH_2)_{14}COOH$ | 63.1 |
| Ácido oleico | 18 : 1 ^{Δ9} | $CH_3(CH_2)_7CH = CH(CH_2)_7COOH$ | 13.4 |

Es interesante notar que el punto de fusión del ácido oleico, el cual es del tipo insaturado, es menor que el de los saturados, esta es una característica importante de los ácidos grasos que influye en el punto de fusión de los lípidos que conforman.

Clasificación general

Los ácidos grasos constituyen los bloques fundamentales de construcción de los lípidos denominados *saponificables* que son aquellos capaces de formar estructuras micelares a partir de la concentración micelar crítica (CMC). El DPPC y el DOPC pertenecen a esta clasificación de lípidos saponificables [15]. Es importante mencionar que también existen lípidos que no están conformados por ácidos grasos y por tanto tienen propiedades químicas y físicas diferentes [34, 35], como el colesterol.

El DPPC y el DOPC son lípidos que se clasifican en el grupo de los fosfoglicéridos por estar conformados por un “esqueleto” del tipo *3-fosfato de glicerilo* donde el número 3 indica que el grupo fosfato se encuentra unido a la posición 3 del grupo glicerol, es decir, un carbono situado en uno de los extremos del grupo glicerol, también llamado *gliceril-fosfato* [34]. Con el fin de tener un panorama general en el cual poder ubicar a los fosfoglicéridos entre otros lípidos saponificables, se presenta la siguiente tabla:

Tabla 2.2: Clasificación de los lípidos saponificables según su estructura molecular.

| | |
|-----------------|--|
| Nombre | Esqueleto |
| Acilglicéridos | Glicerina |
| Fosfoglicéridos | 3-fosfato de glicerilo |
| Esfingolípidos | Esfingolina |
| Ceras | Alcoholes no polares de peso molecular elevado |

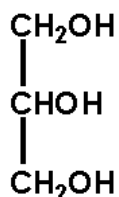


Figura 2.11: Estructura de la glicerina.

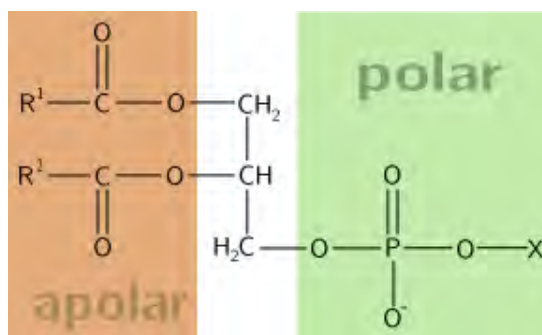


Figura 2.12: Estructura básica de un fosfoglicérido.

Fosfoglicéridos

En los fosfoglicéridos, uno de los grupos hidroxilo primarios de la glicerina se halla esterificado² por el ácido fosfórico (hay que tener cuidado, no por el hecho de que un lípido contenga fósforo implica que sea un fosfoglicérido) mientras que los otros dos se encuentran esterificados por ácidos grasos. La estructura de la glicerina se muestra en la figura 2.11. Mientras que la estructura básica de un fosfoglicérido se muestra en la figura 2.12, donde R_1 y R_2 son ácidos grasos y X es, en general, un alcohol [34], que constituye la región polar del lípido.

En el caso del DPPC y POPC, el grupo X de la figura 2.12 es el aminoalcohol: colina, el cual, al unirse al grupo fosfato, adquiere el nombre de fosfatidilcolina (PC) (ver figura 2.13).

En cuanto a los grupos de ácidos grasos R_1 y R_2 ; en el caso del DPPC, ambos son ácidos palmíticos y en el DOPC, ambos son ácidos oleicos, es por ello que reciben sus respectivos nombres: dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y dioleil fosfatidilcolina (DOPC). Puesto que el ácido oleico y el ácido palmítico tienen puntos de fusión diferentes, la di-

²La esterificación es el proceso mediante el cual un alcohol se une químicamente (dicho formalmente, se sintetiza) a un ácido carboxílico. En nuestro caso, los grupos alcohol (OH) en la glicerina se unen con los grupos carboxilo del ácido graso y del ácido fosfórico.

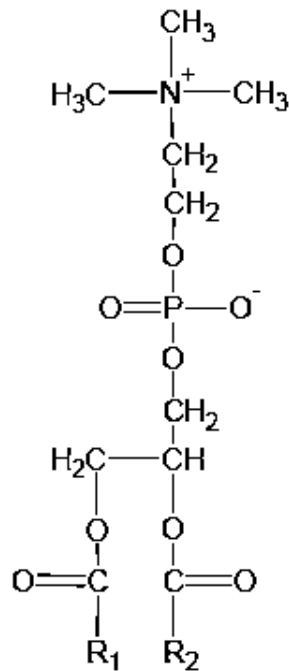


Figura 2.13: Estructura de la fosfatidilcolina.

ferencia estructural que dan los ácidos grasos en el DPPC y POPC conduce también a que difieran en su temperatura crítica de cambio de fase de líquido a gel, siendo de -20°C para el POPC y de 41°C para el DPPC (a presión de 30mN/m). Es importante mencionar la forma en que los fosfoglicéridos se comportan con respecto al pH del medio en el que se encuentran, a saber, a pH 7 todos los fosfoglicéridos poseen una carga negativa en el grupo fosfato y en particular, la fosfatidilcolina posee, a pH 7, una carga positiva en el grupo de la colina; por lo tanto, a este pH, la fosfatidilcolina es un ion híbrido bipolar sin carga eléctrica neta [34].

Colesterol

La estructura del colesterol es diferente a la de los fosfolípidos mencionados arriba, puesto que su región hidrofóbica no está constituida por ácidos grasos. En lugar de ello, posee una estructura formada por cuatro hidrocarburos cíclicos (anillos) que recibe el nombre de *esteroide*. Su región hidrofílica tiene sólo un grupo hidroxilo (-OH), por lo que puede considerarse como una molécula lipídica constituida por una gran región hidrofóbica y una pequeña región polar. Las moléculas con estructura similar reciben el

nombre de esteroides, en esta clasificación están incluidas las hormonas sexuales, la vitamina D, y las sales biliares. Es importante recalcar, que este tipo de estructura molecular no favorece la formación de vesículas; por tanto, es una molécula difícil de incorporar en membranas artificiales, aunque sí está presente en la composición de las membranas biológicas. Una ventaja de la técnica de los microfluídos, es que facilitan la incorporación de esta molécula en vesículas hechas en laboratorio [14].

A continuación se presenta la estructura completa de los lípidos utilizados:

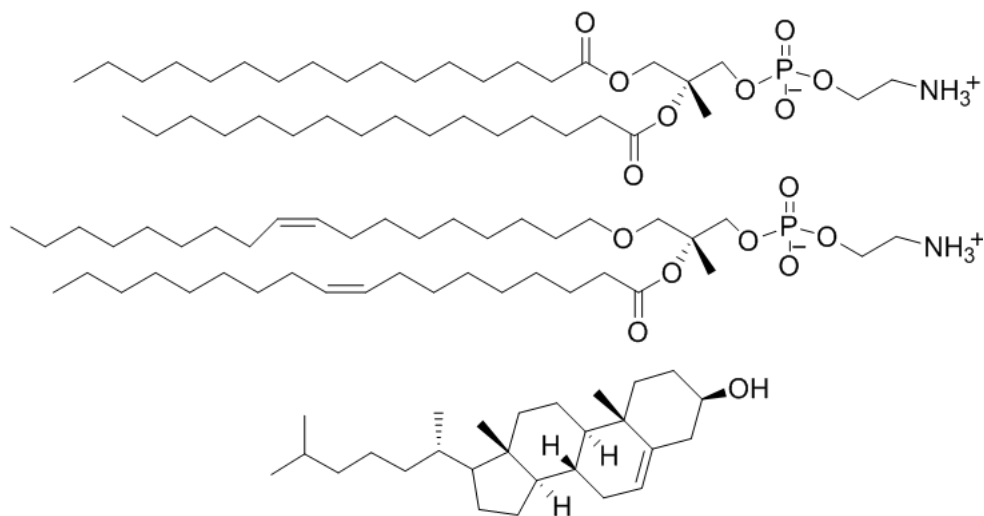


Figura 2.14: Estructura de los lípidos utilizados. Arriba: DPPC, centro: DOPC, abajo: Colesterol

2.7.2. Dendrimeros

La región hidrofóbica de los dendrímeros utilizados está compuesta de 4 ácidos mirísticos (cadena hidrocarbonatada con 14 carbonos) y su región hidrofílica posee cuatro terminaciones hidroxilo (OH). La nomenclatura está dada por los pasos de síntesis necesarios para producirlos y el tipo de terminación hidrofílica que puede formar enlaces (7 pasos de síntesis, H la terminación hidrofílica); también se especifica la estructura de su núcleo, siendo etilen glicol para el 7HEG, trietilen glicol para el 7HTEG y dodecanodiol (cadena con 12 carbonos) para el THDD.

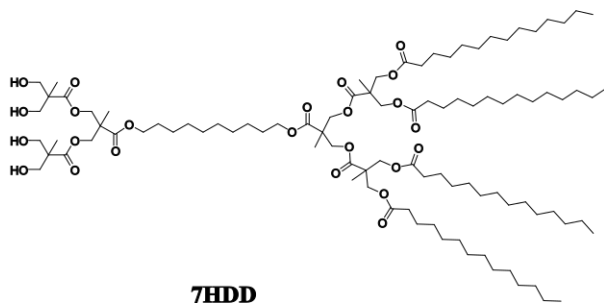
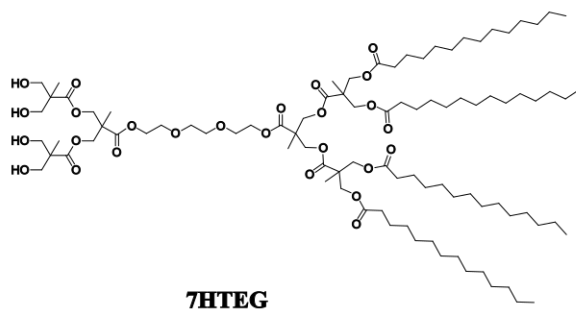
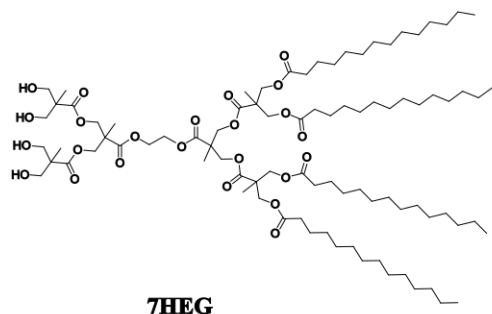


Figura 2.15: Estructura de los dendrímeros utilizados

Capítulo 3

Vesículas lipídicas para aplicaciones de envío controlado de medicamentos.

En este capítulo, se muestra el resultado de diferentes experimentos encaminados en el uso de la microfluídica para la formación de vesículas unilamelares lipídicas y su aplicación en el envío de medicamentos. Algunos de los resultados presentados en este capítulo sirvieron para el aprendizaje de la técnica, al reproducir las vesículas con una mezcla lipídica reportada previamente. El trabajo se amplió con el encapsulado de diferentes activos en la fase acuosa interna de las vesículas y con la formación de vesículas usando un lípido en particular. Los resultados obtenidos muestran el potencial de la técnica de los microfluídos en el encapsulado de diferentes activos hidrofílicos dentro de vesículas lipídicas, así como la gran versatilidad del método. A su vez, constituyen una guía para la planeación de experimentos de microencapsulado. parte de los resultados presentados en este capítulo fueron publicados en el artículo:

Montes-de-Oca, L., Cuellar, F., Rodriguez-Nieto, M., Rodríguez-López, R., Espinoza, S., Espinosa, G., Menchaca, J. (2018). *Micro-Encapsulation of Probiotic Metabolites and Magnetic Nanoparticles Inside Liposomes using Microfluidic Devices.* *Microscopy and Microanalysis*, 24(S1), 1430-1431. doi:10.1017/S1431927618007638

3.1. Introducción.

Las vesículas lipídicas son estructuras esféricas constituídas por una membrana semipermeable, la cual está formada por una bicapa de lípidos. Esta membrana divide dos medios acuosos, el que se encuentra al interior de la vesícula y el del medio externo. Son consideradas como una tecnología biomimética dada su similitud con la membrana

plasmática de las células. Esta similitud les confiere también la característica especial de interactuar con células vivas, haciendo posible incluso, el envío de moléculas dentro de células específicas. La ventaja que esto representa y su capacidad de encapsular agentes hidrofílicos en sus núcleos y lipofílicos en sus membranas, ha motivado ampliamente su uso como acarreadoras de medicamentos [28]. La utilidad de las vesículas en todas sus aplicaciones depende críticamente del grado de control que se tenga sobre sus propiedades, alcanzado durante su proceso de fabricación. Desafortunadamente, los métodos convencionales usados para la fabricación de vesículas, basados en el ensamblaje espontáneo de los anfifilos en el medio acuoso, como el método de rehidratación de *films* y extrusión [36] o de electroformación [37, 38], proveen muy poco control sobre el proceso de fabricación. Lo mismo sucede con los métodos basados el uso de emulsiones dobles como plantillas, cuando éstas emulsiones se obtienen de forma azarosa por agitación [25]. Los ensamblajes obtenidos por estos métodos son llamados vesículas multilamelares. Algunas de las limitaciones inherentes a estos métodos, pueden ser superadas con el uso de la técnica de microfluídos, en particular, fue de nuestro interés la posibilidad de producir vesículas unilamelares, que pueden servir como modelos experimentales y simplificados de la membrana plasmática y como acarreadoras de fármacos. Se ha reportado cierta cantidad de trabajos sobre la formación de vesículas usando microfluídos, en donde se muestra el alto control que puede ser alcanzado con esta técnica, siendo incluso posible la formación de vesículas asimétricas [39].

En este capítulo se describe una serie de experimentos que se eligieron como ejercicios didácticos para el dominio de la técnica experimental de la microfluídica. Se obtuvieron primero vesículas formadas por una mezcla lipídica reportada previamente en Arriaga *et. al* [14], por ser un sistema ya conocido y para demostrar que la técnica se estaba llevando a cabo correctamente. Como una forma de comprobación de la capacidad de encapsulado de las vesículas, se realizó la microencapsulación de fluoresceína en los núcleos acuosos. Se relata también la caracterización hecha en la búsqueda de vesículas de menor tamaño para aplicaciones biológicas. Se probó también la versatilidad del método para producir vesículas hechas con un sólo fosfolípido (DPPC). Finalmente, se muestran los trabajos resultantes de dos colaboraciones con otros grupos de trabajo, en los que se logró encapsular metabolitos de probióticos y nanopartículas magnéticas.

3.2. Materiales y métodos.

3.2.1. Producción y colecta de emulsiones dobles.

En este capítulo, se estudia la fabricación de gotas de emulsión doble tipo W/O/W con fase aceite ultra fina como plantillas para la formación de vesículas lipídicas usando el método de coflujo, el cual se describe a detalle en el capítulo 2 y en las referencias

[13, 14]. En todos los experimentos, las gotas de emulsión doble fueron colectadas en una solución de sucrosa en agua ultra pura a una concentración de 100 mM. El tiempo de colección fue de una hora en todos los casos, el cual es un tiempo suficiente para obtener la cantidad de vesículas necesaria para su observación en microscopio óptico y posterior cuantificación de tamaños. Luego de ser colectadas, las vesículas se almacenaron a temperatura ambiente. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

3.2.2. Obtención y análisis de imágenes.

El funcionamiento de los dispositivos microfluídicos fue monitoreado con microscopía óptica usando un microscopio invertido (Zeiss Axio Observer Z1) equipado con una cámara rápida (Phantom MiroEX2-2048MM, Vision Research, Wayne, EUA), observando 1200 fps. Los radios de las vesículas fueron medidos a partir de las imágenes de microscopía utilizando el software ImageJ (NIH) [40] y su posterior análisis estadístico fue realizado mediante códigos en IgorPro. La cuantificación de los diámetros de la emulsión doble respecto a las razones de flujo fue realizada utilizando el software ImageJ en combinación con códigos propios en MATLAB.

Para los experimentos en los que se encapsuló fluoresceína sal sódica, se preparó una solución acuosa a concentración de 1 mM de fluoresceína (FSS, Sigma) para ser usada en la fase interna durante la producción de la emulsión doble. La cantidad necesaria de fluoresceína se aforó con la mezcla acuosa utilizada en la fase interna, consistente de 2% wt poli vinyl alcohol y 8% wt polietilenglicol en agua ultrapura. Las vesículas conteniendo FSS fueron excitadas con luz de 505 nm de longitud de onda, utilizando un LED (Sistema Colibri de iluminación, Zeiss) como fuente de excitación.

3.3. Resultados.

3.3.1. Vesículas de mezcla lipídica DPPC/DOPC/Colesterol.

El primer paso para confirmar que el método empleado es eficiente en la formación de vesículas, fue reproducir la mezcla lipídica usada por Arriaga *et. al* [14], la cual consiste en una mezcla con 35% mol DPPC, 35% mol DOPC y 30% mol colesterol. La finalidad de usar esta mezcla en particular fue por ser un sistema en el que de antemano se conoce que propicia la formación de vesículas estables. En la figura 3.1a, se muestra la producción de gotas de emulsión doble monodispersas dentro del dispositivo microfluídico, obtenidas bajo el régimen de goteo. Es importante notar que no hay contraste óptico entre el núcleo de las gotas y la fase externa. Esto es debido a que ambas son fases

acuosas con índices de refracción similares. Por lo tanto, en microscopía de campo claro, sólo se hace visible al experimentador la fase aceite delgada que divide las fases acuosas. En la figura 3.1b, se muestra una población típica de vesículas observadas en el fondo del frasco donde fueron colectadas. La correspondiente distribución de radios se muestra en la figura 3.1c. En esta imagen, las vesículas presentan un radio promedio de $30 \pm 5 \mu\text{m}$ lo que significa que se tiene una polispersidad del 17%, definida como la razón entre la desviación estándar y el tamaño promedio de las gotas.

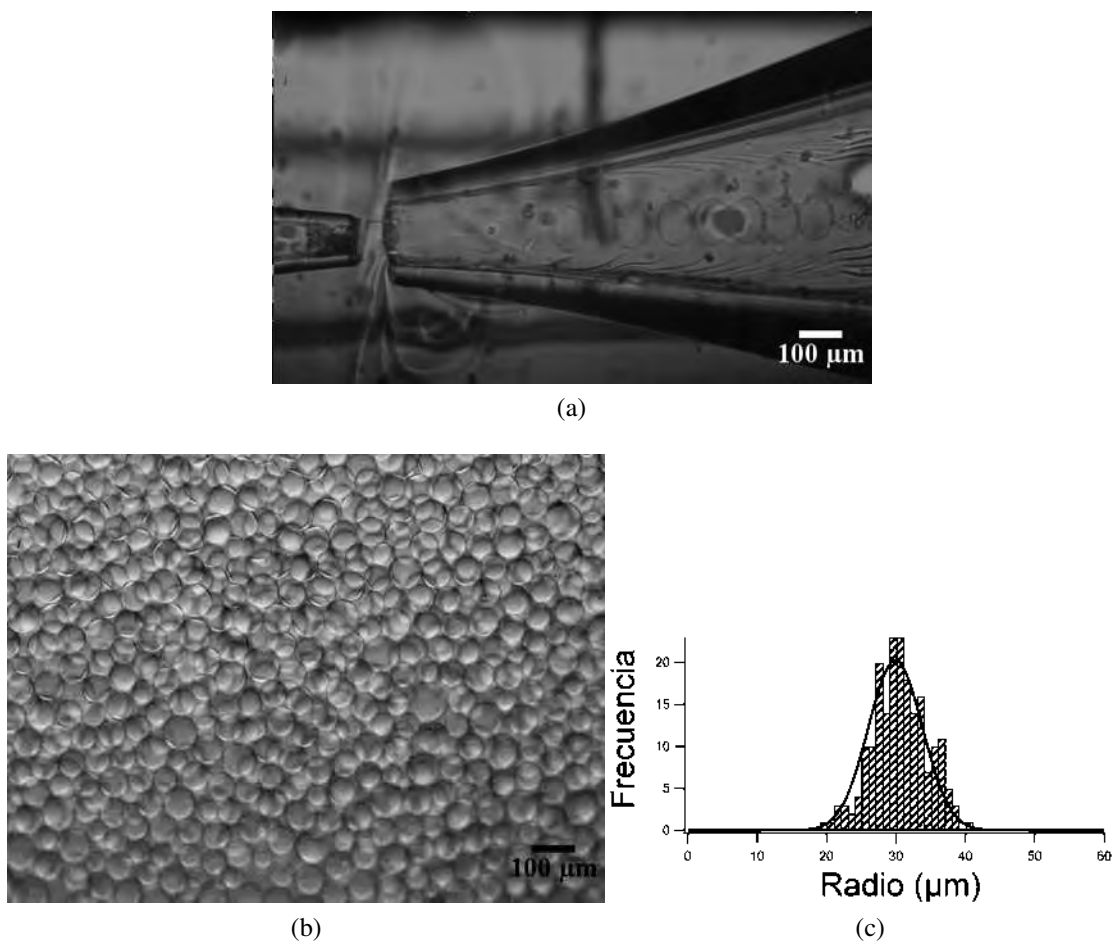


Figura 3.1: (a) Micrografía óptica mostrando la producción típica de gotas monodispersas de emulsión doble con fase aceite ultrafina. (b) Imagen de microscopía óptica de vesículas monodispersas. (c) Distribución de radios de las vesículas obtenida a partir de 3 imágenes como la mostrada en (b), en las que se realizó la medición de los diámetros de las vesículas.

Las vesículas obtenidas con esta mezcla lipídica se mantuvieron estables a temperatura ambiente hasta 30 días después de haber sido colectadas. A partir de este tiempo, se comenzaron a observar los efectos debidos a la coalescencia y maduración de Ostwald, formando estructuras tipo vesicular de mayor tamaño, como se observa en la figura 3.2. Este resultado muestra que las vesículas formadas por el método de microfluídica tienen una gran estabilidad. Sin embargo, se observó que las muestras no perduran en buen estado al someterse a agitación continua.



Figura 3.2: Imagen de microscopía óptica mostrando una población de vesículas lipídicas luego de 30 días de su colección. Se observa la presencia de vesículas de gran tamaño debido a la coalescencia entre ellas y a la maduración de Ostwald.

Encapsulado de solución fluorescente hidrofílica.

Con la finalidad de comprobar la capacidad del método de microfluídica en el encapsulado de agentes hidrofílicos, se preparó una solución conteniendo 1 mM de fluoresceína sal sódica (FSS). La figura 3.3a muestra la producción de las gotas emulsión doble con la solución de FSS en la fase interna, observada con luz UV a 505 nm. Tomando en cuenta que tanto la fase interna como la externa son medios acuosos, la presencia de gotas fluorescentes suspendidas en el medio externo evidencian la formación de la emulsión doble con una fase tipo aceite intermedia, inmisible a ambos medios, interno y externo y por lo tanto, útil para crear una división entre ambos. En la figura 3.3b se muestra una vesícula obtenida en este experimento, suspendida en una solución de sucrosa. Se aprecia un buen contraste entre la luminiscencia de la vesícula respecto al medio externo, lo cual

es un indicativo de la eficiencia de encapsulado con el método de microfluídica. Este experimento es de gran importancia en las aplicaciones de envío y liberación controlada de fármacos, puesto que pone de manifiesto la posibilidad de encapsular eficientemente un agente hidrofílico dentro de las vesículas lipídicas.

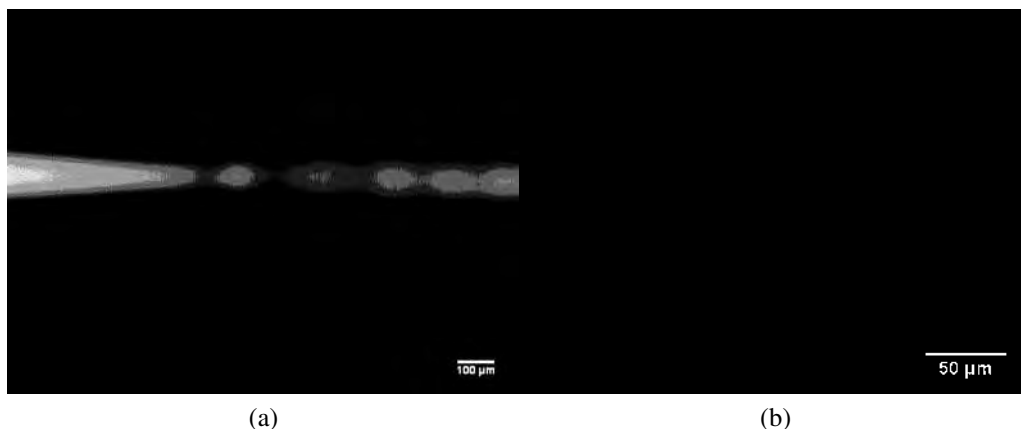


Figura 3.3: Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando: (a) producción típica de gotas monodispersas de emulsión doble con fase aceite ultrafina conteniendo FSS en su fase acuosa. (b) vesículas conteniendo FSS.

Encapsulado de metabolitos de probióticos para tratamiento contra *entamoeba histolytica* HM1-IMSS.

A manera de una aplicación potencial de la formación de vesículas lipídicas, se investigó la posibilidad de encapsular metabolitos producidos por probióticos de la cepa *Lactobacillus Plantarum*. Los probióticos fueron cultivados *in-vitro* y sus metabolitos fueron extraídos y liofilizados, para luego ser redispersados en el mismo medio de cultivo. El medio de cultivo empleado fue similar al TYI-S-33, el cual contiene diversos minerales, fosfatos, aminoácidos y una solución de vitaminas. La motivación para esta investigación surgió de que en un trabajo previo realizado por colaboradores de la Universidad Autónoma de Nuevo León (ver sección de colaboraciones al inicio de la tesis), se encontró que los metabolitos producidos por la cepa de probióticos mencionada son efectivos en la inhibición del crecimiento y formación de estructuras semejantes a quistes de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS en condiciones axénicas (esto es, que la muestra proviene de una sola especie microbiana) *in-vitro*.

La principal dificultad encontrada en este trabajo fue la de producir la emulsión doble usando como fase interna el medio de cultivo conteniendo los metabolitos probióticos. El medio de cultivo empleado presentó menor viscosidad que la solución acuosa usada comúnmente, cuya viscosidad se aumenta con la presencia de polietilene glicol. Una disminución de la viscosidad en la fase interna implica que la presión suministrada por la bomba de infusión en esta fase producirá una mayor velocidad del fluido, puesto que éste disipará menos energía. Así que para obtener gotas de emulsión doble similares a las obtenidas con la solución acuosa usual, será necesario disminuir la razón de flujo suministrada a la fase interna o, de forma equivalente, aumentar la velocidad suministrada a la fase externa.

Bajo esta motivación, se procedió primero a buscar la formación de la emulsión doble (sin lípidos) disminuyendo la velocidad de la fase interna, manteniendo fijas las razones de flujo de las fases intermedia y externa en $Q_{middle} = 8.33\mu\text{L}/\text{min}$ y $Q_{out} = 50\mu\text{L}/\text{min}$, pero no se logró su formación. Posteriormente se aumentó la velocidad de la fase externa de forma gradual, manteniendo fijas las razones de flujo de las fases interna e intermedia en $Q_{inn} = 8.33\mu\text{L}/\text{min}$, $Q_{middle} = 8.33\mu\text{L}/\text{min}$. Se obtuvo la formación de gotas de emulsión doble en régimen de goteo a partir de la razón de flujo de $Q_{out} = 140\mu\text{L}/\text{min}$ para la fase externa. Sin embargo, con estas condiciones no se producían las gotas de emulsión doble de manera estable, sino que se obtenían durante intervalos cortos de tiempo. Este comportamiento se debe a que, como se dijo en el capítulo de conceptos, la formación de gotas es debida a una inestabilidad hidrodinámica. La razón de flujo de $Q_{out} = 140\mu\text{L}/\text{min}$ debía encontrarse en el límite inferior del umbral de velocidades posibles a ser usadas como condición inicial para la formación de gotas de emulsión doble en régimen de goteo. Al estar en este límite, y al ser el sistema muy sensible a las condiciones iniciales, se producen más de un sólo tipo de perfil de flujo, a intervalos de tiempo variables, difíciles de predecir. Por lo tanto tanto, se siguió aumentando la razón de flujo de la fase externa, obteniendo una producción estable de gotas de emulsión doble con $Q_{out} = 150\mu\text{L}/\text{min}$. Una vez que se encontraron estas condiciones, se procedió con velocidades aún mayores para la fase externa, en la búsqueda de la formación de gotas más pequeñas, pero se encontró que con una razón de flujo de alrededor de $Q_{out} = 150\mu\text{L}/\text{min}$ el flujo se volvía de nuevo inestable debido a la alta velocidad.

Una vez conocidas las condiciones necesarias para la formación de la emulsión doble, se realizó el experimento de la formación de vesículas, usando para la fase aceite, la mezcla hexano/cloroformo conteniendo la mezcla de lípidos. En este punto, surgió otra dificultad en este trabajo, que fue el desconocimiento de la presión osmótica del medio

conteniendo los metabolitos de probióticos. Sin embargo, considerando que ésta debía ser similar a la de las condiciones estomacales, se preparó una solución de sucrosa a una concentración de 200 mM, equivalente a una concentración osmótica de 200 mOsmol. La figura 3.4 muestra una vesícula lipídica conteniendo metabolitos de probióticos obtenida con nuestro método. Se observa la presencia de material fluorescente fuera de la vesícula, el cual puede deberse a material no encapsulado, o a vesículas que liberaron su contenido luego de desestabilizar. Consideramos que éste último pudo ocurrir por no tener condiciones isotónicas. Un hecho muy importante a remarcar, es que ésta imagen fue obtenida en el grupo de trabajo de la UANL, de manera que las pocas vesículas observadas sobrevivieron a la agitación producida por 10 horas de traslado terrestre.

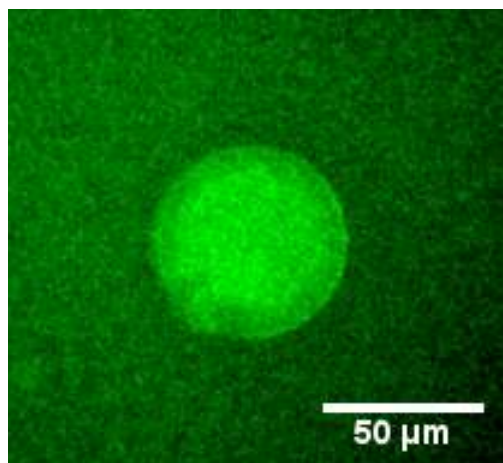


Figura 3.4: Imagen de microscopía de fluorescencia mostrando una vesícula lipídica conteniendo metabolitos de probióticos, a 25 días de su formación.

Búsqueda de gotas de emulsión doble de menor tamaño

En la aplicación de encapsular metabolitos de probióticos para probar su efecto en poblaciones de *entamoeba histolytica* HM1-IMSS, se propuso la idea, de formar vesículas más pequeñas, para que fueran fácilmente fagocitadas por los parásitos. Por lo tanto, Se realizó la búsqueda de las condiciones de razón de flujo para obtener gotas de emulsión doble más pequeñas, lo cual de acuerdo a la teoría de la formación de gotas, debería ocurrir al aumentar la velocidad de la fase externa, manteniendo fijas las fases interna e intermedia. Sin embargo, se encontró, que con los solventes utilizados, el aumento de la velocidad de la fase externa no produjo gotas de menor tamaño. La figura 3.5 muestra el tamaño de las gotas de emulsión doble producidas como función de la razón de flujo de

la fase externa. En lugar de una disminución, se observa un ligero aumento en el tamaño promedio de las gotas, y un aumento en la polidispersidad de las gotas, el cual, se ve reflejado en un aumento de la desviación estándar, mostrada en las barras de error.

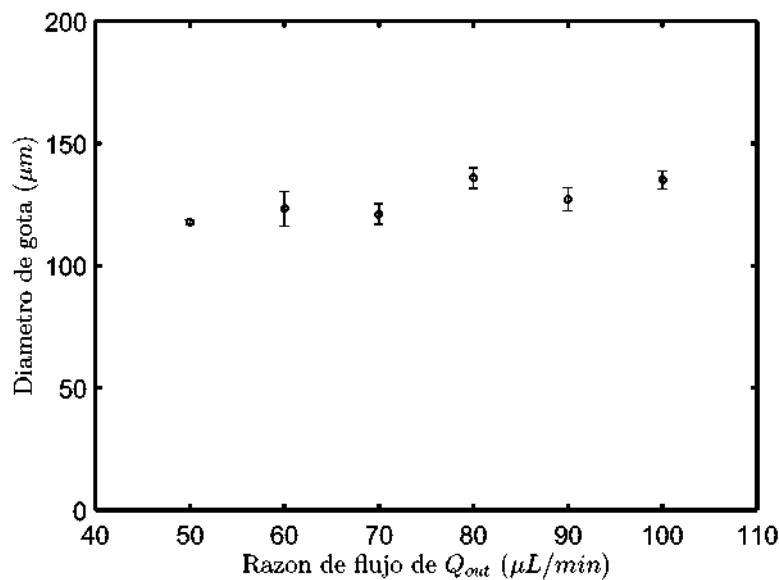


Figura 3.5: Tamaño de las gotas de emulsión doble como función de Q_{out} . Las fases interna e intermedia se mantuvieron fijas a $8.33 \mu\text{L}/\text{min}$

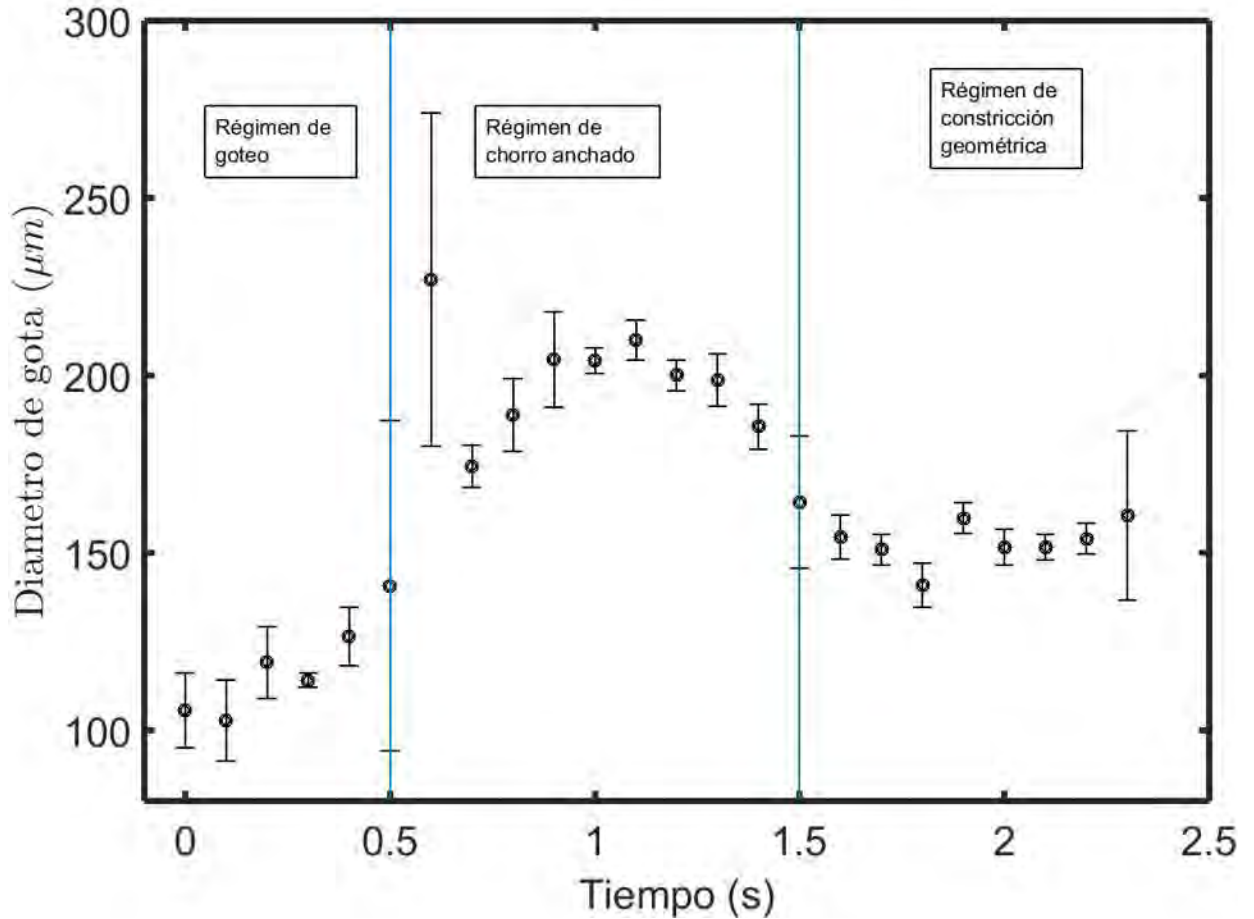
Con el fin de investigar el origen de este comportamiento, se observaron los tamaños de las gotas de emulsión doble respecto al tiempo, manteniendo fijas las tres razones de flujo en: $Q_{inn} = 8.33 \mu\text{L}/\text{min}$, $Q_{middle} = 8.33 \mu\text{L}/\text{min}$ y $Q_{out} = 110 \mu\text{L}/\text{min}$. La figura 3.6a muestra la gráfica de tamaños respecto al tiempo, registrados durante todo el intervalo de tiempo en el que se produjeron las gotas de emulsión doble (recordemos que se producen de forma discontinua). Un resultado importante, fue que además de observar la variación en el tamaño de las gotas, se observaron también tres diferentes regímenes de producción de gotas, a pesar de mantener las velocidades fijas. El primer régimen observado, para tiempos menores a 0.5 s, es el de goteo, mostrado en la figura 3.6b, produjo gotas de entre 100 y 150 μm de diámetro. A partir de los 0.5 s y hasta 1.5 s, se observa un régimen de chorro anchado, el cual se muestra en la figura 3.6c, este régimen produjo las gotas de mayor tamaño observadas, las cuales fueron de alrededor de 200 μm de diámetro. Al final del intervalo de formación de la emulsión doble, en tiempos posteriores a 1.5 s, se observó un régimen similar al de goteo, donde el tamaño de la gota antes del desprendimiento se ve limitado por el diámetro de la punta del capilar colector. Un comportamiento similar

ha sido observado previamente en el caso de emulsiones simples y formación de burbujas con geometría de juntura en forma de T y de coflujo en dispositivos de PDMS [41–43]. Este régimen aparece en sistemas cuyo número capilar es pequeño ($Ca < 0.01$ en emulsiones simples). En este caso, la gota del líquido que emerge crece hasta que toca la punta del capilar colector y continúa creciendo dentro de él, hasta que llega un punto en el que casi llena por completo el área de la sección transversal del colector. Posteriormente, el cuello de la gota se vuelve cada vez más estrecho hasta que se rompe y la gota se separa del resto de líquido emergente [43]. Este régimen no solo está dado por la competencia entre los esfuerzos de cizallamiento y la tensión interfacial, también está dado por la competencia entre la presión de Laplace y la presión del fluido en la fase externa [41, 42], el cual, en este caso, cuando la gota casi llena el capilar colector, se mantiene confinado entre las paredes del capilar y la gota emergente.

Se trata de un régimen de constricción geométrica (squeezing mode), que aparece en sistemas de número capilar bajo ($Ca < 0.01$ en emulsiones simples), donde los esfuerzos viscosos no son suficientes para superar los efectos del confinamiento dados por las paredes de los microcanales. Por lo tanto, en este régimen, la geometría constituye el principal factor para la formación de las gotas. En este caso, la gota de líquido que emerge crece hasta tocar la punta del capilar colector. Una vez que obstruye completamente el canal, la interfaz se adelgaza hasta que la gota se separa.

Se consideró que la causa de que aumente la polidispersidad al aumentar la velocidad de la fase externa es debido a que en este sistema la tensión interfacial es alta, puesto que no se usó ningún tensoactivo adicional a los lípidos, salvo el PVA disuelto en la fase acuosa, de manera que la tensión interfacial entre la mezcla Hexano/cloroforno y la fase acuosa con 10%PVA fue de 5.72 mN/m, medido en un tensiómetro de gota (Biolin Scientific). Por lo tanto, se propone la siguiente explicación a este fenómeno: dada la alta tensión interfacial en este sistema, existe una competencia entre la energía producida por la inercia de las fases interna e intermedia, la presión que ejerce la fase externa y la tensión superficial. La alta presión de la fase externa produce un bloqueo del flujo de las fases interna e intermedia, de manera que en los primeros instantes de formación de la emulsión doble, esta presión externa es muy alta, suficiente para promover el rompimiento de las gotas en régimen de goteo. En el siguiente intervalo de tiempo, la energía inercial de la fase interna es mayor y sobrepasa la presión ejercida por la fase externa, generando el régimen de chorro anchado. Finalmente, en el último régimen observado, la energía de la fase interna disminuye de nuevo, pero la tensión interfacial es muy alta y no promueve el rompimiento de gotas en el régimen de goteo, la interfaz resiste sin romperse hasta que la gota alcanza un volumen considerablemente grande. A pesar de aumentar la polidispersidad, fue posible obtener vesículas con un tamaño promedio menor, como se muestra en la figura 3.7a. La figura 3.7b muestra el histograma correspondiente de radios, con un valor central de $3.1 \pm 2.9 \mu\text{m}$. Este valor tan grande de error surge de que en esta muestra las

vesículas presentaron tamaños muy variados. En este caso se calculó una polidispersidad del 93 %, definida como la razón entre la desviación estándar y el valor promedio.



(a) Tamaño de las gotas de emulsión doble como función del tiempo, manteniendo fijas las razones de flujo en $Q_{inn} = 8.33\mu\text{L}/\text{min}$, $Q_{middle} = 8.33\mu\text{L}/\text{min}$ y $Q_{out} = 110\mu\text{L}/\text{min}$.

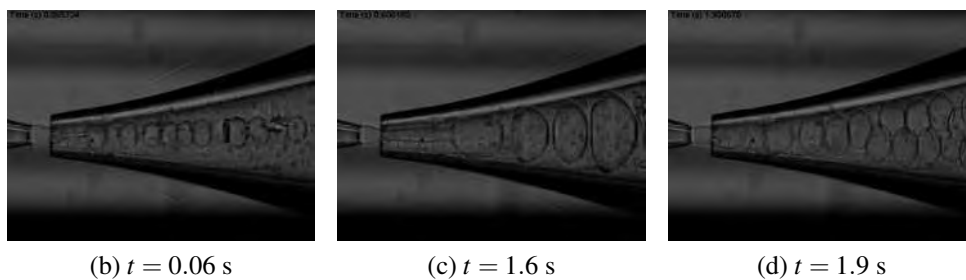


Figura 3.6: (a) Monitoreo del tamaño de gotas de emulsión doble respecto al tiempo, cuando la velocidad de la fase externa es alta. (b-d) Diferentes regímenes de emulsificación observados

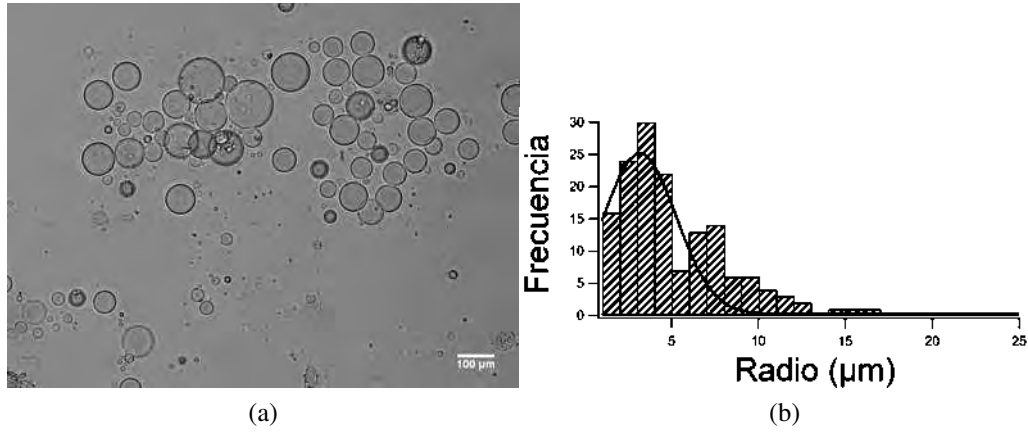


Figura 3.7: (a) Imagen de microscopía óptica mostrando una población de vesículas lipídicas obtenidas con las razones de flujo $Q_{inn} = 8.33\mu\text{L}/\text{min}$, $Q_{middle} = 8.33\mu\text{L}/\text{min}$ y $Q_{out} = 110\mu\text{L}/\text{min}$, observadas al siguiente día de su colección. (b) Distribución de radios correspondiente.

Con el fin de confirmar esta hipótesis se calcularon los números adimensionales implicados: el número capilar y el número de Weber. A este respecto, surge una dificultad desde el punto de vista teórico, puesto que hay tres fases involucradas en el sistema; la fase interna acuosa, la fase aceite y la fase externa acuosa. Podrían definirse números adimensionales para cada fase:

$$Ca_i = \frac{\mu_i v_i}{\gamma_j} \quad (3.1)$$

$$We_i = \frac{\rho_i D_i v_i^2}{\gamma_j} \quad (3.2)$$

donde el índice i , corre de 1 a 3, indicando cada una de las fases respectivas y γ_j se refiere a la tensión interfacial entre la fase i -ésima y aquella con la que está en contacto. Sin embargo, esta aproximación no describe correctamente el sistema, puesto que en el momento en que se forma la gota de emulsión doble, contribuyen las dos velocidades, interna e intermedia a la inercia de la gota, y la interfaz que tiene importancia es la que se forma entre la fase intermedia y la fase externa (γ_{23}). Por lo tanto, se definieron los siguientes números adimensionales efectivos:

$$Ca_{eff} = \frac{\mu_1 v_{sum}}{\gamma_{23}} \quad (3.3)$$

$$We_{eff} = \frac{\rho_1 D_{tip} v_{sum}^2}{\gamma_{23}} \quad (3.4)$$

donde v_{sum} está dado en términos de las razones de flujo Q_i como:

$$v_{sum} = \frac{Q_1 + Q_2}{\pi D_{tip}^2} \quad (3.5)$$

Tomando en cuenta que la presión producida en la punta del capilar inyector D_{tip} está dada por la suma de las presiones que producen las razones de flujo tanto de la fase interna como de la fase intermedia. Usando estas definiciones, se obtuvieron los valores $Ca_{eff} = 0.020$ y $We_{eff} = 0.0590$. El valor encontrado para el número capilar es considerablemente grande, al compararlo con trabajos anteriores, como el de Utada *et. al.*, donde se estudiaron emulsiones simples con números capilares desde el orden de 10^{-3} [9] aunque en emulsiones dobles se han estudiado valores del orden de 10^{-1} [44, 45]. De igual forma, el número de Weber de este sistema presenta un valor cercano a los menores valores estudiados en la formación de emulsiones simples en microcanales por Utada *et. al.* [9]. Esto parece indicar, por lo tanto, que el número adimensional predominante en este fenómeno es el número de Weber, que como se dijo en el capítulo 1, describe la razón entre la energía de arrastre del fluido y la tensión interfacial. Es importante observar que, el valor calculado del número de Weber efectivo se mantiene fijo aún cuando se varía la velocidad externa de la fase externa, dado que es independiente de ésta.

Finalmente, es importante recalcar que debería ser posible, no obstante los resultados anteriores, obtener gotas monodispersas de emulsión doble más pequeñas, aumentando la velocidad de la fase externa, con ayuda de algún co-tensioactivo para disminuir la tensión interfacial, que sea soluble en las fases acuosas, o su difusión en la fase aceite sea más rápida que la frecuencia de formación de las gotas. La contribución de los lípidos para disminuir la tensión interfacial en este sistema es muy pequeña dado que su tiempo de difusión es mayor que el tiempo de formación de las gotas (decenas de milisegundos). Incluso cuando el PVA es soluble en las fases acuosas y se absorbe eficientemente en la interfaz, requiere de al menos 1 s posterior a la formación de la gota para disminuir la tensión interfacial [44]. Con el uso de un co-tensioactivo, si bien se podrían obtener vesículas pequeñas, se tendría que pagar el costo de tener un sistema mixto, formado no solo por lípidos en la interfaz, menos biocompatible y con características más alejadas del concepto biomimético.

3.3.2. Vesículas de DPPC.

Con el fin de probar el método con un tipo de membrana diferente, se formaron vesículas con el fosfolípido DPPC, en lugar de usar la mezcla lipídica. Para ello, se utilizó la misma mezcla de hexano/cloroforno en la fase aceite de las emulsiones dobles, en donde se disolvió DPPC a una concentración de 5mg/mL. La figura 3.8 muestra la población de vesículas obtenida.

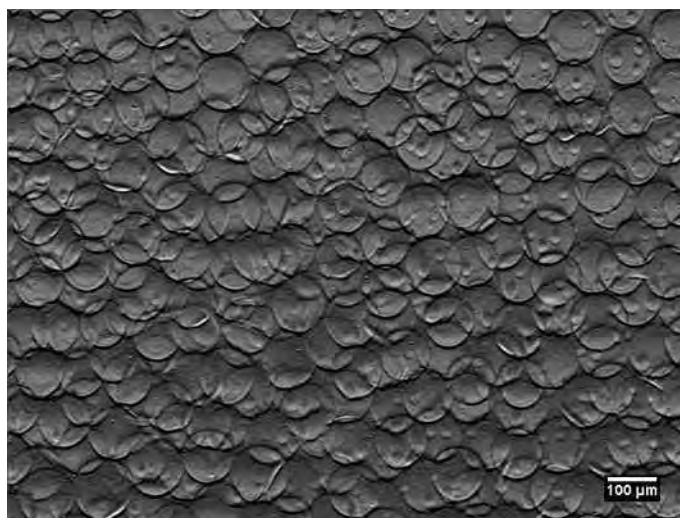


Figura 3.8: Imagen de microscopía óptica mostrando una población de vesículas de DPPC.

Las vesículas se mantuvieron estables por un tiempo de alrededor de 20 días, similar al tiempo de estabilidad de las vesículas formadas por la mezcla usada en la sección anterior. Es de esperarse que las vesículas hechas con DPPC sean más rígidas que las hechas con la mezcla lipídica, la cual contiene el lípido insaturado DOPC, que le confiere mayor fluidez a la membrana. Es interesante destacar que las vesículas (o liposomas) compuestas de una sola especie de lípido en su membrana tuvieron una buena estabilidad a pesar de ser más rígidas y no contener colesterol. La posibilidad de preparar vesículas de un solo lípido usando microfluídos es de importancia para posteriores investigaciones sobre las propiedades mecánicas de éstas vesículas, puesto que tales estudios deberán realizarse con lípidos puros primero, y con diferentes mezclas lipídicas después, siguiendo un creciente nivel de complejidad estructural.

Encapsulado de suspensión de magmita.

El trabajo presentado en esta sección consistió en investigar si era posible el encapsulado de nanopartículas superparamagnéticas en vesículas lipídicas. El trabajo se realizó en vesículas de DPPC, con el fin de que pudieran ser comparadas con los resultados previos hechos por colaboradores de un grupo de trabajo del Instituto de Física de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (IF-UASLP), quienes han estudiado las propiedades mecánicas de este sistema, utilizando los métodos de rehidratación de *films* y electroformación para ensamblar las vesículas. El material encapsulado fue una muestra de nanopartículas del material superparamagnético a base de maghemita (Fe_2O_3) suspendidas en agua desionizada. Las nanopartículas fueron sintetizadas y caracterizadas previamente por el grupo del IF-UASLP. El encapsulado se realizó haciendo disoluciones al 1 % y 5 % v/v de la solución original conteniendo nanopartículas, en la solución acuosa utilizada para la fase interna, la cual, como ya se ha mencionado, contiene los polímeros PEG y PVA. La figura 3.9 muestra poblaciones típicas de vesículas conteniendo la solución de nanopartículas a las dos diferentes concentraciones: 1 % y 5 % v/v en su fase interna.

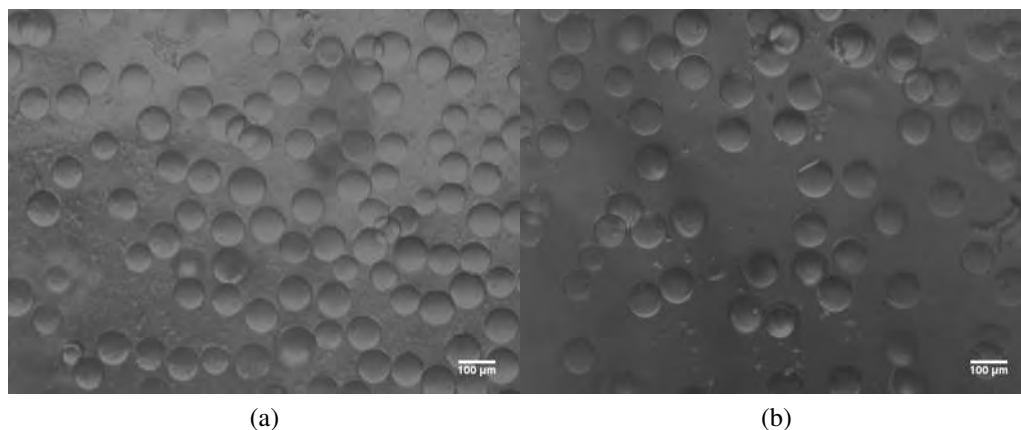


Figura 3.9: Imágenes de microscopía óptica mostrando vesículas de DPPC conteniendo la solución de maghemita a concentraciones de (a) 1 % v/v, estables durante 11 días y (b) 5 % v/v, estables durante 5 días.

Se observó que a mayor concentración de las partículas de maghemita, se obtuvo una cantidad menor de vesículas y se observó una disminución en el tiempo de estabilidad, por lo que se concluye que éstas tienden a desestabilizar la membrana, en especial cuando se encuentran a altas concentraciones. Este hecho podría ser debido a que a altas concentración es mayor la cantidad de nanopartículas que se encuentran cerca de la

membrana lipídica y su interacción con ésta debe ser desfavorable a la estabilidad. Este resultado está en aparente desacuerdo con experimentos previos reportados en [46], donde se estudió el efecto de incorporar nanopartículas de carga negativa a las membranas de liposomas pequeños (de 50 nm de radio). La discrepancia puede deberse a que en el caso mencionado arriba, las nanopartículas fueron adsorbidas por la capa lipídica externa de los liposomas, confiriéndoles carga negativa y evitando los efectos de agregación, coalescencia y maduración de Ostwald. Por otra parte, en nuestro caso las nanopartículas, si bien interactúan con la membrana lipídica, se encuentran dispersadas en la fase acuosa, al interior de los liposomas y el corto alcance de su interacción no permite que el exterior del liposoma se adquiera la carga electrostática suficiente para evitar los efectos de la desestabilización.

Además de los efectos electrostáticos, es posible que las nanopartículas produzcan algún cambio en las propiedades mecánicas de la membrana lipídica. Lo cual podría comprobarse en experimentos futuros utilizando la técnica de la balanza de Langmuir para medir la presión superficial de las membranas a diferentes concentraciones de nanopartículas. Es importante el hecho de haber obtenido vesículas conteniendo nanopartículas magnéticas estables, para futuras aplicaciones en el monitoreo del envío de fármacos, como agentes de contraste en imagenología de resonancia magnética [47].

3.4. Conclusiones.

Los experimentos seguidos en este capítulo constituyeron gran parte de la formación académica en el uso de los microfluídos para el encapsulado de agentes hidrofílicos. El trabajo reportado muestra la versatilidad de las vesículas lipídicas, hechas con microfluídos, para el encapsulado de soluciones hidrofílicas y nanopartículas, y para la formación de dichas vesículas con lípidos puros, así como la gran estabilidad que presentan las vesículas ya formadas. La información presentada constituye también una guía para quien comienza a trabajar con esta técnica experimental. El trabajo presentado en este capítulo muestra la capacidad de encapsulado de diferentes materiales hidrofílicos, en vesículas lipídicas de dos diferentes composiciones de membrana. Los diferentes experimentos realizados en este trabajo, constituyen posibles líneas a seguir para trabajo posterior, como pueden ser, para el caso del estudio de la formación de emulsiones dobles en microcanales bajo números de Weber grandes:

- Realizar los experimentos con partículas trazadoras a fin de conocer el perfil de velocidades en cada régimen.
- Realizar simulaciones numéricas para conocer cómo se da la diferencia de presiones en cada régimen. Dado que en este sistema se presenta la deformación y el rompimiento de la interfaz entre líquidos, sería viable el uso de un método de simulación

de malla libre, puesto que su implementación no requeriría hacer el seguimiento de la interfaz.

A su vez, en el caso del encapsulado de probióticos:

- Realizar un estudio de la biocompatibilidad y toxicidad de las microcápsulas conteniendo probióticos, encaminado a su uso en aplicaciones biológicas.
- Hacer mediciones de presión osmótica para mejorar las condiciones del encapsulado y estudiar la cinética del envío de los probióticos encapsulados.

Mientras que para el estudio de las nanopartículas superparamagnéticas encapsuladas:

- Estudiar el efecto producido por la interacción de las nanopartículas con la membrana en los parámetros viscoelásticos de la misma.
- Estudiar cómo se comportan los módulos viscoelásticos mencionados en el punto anterior ante la presencia de campo magnético (mediciones magnetorheológicas).

Capítulo 4

Microcápsulas poliméricas para el envío activado con pH de metabolitos probióticos. Aplicación hacia tratamiento gastrointestinal.

En este capítulo, se muestra una aplicación del uso de la técnica de la microfluídica en la formación de microcápsulas a partir de gotas de emulsiones dobles tipo W/O/W usadas como plantillas. La membrana a base de aceites de estas emulsiones dobles consistió de una solución del copolímero formado por ácido poliacrílico y poli-metilmetacrilato (PAA-b-PMMA) que solidifica luego de la evaporación del solvente, resultando en microcápsulas sólidas y estables en ambientes ácidos, y que envían su contenido en ambientes alcalinos debido a la disolución de su membrana polimérica. El material encapsulado fueron metabolitos producidos *in vitro* por cuatro diferentes cepas de probióticos. Las ideas principales de este trabajo son la administración de los metabolitos, en lugar de la bacteria viva y su envío controlado a la zona colorectal. En este trabajo, se caracterizó la cinética del envío de los metabolitos probióticos desde las microcápsulas. Se encontró que entre más alta sea la concentración de los metabolitos probióticos encapsulados dentro de las microcápsulas, la cinética del envío es más anómala y que ésta es independiente del grosor de las microcápsulas y del peso molecular de los metabolitos probióticos encapsulados. Por tanto, estos experimentos *in-vitro* muestran que las microcápsulas de este tipo son candidatos potenciales para enviar y liberar metabolitos probióticos de forma funcional al tracto colorectal.

4.1. Introducción

Los probióticos son organismos vivos que pueden conferir un beneficio en la salud del huésped al ser administrados oralmente en dosis adecuadas. Entre la gama de probióticos, los géneros más utilizadas en alimentos son *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* [48]. En las últimas décadas, han sido reportados muchos beneficios saludables de los probióticos, incluyendo la estimulación del sistema inmune, síntesis de vitaminas y predigestión de proteínas, absorción de calcio, prevención de enfermedades gastrointestinales, mejora en la digestión de la lactosa, aumento de la salud de la microbiota intestinal y mantenimiento de su balance, inhibición del crecimiento de patógenos y reducción del colesterol [49–53] así como prevención y terapia contra diferentes tipos de cáncer, en particular, cáncer colorectal [49, 54, 55]. El cáncer colorectal es una enfermedad letal si no se trata adecuadamente. De hecho, a pesar de representar sólo el 13% de todos los tipos de cánceres, es la segunda causa de muerte más frecuente en la unión europea y, junto con otros tipos de cáncer, la mayor causa de mortalidad en Estados Unidos además de que la mortalidad causada por este tipo de cáncer en los países en desarrollo está en incremento [54, 56]. En el año 2012, se observó en México el porcentaje de defunciones por diferente tipo de cáncer y se reportó que el cáncer colorectal representa el 4.3% y 5.3% para la población femenina y masculina, respectivamente (INEGI 2012).

Para producir beneficios a la salud, los probióticos deben crecer en el huésped y sobrevivir a las condiciones fisiológicas del mismo. En particular, en su trayecto, deben sobrevivir a las condiciones ácidas del estómago (pH 1-4), resistir las sales biliares y las enzimas digestivas y finalmente, alcanzar la zona intestinal en condiciones funcionales [52, 57]. Las propiedades funcionales de los probióticos dependen de su actividad metabólica y de su habilidad para que sus colonias crezcan en el huésped. Éstos factores son altamente dependientes de los hábitos alimenticios y las condiciones gastrointestinales del huésped [57, 58]. La supervivencia de los probióticos puede ser optimizada con la administración simultánea de ciertos alimentos, como jugo de tomate, azúcares o leche [57]. Para asegurar sus propiedades funcionales, se estableció una concentración mínima viable¹ de bacterias de aproximadamente 10⁶ cfu/mL; por lo tanto, la dosis terapéutica mínima a administrar debe ser de 10⁸-10⁹ células viables por día [57]. A pesar de que ésta dosis está disponible en muchos productos comerciales, las condiciones hostiles del tracto gastrointestinal del huésped hacen difícil que los probióticos alcancen y permanezcan de forma funcional en el intestino [59]. Por lo tanto, los tratamientos gastrointestinales efectivos basados en la administración oral de probióticos continúan siendo un reto.

En este capítulo, se propone una nueva alternativa para el tratamiento gastrointestinal que involucra la administración de metabolitos de probióticos en lugar de los microorganismos vivos. Para este tratamiento, los probióticos se cultivan bajo condiciones

¹Viable: Con la capacidad de multiplicarse mediante una fisión binaria.

controladas de laboratorio y los metabolitos que producen se extraen y liofilizan. Estos metabolitos probióticos son dispersados en un medio acuoso y encapsulados en gotas de emulsión doble tipo W/O/W, usando tecnologías microfluídicas. Esta idea de encapsulado está basada en estudios que demuestran que el encapsulado de probióticos incrementa su viabilidad, reduciendo el daño celular y resultando en una mejora en el envío de los probióticos al tracto intestinal [52, 60–62]. Estas gotas de emulsión doble se convierten en microcápsulas sólidas y estables, que contienen a los metabolitos probióticos en sus núcleos acuosos. En particular, en este trabajo se usó un polímero sensible al pH del medio para formar las membranas de las microcápsulas [63, 64]; esta característica acciona el envío de los metabolitos de probióticos desde las microcápsulas por el pH característico del intestino. Este planteamiento para la administración podría promover una forma más controlada de enviar las moléculas benéficas que metabolizan las bacterias probióticas y un aumento en la viabilidad.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Crecimiento de probióticos y extracción de sus metabolitos.

Las cepas de metabolitos *Lactobacillus Casei* (CCRC 10697, LC), *Lactobacillus Plantarum* (229, LP), *Lactobacillus Acidophilus* (LA1, LA) y *Bifidobacterium Longum* (BB536, BL) fueron obtenidas de la Colección de Cultivos Tipo Americanos (American Type Culture Collection, Manassas, VA (ATCC, 1994). MRS-broth (Sigma) fue usado para crecer las cepas seleccionadas de probióticos productores de metabolitos. Las cepas seleccionadas fueron cultivadas inoculando 1 % de cada probiótico e incubándolos a 37°C por 24 h. Los metabolitos de probióticos fueron obtenidos a partir de los probióticos cosechados y centrifugados a 2500 rpm por 10 min. El sobrenadante fue removido y esterilizado con filtros de 0.22µm (Millipore). Los metabolitos probióticos obtenidos fueron congelados a –40°C y liofilizados. La liofilización fue realizada usando un equipo de liofilización al vacío a –50°C (LABCONCO). Luego de la liofilización los productos fueron almacenados a –20°C.

4.2.2. Caracterización de los metabolitos de probióticos.

Para caracterizar el peso molecular de las diferentes proteínas presentes en los diferentes metabolitos probióticos, en particular, en las muestras de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*, se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Para hacer esto, las muestras fueron suspendidas, a una mayor concentración que la usada en los experimentos de encapsulado, en solución amortiguadora RIPA con inhibidor de proteasas. Esta solución amortiguadora incluye 50 mM Tris

(pH7.4), 0.5 wt% de surfactante no-iónico NP-40, 100 mM NaCl y 1 mM de coctel inhibidor de proteasas (Complete Mini ROCHE). Las muestras fueron cargadas en gel de poliacrilamida al 15% y el peso molecular aparente de las proteínas fue determinado por electroforesis a 100V por 120 min. Como referencia, se utilizó un marcador de peso molecular de proteínas (Amersham ECL Full range rainbow, GE Health Care Life Science); éste comprende una mezcla de proteínas individuales teñidas que, previo a la electroforesis, producen bandas de color de igual intensidad. Para evitar la difusión de proteínas durante el teñido del gel, éste fue tratado con una solución de 40 vol% agua destilada, 10 vol% ácido acético y 50 vol% metanol; este procedimiento induce a la precipitación de casi la totalidad de las proteínas. Para visualizar las proteínas, el gel de poliacrilamida fue incubado por 3 h a 4°C en una solución para teñir, la cual consta de 44.8 vol% metanol, 44.8 vol% agua destilada, 9.97 vol% ácido acético y 0.25 vol% Coomassie Brilliant Blue. Para remover el exceso de solución teñidora, el gel fue enjuagado con la misma solución, pero sin Coomassie Brilliant Blue. Además, para determinar la concentración de las proteínas presentes en los metabolitos de probióticos, se midió en cada muestra la absorbancia de luz UV-vis de 280 nm usando un lector multimodal de microplacas (Varioskan Lux, Thermo Scientific) y se realizó análisis de Bradford a longitud de onda de 595 nm en placas funcionalizadas para adherir proteínas.

4.2.3. Formación de microcápsulas conteniendo metabolitos de probióticos

Para formar las microcápsulas, se utilizaron los dispositivos microfluídicos contruidos a partir de capilares estirados con el método de flujo enfocado y con los solventes y velocidades que se mencionan en la sección 2.4.2 del capítulo 2.

Como se mencionó en la sección 2.4.2 del capítulo 2, los dispositivos microfluídicos pueden operarse produciendo la emulsión doble en los regímenes de goteo y de chorro [9, 31]. Mientras que la monodispersidad en el tamaño de las muestras es mayor en el régimen de goteo, el régimen de chorro reduce la posibilidad de obstrucción de los capilares. En general, en este trabajo se produjeron gotas de emulsión doble encapsulando los diferentes metabolitos de probióticos en el régimen de goteo. Sin embargo, para la muestra de *Bifidobacterium longum* el comportamiento de flujo en el régimen de goteo fue inestable luego de aproximadamente 10 minutos, por tanto, la emulsión doble para esta muestra fue producida en el régimen de chorro, obtenido con el incremento de la razón de flujo de la fase interna. La suspensión de gotas de emulsión doble a la salida del dispositivo fue colectada en un vial vacío. Una vez en el vial, el solvente contenido en la fase intermedia de la emulsión doble, a base de aceites, comienza a difundirse lentamente hacia la fase externa acuosa [8, 63]. Durante este proceso, se mantuvo el vial abierto para permitir la evaporación de los solventes desde la fase acuosa externa. Este proceso, el cual es una

modificación de la técnica de evaporación de solvente para producir esferas poliméricas sólidas a partir de emulsiones dobles [65], hace precipitar al PAA-b-PMMA; formando una membrana sólida alrededor de los núcleos acuosos de la emulsión doble. Usando este método, se obtuvieron microcápsulas esféricas con membranas sólidas al cabo de 1 Hr. [63]. Posteriormente, las microcápsulas sólidas fueron enjuagadas tres veces para remover solventes residuales y tensoactivos libres. Todos los experimentos fueron hechos a temperatura ambiente. La producción de las gotas de emulsión doble en el dispositivo microfluídico fue monitoreada usando un objetivo 5X en un microscopio óptico (Olympus BX40) equipado con una cámara rápida (Phantom V9).

4.2.4. Microscopía confocal.

La membrana de las microcápsulas fue marcada con 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-rodamina B (DHPE-Rh). Para este efecto, se agregó 1 % mol de DHPE-Rh a la fase intermedia usada en la producción de las plantillas de emulsión doble. Con la ayuda de un microscopio confocal (Leica TCS SP5), se visualizó la membrana de las microcápsulas, usando como fuente de excitación de la DHPE-Rh un láser HeNe (543nm). Los detectores fotomultiplicadores se equiparon con filtros pasa-banda de 560 y 670 nm para coleccionar la fluorescencia emitida.

4.2.5. Análisis de imágenes.

Los valores reportados en este capítulo sobre el radio de las microcápsulas y el grosor de sus membranas fueron medidos a partir de las imágenes de microscopía confocal, con el uso combinado del software ImageJ (NIH) [40] y códigos de MATLAB. En la determinación del grosor de la membrana de las microcápsulas conteniendo los metabolitos de *Bifidobacterium longum*, se utilizó un procedimiento similar al descrito por Pécréaux *et. al.* en la referencia [66], implementado en MATLAB.

4.2.6. Absorbancia de UV-vis

Usando un espectrofotómetro (Cary 500), se monitorearon los espectros de absorción de luz UV-vis en función del tiempo, del medio acuoso externo donde se encontraban las microcápsulas en suspensión. En este espectro, se leyó la absorción a una longitud de onda de 280 nm, porque ésta es la longitud de onda de absorción típica de las proteínas contenidas en los diferentes metabolitos de probióticos. Para determinar la concentración de los metabolitos de probióticos enviados desde las cápsulas, se realizó una calibración de la absorbancia a 280 nm como función de la concentración de los metabolitos para las cuatro diferentes muestras estudiadas. A partir de esta calibración, se estableció el límite

de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y sensibilidad de nuestro espectrofotómetro para cada muestra de metabolito de probiótico.

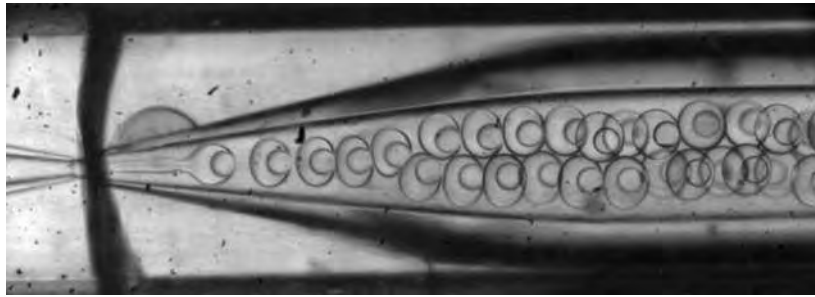
4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Fabricación de microcápsulas conteniendo metabolitos de probióticos.

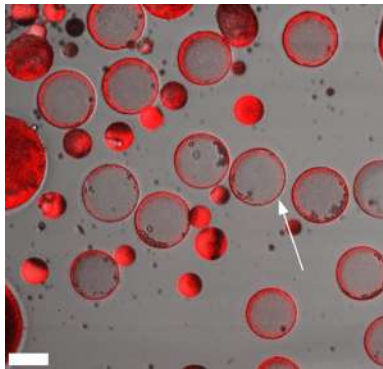
Usando los dispositivos microfluídicos para la formación de gotas de emulsión doble con el método de flujo enfocado, se produjeron gotas de emulsión doble conteniendo en sus núcleos a los metabolitos expresados por los probióticos en cultivos de laboratorio y con un polímero sensible a pH en su fase intermedia a base de aceites, tal como se muestra en la figura 4.1a. En particular, se fabricaron gotas de emulsión doble conteniendo cuatro diferentes metabolitos de probióticos: *Bifidobacterium longum* (BL), *Lactobacillus acidophilus* (LA), *Lactobacillus plantarum* (LP) y *Lactobacillus casei* (LC), cada uno a la concentración correspondiente a su dosis letal media contra la línea celular HT29 de adenocarcinoma colorectal, tal como se muestra en la tabla 4.1.

Tabla 4.1: Diferentes concentraciones de metabolitos utilizadas para su encapsulado. Las concentraciones están basadas en la dosis letal media de los metabolitos contra la línea celular HT-29. Los metabolitos con dosis letal media menor, son más efectivos en el combate al HT-29 que aquellos que requieren una mayor concentración.

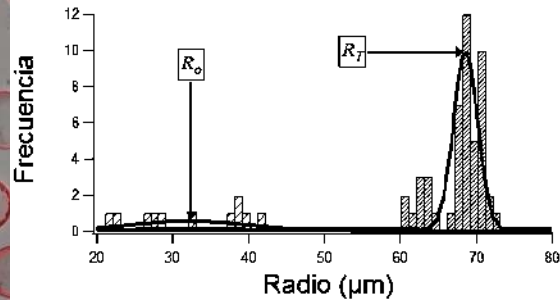
| Metabolitos de probióticos | Dosis letal media (LD50) mg/mL |
|----------------------------------|--------------------------------|
| <i>Bifidobacterium longum</i> | 1.206 |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | 0.294 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | 2.973 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 5.132 |



(a)



(b)



(c)

Figura 4.1: (a) Micrografía óptica mostrando la producción típica de gotas monodispersas de emulsión doble conteniendo metabolitos probióticos. (b) Imagen de microscopía confocal de microcápsulas monodispersas con metabolitos *L. casei* en su interior. Las barras de escala corresponden a $100 \mu\text{m}$. La flecha blanca señala una microcápsula. Se observan también, gotas de emulsión simple provenientes de microcápsulas que han desestabilizado. (c) Distribución de radios de las microcápsulas mostradas en (b). Los valores promedio R_0 y R_t corresponden a los radios de las gotas de emulsión simple observadas en (b) y las de emulsión doble, respectivamente. Estos valores permiten determinar el grosor de las microcápsulas [13].

4.3.2. Estabilidad de las microcápsulas a pH ácido.

Para ser portadores útiles de metabolitos de probióticos destinados a alcanzar la zona intestinal, estas microcápsulas deberían ser resistentes al pH ácido característico del estómago. Por tanto, se estudió la estabilidad de las microcápsulas al exponerlas a un ambiente ácido. Para realizar esto, las microcápsulas fueron colocadas en una solución buffer a pH2 de 0.1 M de cloruro de potasio-ácido clorhídrico (KCl-HCl). Las figuras 4.2a y 4.2b muestran imágenes de microscopía confocal de microcápsulas conteniendo LC a dos tiempos diferentes, donde no se observa ninguna liberación del contenido de la

microcápsulas y ninguna deformación ni ruptura de la membrana, luego de 333 s (5.55 min) de exposición. Las figuras 4.2c y 4.2d muestran la sección transversal del plano ecuatorial de una microcápsula conteniendo BL inmersa en la misma solución buffer. Luego de un tiempo aproximado de inmersión de 1000s (16.6 min), no fue observada liberación del contenido de la microcápsula ni ruptura o cambios morfológicos en su membrana, tal como se observa en la superposición de imágenes de la figura 4.2e.

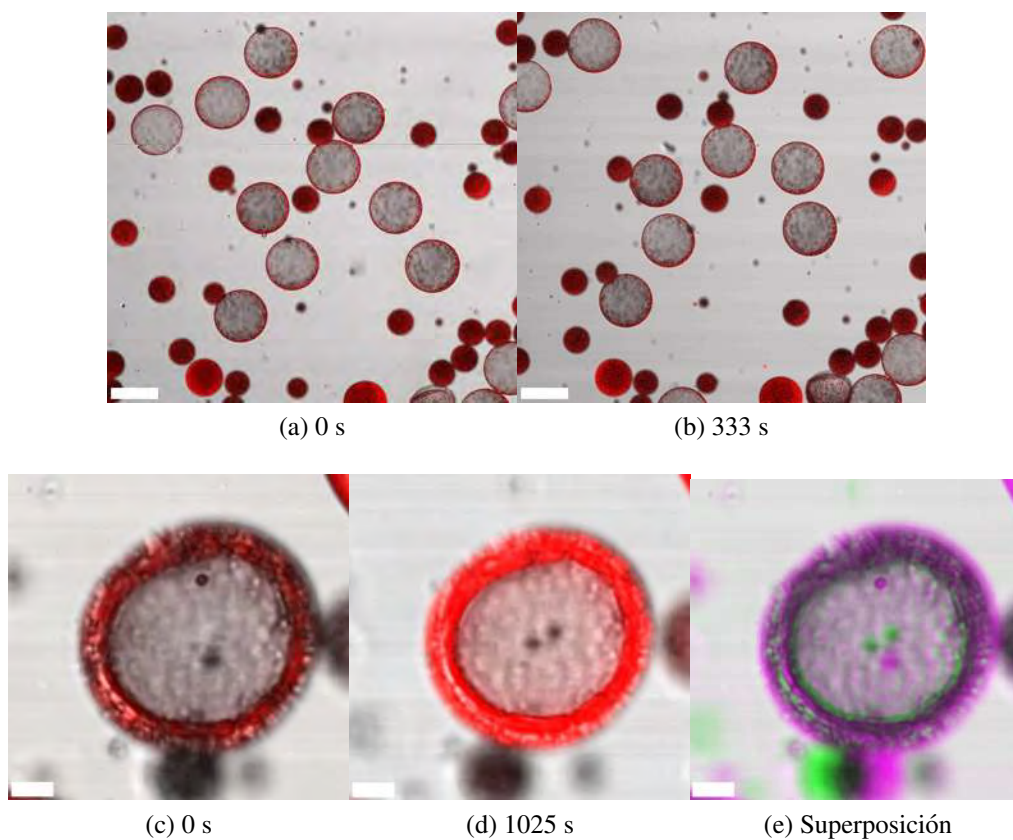


Figura 4.2: Secuencia de imágenes de microscopía de fluorescencia de microcápsulas inmersas en buffer a pH 2. (a) y (b) Microcápsulas conteniendo LC, monitoreadas por 333 s. (c) y (d) Microcápsulas conteniendo BL monitoreada por 1025 s. (e) Superposición de las imágenes(c) y (d). La barra de escala es de $10\mu\text{m}$.

4.3.3. Estabilidad de las microcápsulas y liberación en un ambiente alcalino.

Los polímeros que conforman las microcápsulas, inmersos en una solución buffer a pH 8 de 0.1 M de fosfato dibásico de potasio y fosfato monobásico de potasio, se vuelven

altamente cargados. Este exceso de carga causa una repulsión electrostática entre las cadenas poliméricas. Consecuentemente, las microcápsulas se disuelven a razón constante formando poros a través de la membrana. Estos poros permiten la liberación del contenido de las microcápsulas. El tiempo para la completa disolución de las microcápsulas depende del grosor de sus membranas [63]. El grosor de las membranas puede ser controlado variando las razones de flujo de las fases interna e intermedia, manteniendo constante su suma y la razón de flujo de la fase externa para preservar el diámetro externo de las gotas de emulsión doble [63]. Usando esta estrategia, se produjeron microcápsulas con grosores de membrana de aproximadamente 2 y 7 μm . La disolución de la membrana y la liberación completa del contenido fue observada en 3 minutos para las microcápsulas con membranas más delgadas mientras que para las de membranas más gruesas, este tiempo tuvo un incremento, tal como se muestra en la figura 4.3.

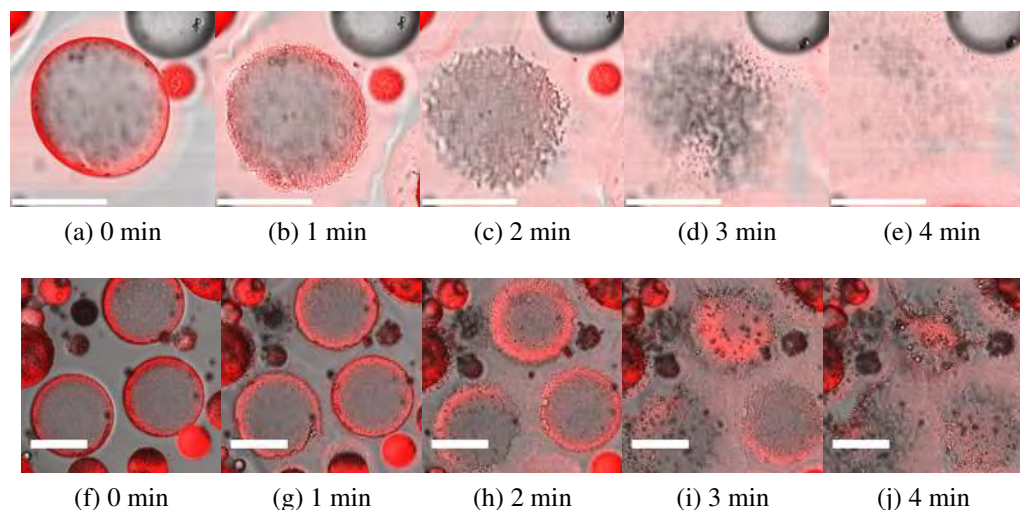


Figura 4.3: Secuencia de imágenes de microscopía de fluorescencia de microcápsulas inmersas en buffer a pH 8. (a)-(e) Microcápsulas conteniendo LA, con un grosor de membrana de aproximadamente 2 μm . (e)-(j) Microcápsulas conteniendo LC con un grosor de membrana de aproximadamente 7 μm . Las barras de escala son de 100 μm .

El tiempo requerido para la completa disolución de las microcápsulas conteniendo los diferentes metabolitos de probióticos fue diferente para cada muestra: 6 min para LC, 12 min para LP, y 16 min para BL, como se muestra en la figura 4.4. Además, el inicio de la disolución de las microcápsulas fue también diferente para cada muestra: 1 min para LC, 6 min para LP, and 13 min para BL, como se muestra en la figura 4.4. Estas observaciones están en de acuerdo con el comportamiento esperado debido al grosor de las membranas de las microcápsulas fabricadas, que fueron de 2.5 μm para LC, 4.1 μm para LP and 13.7 μm para BL).

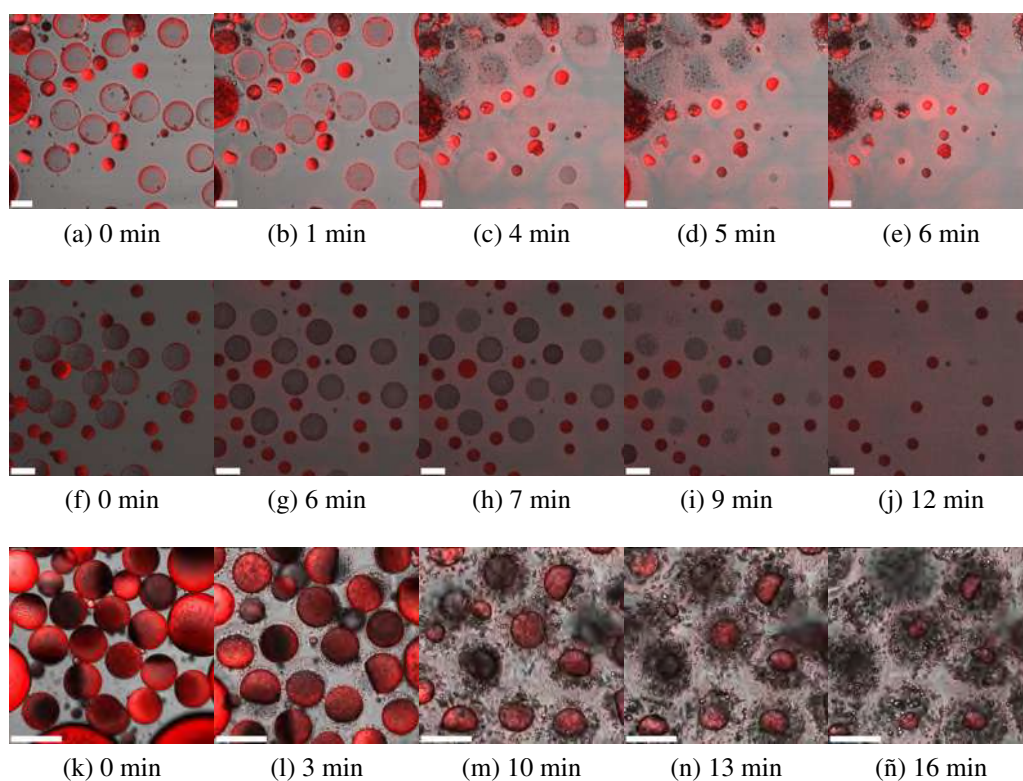
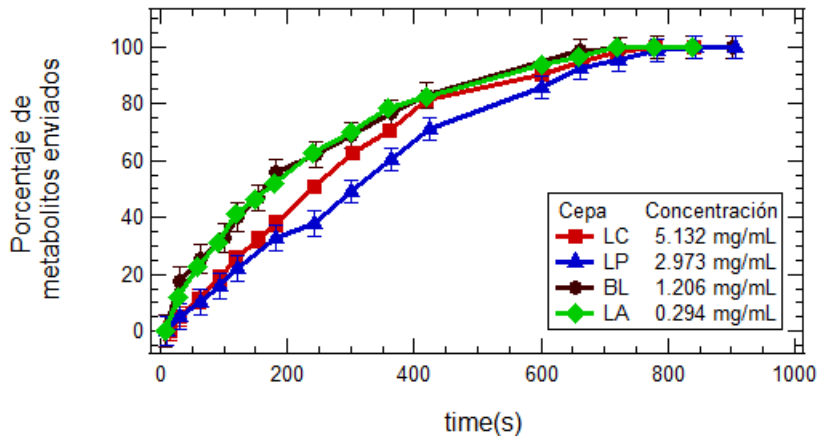
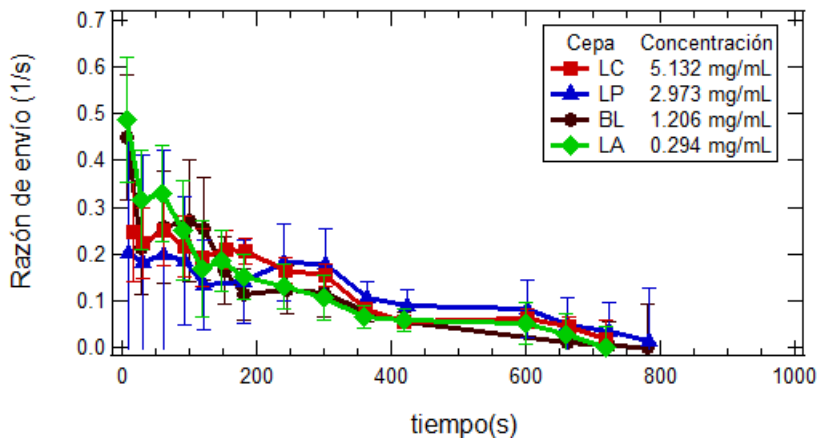


Figura 4.4: Secuencia de imágenes de microscopía de fluorescencia de microcápsulas inmersas en buffer a pH 8. La disolución de las microcápsulas se observa para (a)-(e) Microcápsulas conteniendo LC, (e)-(j) Microcápsulas conteniendo LP y (k)-(o) Microcápsulas conteniendo BL. Las barras de escala son de $100 \mu\text{m}$. El remanente de material fluorescente corresponde a agregados de cadenas poliméricas.

La cinética de la liberación de los metabolitos de probióticos fue observada por medio de absorción UV, dado que los metabolitos de probióticos están compuestos de ácidos grasos de cadenas cortas y proteínas, los cuales son moléculas que presentan una respuesta lineal a la absorción de luz UV [67]. El porcentaje de liberación de cada metabolito probiótico es proporcional a la absorbancia de la muestra. Las microcápsulas conteniendo BL y LA inmersas en medios a pH 8 presentaron una rápida liberación de su contenido. Luego de 700 s, el valor de absorbancia de luz UV alcanzó un máximo y se tornó constante en el tiempo, indicando que el contenido fue enviado por completo, como se muestra en la figura 4.5a. En contraste, la absorbancia de luz UV de las microcápsulas conteniendo LC y LP siguieron una cinética de liberación ligeramente más lenta, alcanzando la región plana en aproximadamente 800 s, como se muestra en la figura 4.5a.



(a)



(b)

Figura 4.5: (a) Cantidad de material enviado como función del tiempo. (b) Evolución temporal de la razón de envío para las diferentes muestras de metabolitos. Las barras de error en (a) muestran el error estándar porcentual $\%SE$ definido en cada punto como $\%SE_i = SE/x_i$ donde el SE es el error estándar calculado a partir del LOD de cada una de las muestras como $SE = LOD/\sqrt{n}$, siendo n el número de puntos usados en la curva de calibración.

A partir de las curvas de la figura 4.5a, se realizó la derivada numérica respecto al tiempo para obtener la razón de liberación de los metabolitos de probióticos (figura 4.5b). Para las microcápsulas conteniendo BL y LA, la razón de liberación es mayor a tiempos cortos, es decir, se observa que 50% del contenido fue liberado en 150 s, mientras que el 50% restante terminó de liberarse hasta los 500 s. Para todas las microcápsulas conteniendo metabolitos, la liberación fue mas rápida a tiempos cortos, como se muestra en la figura 4.5b. Cualitativamente, el comportamiento de liberación seguido por las

curvas de la figura 4.5 es similar al observado en sistemas que no siguen la difusión de Fick. De hecho, se ha demostrado que las propiedades mecánicas de la membrana de las microcápsulas influyen en el transporte de sustancias a través de ella [68]. Además, la variación en el grosor y el tamaño de poro de la membrana de las cápsulas ante la exposición al pH de activación podría resultar también en una difusión anómala del material a través de las membranas de las microcápsulas. Para tomar en cuenta estos posibles procesos, se realizó el ajuste de los datos experimentales al modelo de ley de potencias descrito por Sinclair y Peppas [69]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^\eta \quad (4.1)$$

Donde

$$M_t/M_\infty$$

es la cantidad de material total liberado al tiempo t (el porcentaje acumulado), K es la constante de razón de liberación y η es el exponente de liberación adimensional, el cual es un parámetro que depende de la geometría del problema. Este modelo está basado en la idea de que la superposición de diferentes tipos de difusión, fickeana y no fickeana, puede ser expresada como en una ley de potencias única, mediante una aproximación válida a cortos tiempos. El exponente de envío provee información sobre el tipo de mecanismo de transporte que domina el proceso del envío [69]. De acuerdo con este modelo, en el caso de una fuente esférica de liberación, un valor de $\eta = 0.43$ indica que el mecanismo de transporte es predominantemente fickeano. Valores en un rango de $0.45 < \eta < 0.85$ corresponden a transporte anómalo o transporte caso II, el cual está asociado con esfuerzos, transiciones de estado y deformación extensional (dinámica de hinchazón) de los polímeros vítreos que componen las microcápsulas. Valores de $\eta = 0.85$ corresponden a transporte de relajación. Valores de $\eta > 0.85$ corresponden a transporte super caso II, como resultado de los mecanismos de esfuerzo-relajación de los polímeros, debidos a su naturaleza viscoelástica. De hecho, la viscoelasticidad de las membranas de las microcápsulas puede cambiar la difusión aparente de su contenido, tornándola anómala [70]. Finalmente, si $\eta = 1$, la liberación del material es directamente proporcional al tiempo [68, 69, 71]. Puesto que la ecuación 4.3.3 es una aproximación a cortos tiempos de la solución completa dependiente del tiempo de las ecuaciones de Fick [72], sólo puede ser usada para describir hasta un 60% de las curvas de liberación [68]. Por lo tanto, el ajuste a los datos experimentales con el modelo de Sinclair-Peppas, fue hecho hasta el 60% de las curvas de liberación, como lo muestran las líneas continuas en la figura 4.6. El porcentaje acumulado del envío a tiempos largos no tiene dependencia con el tiempo t (η es cercano a cero), lo cual indica que las presiones osmótica y de Laplace se han equilibrado.

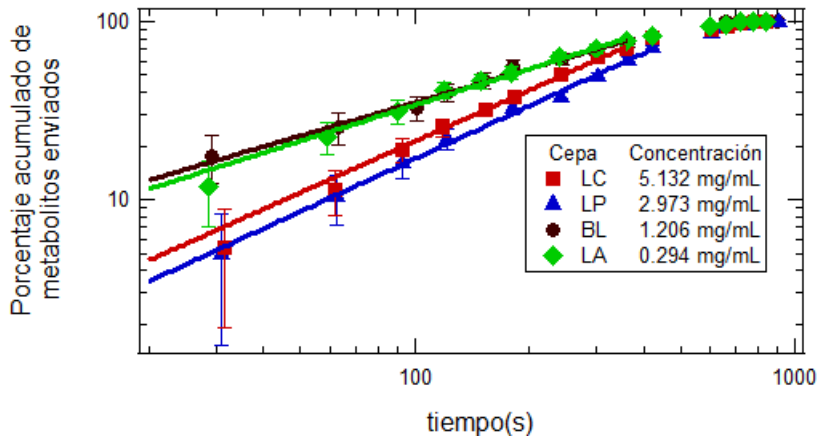


Figura 4.6: Porcentaje acumulado de la liberación de los metabolitos de probióticos respecto al tiempo de liberación a pH 8. Las líneas sólidas representan el ajuste al modelo de ley de potencias de Sinclair-Peppas. Las barras de error muestran el error propagado al calcular el porcentaje acumulado.

Los parámetros resultantes de K y η provenientes del modelo de Sinclair-Peppas, y el resultado estadístico χ^2 se resumen en la tabla 4.2. El error en el parámetro K es grande debido a que los puntos de las curvas experimentales correspondientes a bajas concentraciones presentan un error grande. Esto puede entenderse mejor observando que el parámetro K representa el punto donde las rectas, en escala logarítmica cruzan el eje y en la figura 4.6.

Los valores de η corresponden a difusión anómala o transporte caso II para las muestras de LC y LP. A pesar de que los metabolitos de los probióticos BL y LA fueron encapsulados en microcápsulas que exhiben grosores de membrana significativamente diferentes, exhiben el mismo tipo de comportamiento de liberación. Por lo tanto, se consideró que el comportamiento de liberación no está controlado por el grosor de las membranas. El comportamiento de liberación de los metabolitos de probióticos encapsulados en este estudio es similar al observado en experimentos reportados previamente de proteínas con alto peso molecular, donde se comparó la liberación de material encapsulado de diferentes pesos moleculares [73, 74]. En sus resultados, el material encapsulado consistente de moléculas de menor peso molecular, presentó difusión rápida a tiempos cortos, seguida por una fase de retraso, y una difusión sostenida a tiempos largos (un mecanismo combinado de difusión a tiempos cortos y de difusión-disolución de la microcápsula a tiempos largos), un comportamiento similar al observado para las muestras de BL y LA encapsuladas en este estudio. En contraste, las muestras con altos pesos moleculares (mayores a 29 kDa) a concentraciones altas, presentaron una difusión más rápida a tiempos largos sin la presencia de una fase de retraso, similar al comportamiento observado para

Tabla 4.2: Parámetros obtenidos a partir del ajuste de las curvas de liberación con el modelo de Sinclair-Peppas.

| Probiótico | K | η | χ^2 | Valor P |
|------------|----------------|-----------------|----------|---------|
| BL | 1.0 ± 0.7 | 0.60 ± 0.06 | 0.8269 | 0.9913 |
| LC | 0.2 ± 0.08 | 0.90 ± 0.05 | 0.911 | 0.9887 |
| LP | 0.1 ± 0.06 | 0.90 ± 0.06 | 0.4802 | 0.998 |
| LA | 1.5 ± 0.5 | 0.60 ± 0.06 | 1.7997 | 0.9371 |

las muestras de LC y LP. Por lo tanto, se formuló la hipótesis de que el peso molecular de las proteínas de los diferentes metabolitos de probióticos juega un rol de mayor importancia en el comportamiento de la liberación. Para comprobar esta hipótesis, las muestras de metabolitos de LC y LP fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), para determinar si su comportamiento altamente anómalo es debido a la presencia de proteínas con altos pesos moleculares. Para ambas muestras, se encontraron moléculas con pesos moleculares, menores a 12 kDa. Aunado a esto, trabajos previos sobre la evaluación del contenido protéico en BL y LA reportaron la presencia de proteínas y péptidos de bajo peso molecular (menores a 20 kDa) para BL [75] y de alto peso molecular para LA (mayor a 44 kDa) [76]. Estos resultados permitieron excluir el peso molecular de las proteínas como un factor que dicte el comportamiento del envío de los diferentes metabolitos de probióticos desde las microcápsulas. Sin embargo, no se descarta el efecto del enredamiento entre proteínas dentro de las microcápsulas, el cual, podría contribuir a la difusión observada.

Una vez excluido el peso molecular de los metabolitos de probióticos y las diferencias en el grosor de las membranas como responsables del comportamiento de liberación, se propuso la hipótesis de que el principal determinante del comportamiento de envío desde las microcápsulas es la diferente concentración requerida en cada probiótico para conferir beneficios a la salud del huésped, la cual obedece a su dosis letal media contra la línea celular HT29. Mientras que para las cepas de LC y LP, se requieren altas concentraciones (> 2.5 mg/mL), las de BL y LA requieren concentraciones bajas (< 1.5 mg/mL) para causar la muerte de las células HT29, tal como se enlista en la tabla 4.1. Este resultado es un indicativo de que el mecanismo de liberación de material en estas microcápsulas depende principalmente de la concentración usada, y es independiente del grosor de las membranas en el rango de los grosores estudiados ($2-14\mu\text{m}$) y es independiente también del peso molecular de los metabolitos producidos por los probióticos.

4.3.4. Conclusiones

En el trabajo reportado en este capítulo, se mostró una aplicación de la técnica de microfluídica para la microencapsulación de metabolitos probióticos dentro de microcápsulas monodispersas con membranas activadas mediante el pH del medio, formadas a partir de plantillas de emulsiones dobles. Se mostró que las microcápsulas permanecieron estables en un medio acuoso a pH 2, que mimetiza las condiciones acídicas del estómago. El envío de los metabolitos de probióticos fue observado en un medio acuoso a pH 8, similar a las condiciones de pH colorectales. Estos resultados sugieren que las microcápsulas conteniendo metabolitos de probióticos podrían ser buenos candidatos para aplicaciones farmacéuticas en el envío de probióticos y otras drogas que requieran ser dirigidas para actuar en el tracto intestinal. Además, usando el modelo de Sinclair-Peppas de la liberación de material, se determinó el tipo de difusión aparente de los metabolitos probióticos desde las microcápsulas, encontrando difusión anómala en la liberación de metabolitos de probióticos BL y LA con exponentes de liberación de 0.6 y transporte super caso II en la liberación de metabolitos de las cepas LC y LP, con exponentes de liberación de 0.9. La diferencia en la cinética de liberación fué atribuída a la diferencia en las concentraciones usadas para los diferentes probióticos, las cuales, pertenecen a su diferente dosis letal media contra la línea celular HT29.

Capítulo 5

Ensamblado de dendrímeros Jano Anfílicos en dendrimerosomas usando microfluídica.

Un tipo particular de dendrímeros Jano (JDs) fue sintetizado a partir de 2,2-bis (hidroximetil) ácido propanoico, ácido mirístico y trietilenglicol. El ensamblado de los JDs en agua, fue evaluado por el método de hidratación de film y por microfluídica, usando gotas de emulsión doble con fase aceite ultrafina como plantillas. También se evaluó la capacidad de los JD para encapsular colorantes fluorescentes. Las estructuras ensambladas de JDs fueron caracterizadas por microscopía de campo claro, de fluorescencia y confocal. Se obtuvo un alto rendimiento de producción de dendrimerosomas usando el enfoque microfluídico. Los JDs sintetizados fueron capaces de formar dendrimerosomas usando microfluídica, incluso cuando éstos en la presencia de agua se autoensamblan en agregados en lugar de vesículas, usando el método de hidratación de film. Los resultados muestran que estos dendrimerosomas pueden encapsular agentes tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Hasta lo que sabemos, este es el primer reporte de dendrimerosomas producidos con la técnica de microfluídos.

5.1. Introducción.

Los dendrímeros Jano anfílicos incluyen una región dendrítica polar (hidrofílica) separada, mediante un núcleo, de otra región no polar (hidrofóbica) [77]. Su carácter anfílico es el factor clave que favorece su autoensamblado espontáneo en agua, en estructuras supramoleculares complejas [78], tales como cubosomas, discos, listones helicoidales, vesículas tubulares y vesículas formadas por bicapas, también llamadas dendrimerosomas [79]. En años recientes, los dendrimerosomas han ganado más atención

debido a sus características fisicoquímicas, que los hacen vehículos ideales para el envío de medicamentos o como agentes diagnósticos o teranósticos [80–83]. Estas vesículas son monodispersas, estables en varios medios y pueden encapsular especies hidrofílicas e hidrofóbicas [80, 84]. Además, exhiben propiedades mecánicas similares a sus análogos polimerosomas y liposomas estabilizados con colesterol [85].

Existen diferentes técnicas usadas para la preparación de dendrimerosomas, tales como hidratación de *film* [79, 86], inyección de solventes [84, 87] y emulsificación [78, 84]. Sin embargo, un problema común, que surge con los métodos mencionados previamente, es la dificultad de escalamiento para su producción en grandes cantidades y con alta reproducibilidad; condición necesaria para las aplicaciones de envío de medicamentos en el campo biomédico.

El uso de la técnica de microfluídos para la formación de vesículas y microcápsulas y para el encapsulado de medicamentos, ofrece varias ventajas sobre las técnicas tradicionales; tales como la habilidad para producir grandes cantidades de microcápsulas altamente monodispersas y para lograr control sobre las concentraciones y composición molecular dentro de los núcleos y en las membranas de las microcápsulas. Uno de los usos de la microfluídica en la industria farmacéutica es la capacidad para reducir el desperdicio de material preciado durante el proceso de encapsulado y la consecuente reducción de costos en los procesos de elaboración [10, 32, 88].

En este capítulo, se reporta la síntesis de dendrímeros Jano anfífilicos de segunda generación, sintetizado a base de 2,2-bis(hidroximetil) ácido propanoico y se compara su comportamiento de ensamblado en soluciones acuosas usando el método convencional de hidratación de films y con microfluídica, usando gotas de emulsión doble como plantillas. Nuestros resultados muestran que usando la técnica de microfluídos, es posible obtener dendrimerosomas a partir de moléculas anfífilicas dendríticas que de otra manera formarían agregados, diferentes a vesículas. También se muestra que éste método es eficiente para el encapsulado de agentes hidrofílicos e hidrofóbicos.

5.2. Materiales y Métodos.

5.2.1. Materiales.

Todos los químicos fueron comprados en Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) y usados sin purificación posterior, excepto donde se indique lo contrario. El agua ultrapura (18.2 M Ω /cm) fue obtenida de un sistema Mili-Q de Millipore (Billerica, EUA).

5.2.2. Síntesis de los dendrímeros.

La síntesis de los JDs fue realizada por un grupo de trabajo la Escuela de Ingeniería y Ciencias de Instituto Tecnológico de Monterrey (ver sección de colaboraciones al inicio de la tesis). Ésta fue adaptada a partir de reacciones reportadas en la literatura. De forma resumida, el crecimiento de los dendrímeros fue realizado mediante esterificaciones Steglich, las cuales, involucran el uso de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 4-(dimetilamino)piridina p-tolueno sulfonato (DPTS) como agentes activadores [78].

5.2.3. Formación de agregados por el método de hidratación de *films*.

El método de hidratación de films para la formación de dendrimerosomas fue adaptado del procedimiento de *Percec et. al.* [79]. En breve, 200 μL de una solución a 10 mg/mL de dendrímeros en cloroformo y 10 μL de una solución de 3 mg/mL de Rojo Nilo en el mismo solvente, fueron mezclados y depositados en una placa de teflón rugosa de 2 cm^2 . Luego de la evaporación de solventes, la placa de teflón fue colocada en un vial y secada bajo presión reducida por 2 h. La adición de 4 mL de agua ultrapura y subsecuente hidratación, a 65°C por 1 h, seguida por hidratación a 23°C por ~ 12 h, condujo a la formación de agregados. Éstos fueron caracterizados por microscopía confocal usando un microscopio Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). El Rojo Nilo fue excitado con luz de longitud de onda de 488 nm usando un laser de argón como fuente luminosa. La emisión fue colectada a una longitud de onda de entre 600-700nm.

5.2.4. Gotas de emulsión doble tipo W/O/W como plantillas para la formación de dendrimerosomas.

Fabricación del dispositivo.

Se produjeron gotas de emulsión doble tipo agua-en-aceite-en-agua (W/O/W) con fase aceite ultra fina, éstas fueron obtenidas usando dispositivos microfluídicos con el método de coflujo. Las gotas de emulsión doble así formadas fueron utilizadas como plantillas para formar dendrimerosomas.

Operación de los dispositivos microfluídicos.

El capilar interno provee la entrada para inyectar la fase acuosa interna. Esta fase fue preparada por la disolución de 8 % w/w poli(etilenglicol) (PEG, Mw = 6 kDa) y 2 % w/w poli(vinil alcohol) (PVA, Mw = 13–23 kDa, 87-89 % hidrolizado) en agua ultrapura. La fase intermedia, a base de aceite, se conformó de una solución de 12 mg/ml de

dendrimeros, disueltos en una mezcla de 44 % cloroformo, 56 % hexano (v/v). La concentración usada de dendrimeros corresponde a 7.76mM. La evaporación de esta mezcla de solventes resultó en la formación de dendrimerosomas. La fase aceite intermedia fue inyectada a través del capilar izquierdo, en la misma dirección de la fase acuosa interna. La fase acuosa externa, compuesta de una solución acuosa con 10% w/w PVA, fue inyectada a través de los intersticios entre el capilar izquierdo y el externo y ésta fluye en la misma dirección en las fases interna e intermedia, como se muestra en la figura 5.1. Las razones de flujo usadas fueron $Q_{inn} = 8.3\mu\text{L}/\text{min}$, $Q_{middle} = 8.3\mu\text{L}/\text{min}$ y $Q_{out} = 50\mu\text{L}/\text{min}$.

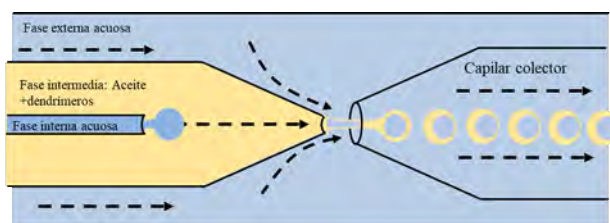


Figura 5.1: Dibujo esquemático de la producción de gotas de emulsión doble en los dispositivos microfluídicos.

Las gotas de emulsión doble fueron producidas en el régimen de goteo, el cual promueve la monodispersidad de la muestra colectada [13] y fueron usadas como plantillas para la formación de dendrimerosomas. Las gotas de emulsión doble resultante fueron colectadas en un vial de vidrio conteniendo una solución de sucrosa a concentración de 100mM en agua, manteniendo la misma osmolaridad que en los núcleos acuosos para evitar esfuerzos por presión osmótica. Una vez en el vial, los solventes contenidos en la fase intermedia a base de aceites de la emulsión doble, comienza a difundirse hacia la fase externa acuosa [14]. El vial colector fue mantenido sin cubrir por 1 h, durante el proceso de colección, para permitir la evaporación de los solventes hacia en la fase acuosa externa. Todos los experimentos fueron realizados a temperatura ambiente. La producción de las gotas de emulsión doble en los dispositivos microfluídicos fue monitoreada usando un objetivo de 10x en un microscopio invertido (Axio Observer Z1, Zeiss, Göttingen, Alemania) equipado con una cámara rápida (Phantom MiroEX2-2048MM, Vision Research, Wayne, EUA). El tiempo de colección fue de 1 h en todos los experimentos.

La membrana de los dendrimerosomas fue marcada con Rojo Nilo a una concentración de 0.03 mg/ml en la fase intermedia durante la formación de la emulsión doble. Para marcar los núcleos de los dendrimerosomas, se agregó fluoresceína sal sódica (FSS) a la solución acuosa de la fase interna, a una concentración de 1mM. Los dendrimerosomas fueron caracterizados por microscopía de fluorescencia usando un microscopio invertido

(Axio Observer Z1). La FSS fue excitada con luz de 365nm de longitud de onda y el Rojo Nilo con 505nm de longitud de onda, usando LEDs como fuente de excitación.

5.2.5. Análisis de datos y software

Los valores reportados sobre el radio de los dendrímeros fue medido a partir de las imágenes de microscopía de campo claro con el uso del software ImageJ [40] en combinación con códigos de MATLAB para su análisis posterior. Las imágenes digitales de los stacks confocales fueron procesados usando el software Fiji [89]. El balance hidrofílico-lipofílico (HLB) fue calculado con el programa MarvinSketch 17.27 (ChemAxon Ltd., Cambridge, EUA), usando el método de Griffin [90, 91].

5.3. Resultados y discusión.

5.3.1. Síntesis y caracterización de dendrímeros.

La síntesis de los dendrímeros de segunda generación usados fue derivada de 2,2-bis(hidroximetil) ácido propanoico (bis-MPA), ácido mirístico y trietilenglicol. En la estructura dendrítica, las cadenas alquiladas de ácidos mirísticos agregan suficiente hidrofobicidad al dendrímero [92], mientras los grupos hidroxilo de bis-MPA son hidrofílicos. Finalmente se utilizó trietilenglicol como enlace entre los dendrones hidrofílico e hidrofóbico.

En general, el dendrímero fue obtenido por la combinación de estrategias de síntesis convergentes y divergentes (ver figura 5.2). El dendrón isopropilidina-[G-2]-bencil éster, previamente reportado [93], fue la base para la síntesis de los bloques estructurales dendríticos hidrofílico e hidrofóbico. El dendrón hidrofílico consiste de su producto hidrogenado, isopropilidina-[G-2]-COOH, que ha sido usada con anterioridad en JDs anfílicos [79, 94, 95]. Por otro lado, el bloque estructural hidrofóbico (dendrón 1) fue formado en un rendimiento del 79% por la condensación de ácido mirístico con el producto acetónido-desprotegido de isopropilidina-[G-2]-bencil éster (figura 5.2). Tomando ventaja de las diferencias en la solubilidad del reactante y el producto, se purificó el dendrón 1 por precipitación en etanol a 4°C, sin la necesidad de usar cromatografía en columna. Luego, el dendrón 1 fue desprotegido del grupo bencilo por hidrogenación para formar el dendrón 2 en una eficiencia del 99%.

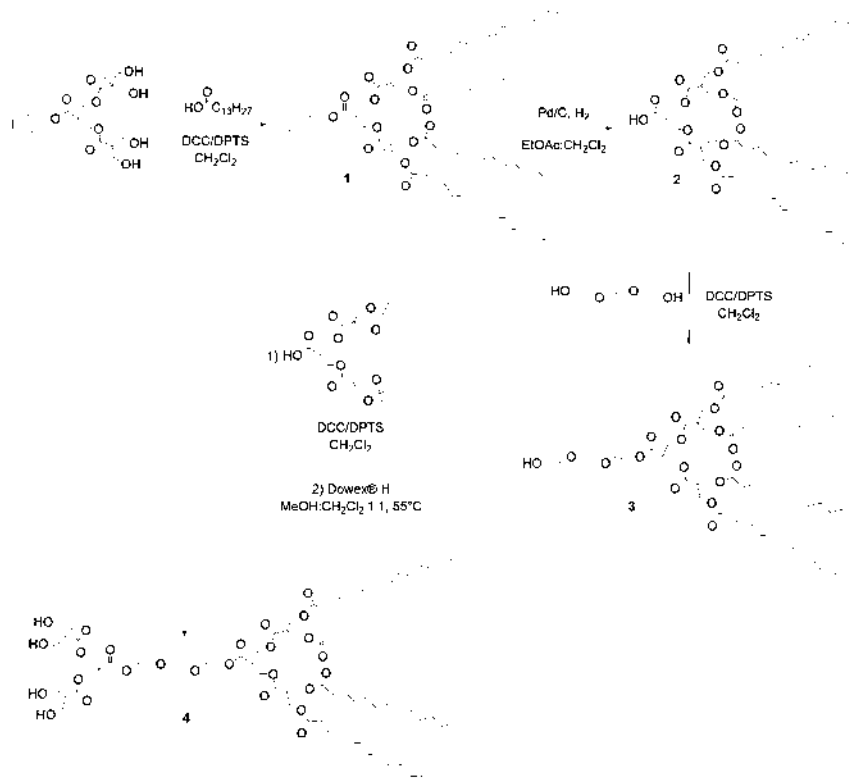


Figura 5.2: Síntesis del dendrímero Jano de segunda generación.

Para obtener el dendrímero final (compuesto 4, 5.2), el dendron 3 fue acoplado al dendron hidrofílico y purificado por cromatografía de columna a una eficiencia del 44%. La estructura del dendrímero 4 y sus precursores fue caracterizada por $^1\text{H NMR}$, cuyo espectro se muestra en la figura 5.3

5.3.2. Ensamblado de estructuras a base de dendrímeros Jano mediante hidratación de films

En este trabajo, se adoptó el método reportado por Percec *et al.* [79] de hidratación de films para obtener estructuras ensambladas en el medio acuoso con el dendrímero sintetizado. La metodología seguida produjo agregados esféricos de dendrímeros con un radio de aproximadamente $20 \mu\text{m}$, como se observa en la figura 5.4. Con este método se observó una baja eficiencia en la formación de agregados en agua, lo cual pudo deberse a una pobre hidratación del *film* de dendrímero causado por una repulsión electrostática insuficiente entre los *films* de fosfolípidos, tal como ha sido observado previamente en

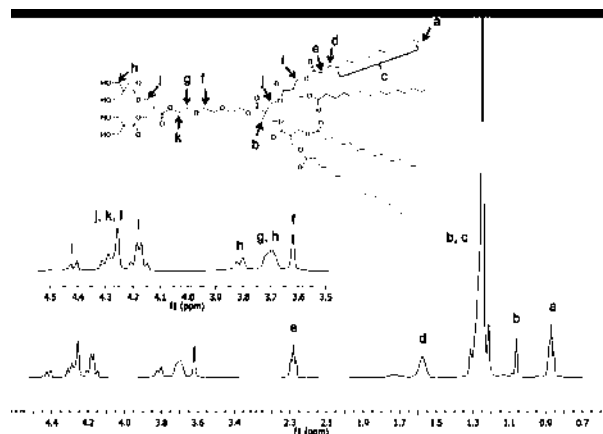


Figura 5.3: Síntesis del dendrímero Jano de segunda generación.

fosfolípidos neutros [96, 97]. Las imágenes de microscopía confocal de los agregados formados en presencia de Rojo Nilo mostraron el encapsulado de éste marcador hidrofóbico (figura 5.4). Sin embargo, se observa la coloración del Rojo Nilo dentro de la totalidad de la estructura de los agregados con una misma intensidad. Este resultado no es el esperado para el caso de vesículas unilamelares e indica que la estructura se compone principalmente por dominios hidrofóbicos, los cuales, podrían estar formados por múltiples capas de dendrímeros. Sin embargo, se consideró que las estructuras obtenidas por la simple hidratación de los dendrímeros podrían ser usadas como acarreadores de agentes hidrofóbicos, los cuales tienen una baja solubilidad en medios acuosos. El ensamblado de los dendrímeros en estructuras tipo esponja se atribuyó a su poca hidrofiliidad. Siguiendo esta idea, se calculó el balance hidrofílico-lipofílico (HLB) del dendrímero. El valor resultante fue de 7.07, sin embargo, para la formación de bicapas y vesículas es necesario que la molécula estructural utilizada tenga un HLB de 10 y moléculas con valores menores de HLB propician la formación de miscelas invertidas [15].

5.3.3. Uso de los microfluídos para la formación de dendrimerosomas.

Se generaron gotas de emulsión doble tipo W/O/W con fase de aceite ultrafina como plantillas para la formación de dendrimerosomas, usando el JD descrito arriba como bloque estructural. Para este propósito, usamos dispositivos de microfluídica hechos a base de vidrio.

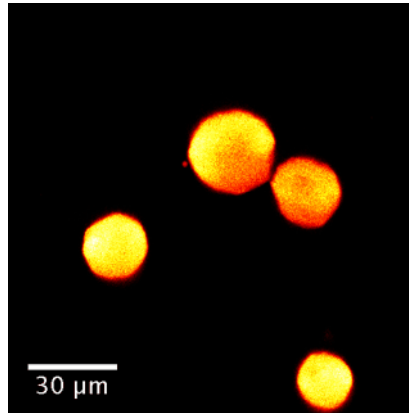


Figura 5.4: Imágen de microscopía confocal estructuras autensambladas por el dendrímero Jano utilizado, obtenidas por el método de rehidratación.

Producción continua de gotas de emulsión doble para su caracterización.

Se realizó un primer experimento para producir gotas de emulsión doble de forma continua conteniendo dendrímeros en la fase aceite. La fase aceite para este experimento estuvo constituida por una mezcla de 36 % cloroformo y 64 % hexano. La concentración de dendrímero usada en este experimento fue de 5mg/mL. Este experimento permitió hacer una estimación sobre la concentración correcta de dendrímeros necesaria para formar dendrimerosomas, basados en el grosor de la fase aceite de la emulsión doble, obtenida en base a consideraciones geométricas sobre el área que cubre cada molécula de dendrímero. La figura 5.5a muestra la producción de la emulsión doble en el dispositivo microfluídico. Dado el control que se tiene sobre las razones de flujo en el dispositivo microfluídico, las gotas resultantes de emulsión doble tuvieron una alta monodispersidad, con un radio de $30.7 \pm 3 \mu\text{m}$, como se muestra en la figura 5.5b y en el histograma de la figura 5.5c. Las gotas pequeñas con alto contraste óptico que se observan en dicha figura, son gotas de emulsión simple tipo O/W (indicadas con un óvalo blanco en el recuadro). Dado que las gotas de emulsión doble fueron obtenidas de forma continua, las gotas de emulsión simple observadas deben provenir de gotas de emulsión doble que se desestabilizaron. Por tanto, es posible usar el radio promedio R_o de éstas gotas para determinar el grosor de la fase aceite de las gotas de emulsión doble [13]: puesto que el volumen total de la microcápsula (V_T) debe ser igual a la suma del volumen de la fase acuosa (V_{aq}) más el volumen de la fase aceite (V_o) (ecuación 5.3.3), la expresión del grosor t de la membrana a base de aceite de las gotas de emulsión doble puede formularse como en la ecuación 5.3.3, donde R_T es el radio externo de la microcápsula. Es importante notar que las gotas de emulsión simple representan sólo el 14 % del total de la muestra.

$$V_T = V_{aq} + V_o \quad (5.1)$$

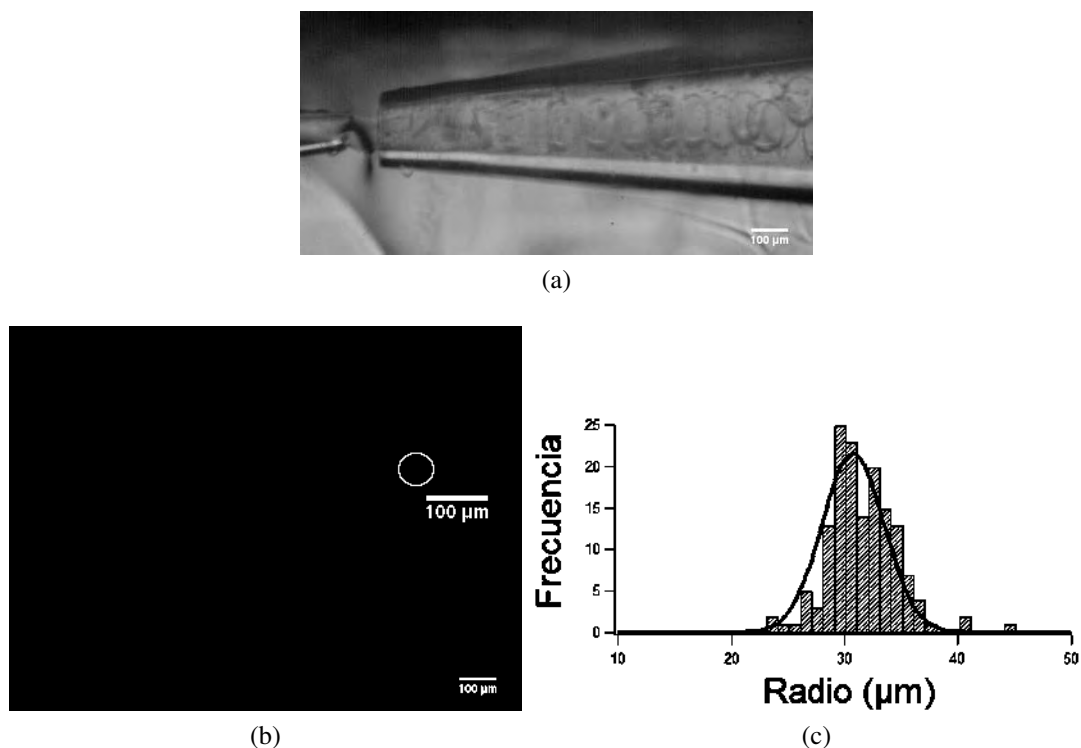


Figura 5.5: (a) Micrografía óptica mostrando la producción típica de gotas monodispersas de emulsión doble conteniendo dendrímeros en su fase aceite. (b) Población de gotas de emulsión doble luego de su producción. (c) Distribución de radios de las microcápsulas mostradas en (b). El radio promedio es de $30.7 \pm 3 \mu\text{m}$. El recuadro muestra una gota de emulsión simple, señalada por un óvalo blanco.

$$t = (R_T^3 + R_o^3)^{1/3} \quad (5.2)$$

Usando este cálculo, se encontró un grosor de la membrana de 140 nm, considerando una incertidumbre del 6%, debido al límite de resolución óptica de las imágenes de microscopía. Este valor es similar al reportado previamente en trabajos hechos con el método de microfluídica, siendo de entre 200-600 nm para gotas de emulsión doble usando el surfactante SPAN 80 como molécula estructural y hexadecano como fase aceite [13, 98]. Una vez que se conoce el área de la interfaz de debe ser cubierta por los dendrímeros, la sección de área que cubre cada dendrímero y el volumen de la fase aceite, fue posible calcular la concentración necesaria de dendrímeros para formar dendrímerosomas, encontrando el valor de 12 mg/ml. Las emulsiones dobles obtenidas en este experimento fueron estables durante 20 días a temperatura ambiente, mostrando la capa-

cidad de los dendrímeros para formar emulsiones dobles, sin embargo, no precipitaron en estructuras tipo vesícula.

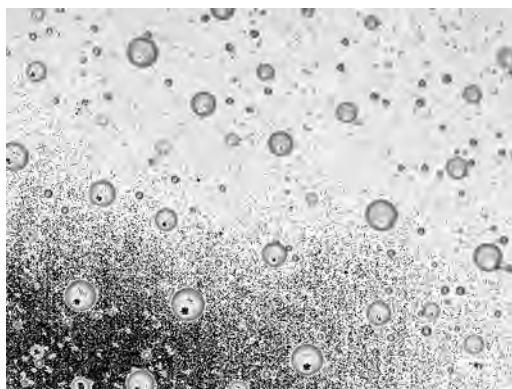
Producción discontinua de gotas de emulsión doble como plantillas para formar dendrimerosomas.

Se realizó un segundo experimento, utilizando la concentración de dendrímero calculada con el primer experimento. En este caso se usó una mezcla de 44 % cloroformo y 56 % hexano para la fase aceite de la emulsión doble. Dicha mezcla, fue la correspondiente al punto de enturbamiento¹ a temperatura ambiente para una solución conteniendo dendrímeros. Con esta mezcla de aceites y con las velocidades utilizadas, el dispositivo microfluídico generó gotas de doble emulsión de forma discontinua, alternando con periodos de tiempo en el cual se formaron gotas de emulsión simple. Es importante mencionar que en este experimento no se lograron obtener muestras monodispersas debido a que los dendrímeros, a diferencia de los lípidos, afectan la hidrodinámica durante la formación de las gotas y no fue posible tener una noción previa de las velocidades ideales para la producción. Con esta nueva elección de aceites y de concentración, fue posible la precipitación de las gotas de emulsión doble en estructuras tipo vesícula, las cuales se muestran en la figura 5.6a.

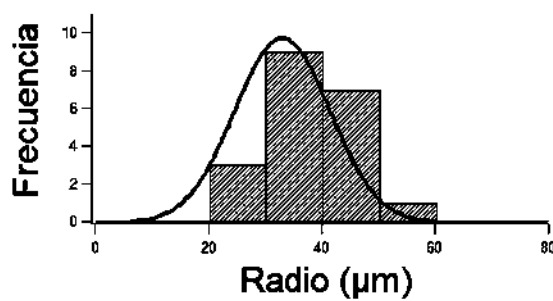
Los dendrimerosomas resultantes, fueron como ya se mencionó, polidispersos con un radio promedio de $33 \pm 11 \mu\text{m}$, como se aprecia en la figura 5.6a y en el histograma de la figura 5.6b. Se observa la formación de reservorios de dendrímero, los cuales son visibles in la figura 5.6a. Éstos reservorios de moléculas tensoactivas han sido observados previamente en vesículas lipídicas obtenidas con este método [14], en las cuales, la formación de estructuras tipo vesícula es promovida por el hecho de tener una fase aceite ultrafina en las gotas de emulsión doble. La elección de la mezcla de aceites en la fase aceite, que incluye un solvente volátil como lo es el cloroformo y un solvente que, aunque menos volátil, promueva la agregación de los dendrímeros, como lo es el hexano, conduce a la formación de bicapas mediante de una fluctuación hidrodinámica que ocurre luego de la evaporación de los solventes; proceso conocido como dewetting (eliminado de solventes, en una traducción no literal) [14, 99, 100]. Los dendrimerosomas tuvieron poca estabilidad, y se mantuvieron sin cambio sólo durante tres días, luego de los cuales, formaron agregados. La poca estabilidad de los dendrimerosomas fue atribuida a la poca hidrofiliidad de los dendrímeros. Para verificar esta hipótesis, calculamos el balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de los dendrímeros, encontrando un valor de 7.07, el cual es pequeño tomando en cuenta que una de las condiciones para la formación de bicapas y

¹Es el punto a partir del cual, los dendrímeros comienzan a agregarse. La mezcla ideal en el método de evaporación de solventes es aquella cercana al punto de enturbamiento, pero con un ligero exceso de cloroformo, que ha de evaporarse en los primeros minutos posteriores a la producción de la emulsión doble.

vesículas en soluciones acuosas, es que la molécula estructural usada tenga un valor de HLB de alrededor de 10, mientras que, moléculas más hidrofóbicas, con menos grupos polares tienden a formar fases cúbicas o hexagonales, tipo esponja [15]. Este resultado muestra la capacidad del método de microfluídica para lograr el ensamblado en estructuras tipo vesícula, utilizando moléculas que no forman este tipo de estructuras por otros métodos.



(a)



(b)

Figura 5.6: (a) Población típica de dendrimerosomas. (b) Distribución de radios de las microcápsulas mostradas en (a). El radio promedio es de $33 \pm 11 \mu\text{m}$.

5.3.4. Capacidad de encapsulado de los dendrimerosomas.

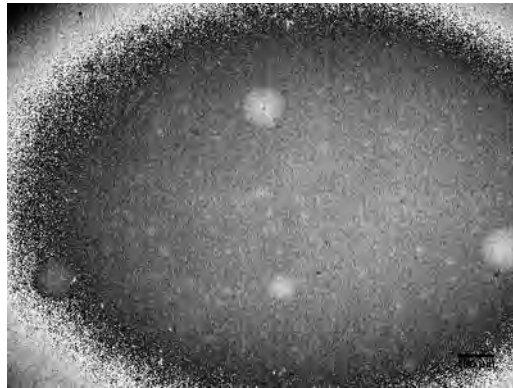
Con el fin de mostrar la capacidad de encapsular moléculas, tanto hidrofílicas como hidrofóbicas en los dendrimerosomas obtenidos con microfluídica, se prepararon emulsiones dobles con los JDs, conteniendo fluoresceína sal sódica (FSS) en sus núcleos como marcador hidrofílico y Rojo Nilo en sus membranas como marcador hidrofóbico. Los dendrimerosomas resultantes, dispersados en una solución acuosa con 100mM sucrosa, se muestran en la figura 5.7. La figura 5.7a muestra una población de dendrimerosomas

conteniendo FSS en sus núcleos. La presencia de estructuras fluorescentes suspendidas en el medio acuoso muestra la habilidad de los dendrimerosomas para encapsular el marcador hidrofílico. En la figura 5.7b se observa una muestra de dendrimerosomas cuyas membranas han sido marcadas con Rojo Nilo, mientras que en la figura 5.7c se muestra la gráfica de las intensidades de fluorescencia a lo largo de una sección transversal de uno de los dendrimerosomas mostrados en la figura 5.7b. Se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia en la orilla que delimita el cuerpo esférico, como es de esperar que suceda para un dendrimerosoma unilamelar con un marcador fluorescente en su membrana dendrítica. Estos experimentos indican que los dendrimerosomas hechos con dendrímeros Jano usando microfluídos pueden encapsular de manera eficiente agentes tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. Este resultado es una condición importante para su uso en cosméticos y en aplicaciones médicas, como acarreadores de medicamentos.

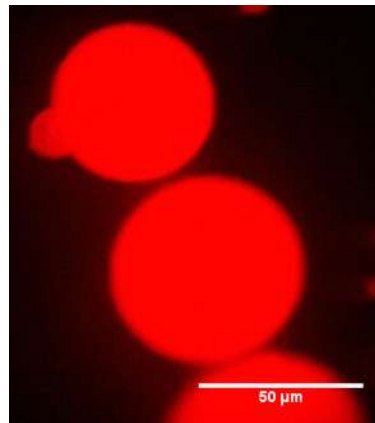
5.4. Conclusión.

Se realizó la síntesis de un dendrímero Jano anfifílico de segunda generación y se estudió su comportamiento de ensamblado en el medio acuoso usando el método tradicional de hidratación de *films*. Posteriormente se estudió la posibilidad de formar dendrimerosomas a partir del mismo dendrímero usando microfluídica. El método de hidratación de *films* fue ineficaz para producir dendrimerosomas con el dendrímero utilizado. El autoensamblado de estas moléculas produjo agregados cuya estructura podría corresponder a una fase esponja. Este comportamiento fue atribuido a la poca hidrofiliidad del dendrímero usado. Sin embargo, con el uso de las técnicas de microfluídica, se produjeron dendrimerosomas con una cantidad mínima de residuos solventes en sus membranas. La técnica de microfluídos permitió la producción de una cantidad de estructuras mayor a la obtenida con el método de hidratación de *films*, además de permitir la formación de dendrimerosomas con composición química controlada. Dado que los dendrimerosomas obtenidos fueron capaces de retener marcadores fluorescentes de los tipos hidrofílico e hidrofóbico, se consideró que este método es útil para el encapsulado de agentes activos en el envío de fármacos. Este trabajo mostró la capacidad de la técnica de microfluídica para ensamblar moléculas en una forma deseada, en este caso, en estructuras tipo vesícula, incluso cuando las moléculas usadas se autoensamblan de una forma distinta y por lo tanto, no podrían ensamblarse así por otros métodos. Además de lo anterior, los resultados reportados en este capítulo son los primeros trabajos sobre el ensamblado de dendrímeros usando microfluídica. Como perspectivas a futuro, se considera necesaria una caracterización completa de las propiedades mecánicas de las monocapas de dendrímeros en interfaces, con el fin de conocer las condiciones óptimas de concentración para preparar dendrimerosomas de forma más eficiente. También, será necesario el estudio de las propiedades mecánicas de los dendrimerosomas ya ensamblados, como su módulo de do-

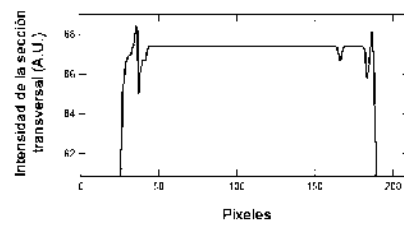
blamiento y de deformación extensional, lo cual es de gran importancia para sus diferentes aplicaciones. Finalmente, la posibilidad que se abre con el uso de la microfluídica de tener control sobre la composición química de los dendrimerosomas, da lugar a trabajos a futuro en el desarrollo de dendrimerosomas inteligentes para el envío controlado de fármacos, tomando ventaja de la gran versatilidad de moléculas de tipo dendrímérico que pueden ser sintetizadas.



(a)



(b)



(c)

Figura 5.7: Imágenes de microscopía de fluorescencia mostrando dendrimerosomas con marcadores fluorescentes encapsulados: (a) FSS en sus núcleos (b) Rojo Nilo en sus membranas, excitados con luz a longitud de onda de 365 nm y 505 nm, respectivamente. (c) Perfil de intensidad de fluorescencia de la sección transversal de un dendrimerosoma de los mostradas en (b). Se observa un incremento de la intensidad en la membrana del dendrimerosoma.

Capítulo 6

Propiedades interfaciales en el equilibrio de monocapas de puntos cuánticos de Oxido de Zinc en la interfaz aire/agua. Estudio dirigido a aplicaciones de estabilización de espumas y emulsiones.

En este capítulo se presenta un estudio de las propiedades mecánicas en el equilibrio de membranas bidimensionales formadas por puntos cuánticos de ZnO, depositados en la interfaz aire/agua. Este es un trabajo de caracterización encaminado a la fabricación de espumas y emulsiones estabilizadas por nanopartículas usando microfluídos. Las nanopartículas fueron sintetizadas por el método de solución-gel (sol-gel) y se realizó su funcionalización por el método de silanización hidrolítica. Se evaluaron sus propiedades mecánicas usando una palangana de Langmuir equipada con un rodillo de Du Noüy-Padday. Con esta técnica, se obtuvieron las isotermas, módulos de compresión y ciclos de histéresis del sistema. Nuestros resultados muestran que las partículas parcialmente hidrofóbicas forman sólidos suaves bidimensionales en la interfaz aire/agua, alcanzando valores de sus módulos de compresión adiabática correspondientes a una fase líquida condensada cuando son comprimidos sobre concentraciones superficiales del orden de 1×10^1 mg/m². Las membranas formadas por las nanopartículas presentaron dependencia con la razón de compresión a la vez que una histéresis significativa, demostrando su comportamiento complejo. Las membranas no presentaron colapso, en lugar de ello, se observó un valor semi-constante de la presión a altas concentraciones superficiales, un indicativo de la alta energía

de adsorción de las nanopartículas. Las propiedades mecánicas reportadas hacen de estas nanopartículas, candidatas adecuadas para futuras aplicaciones en la estabilización de espumas acuosas y emulsiones. Estas últimas podrían ser usadas para envío de fármacos, motivación principal de este trabajo de tesis. El trabajo presentado en este capítulo fue aceptado para su publicación como: **Luis M. Montes-de-Oca**, Ana Hernandez-Prudencio. Interfacial Mechanical Properties at Equilibrium of Functionalized ZnO Quantum Dots Monolayers at the Air/Water Interface. Revista Mexicana de Ingeniería Química (aceptado 2018).

6.1. Introducción.

Las espumas y emulsiones estabilizadas por partículas sólidas son de gran interés debido a sus aplicaciones industriales. Las partículas pueden ser usadas como estabilizadores en situaciones en las que no se puede usar sontoactivos, como en sistemas expuestos a altas temperaturas. A pesar de que las partículas sólidas han sido ampliamente estudiadas como estabilizadores en emulsiones, formando lo que se conoce como Emulsiones Pickering [101–103], su adsorción en la interfaz aire/líquido y su habilidad para estabilizar espumas acuosas sin el uso de tensoactivos ha sido estudiada sólo recientemente [103–109]. El uso de partículas cuyo tamaño es del orden de nanómetros es de especial interés [105, 106, 108, 109] dado que esta característica reduce el tiempo de difusión de las partículas y de su adsorción en la interfaz aire/agua, favoreciendo la formación de espumas [105, 110, 111]. Otra característica interesante del uso de partículas para la estabilización de espumas es que, dado que las partículas tienen energías de adsorción altas, del orden de cientos de kT [101, 104], éstas tienden a estabilizar espumas por tiempos prolongados, incluso de meses [105, 107, 112] o por tiempos mayores [113]. Se considera que la monocapa coloidal que se forma en la interfaz aire/agua de estas espumas, inhibe la coalescencia de burbujas y el efecto de engrosamiento de la fase líquida, principales mecanismos de desestabilización de espumas [113–115]. Con el fin de incrementar el conocimiento que se tiene de las propiedades de las espumas estabilizadas por partículas y progresar en sus aplicaciones tecnológicas, se hace necesario el desarrollo de nuevos materiales funcionalizados, utilizando procedimientos controlados de síntesis y funcionalización, y realizando la correspondiente caracterización de sus propiedades mecánicas en la interfaz aire/agua.

De la gran cantidad de materiales cuya superficie puede ser funcionalizada para este propósito, se eligió el Oxido de Zinc (ZnO), por ser un material no-toxico con estructura cristalina bien definida [116, 117], otra razón para ser elegido fue por sus propiedades ópticas ante la excitación con luz ultravioleta, como son, la emisión estable y la presencia de emisión visible, junto con un pico de emisión en el ultravioleta [118–121]. Todas estas características pueden conducir a nuevas aplicaciones de las espumas estabilizadas por

nanopartículas. Los puntos cuánticos de ZnO son estructuras del orden de nanómetros que toman una forma semiesférica [122]. Han sido utilizados en imagenología celular [123] y en la detección selectiva de aldehídos [124]. Las nanoestructuras de ZnO pueden sintetizarse por varios métodos, como el de solución-gel (sol-gel) [125], co-precipitación [126], mediante el uso de microemulsiones [127], por procesos metalúrgicos [128] y por síntesis hidrotermal [129]. Entre estos métodos, el de sol-gel, es de particular interés debido a su reproducibilidad, bajo costo y simplicidad [122].

En este trabajo, se sintetizaron nanopartículas de ZnO por el método de sol-gel y posteriormente, se funcionalizó sus superficie utilizando trimetoxi(octadecil)silano (ODS), para volverlos parcialmente hidrofóbicos. Sus propiedades mecánicas en la interfaz aire/agua fueron estudiadas en el equilibrio usando una balanza de Langmuir equipada con un rodillo de Du Nouüy-Padday. Con esta técnica, se obtuvieron isothermas, módulos de compresión y ciclos de histéresis; y fue discutido su comportamiento.

6.2. Materiales y Métodos.

6.2.1. Síntesis controlada de puntos cuánticos de óxido de zinc.

Las nanopartículas de ZnO fueron preparadas por el método de sol-gel utilizando como precursores acetato de Zinc (Sigma) e hidróxido de sodio NaOH (Sigma) y siguiendo un procedimiento similar al reportado por Bera *et. al.* [119]. En una síntesis típica, se disolvieron 0.002 mol de acetato de Zn en 30 ml de etanol a 70 °C y 0.005 mol de NaOH en 30 ml de etanol a una temperatura entre 50-60 °C, de forma que se obtuvo una razón de iones $[\text{OH}^-]/[\text{Zn}^{2+}]$ de 2.5. Ambas soluciones fueron disueltas con agitación vigorosa (700 rpm). Posteriormente, la temperatura de ambas soluciones fue disminuida. La solución conteniendo iones Zn^{2+} fue colocada en un baño frío, cuya temperatura se controló utilizando un recirculador (HAAKE A10, Thermo scientific). Una vez que la solución de Zn^{2+} alcanzó la temperatura deseada para la síntesis, se agregó la solución de OH^- en forma de goteo. Para controlar el goteo durante la síntesis, se llenaron dos jeringas (20 mL, Beckton-Dickinson) con la solución de OH^- y el tiempo de goteo se controló usando bombas de infusión (Kent Scientific) con razones de flujo previamente programadas. La síntesis de las nanopartículas de ZnO se realizó durante 30 minutos a temperatura de 0 °C con agitación vigorosa. En todos los casos, la temperatura se mantuvo constante durante la síntesis. Posteriormente, se agregó n-heptano para efectuar la precipitación de las nanopartículas. Se utilizó para ello una razón de volumen de heptano de 3:2 respecto al volumen de la solución resultante conteniendo ZnO. Posteriormente, la muestra fue centrifugada (a 300 rpm durante 10 min), para aumentar la sedimentación de las partículas y separar los remanentes de acetato y de iones de sodio, los cuales, al ser más ligeros no precipitan y permanecen en la suspensión. Las muestras fueron decantadas para eli-

minar dicho sobrenadante y el precipitado resultante (constituido por las nanopartículas de ZnO) fue enjuagado con en 100 ml de etanol. Las nanopartículas fueron centrifugadas nuevamente, repitiendo este proceso de lavado un total de 3 veces. Finalmente, los puntos cuánticos de ZnO ya lavados fueron secados en un horno a 40 °C durante un día y fueron almacenados hasta su uso o caracterización.

6.2.2. Preparación de los nanocompositos de ZnO@ODS.

Los nanocompositos de ZnO@ODS fueron obtenidos recubriendo los puntos cuánticos de ZnO con el silano hidrofóbico trimetoxi(octadecil)silano (ODS) mediante el procedimiento de silanización hidrolítica en etanol. Para ello, se realizaron soluciones al 2 % y 4 % v/v de ODS en una suspensión de 1mg/mL de puntos cuánticos en etanol. La mezcla fue agitada durante 1h a temperatura ambiente. Los nanocompositos resultantes fueron centrifugados y lavados tres veces con etanol. Los nanocompositos de ZnO@ODS resultantes fueron secados en un horno a 40 °C durante un día y fueron almacenados. Posteriormente, fueron redispersados en n-hexano para estudiar su comportamiento superficial en la interfaz aire/agua.

6.2.3. Caracterización de los puntos cuánticos de ZnO.

Difracción de rayos X.

Se llevaron a cabo estudios de difracción de rayos X (XRD) con el fin de investigar la estructura cristalina de los puntos cuánticos obtenidos y asegurar que no quedaran remanentes de acetato de zinc, iones de sodio o algún otro contaminante. El patrón de XRD fue colectado en modo de escaneo a pasos con un ángulo de incidencia de rayos x pequeño y con un rango de escaneo de $5^\circ < 2\theta < 80^\circ$ y un tamaño de paso de 0.02° .

Dispersión dinámica de luz.

Las mediciones de dispersión dinámica de luz (DLS) fueron realizadas en un equipo Zetasizer Nano. Las muestras fueron suspendidas en etanol y sonicadas durante 1 minuto antes de cada medición. Utilizando el Software de Tecnología de Dispersión (DTS) del equipo Zetasizer nano, se promediaron las funciones de autocorrelación provenientes de haber colectado datos durante intervalos de tiempo de 10 s de escaneo. Los cálculos para obtener el tamaño hidrodinámico de las partículas se hicieron usando un algoritmo incluido en el software DTS, que realiza un análisis cumulativo y multimodal de la distribución de tamaños. Cada muestra fue medida cinco veces y los valores reportados son el promedio de dichas mediciones.

6.2.4. Preparación y caracterización de las monocapas formadas por nanopartículas ZnO@ODS en la interfaz aire/agua.

Con el fin de ser depositados en la interfaz aire/agua, los puntos cuánticos de ZnO@ODS fueron dispersados en hexano (99.99 %, Sigma) a una concentración de 1mg/mL, mientras que los puntos cuánticos de ZnO fueron dispersados en etanol (99.5 %, Meyer). Esta diferencia surgió de la necesidad de que las partículas estuvieran en solventes donde se dispersaran bien, en el caso del ZnO@ODS, debía ser un solvente orgánico, dado su recubrimiento hidrofóbico, mientras que en el caso del ZnO, debía ser un solvente más afín a su poca hidrofobicidad. Con el fin de evitar la formación de grandes agregados de partículas, las dispersiones fueron sonicadas por 1 minuto, justo antes de cada experimento usando para ello un baño ultrasónico (Fisher Scientific). Este procedimiento también asegura que el tamaño hidrodinámico de las partículas al ser depositadas en la interfaz es el mismo que el obtenido en las mediciones de DLS. Las isothermas de compresión fueron obtenidas en una balanza de Langmuir (Nima, área total = 243 cm²) equipada con un rodillo de Du Noüy-Padday hecho de platino, con diámetro de 1.056mm, el cual, al estar acoplado a un tensiómetro, permite obtener mediciones de tensión superficial. Antes de cada experimento el rodillo de Du Noüy-Padday fue lavado cuidadosamente con cloroformo y expuesto al fuego. La balanza también fue lavada con cloroformo y etanol antes de cada experimento. La subfase utilizada en la balanza de Langmuir fue agua ultra-pura, obtenida con un instrumento Simplicity (Millipore). Antes de depositar los puntos cuánticos en la balanza, se realizaron isothermas de compresión, verificando que la presión superficial no excediera los 0.3 mN/m durante la compresión, lo cual asegura la ausencia de contaminantes o impurezas con actividad superficial. Las monocapas de partículas fueron formadas dispersando en la subfase 300 μ L de la suspensión a 1mg/mL de los puntos cuánticos en hexano (o etanol), esta dispersión se hizo utilizando una microjeringa de vidrio de 1mL (Hamilton). La compresión de las monocapas comenzó 20 minutos después de haber hecho la dispersión de las partículas en la interfaz, con el fin de asegurar la evaporación del solvente. Cada isoterma presentada es el resultado de promediar tres experimentos. Todos los experimentos fueron hechos a la temperatura de 20 ± 1 °C, la cual fue controlada con un recirculador (HAAKE A10, Thermo scientific).

Experimentos de compresión.

En esta serie de experimentos, las barreras fueron cerradas para comprimir las monocapas. Se utilizaron dos diferentes velocidades: 5 mm²/min y 50 mm²/min. Durante cada experimento de compresión continua, la velocidad de las barreras fue mantenida constante.

Ciclos de Histéresis

En los experimentos para estudiar la histéresis de las monocapas, la compresión de las mismas fue seguida por una expansión a la misma velocidad, inmediatamente después de la compresión.

6.3. Resultados y discusión.

6.3.1. Estructura cristalina y tamaño de los puntos cuánticos de ZnO.

La síntesis de los puntos cuánticos fue realizada bajo condiciones controladas por el método de sol-gel a partir de acetato de Zinc y NaOH, manteniendo la temperatura constante y controlando la razón de goteo de la solución de OH^- en la solución de Zn^{2+} durante la síntesis. La figura 6.1 muestra el espectro de XRD de una de las muestras de ZnO sintetizadas en nuestro laboratorio. Se muestra también un patrón de referencia correspondiente a ZnO en bulto (cristales macroscópicos) obtenido de la base de datos abierta RUFF (RRUFF ID: R050419). Todos los picos de XRD observados en nuestra muestra corresponden bien con el patrón de referencia de la base de datos, confirmando la formación de estructuras cristalinas de ZnO en forma hexagonal. No se observan picos de difracción de hidróxido de Zinc ni de contaminantes. El ancho de los picos de difracción observado, se interpreta como resultado de la reducción en el tamaño de los cristales [120].

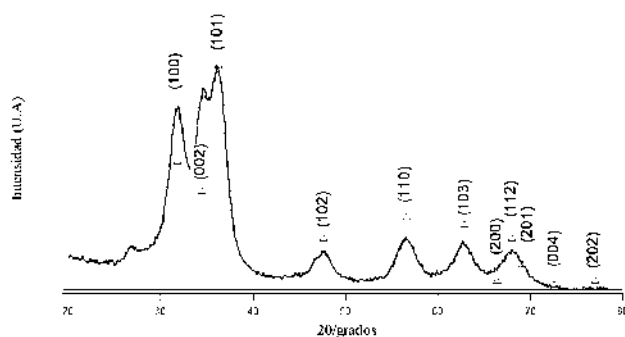


Figura 6.1: Espectro de XRD de los puntos cuánticos de ZnO en su fase hexagonal (línea continua). Se muestra la comparación con un patrón de referencia de la base de datos abierta RUFF (RRUFF ID: R050419) correspondiente a la fase hexagonal de ZnO en bulto (Triángulos).

El tamaño promedio de los puntos cuánticos fue calculado usando la fórmula de Scherrer [130]:

$$D = \frac{0.9\lambda}{B\cos\theta_B}, \quad (6.1)$$

donde D es el tamaño de partícula, λ es la longitud de onda de los rayos X incidentes y B es el ancho medido a la mitad de la altura del pico (FWHM) centrado en θ_B . Con este cálculo, se encontró un valor de 14.8 nm. Este valor encontrado corresponde a diámetro original de las partículas en su forma de polvo, sin embargo, a partir de las mediciones de dispersión dinámica de luz se encontró que las partículas en suspensión forman agregados estables con un radio hidrodinámico de 121 ± 3.1 nm.

6.3.2. Propiedades superficiales de las nanopartículas de ZnO@ODS en la interfaz aire/agua.

Se estudiaron las propiedades interfaciales de los nanocompositos de ZnO@ODS con hidrofobicidades intermedias. Para este propósito, se usó la técnica de la balanza de Langmuir para obtener isothermas de presión superficial Π vs densidad superficial Γ , como las que se muestra en la figura 6.2, obtenidas a una razón de compresión constante. Esta presión superficial, que hemos llamado Π es la diferencia entre la tensión superficial antes y después de depositar las nanopartículas, mientras que Γ es el inverso de la superficie cubierta por las partículas y viene dada como masa por unidad de área. Cada punto presentado es el resultado de haber promediado tres diferentes experimentos. Para las partículas más hidrofóbicas de las estudiadas (ZnO@4%ODS), se observa un rápido incremento en la presión superficial, incluso en densidades superficiales pequeñas ($\Gamma < 10$ mg/m²), un comportamiento característico de una fase condensada. Para concentraciones superficiales de $\Gamma > 10$ mg/m², se observa un cambio en la pendiente de la isoterma, siendo más lento el incremento de la presión superficial con respecto al aumento de concentración, pero no se observa ningún colapso abrupto de la monocapa. Para partículas con hidrofobicidad intermedia (ZnO@2%ODS), se observa un incremento lineal en la presión superficial, en el rango de densidades de $13 < \Gamma < 15$ mg/m², un comportamiento lineal característico de una fase expandida. Posterior a ello, en el punto $\Gamma = 15$ mg/m² se observa un cambio en la pendiente de la isoterma, seguido de un rápido incremento de la presión superficial en el intervalo de $15 < \Gamma < 20$ mg/m². No se observa la presencia de ninguna región de presión constante entre la región de incremento lineal y la región de rápido incremento; esto significa que no se tienen indicativos de la existencia de transiciones de primer orden entre fases. Para concentraciones superficiales de $\Gamma > 20$ mg/m² se observa una región semi constante con un valor de tensión superficial bajo (alta presión superficial). Esta monocapa tampoco presenta colapso, en lugar de ello, la presión semi constante per-

manece mientras las barreras continúan cerrándose. Este comportamiento es similar al reportado previamente en monocapas hechas a base de partículas de sílica [106, 108, 109] y es un indicativo de que las partículas tienen grandes energías de adsorción, por tanto, se requiere de mucha energía para desorberlas de la interfaz y no ocurre colapso a altas presiones. Para las partículas con menos hidrofobicidad (ZnO con 0%ODS), se observa una pequeña reducción constante en la presión superficial, alcanzando un valor máximo de $\Pi = 1.7$ mN/m. Este comportamiento es debido a que las nanopartículas de ZnO son más solubles en la subfase (agua) y pueden desorberse de la interfaz aire/agua con cantidades de energía incluso menores a kT , de forma que la sola energía de las fluctuaciones térmicas es suficiente para desorberlas.

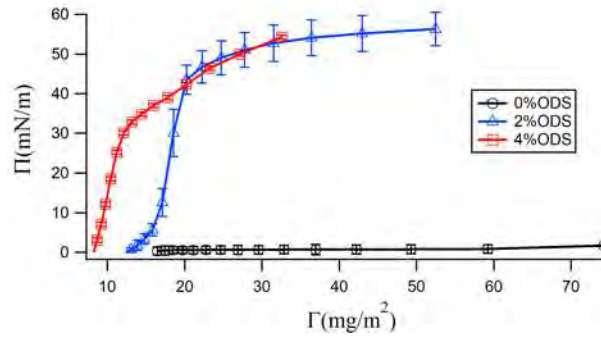


Figura 6.2: Gráfica de presión superficial (Π) contra densidad superficial (Γ) durante el primer compresión de monocapas formadas por partículas con diferentes hidrofobicidades (dadas como %ODS). La velocidad de compresión fue de $5 \text{ mm}^2/\text{min}$.

El módulo de compresión adiabática E_0 puede obtenerse a partir de la derivada numérica de las isothermas de compresión como:

$$E_0 = -A \frac{d\Pi}{dA}, \quad (6.2)$$

donde A es el área promedio disponible por partícula. En este caso, estamos tratando con la concentración superficial Γ , la cual es inversamente proporcional al área disponible A , por tanto, la expresión para obtener el módulo será [108, 109]:

$$E_0 = \Gamma \frac{d\Pi}{d\Gamma}. \quad (6.3)$$

Las curvas correspondientes a los módulos de compresión adiabática se muestran en la figura 6.3. Los módulos obtenidos muestran diferente comportamiento para las dife-

rentes hidrofobicidades estudiadas. para el ZnO puro (ZnO@0 %ODS) el módulo de compresión alcanzó un valor bajo ($E_0 < 3.5$ mN/m). La monocapa formada por las partículas de ZnO@2 %ODS presentaron un máximo en el módulo de compresión de 183.5 mN/m a la concentración superficial de $\Gamma = 18.5$ mg/m². Este valor de E_0 corresponde a una fase condensada. Para las partículas más hidrofóbicas (ZnO@4 %ODS), el módulo de compresión tuvo el valor máximo de 95.5 mN/m a una concentración superficial de $\Gamma = 10.5$ mg/m² correspondiente también a una fase líquida condensada. Se observa que la monocapa hecha con partículas más hidrofóbicas alcanza su máximo valor de E_0 en una concentración superficial menor que aquellas con hidrofobicidades intermedias, sin embargo, ésta es más compresible dado que su máximo valor es menor que el de las partículas de ZnO@2 %ODS. Esto significa que las partículas más hidrofóbicas producen una mayor reducción de la tensión superficial a menores concentraciones, pero no forman membranas muy rígidas. Posiblemente, esto se deba a un suavizado de las partículas debido a la funcionalización de su superficie con el silano.

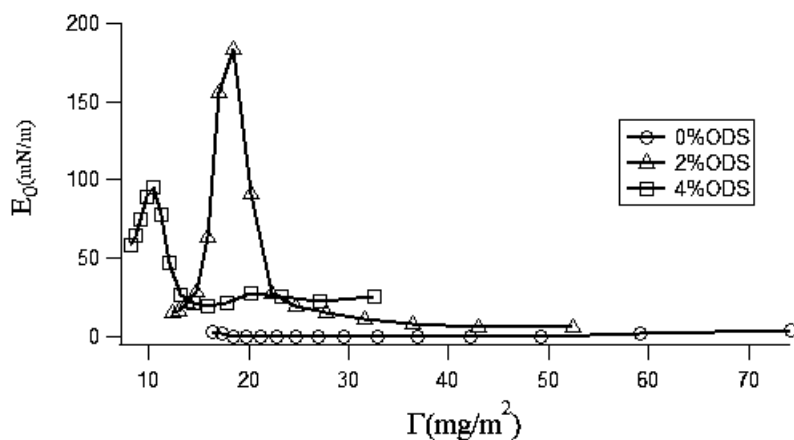


Figura 6.3: Gráfica del módulo de compresión (E_0) contra densidad superficial (Γ) en monocapas formadas por partículas con diferentes hidrofobicidades (dadas como %ODS). La velocidad de compresión fue de $5 \text{ mm}^2/\text{min}$.

Luego de estudiar los módulos de compresión, se estudió la histéresis en las monocapas formadas por nanopartículas de hidrofobicidad intermedia (ZnO@2 %ODS). Se observó una histéresis significativa entre la primer compresión de la monocapa y su expansión, así como entre su expansión y su segunda compresión. Estos ciclos de compresión y expansión se muestran en la figura 6.4. Este resultado muestra que el ordenamiento de las partículas de la monocapa durante su empaquetamiento es irreversible.

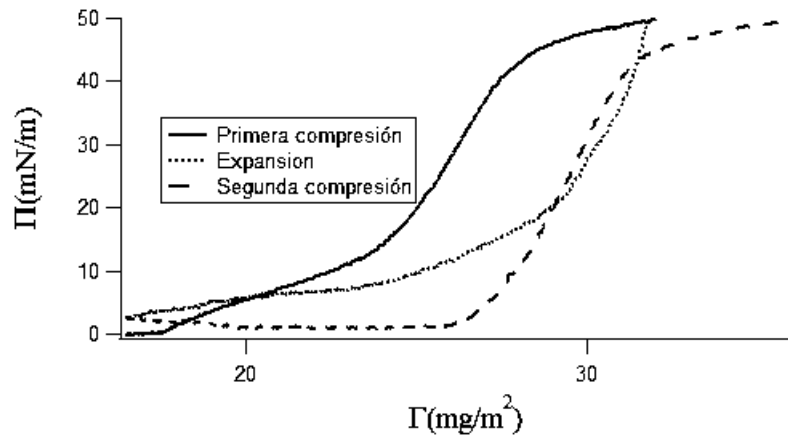


Figura 6.4: Gráfica de isothermas bidimensionales ($\Pi - \Gamma$) en monocapas formadas por partículas con hidrofobicidad intermedia (ZnO@2%ODS) obtenidas durante el primer y segundo ciclo de expansión. La razón de compresión es de 5mm²/min. El segundo ciclo comenzó inmediatamente después del primero.

La influencia de la razón de compresión en los perfiles de las isothermas fue evaluado también en las monocapas con hidrofobicidad intermedia, formadas por partículas de ZnO@2%ODS. Tal como se observa en la figura 6.5, la monocapa comienza a incrementar la presión superficial a mayores concentraciones cuando la velocidad de las barreras es incrementada. De forma similar, observando el módulo de compresión mostrado en la figura 6.6 se aprecia que cuando la velocidad de compresión es alta, la monocapa se vuelve más compresible, dado que el valor máximo de su módulo es menor que el obtenido bajo compresión lenta. Esto es un indicativo de un comportamiento de adelgazamiento extensional, es decir, deformaciones rápidas conducen a un suavizado de la monocapa. Este resultado muestra que este tipo de monocapas poseen un comportamiento complejo, dependiente del tiempo, y a partir de ello, se espera que bajo experimentos reológicos se obtenga comportamiento viscoelástico, con módulos dependientes de la frecuencia de la deformación.

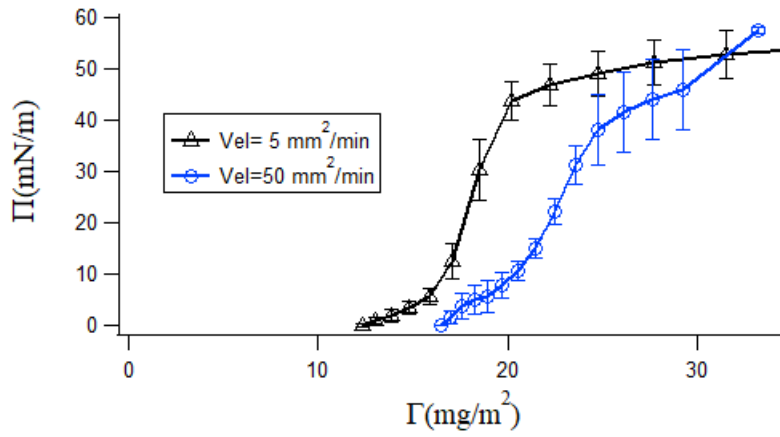


Figura 6.5: Gráfica de isothermas bidimensionales ($\Pi - \Gamma$) en monocapas formadas por partículas con hidrofobicidad intermedia (ZnO@2\%ODS) bajo diferentes velocidades de compresión continua.

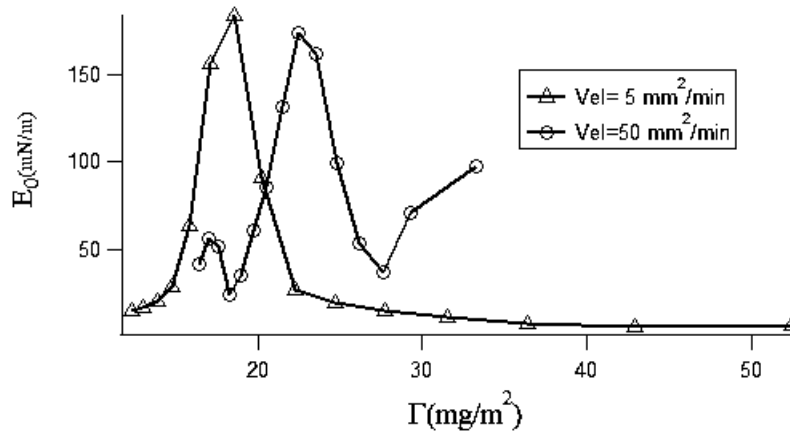


Figura 6.6: Gráfica del módulo de compresión (E_0) contra densidad superficial (Γ) en monocapas formadas por partículas con hidrofobicidad intermedia (ZnO@2\%ODS) bajo diferentes velocidades de compresión continua.

6.4. Conclusión.

En este trabajo se presentó el primer estudio de las propiedades mecánicas interfaciales en el equilibrio de monocapas bidimensionales formadas por nanopartículas funcionalizadas de ZnO en la interfaz aire/agua. Las nanopartículas parcialmente hidrofóbicas formaron sólidos suaves al ser comprimidas en concentraciones mayores al orden de $1 \times 10^1 \text{ mg/m}^2$, alcanzando valores de sus módulos de compresión isotérmica correspondientes a una fase condensada. Las monocapas no presentaron colapso, en lugar de ello, se mantuvo un valor de presión semi constante a altas presiones superficiales, mientras las barreras continuaban cerrándose. Esto es un indicativo de que las nanopartículas poseen altas energías de adsorción. No se observó evidencia de transiciones de primer orden entre las fases expandida y condensada. Las monocapas de nanopartículas presentaron una fuerte dependencia con la razón de compresión, un indicativo de que sus parámetros viscoelásticos podrían ser dependientes del tiempo bajo experimentos de reología dinámica. Estos resultados, junto con la presencia significativa de histéresis en los ciclos de compresión-expansión, evidencian el complejo comportamiento mecánico de estas monocapas. Las propiedades mecánicas observadas en las monocapas de nanopartículas de ZnO funcionalizadas hacen de ellas candidatas apropiadas para ser utilizadas como estabilizadoras de espumas y emulsiones, en concreto, por su alta energía de adsorción y su capacidad para reducir la tensión superficial usando concentraciones superficiales pequeñas, y por que permanecen como un material suave, compresible, capaz de disipar los flujos superficiales que tienden a desestabilizar las estructuras coloidales.

Como perspectivas a futuro en este trabajo se propone:

- Estudiar la respuesta mecánica de las monocapas ante deformaciones de diferente frecuencia y amplitud para conocer sus parámetros viscoelásticos, utilizando tanto deformaciones extensionales como de cizallamiento.
- Obtener imágenes de Microscopía de Ángulo de Breuster (BAM) para observar la posible formación de dominios en las fases expandidas de las monocapas o bien la posible formación de dobleces (ripples) en altas concentraciones superficiales.
- Fabricar espumas estabilizadas por nanopartículas funcionalizadas de ZnO inyectando aire a razones de flujo controladas o bien, utilizando dispositivos microfluídicos para poder obtener información de la correlación entre la estabilidad y los tamaños de las burbujas y concentración superficial.

Capítulo 7

Conclusiones

En la presente tesis doctoral, se realizó el encapsulado de diferentes agentes tanto hidrofílicos como hidrofóbicos en estructuras de diferente tipo, a saber, en vesículas lipídicas, en dendrimerosomas y en microcápsulas poliméricas, todas ellas fueron ensambladas a partir de emulsiones dobles formadas en dispositivos microfluídicos. Los dispositivos microfluídicos utilizados fueron fabricados a partir de capilares de vidrio estirado. Entre los agentes encapsulados figuran marcadores fluorescentes, metabolitos extracelulares de probióticos y nanopartículas paramagnéticas en suspensión.

El método de fabricación de dispositivos microfluídicos elegido para esta tesis resultó muy versátil, al ser modular, resistente a solventes orgánicos y fácil de funcionalizar, a la vez que es un método de bajo costo, puesto que se necesita menos equipo de laboratorio que con los métodos de litografía. Como ya es sabido, este método es de gran utilidad para la formación de emulsiones dobles gracias que posee una configuración axial-simétrica, difícil de obtener con métodos de litografía.

La gama de sistemas estudiados muestra la versatilidad de la técnica de microfluídica para ensamblar estructuras de diferente composición molecular así como para el encapsulado eficiente de moléculas tanto dentro de las microcápsulas como incorporadas en su membrana, lo cual la hace una técnica viable para su uso en el envío de fármacos y nutrientes a zonas específicas del organismo.

En cada uno de los trabajos realizados, se estudiaron fenómenos físicos distintos, dependiendo de la característica más interesante e importante del sistema. Así, el capítulo de encapsulado en vesículas lipídicas incluye un estudio sobre la búsqueda de la formación de emulsiones dobles de menor tamaño, con el fin de obtener vesículas de un tamaño promedio menor, sin el uso de surfactantes adicionales, un trabajo enfocado en la observa-

ción de la dinámica de los flujos en microcanales. En el capítulo dedicado al estudio de los probióticos confinados en microcápsulas poliméricas, se estudió, mediante un modelo matemático, el tipo de difusión seguida por los metabolitos al disolverse las microcápsulas, un mecanismo derivado de la diferencia de concentraciones entre el interior y el exterior de las microcápsulas y la viscoelasticidad de las mismas. Por otra parte, el capítulo de la formación de dendrimerosomas hace énfasis en las propiedades de las moléculas utilizadas, y cómo dichas propiedades permiten ciertos tipos de ensamblado. El haber estudiado el fenómeno de encapsulado desde diferentes enfoques fue de gran ayuda en la formación académica del programa de doctorado, puesto que permitió tener un panorama amplio de los distintos procesos físicos involucrados en la formación de emulsiones y microcápsulas usando microfluidos, así como de algunas de sus aplicaciones. Además, cada enfoque da lugar a trabajos a que podrían desarrollarse a futuro, tanto en aplicaciones como en la caracterización física de los sistemas, como es, el comportamiento de los fluidos, respecto a las razones de flujo utilizadas y los números adimensionales de importancia en microcanales: el número de Weber y el número capilar; así como la caracterización de las propiedades viscoelásticas de las membranas, ya sean poliméricas, dendríméricas o lipídicas y su relación con las propiedades de las microcápsulas formadas.

Otro factor importante a mencionar es que mucho del trabajo presentado en esta tesis tuvo un carácter multidisciplinario, ya que los mejores resultados que se obtuvieron fueron consecuencia del trabajo en colaboración con estudiantes y profesores de áreas como biología, ingeniería química y químico fármaco biología. Estas colaboraciones se hicieron tanto con investigadores y estudiantes de la misma Universidad Michoacana, como con algunos pertenecientes a otras instituciones del país, como el Instituto de Estudios Superiores de Monterrey, la Universidad Autónoma de San Luis Potosí y la Universidad Autónoma de Nuevo León. Este hecho, además de demostrar el carácter multidisciplinario del estudio del flujo en microcanales y sus aplicaciones, fue también de gran ayuda en la formación académica, pues fue un entrenamiento necesario para continuar trabajando en colaboración con académicos con una formación diferente.

Bibliografía

- [1] J. Renukuntla, A. D. Vadlapudi, A. Patel, S. H. Boddu, and A. K. Mitra, “Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 447, no. 1-2, pp. 75–93, 2013.
- [2] K. Thanki, R. P. Gangwal, A. T. Sangamwar, and S. Jain, “Oral delivery of anticancer drugs: Challenges and opportunities,” *Journal of Controlled Release*, vol. 170, no. 1, pp. 15–40, 2013.
- [3] P. Lam and R. Gambari, “Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries,” *Journal of Controlled Release*, vol. 178, no. Supplement C, pp. 25 – 45, 2014.
- [4] M. I. J. and B. J. J. R., *Dendrimer-Based Nanomedicine*. Pan Stanford Publishing, 2008.
- [5] M. N. Singh, K. S. Y. Hemant, M. Ram, and H. G. Shivakumar, “Microencapsulation : A promising technique for controlled drug delivery,” *Research in pharmaceutical sciences*, vol. 5, no. 2, pp. 65–77, 2010.
- [6] M. Iqbal, N. Zafar, H. Fessi, and A. Elaissari, “Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 496, no. 2, pp. 173–190, 2015.
- [7] A. S. Utada, L.-Y. Chu, A. Fernandez-Nieves, D. R. Link, C. Holtze, and D. A. Weitz, “Dripping, jetting, drops, and wetting: The magic of microfluidics,” *MRS Bulletin*, vol. 32, no. 9, p. 702–708, 2007.
- [8] A. Utada, E. Lorenceau, D. Link, P. Kaplan, H. Stone, and D. Weitz, “Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device,” *Science*, vol. 308, no. 5721, pp. 537–541, 2005.
- [9] A. S. Utada, A. Fernandez-Nieves, H. A. Stone, and D. A. Weitz, “Dripping to jetting transitions in coflowing liquid streams,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 99, p. 094502, Aug 2007.

- [10] C.-X. Zhao, “Multiphase flow microfluidics for the production of single or multiple emulsions for drug delivery,” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 65, no. 11, pp. 1420–1446, 2013.
- [11] P. Tabeling and S. Chen, *Introduction to Microfluidics*. OUP Oxford, 2005.
- [12] C. Cramer, P. Fischer, and E. J. Windhab, “Drop formation in a co-flowing ambient fluid,” *Chemical Engineering Science*, vol. 59, no. 15, pp. 3045 – 3058, 2004.
- [13] S.-H. Kim, J. W. Kim, J.-C. Cho, and D. A. Weitz, “Double-emulsion drops with ultra-thin shells for capsule templates,” *Lab Chip*, vol. 11, pp. 3162–3166, 2011.
- [14] L. R. Arriaga, S. S. Datta, S.-H. Kim, E. Amstad, T. E. Kodger, F. Monroy, and D. A. Weitz, “Ultrathin shell double emulsion templated giant unilamellar lipid vesicles with controlled microdomain formation,” *Small*, vol. 10, no. 5, pp. 950–956, 2014.
- [15] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and surface forces*. Oxford, U.K.: Academic Press (Elsevier), 3a. ed. ed., 2011.
- [16] D. K. Martin, *Nanobiotechnology of biomimetic membranes*. New York: Springer, 2007.
- [17] A. w. Adamson and A. P. Gast, *Physical chemistry of surfaces*. Wiley, 1997.
- [18] K. Huang, *Statistical mechanics*. Wiley, 1987.
- [19] E. Fermi, *Thermodynamics*. New York: Dover Publications, Inc., 1937.
- [20] H. Bruus, *Theoretical Microfluidics*. Department of Micro and Nanotechnology, Technical University of Denmark, 2006.
- [21] “Other titles in the series,” in *Fluid Mechanics (Second Edition)* (L. L.D. and L. E.M., eds.), pp. ifc2 –, Pergamon, second edition ed., 1987.
- [22] L. L. Schramm, *Emulsions, Foams and Suspensions*. Wiley, 2006.
- [23] L. E. Reichl, *Statistical physics*. Wiley, 1998.
- [24] D. Zang, D. Langevin, B. P. Binks, and B. Wei, “Shearing particle monolayers: Strain-rate frequency superposition,” *Phys. Rev. E*, vol. 81, p. 011604, Jan 2010.
- [25] S. Pautot, B. J. Frisken, and D. A. Weitz, “Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion,” *Langmuir*, vol. 19, no. 7, pp. 2870–2879, 2003.

- [26] X. Huang, D. Appelhans, P. Formanek, F. Simon, and B. Voit, “Tailored synthesis of intelligent polymer nanocapsules: An investigation of controlled permeability and pH-dependent degradability,” *ACS Nano*, vol. 6, no. 11, pp. 9718–9726, 2012. PMID: 23102500.
- [27] A. San Miguel, J. Scrimgeour, J. E. Curtis, and S. H. Behrens, “Smart colloidosomes with a dissolution trigger,” *Soft Matter*, vol. 6, pp. 3163–3166, 2010.
- [28] V. P. Torchilin, “Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers,” *Nat Rev Drug Discov*, vol. 4, pp. 145–160, 2005.
- [29] Soraya and A. Bertin, “Vesicles from amphiphilic dumbbells and janus dendrimers: Bioinspired self-assembled structures for biomedical applications,” *Polymers*, vol. 9, no. 7, 2017.
- [30] G. K. Batchelor, *An introduction to fluid dynamics*. Cambridge University Press, 1967.
- [31] P. B. Umbanhowar, V. Prasad, and D. A. Weitz, “Monodisperse emulsion generation via drop break off in a coflowing stream,” *Langmuir*, vol. 16, no. 2, pp. 347–351, 2000.
- [32] C. N. Baroud, F. Gallaire, and R. Danga, “Dynamics of microfluidic droplets,” *Lab Chip*, vol. 10, pp. 2032–2045, 2010.
- [33] D. F. Zhang and H. A. Stone, “Drop formation in viscous flows at a vertical capillary tube,” *Phys. Fluids*, vol. 9, no. 8, p. 2234, 1997.
- [34] A. L. Lehninger, *Bioquímica*. Barcelona: Ediciones Omega, 2a edición ed., 1982.
- [35] O. G. Mouritsen, *Life as a matter of fat*. Berlin: Springer, 2005.
- [36] P. J. Patty and B. J. Frisken, “The pressure-dependence of the size of extruded vesicles,” *Biophysical journal*, vol. 85, no. 2, pp. 996–1004, 2003.
- [37] M. I. Angelova and D. S. Dimitrov, “Liposome electroformation,” *Faraday discussions of the Chemical Society*, vol. 81, pp. 303–311, 1986.
- [38] D. J. Estes and M. Mayer, “Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1712, no. 2, pp. 152–160, 2005.
- [39] Y. Huang, S.-H. Kim, and L. R. Arriaga, “Emulsion templated vesicles with symmetric or asymmetric membranes,” *Advances in colloid and interface science*, vol. 247, pp. 413–425, 2017.

- [40] M. D. Abràmoff, P. J. Magalhães, and S. J. Ram, “Image processing with imagej,” *Biophotonics international*, vol. 11, no. 7, pp. 36–42, 2004.
- [41] P. Garstecki, I. Gitlin, W. Diluzio, G. M. Whitesides, E. Kumacheva, and H. A. Stone, “Formation of monodisperse bubbles in a microfluidic flow-focusing device,” *Applied Physics Letters*, vol. 85, no. 13, pp. 2649–2651, 2004.
- [42] P. Garstecki, M. J. Fuerstman, H. A. Stone, and G. M. Whitesides, “Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction—scaling and mechanism of break-up,” *Lab on a Chip*, vol. 6, no. 3, p. 437, 2006.
- [43] S. L. Anna, “Droplets and bubbles in microfluidic devices,” *Annual Review of Fluid Mechanics*, vol. 48, pp. 285–309, 2016.
- [44] R. M. Erb, D. Obrist, P. W. Chen, J. Studer, and A. R. Studart, “Predicting sizes of droplets made by microfluidic flow-induced dripping,” *Soft Matter*, vol. 7, no. 19, pp. 8757–8761, 2011.
- [45] S. A. Nabavi, G. T. Vladisavljevic, S. Gu, and E. E. Ekanem, “Double emulsion production in glass capillary micro fluidic device : Parametric investigation of droplet generation behaviour,” *Chemical Engineering Science*, vol. 130, pp. 183–196, 2015.
- [46] R. Michel, T. Plostica, L. Abezgauz, D. Danino, and G. Michael *Soft Matter*.
- [47] L. A. Tai, P. J. Tsai, Y. C. Wang, Y. J. Wang, L. W. Lo, and C. S. Yang, “Thermosensitive liposomes entrapping iron oxide nanoparticles for controllable drug release,” *Nanotechnology*, vol. 20, no. 13, 2009.
- [48] FAO/WHO, *Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. rome, ital ed., 2001.
- [49] M. Rescigno, “The impact of probiotics and prebiotics on the immune system,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 12, no. 10, pp. 728–734, 2012.
- [50] M. E. Sanders, “Summary of conclusions of Lactic Cultures,” *Journal of dairy science*, vol. 76, pp. 1819–1828, 1993.
- [51] Y.-k. Lee and S. Salminen, “The coming of age of probiotics,” *Trends in food science and technology*, vol. 6, no. July, pp. 241–245, 1995.
- [52] M. J. Martín, F. Lara-Villoslada, M. A. Ruiz, and M. E. Morales, “Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects,” *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 27, pp. 15–25, 2015.

- [53] M. G. Gareau, P. M. Sherman, and W. A. Walker, “probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease,” *Nature Publishing Group*, vol. 7, no. 9, pp. 503–514, 2010.
- [54] P. Ambalam, M. Raman, R. K. Purama, and M. Doble, “Probiotics, Prebiotics and Colorectal Cancer Prevention,” *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, vol. 30, pp. 119–131, 2016.
- [55] S. Roy and G. Trinchieri, “Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy,” *Nature reviews Cancer*, vol. 17, pp. 271–285, 2017.
- [56] C. J. H. V. D. Velde, P. G. Boelens, J. M. Borrás, J.-w. Coebergh, A. Cervantes, L. Blomqvist, R. G. H. Beets-tan, C. B. M. V. D. Broek, G. Brown, E. V. Cutsem, E. Espin, K. Haustermans, B. Glimelius, L. H. Iversen, J. H. V. Krieken, C. A. M. Marijnen, G. Henning, J. Gore-booth, E. Meldolesi, P. Mroczkowski, I. Nagtegaal, P. Quirke, C. Ro, P. Naredi, H. Ortiz, L. Pa, A. Roth, H. Rutten, H. J. Schmoll, J. J. Smith, P. J. Tanis, C. Taylor, A. Wibe, T. Wiggers, M. A. Gambacorta, C. Aristei, and V. Valentini, “EURECCA colorectal : Multidisciplinary management : European consensus conference colon and rectum,” *European Journal of Cancer*, vol. 50, no. 1, pp. 1.e1–1.e34, 2013.
- [57] K. Kailasapathy and J. Chin, “Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to lactobacillus acidophilus and bifidobacterium spp.,” *Immunology and cell Biology*, vol. 78, no. 1, pp. 80–88, 2000.
- [58] L. V. Thomas, T. Ockhuizen, and K. Suzuki, “Exploring the influence of the gut microbiota and probiotics on health: a symposium report,” *British Journal of Nutrition*, vol. 112, no. S1, pp. S1–S18, 2014.
- [59] J. Hamilton-Miller, S. Shah, and J. Winkler, “Public health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms,” *Public health nutrition*, vol. 2, no. 2, pp. 223–229, 1999.
- [60] A. Homayouni, A. Azizi, M. Ehsani, M. Yarmand, and S. Razavi, “Effect of micro-encapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream,” *Food chemistry*, vol. 111, no. 1, pp. 50–55, 2008.
- [61] T. Jankowski, M. Zielinska, and A. Wysakowska, “Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules,” *Biotechnology Techniques*, vol. 11, no. 1, pp. 31–34, 1997.
- [62] A. C. Anselmo, K. J. McHugh, J. Webster, R. Langer, and A. Jaklenec, “Layer-by-layer encapsulation of probiotics for delivery to the microbiome,” *Advanced Materials*, vol. 28, no. 43, pp. 9486–9490, 2016.

- [63] A. Abbaspourrad, S. S. Datta, and D. A. Weitz, “Controlling release from pH-responsive microcapsules,” *Langmuir*, vol. 29, no. 41, pp. 12697–12702, 2013.
- [64] S. Bazban-Shotorbani, M. M. Hasani-Sadrabadi, A. Karkhaneh, V. Serpooshan, K. I. Jacob, A. Moshaverinia, and M. Mahmoudi, “Revisiting structure-property relationship of pH-responsive polymers for drug delivery applications,” *Journal of Controlled Release*, 2017.
- [65] S. Cohen, T. Yoshioka, M. Lucarelli, L. H. Hwang, and R. Langer, “Controlled delivery systems for proteins based on poly (lactic/glycolic acid) microspheres,” *Pharmaceutical research*, vol. 8, no. 6, pp. 713–720, 1991.
- [66] J. Pécrciaux, H.-G. Döbereiner, J. Prost, J.-F. Joanny, and P. Bassereau, “Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles,” *The European Physical Journal E: Soft Matter and Biological Physics*, vol. 13, no. 3, pp. 277–290, 2004.
- [67] G. D. Christian, *Analytical chemistry*. Jhon Wiley & Sons, Inc., 2nd ed., 1990.
- [68] N. A. Peppas and J. J. Sahlin, “A simple equation for the description of solute release. iii. coupling of diffusion and relaxation,” *International journal of pharmaceuticals*, vol. 57, no. 2, pp. 169–172, 1989.
- [69] G. W. Sinclair and N. A. Peppas, “Analysis of non-fickian transport in polymers using simplified exponential expressions,” *Journal of Membrane Science*, vol. 17, no. 3, pp. 329–331, 1984.
- [70] J. Crank, *The Mathematics of Diffusion*. Bristol, England: Press, Oxford University, 1975.
- [71] J. Siepmann and N. Peppas, “Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (hpmc),” *Advanced drug delivery reviews*, vol. 64, pp. 163–174, 2012.
- [72] P. L. Ritger and N. A. Peppas, “A simple equation for description of solute release i. fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs,” *Journal of controlled release*, vol. 5, no. 1, pp. 23–36, 1987.
- [73] S. Feng, L. Nie, P. Zou, and J. Suo, “Effects of drug and polymer molecular weight on drug release from plga-mpeg microspheres,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 132, no. 6, 2015.
- [74] M. Sandor, D. Ensore, P. Weston, and E. Mathiowitz, “Effect of protein molecular weight on release from micron-sized plga microspheres,” *Journal of controlled release*, vol. 76, no. 3, pp. 297–311, 2001.

- [75] T. He, H. Roelofsen, G. Alvarez-Llamas, M. de Vries, K. Venema, G. W. Welling, and R. J. Vonk, “Differential analysis of protein expression of bifidobacterium grown on different carbohydrates,” *Journal of microbiological methods*, vol. 69, no. 2, pp. 364–370, 2007.
- [76] T. E. Askelson, A. Campasino, J. T. Lee, and T. Duong, “Evaluation of phytate-degrading lactobacillus culture administration to broiler chickens,” *Applied and environmental microbiology*, vol. 80, no. 3, pp. 943–950, 2014.
- [77] R. S. Kalhapure, M. K. Kathiravan, K. G. Akamanchi, and T. Govender, “Dendrimers—from organic synthesis to pharmaceutical applications: an update,” *Pharmaceutical development and technology*, vol. 20, no. 1, pp. 22–40, 2015.
- [78] E. Fedeli, A. Lancelot, J. L. Serrano, P. Calvo, and T. Sierra, “Self-assembling amphiphilic janus dendrimers: mesomorphic properties and aggregation in water,” *New Journal of Chemistry*, vol. 39, no. 3, pp. 1960–1967, 2015.
- [79] V. Percec, D. A. Wilson, P. Leowanawat, C. J. Wilson, A. D. Hughes, M. S. Kaucher, D. A. Hammer, D. H. Levine, A. J. Kim, F. S. Bates, *et al.*, “Self-assembly of janus dendrimers into uniform dendrimersomes and other complex architectures,” *Science*, vol. 328, no. 5981, pp. 1009–1014, 2010.
- [80] D. R. Sikwal, R. S. Kalhapure, and T. Govender, “An emerging class of amphiphilic dendrimers for pharmaceutical and biomedical applications: Janus amphiphilic dendrimers,” *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, pp. 113–134, 2017.
- [81] M. Filippi, J. Martinelli, G. Mulas, M. Ferraretto, E. Teirlinck, M. Botta, L. Tei, and E. Terreno, “Dendrimersomes: a new vesicular nano-platform for mr-molecular imaging applications,” *Chemical Communications*, vol. 50, no. 26, pp. 3453–3456, 2014.
- [82] M. Filippi, V. Catanzaro, D. Patrucco, M. Botta, L. Tei, and E. Terreno, “First in vivo mri study on theranostic dendrimersomes,” *Journal of Controlled Release*, vol. 248, pp. 45–52, 2017.
- [83] M. Filippi, D. Patrucco, J. Martinelli, M. Botta, P. Castro-Hartmann, L. Tei, and E. Terreno, “Novel stable dendrimersome formulation for safe bioimaging applications,” *Nanoscale*, vol. 7, no. 30, pp. 12943–12954, 2015.
- [84] A. Nazemi and E. R. Gillies, “Dendrimersomes with photodegradable membranes for triggered release of hydrophilic and hydrophobic cargo,” *Chemical Communications*, vol. 50, no. 76, pp. 11122–11125, 2014.

- [85] M. Peterca, V. Percec, P. Leowanawat, and A. Bertin, "Predicting the size and properties of dendrimersomes from the lamellar structure of their amphiphilic janus dendrimers," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, no. 50, pp. 20507–20520, 2011.
- [86] Q. Xiao, J. D. Rubien, Z. Wang, E. H. Reed, D. A. Hammer, D. Sahoo, P. A. Heiney, S. S. Yadavalli, M. Goulian, S. E. Wilner, *et al.*, "Self-sorting and coassembly of fluorinated, hydrogenated, and hybrid janus dendrimers into dendrimersomes," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 138, no. 38, pp. 12655–12663, 2016.
- [87] S. Zhang, H.-J. Sun, A. D. Hughes, R.-O. Moussodia, A. Bertin, Y. Chen, D. J. Pochan, P. A. Heiney, M. L. Klein, and V. Percec, "Self-assembly of amphiphilic janus dendrimers into uniform onion-like dendrimersomes with predictable size and number of bilayers," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, no. 25, pp. 9058–9063, 2014.
- [88] T. S. Kaminski, O. Scheler, and P. Garstecki, "Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges," *Lab on a Chip*, vol. 16, no. 12, pp. 2168–2187, 2016.
- [89] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, and A. Cardona, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis," *Nat Meth*, vol. 9, pp. 676–682, jul 2012.
- [90] W. C. Griffin, "Calculation of hlb values of non-ionic surfactants," *Journal of the society of cosmetic chemists*, vol. 5, no. 4, pp. 249–256, 1954.
- [91]
- [92] N. R. Luman and M. W. Grinstaff, "Synthesis and aqueous aggregation properties of amphiphilic surface-block dendrimers," *Organic letters*, vol. 7, pp. 4863–6, oct 2005.
- [93] R. Appel, J. Fuchs, S. M. Tyrrell, P. A. Korevaar, M. C. A. Stuart, I. K. Voets, M. Schönhoff, and P. Besenius, "Steric Constraints Induced Frustrated Growth of Supramolecular Nanorods in Water," *Chemistry - A European Journal*, vol. 21, no. 52, pp. 19257–19264, 2015.
- [94] J. Ropponen, S. Nummelin, and K. Rissanen, "Bisfunctionalized Janus molecules," *Organic letters*, vol. 6, pp. 2495–7, jul 2004.

- [95] S. Nummelin, M. Selin, S. Legrand, J. Ropponen, J. Seitsonen, A. Nykänen, J. Koivisto, J. Hirvonen, M. A. Kostainen, and L. M. Bimbo, “Modular synthesis of self-assembling Janus-dendrimers and facile preparation of drug-loaded dendrimersomes,” *Nanoscale*, vol. 9, no. 21, pp. 7189–7198, 2017.
- [96] K. Tsumoto, H. Matsuo, M. Tomita, and T. Yoshimura, “Efficient formation of giant liposomes through the gentle hydration of phosphatidylcholine films doped with sugar,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 68, no. 1, pp. 98–105, 2009.
- [97] N. Rodriguez, F. Pincet, and S. Cribier, “Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: a comparison by fluorescence microscopy,” *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 42, no. 2, pp. 125–130, 2005.
- [98] C.-X. Zhao, D. Chen, Y. Hui, D. A. Weitz, and A. P. Middelberg, “Controlled generation of ultrathin-shell double emulsions and studies on their stability,” *ChemPhys-Chem*, vol. 18, no. 10, pp. 1393–1399, 2017.
- [99] D. F. do Nascimento, L. R. Arriaga, M. Eggersdorfer, R. Ziblat, M. d. F. V. Marques, F. Reynaud, S. A. Koehler, and D. A. Weitz, “Microfluidic fabrication of pluronic vesicles with controlled permeability,” *Langmuir*, vol. 32, no. 21, pp. 5350–5355, 2016.
- [100] R. C. Hayward, A. S. Utada, N. Dan, and D. A. Weitz, “Dewetting Instability during the Formation of Polymersomes from Block-Copolymer-Stabilized Double Emulsions,” *Langmuir*, vol. 22, no. 10, 2006.
- [101] B. B. P. Aveyard Robert and C. J. H., “Emulsions stabilised solely by colloidal particles,” *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 100-102, pp. 503–5461, 2013.
- [102] S. U. Pickering, “Emulsions,” *Journal of the chemical society*, vol. 91, pp. 2001–2021, 1907.
- [103] B. P. Binks, “Particles as surfactants - Similarities and differences,” *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, vol. 7, no. 1-2, pp. 21–41, 2002.
- [104] Z. Du, M. P. Bilbao-Montoya, B. P. Binks, E. Dickinson, R. Ettelaie, and B. S. Murray, “Outstanding stability of particle-stabilized bubbles,” *Langmuir*, vol. 19, no. 8, pp. 3106–3108, 2003.
- [105] U. T. Gonzenbach, A. R. Studart, E. Tervoort, and L. J. Gauckler, “Ultrastable particle-stabilized foams,” *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 45, no. 21, pp. 3526–3530, 2006.

- [106] M. Safouane, D. Langevin, and B. P. Binks, "Effect of particle hydrophobicity on the properties of silica particle layers at the air-water interface," *Langmuir*, vol. 23, no. 23, pp. 11546–11553, 2007.
- [107] A. Stocco, F. Garcia-Moreno, I. Manke, J. Banhart, and D. Langevin, "Particle-stabilised foams: structure and aging," *Soft Matter*, vol. 7, no. 2, pp. 631–637, 2011.
- [108] D. Zang, D. Langevin, B. P. Binks, and B. Wei, "Shearing particle monolayers: Strain-rate frequency superposition," *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, vol. 81, no. 1, pp. 1–5, 2010.
- [109] D. Y. Zang, E. Rio, D. Langevin, B. Wei, and B. P. Binks, "Viscoelastic properties of silica nanoparticle monolayers at the air-water interface," *European Physical Journal E*, vol. 31, no. 2, pp. 125–134, 2010.
- [110] D. Beneventi, B. Carre, and A. Gandini, "Role of surfactant structure on surface and foaming properties," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 189, pp. 65–73, 2001.
- [111] R. Miller, P. Joos, and V. B. Fainerman, "Dynamic surface and interfacial tensions of surfactant and polymer solutions," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 49, no. C, pp. 249–302, 1994.
- [112] L. R. Arriaga, W. Drenckhan, A. Salonen, J. A. Rodrigues, R. Íñiguez-Palomares, E. Rio, and D. Langevin, "On the long-term stability of foams stabilised by mixtures of nano-particles and oppositely charged short chain surfactants," *Soft Matter*, vol. 8, no. 43, p. 11085, 2012.
- [113] A. Cervantes Martinez, E. Rio, G. Delon, A. Saint-Jalmes, D. Langevin, and B. P. Binks, "On the origin of the remarkable stability of aqueous foams stabilised by nanoparticles: link with microscopic surface properties," *Soft Matter*, vol. 4, no. 7, p. 1531, 2008.
- [114] E. Dickinson, "Food emulsions and foams: Stabilization by particles," *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, vol. 15, no. 1-2, pp. 40–49, 2010.
- [115] T. N. Hunter, R. J. Pugh, G. V. Franks, and G. J. Jameson, "The role of particles in stabilising foams and emulsions," *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 137, no. 2, pp. 57–81, 2008.
- [116] H. Morkoç and U. Özgür, *Zinc Oxide: Fundamentals, Materials and Device Technology*. Weinheim: WILEY-VCH verlag GmbH & Co., 2009.

- [117] Ü. Özgür, Y. I. Alivov, C. Liu, A. Teke, M. A. Reshchikov, S. Doğan, V. Avrutin, S. Cho, and H. Morkoç, “A comprehensive review of ZnO materials and devices,” *Journal of Applied Physics*, vol. 041301, no. 2005, pp. 1–102, 2016.
- [118] J. Bang, H. Yang, and P. H. Holloway, “Enhanced and stable green emission of ZnO nanoparticles by surface segregation of Mg,” *Nanotechnology*, vol. 17, pp. 973–8, feb 2006.
- [119] D. Bera, L. Qian, S. Sabui, S. Santra, and P. H. Holloway, “Photoluminescence of ZnO quantum dots produced by a sol–gel process,” *Optical Materials*, vol. 30, pp. 1233–1239, apr 2008.
- [120] Y. Lv, W. Xiao, W. Li, J. Xue, and J. Ding, “Controllable synthesis of ZnO nanoparticles with high intensity visible photoemission and investigation of its mechanism,” *Nanotechnology*, vol. 24, no. 17, p. 175702, 2013.
- [121] a. Van Dijken, E. a. Meulenkaamp, D. Vanmaekelbergh, and a. Meijerink, “Identification of the transition responsible for the visible emission in ZnO using quantum size effects,” *Journal of Luminescence*, vol. 90, no. 3, pp. 123–128, 2000.
- [122] A. Kołodziejczak-Radzimska and T. Jesionowski, “Zinc Oxide—From Synthesis to Application: A Review,” *Materials*, vol. 7, no. 4, pp. 2833–2881, 2014.
- [123] S. Li, Z. Sun, R. Li, M. Dong, L. Zhang, W. Qi, X. Zhang, and H. Wang, “ZnO Nanocomposites Modified by Hydrophobic and Hydrophilic Silanes with Dramatically Enhanced Tunable Fluorescence and Aqueous Ultrapstability toward Biological Imaging Applications,” *Scientific Reports*, vol. 5, p. 8475, 2015.
- [124] N. R. Jana, H.-h. Yu, E. M. Ali, Y. Zheng, and J. Y. Ying, “Controlled photostability of luminescent nanocrystalline ZnO solution for selective detection of aldehydes,” *Chemical communications (Cambridge, England)*, no. 14, pp. 1406–1408, 2007.
- [125] H. Benhebal, M. Chaib, T. Salmon, J. Geens, A. Leonard, S. D. Lambert, M. Crine, and B. Heinrichs, “Photocatalytic degradation of phenol and benzoic acid using zinc oxide powders prepared by the sol–gel process,” *Alexandria Engineering Journal*, vol. 52, no. 3, pp. 517–523, 2013.
- [126] J. Khan, S. Ilyas, B. Akram, K. Ahmad, M. Hafeez, M. Siddiq, and M. A. Ashraf, “Zno/NiO coated multi-walled carbon nanotubes for textile dyes degradation,” *Arabian Journal of Chemistry*, 2018.
- [127] A. B. Lavand and Y. S. Malghe, “Synthesis, characterization and visible light photocatalytic activity of carbon and iron modified ZnO,” *Journal of King Saud University - Science*, vol. 30, no. 1, pp. 65–74, 2018.

- [128] S. Mahmud, M. J. Abdullah, G. A. Putrus, J. Chong, and A. K. Mohamad, "Nanos-structure of ZnO fabricated via French process and its correlation to electrical properties of semiconducting varistors," *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*, vol. 36, no. 2, pp. 155–159, 2006.
- [129] N. A. Alshehri, A. R. Lewis, C. Pleydell-Pearce, and T. G. Maffei, "Investigation of the growth parameters of hydrothermal ZnO nanowires for scale up applications," *Journal of Saudi Chemical Society*, 2017.
- [130] A. West, *Solid State Chemistry and its Application*. New York: Wiley, 1984.