

PRODUCCIÓN DE MICROPARTÍCULAS FLUORESCENTES DE POLIESTIRENO MEDIANTE LA TECNOLOGÍA FLOW FOCUSING

Lucía Martín- Banderas¹, Mercedes Fernández-Arévalo², Alfonso M. Gañán Calvo^{1,3}

¹ Departamento de Ingeniería Energética y Mecánica de Fluidos, ESI, Camino de los Descubrimientos s/n 41092, Universidad de Sevilla. ² Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Profesor García González s/n 41012, Universidad de Sevilla. ³ Ingeniatics, Avda. Américo Vespucio 41092, Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93, Sevilla.

Resumen

El presente trabajo describe la producción de micropartículas (MPs) fluorescentes de poliestireno empleando la tecnología **Flow Focusing**.

Las MPs se han elaborado mediante un nuevo y prometedor método de bajo coste. Las MPs obtenidas presentaron una estrecha distribución tamaño, aspecto uniforme y propiedades de fluorescencia adecuadas.

Abstract

Present work describes the production of fluorescent polystyrene microparticles (MPs) using the **Flow Focusing** technology. We have produced the MPs by a novel, low-cost and promising method. The MPs showed a narrow size distribution, with a uniform morphology and suitable fluorescence properties.

Introducción

La Tecnología Flow Focusing (1), desarrollada por el Dpto. de Ingeniería Energética y Mecánica de Fluidos de la Universidad de Sevilla, se basa en la formación de un microchorro de un fluido en el núcleo de una corriente laminar altamente acelerada de otro fluido inmiscible con el primero. Se trata de un método mecánico y "suave".

La configuración básica consiste en una cámara que se encuentra presurizada mediante la entrada constante de un fluido, "enfocante". En el interior de esta cámara se inyecta un segundo fluido inmiscible, "enfocado", a través de un

capilar enfrentado a un orificio en la pared de la cámara.

La corriente del fluido "enfocante" rodea al "enfocado" y lo dirige hacia el exterior de la cámara a través del orificio generando un microchorro estacionario de forma controlada. Este ligamento se rompe rápidamente en gotas pequeñas y homogéneas (figura 1).

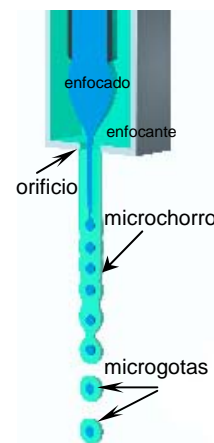


Figura 1. Esquema de la formación del microchorro y posterior formación de las microgotas

La tecnología Flow Focusing presenta un alto potencial de aplicación en el campo farmacéutico ya que (i) permite un control exhaustivo del tamaño de partícula, así como de su estructura (2-4), (ii) se trata de un método puramente mecánico, y (iii) el fluido enfocado (el fluido "objetivo") es conducido suavemente por el enfocante, evitándose esfuerzos violentos.

El **objetivo** de este trabajo es la aplicación de la tecnología Flow Focusing a la producción de micropartículas (MPs) fluorescentes con aplicaciones en múltiples campos de la investigación y el diagnóstico.

Materiales y Métodos

Materiales

Poliestireno (PS) (PM 4000-200000), Rodamina B (RB), fluoresceínamina isómero I (Flu), alcohol polivinílico 72000 (PVA) de Sigma-Aldrich y acetato de etilo PRS (AE) de Panreac Química.

Métodos

Producción de las MPs de poliestireno: La producción de las MPs se llevó a cabo mediante una modificación del método emulsión-evaporación del disolvente empleando un nebulizador Flow Focusing para la formación controlada de las gotículas de una emulsión o/a. Como fase oleosa se utilizó una solución al 4% p/v de PS en AE y como fase acuosa se utilizó agua destilada.

Para la producción de MPs fluorescentes junto con el PS se disolvió RB (0.006, 0.06, 0.6 mM) o Flu (1 mM).

La formación de la emulsión o/a se llevo a cabo en el seno de una solución de PVA al 1% p/v en agitación continua para evitar la formación de agregados. La concentración final de PVA fue del 0.25% p/v. A continuación, la emulsión se mantuvo en agitación durante 16 horas hasta la total evaporación del disolvente. Finalmente, las MPs se lavaron tres veces con agua destilada, se centrifugaron a 4000 r.p.m durante 10 minutos, se liofilizaron y almacenaron a 4°C en forma de polvo seco.

Caracterización de las MPs: Para la caracterización se llevaron a cabo estudios de:

- distribución de tamaño de partícula mediante microscopía óptica (Leica DM LS) y un programa de análisis de imagen (Image J 1.30v) (5);
- rendimiento de la producción expresado como porcentaje en peso de MPs obtenidas con respecto a la cantidad total de polímero empleada;
- morfología y superficie mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Phillips XL30);
- propiedades de fluorescencia (Leica DM R);

Resultados y Discusión

Distribución de tamaño de partícula. Se han ensayado diversas combinaciones de caudales entre la fase interna y la externa obteniéndose

tamaños de partícula entre 3 y 17 μm . En la figura 2 se muestra el buen ajuste entre los diámetros de partículas obtenidos experimentalmente y los que predicen las leyes de la tecnología Flow Focusing (1).

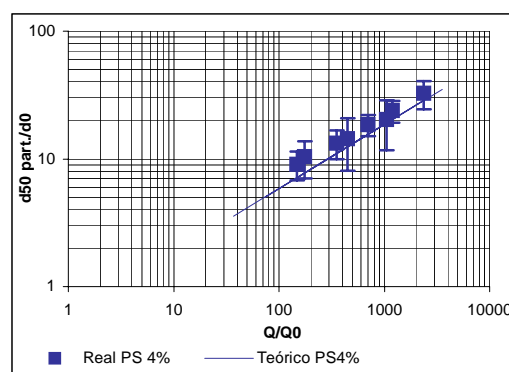


Figura 2. Ajuste resultados reales y teóricos de las tamaños de partícula para las condiciones ensayadas (barras de error: desviación estándar)

Las condiciones seleccionadas para la producción de las MPs y los tamaños de partículas obtenidos quedan recogidos en la tabla 1.

| Q_o | Q_a | $D_{\text{medio}} (\mu\text{m} \pm DE)$ | $CV (\%)$ |
|-------|-------|-----------------------------------------|-----------|
| 1 | 3 | 5.290 ± 0.509 | 9.613 |
| 2 | 2 | 9.278 ± 0.865 | 9.320 |

Tabla 1. Caudales de las fases orgánica (Q_o mL/h) y acuosa (Q_a mL/min) y tamaños de MPs obtenidos

En la figura 3 quedan reflejados los histogramas obtenidos en las condiciones antes descritas. Como se observa, con un mismo nebulizador es posible obtener distintos tamaños de partícula con una estrecha distribución de tamaño.

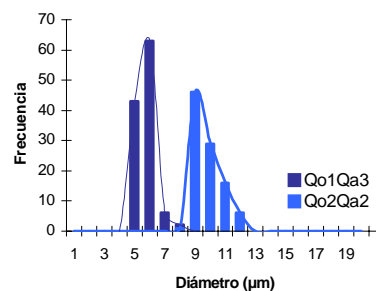
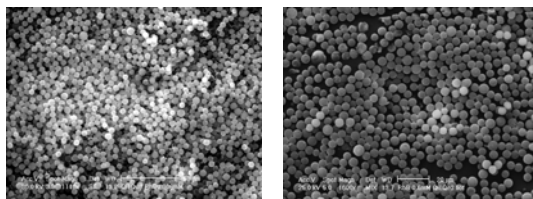


Figura 3. Histogramas obtenidos en las condiciones de caudales descritas para partículas "blanco"

La producción de las MPs cargadas con RB y Flu se llevo a cabo utilizando la combinación Qo1Qa3. Para RB 0.6 mM además se obtuvieron partículas de mayor tamaño utilizando la combinación Qo2Qa2.

La figura 4 muestra imágenes del SEM de MPs cargadas con diferente concentración de RB.



a) RB 0.006 Mm b) RB 0.6 mM

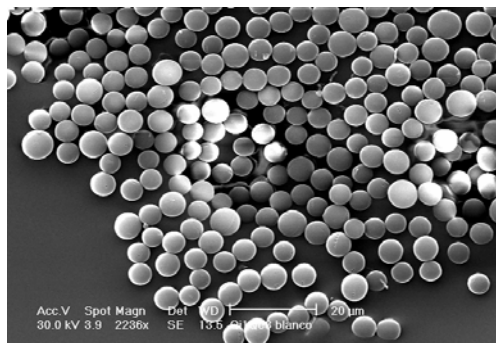
Figura 4. SEM de MPs (Qo1Qa3) cargadas con RB: a)0.006 mM y b) 0.6 Mm

Rendimiento de la producción. El porcentaje del rendimiento de la producción para las formulaciones ensayadas fue de 30 – 67 % p/p (tabla 2).

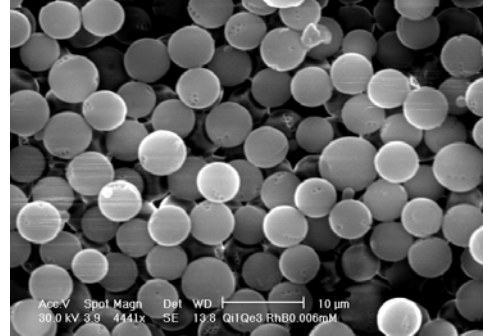
| Qo | Qa | [RB] mM | Rendimiento (%) |
|----|----|---------|-----------------|
| 1 | 3 | 0 | 29.41 |
| | | 0.006 | 41.18 |
| | | 0.06 | 64.71 |
| | | 0.6 | 52.94 |
| | | Flu 1mM | 66.67 |
| 2 | 2 | 0.6 | 27.80 |

Tabla 2. Rendimiento de la producción obtenidos para las formulaciones ensayadas (Qo mL/h; Qa mL/h)

Morfología y superficie. Las imágenes del SEM muestran partículas esféricas, no agregadas y de superficie no porosa tanto para partículas cargadas como no cargadas, partículas "blanco" (figura 5).



a)MPs "blanco" Qo1Qa3

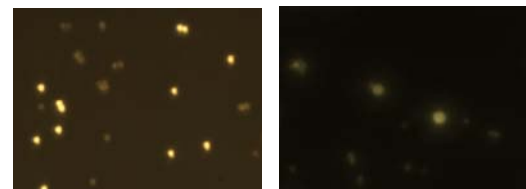


b) MPs RB 0.006 mM Qo1Qa3

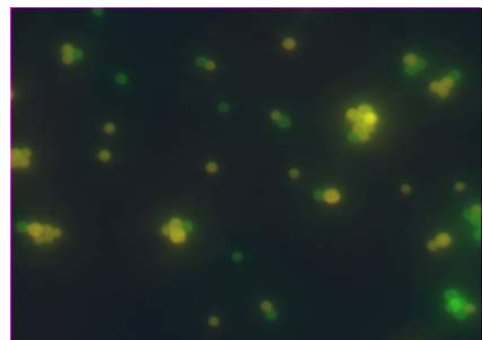
Figura 5. SEM de Mps de poliestireno: a)"blanco" y b) cargadas con RB 0.006 mM

Fluorescencia. Las imágenes del microscopio de fluorescencia muestran una distribución uniforme de los fluoróforos en el interior de las MPs y ponen de manifiesto que su contenido fue adecuado para la diferenciación de distintas poblaciones en función de:

- la carga en RB (figura 6.a),
- tamaño de MP (figura 6.b) y
- tipo de fluoróforo (figura 6.c,d)



a) RB 0.006 + 0.6 mM b) RB 0.6mM (5+9 μm)



c) RB 0.6 mM + Flu 1 mM

Figura 6. Diferenciación de poblaciones de MPs fluorescentes en función de: a) carga de RB, b) tamaño y c) tipo de fluoróforo (aumento 40X)

Conclusiones

En este trabajo se ha puesto de manifiesto la posibilidad de producir micropartículas fluorescentes de poliestireno empleando la tecnología Flow Focusing mediante un método nuevo y directo de bajo coste.

Se han obtenido partículas fluorescentes de 5 y 10 μm con una estrecha distribución de tamaño ($\text{CV} < 10\%$), con propiedades de emisión de fluorescencia aptas para su diferenciación en función de varios parámetros.

Bibliografía

- (1) A.M. Gañán-Calvo. Phys Rev Lett 80, 285 (1998).
- (2) L. Martín et al., XII International workshop on Bioencapsulation, 21, Vitoria, 2004.
- (3) L. Martín-Banderas y col., XXIV Symposium AEFI. Innovación Farmacéutica en la nueva Europa, 378, Córdoba, 2004.
- (4) María Flores-Mosquera et al., 57th Annual Meeting of the Division of Fluid Dynamics, Seattle, 2004.
- (5) [A. Jilavenkatesa et al. Particle Size Characterization. NIST recommended practice guide, 69, \(2004\)](#)

Agradecimientos

Parte del trabajo ha sido financiado por una beca FPI del MCYT.

Autor de contacto:

Lucía Martín Banderas

lucia@eurus2.us.es

Dpto. Ingeniería Energética y Mecánica de Fluidos, ESI, Univ. Sevilla

C/ Camino de los Descubrimientos s/n

Sevilla

Tel./Fax: 954.487.339