



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

**MICROENCAPSULACIÓN MEDIANTE LA
TECNOLOGÍA FLOW FOCUSING
PARA APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS Y
BIOMÉDICAS**

LUCÍA MARTÍN BANDERAS
SEVILLA, 2007

INDICE

ÍNDICE

PREFACIO	1
OBJETIVOS	3
CAPÍTULO 1. ASPECTOS GENERALES DE LA MICROENCAPSULACIÓN	5
1.1. MÉTODOS Y TÉCNICAS DE MICROENCAPSULACIÓN	5
1.1.1. Razones para la microencapsulación. Aplicaciones	5
1.1.2. Sistemas de diagnóstico: sistemas <i>multiplex</i>	7
1.1.3. Métodos y técnicas de obtención de micropartículas	9
1.1.3.1. Métodos fisicoquímicos.....	11
1.1.3.2. Métodos químicos.....	13
1.1.3.3. Métodos mecánicos.....	14
1.1.3.4. Otros métodos.....	16
1.2. MÉTODOS DE GENERACIÓN DE GOTAS	22
1.2.1. Sistemas de alta productividad y bajo control del tamaño de gota	22
1.2.2. Sistemas con baja productividad y alto control del tamaño de gota	23
1.2.3. Sistemas con alta productividad y alto control del tamaño de gota	24
1.2.3.1. Vibración.....	24
1.2.3.2. Jet Cutter.....	25
1.2.3.3. Disco rotatorio.....	26
1.2.3.4. Formación de gotas asistida por campo eléctrico.....	27
1.2.3.5. Técnicas de microenfocamiento fluídico: Flow Focusing.....	28
1.2.3.6. Otras.....	29
CAPÍTULO 2. MICROENFOCAMIENTO FLUÍDICO: FLOW FOCUSING	32
2.1. INTRODUCCIÓN	32
2.2.1 Configuraciones posibles para un nebulizador FF	35
2.2.2. Características de la atomización mediante FF, parámetros geométricos	36
2.2.3. Tamaño del chorro	38
2.2.4. Tamaño de gota	41
2.2.5. Predicción tamaño gota	44
2.2.6. Caso práctico: microencapsulación de un antibiótico	45
2.2.6.1. Producción de las micropartículas.....	45
2.2.6.1.1. Producción de microesferas.....	45
2.2.6.1.2. Producción de microcápsulas.....	46
2.2.6.2. Caracterización de las micropartículas.....	46
2.2.6.2.1. Determinación del tamaño de partícula.....	46

2.2.6.2.2. <u>Aspecto y morfología</u>	48
2.2.6.2.2. <u>Determinación del contenido en sulfato de gentamicina</u>	49
2.2.6.2.3. <u>Actividad antimicrobiana</u>	49
2.2.7. <u>Ventajas frente a otras técnicas de atomización</u>	51
2.2.8. <u>Otras geometrías Flow Focusing</u>	52
CAPÍTULO 3. <u>PRODUCCIÓN DE MICROPARTÍCULAS</u>	58
3.1. INTRODUCCIÓN	58
3.1.1. <u>Selección de polímeros para la producción de MPs como herramienta de diagnóstico</u>	58
3.2. OBJETIVOS	61
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	62
3.3.1. <u>Materiales</u>	62
3.3.2. <u>Métodos</u>	62
3.3.2.1. <u>Caracterización fluidos</u>	62
3.3.2.1.1. <u>Medición de la viscosidad</u>	62
3.3.2.1.2. <u>Medición de la tensión superficial e interfacial</u>	63
3.3.2.1.3. <u>Nebulizadores Flow Focusing</u>	64
3.3.2.1.4. <u>Producción de micropartículas</u>	65
3.3.2.1.5. <u>Caracterización micropartículas</u>	65
3.3.2.4.1. <u>Determinación del tamaño de partícula y distribución de tamaño</u>	65
3.3.2.4.2. <u>Aspecto y morfología</u>	65
3.3.2.4.3. <u>Estabilidad de las micropartículas</u>	65
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
3.4.1. <u>Caracterización de las disoluciones poliméricas</u>	67
3.4.1.1. <u>Medición de la viscosidad</u>	67
3.4.1.2. <u>Medición de la tensión superficial e interfacial</u>	67
3.4.2. <u>Producción de MPs blancas</u>	71
3.4.2.1. <u>Búsqueda condiciones de monodispersión</u>	75
3.4.2.2. <u>Influencia del material del capilar</u>	75
3.4.2.3. <u>Reproducibilidad del proceso</u>	77
3.4.2.4. <u>Ajuste de los resultados experimentales a los teóricos</u>	78
3.4.2.5. <u>Determinación del caudal mínimo de fluido enfocado</u>	85
3.4.2.6. <u>Reducción tamaño de partícula (escala nanométrica)</u>	87
3.4.2.6.1. <u>Reducción tamaño orificio salida (<i>D</i>)</u>	88
3.4.2.6.2. <u>Modificación geometría de la salida del nebulizador</u>	90

3.4.2.7. Formación de las micropartículas combinando FF y el método de extracción / evaporación del disolvente.....	91
3.4.3. <u>Caracterización de las micropartículas</u>	95
3.4.3.1. Estudio de la influencia del tipo de poliestireno y el tamaño de partícula en la morfología.....	95
3.4.3.2. Estudio de estabilidad de las MPs elaboradas.....	97
3.5. CONCLUSIONES.....	99
CAPÍTULO 4. PRODUCCIÓN DE MICROPARTÍCULAS CODIFICADAS	101
4.1. INTRODUCCIÓN.....	101
4.1.1. <u>Selección de los fluoróforos</u>	102
4.1.1.1. Fluoróforos orgánicos.....	102
4.1.1.2. Fluoróforos inorgánicos o <i>quantum dots</i>	102
4.2. OBJETIVOS.....	105
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	106
4.3.1. <u>Materiales</u>	106
4.3.2. <u>Métodos</u>	106
4.3.2.1. Producción de micropartículas codificadas.....	106
4.3.2.2. Caracterización de las micropartículas.....	108
4.3.2.2.1. <u>Determinación de las propiedades de fluorescencia</u>	109
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	111
4.4.1. <u>Caracterización de las micropartículas</u>	111
4.4.1.1. Distribución de tamaños de partícula.....	111
4.4.1.1.1. <u>Influencia del tipo de fluoróforo y su concentración</u>	111
4.4.1.1.2. <u>Influencia del tipo de poliestireno</u>	113
4.4.1.2. Aspecto y morfología.....	113
4.4.1.3. Propiedades de fluorescencia.....	115
4.4.1.3.1. <u>Microscopía de fluorescencia</u>	115
4.4.1.3.2. <u>Microscopía confocal</u>	116
4.4.1.3.3. <u>Citometría de flujo</u>	120
4.4.2. <u>Validación del MBA diseñado para ensayos de hibridación e inmuno-ensayos</u>	130
4.5. CONCLUSIONES.....	133
CAPÍTULO 5. PRODUCCIÓN DE MICROPARTÍCULAS CON PROPIEDADES PARAMAGNÉTICAS	134
5.1. INTRODUCCIÓN.....	134
5.1.1. <u>Aplicaciones de las partículas paramagnéticas</u>	134
5.1.1.1. Aplicaciones <i>in vivo</i>	134

5.1.1.2. Aplicaciones <i>in vitro</i>	135
5.1.2. Formación y estabilización de suspensiones magnéticas	136
5.1.2.1. Agentes estabilizadores.....	138
5.1.2.1.1. <u>Agentes humectantes</u>	138
5.1.2.1.2. <u>Agentes viscosizantes</u>	138
5.1.2.1.3. <u>Electrolitos</u>	139
5.2. OBJETIVOS.....	140
5.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	141
5.3.1. Materiales	141
5.3.2. Métodos	141
5.3.2.1. Elaboración de la suspensión de magnetita.....	142
5.3.2.2. Caracterización de las suspensiones elaboradas.....	143
5.3.2.3. Producción de micropartículas paramagnéticas.....	143
5.3.2.4. Caracterización de las micropartículas con propiedades paramagnéticas.....	143
5.3.2.4.1. <u>Comportamiento de las micropartículas paramagnéticas en presencia de un campo magnético</u>	143
5.3.2.4.2. <u>Estabilidad de las partículas paramagnéticas</u>	144
5.3.2.4.3. <u>Cuantificación del contenido en magnetita</u>	144
5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	146
5.4.1. Caracterización de las suspensiones elaboradas	146
5.4.1.1. Estabilidad de suspensiones elaboradas en medio acuoso.....	146
5.4.1.2. Estabilidad de suspensiones elaboradas en medio orgánico.....	146
5.4.2. Caracterización de las micropartículas elaboradas	149
5.4.2.1. Determinación del tamaño de partícula.....	149
5.4.2.2. Determinación del aspecto y morfología de partícula.....	151
5.4.3. Micropartículas elaboradas con Aerosil® 200 Pharma	151
5.4.3.1. Estudio de la influencia del tipo polímero y su concentración..	152
5.4.3.2. Estudio de la influencia de la concentración de Aerosil® 200 Pharma.....	154
5.4.3.3. Estudio de estabilidad de MPs paramagnéticas elaboradas con Aerosil® 200 Pharma.....	156
5.4.3.4. Codificación de las MPs paramagnéticas.....	159
5.4.4. Micropartículas elaboradas con Ethocel®	162
5.4.4.1. Determinación del tamaño de partícula.....	163
5.4.4.2. Aspecto y morfología.....	164

5.4.4.3. Estudio de estabilidad de MPs paramagnéticas elaboradas con Ethocel®.....	165
5.4.5. <u>Determinación del contenido en hierro</u>	167
5.5. CONCLUSIONES.....	169
<u>CONCLUSIONES</u>	170
<u>FUTURO Y PERSPECTIVAS</u>	173
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	174
<u>NOMENCLATURA</u>	186
ANEXO I.....	188
ANEXO II.....	189
ANEXO III.....	190
ANEXO IV.....	191
ANEXO V.....	192
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	193

El trabajo de investigación que se presenta en este documento, ha sido posible gracias a la colaboración entre los Departamentos de Ingeniería Aeroespacial y Mecánica de Fluidos y Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla así como de la empresa Ingeniatrics Tecnología S.L.

El objetivo principal de este trabajo, ha sido validar y consolidar la tecnología Flow Focusing como una alternativa firme en procesos de microencapsulación. Se trata de una técnica sencilla, barata y fácil de multiplexar con un control exhaustivo tanto del tamaño de gota como de su estructura. Para ello, y con objeto de realizar un trabajo práctico, el trabajo ha sido realizado estrecha colaboración con el Departamento de I+D de Ingeniatrics Tecnologías S.L. a fin de desarrollar un posible producto comercial.

El trabajo se ha dividido en 5 capítulos diferentes. Los dos primeros dedicados a una revisión del estado del arte en el campo de la microencapsulación y a la tecnología Flow Focusing. Los otros tres capítulos, estructurados típicamente en Introducción, Objetivos, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, se centran en el proceso de obtención de diferentes tipos de micropartículas sólidas poliméricas y su caracterización para su empleo en sistemas de diagnóstico.

- El primer capítulo trata sobre las técnicas y métodos de microencapsulación existentes, así como en sus principales aplicaciones dedicando especial interés a los sistemas de diagnóstico múltiples. Por otro lado, se describen los principales métodos de generación de gotas empleados en la actualidad en procesos de microencapsulación.
- En el segundo capítulo, en donde se describe la tecnología Flow Focusing, se detallan las características de esta tecnología como técnica de atomización, exponiéndose los resultados obtenidos para la encapsulación de un fármaco, a modo de ejemplo de caso práctico.
- En el tercer capítulo, se emplea la técnica FF en una configuración líquido-líquido para generar una emulsión o/a como paso intermedio en el proceso de obtención de micropartículas sólidas. Se centra en la geometría del nebulizador, valor de los principales números adimensionales, ajuste de los resultados experimentales al modelo teórico, etc.

- El capítulo cuarto trata de la codificación de las partículas como herramienta en sistemas de diagnóstico *multiplex* mediante el empleo de distintos tipos de fluoróforos.
- El capítulo quinto, describe los resultados experimentales obtenidos en cuanto a la producción de micropartículas con propiedades paramagnéticas, centrándose en la producción de una suspensión estable de nanomateriales con propiedades paramagnéticas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El **objetivo general** del presente trabajo de investigación es establecer las condiciones experimentales necesarias para la producción de micropartículas poliméricas monodispersas para aplicaciones tanto biotecnológicas como biomédicas, utilizando la tecnología Flow Focusing.

Para llevarlo a cabo, se plantean los siguientes **objetivos parciales**:

- La tecnología FF permite la generación de micro-estructuras con dos geometrías muy generales: (i) estructuras cilíndricas (micro-chorros, micro-fibras y micro-tubos) y (ii) esféricas (micro-gotas, micro-cápsulas, micro-burbujas). Estas últimas representan el objetivo fundamental del trabajo. Por otro lado, la tecnología permite obtener geometrías de diversa estructura (simple, concéntrica, multicapa, multivesícula, etc.) en función de la configuración empleada. Así, según la aplicación final, naturaleza del material a encapsular y polímeros empleados como soporte, se seleccionará aquella configuración más apropiada.
- Independientemente de la configuración a emplear, se realizará un estudio sobre la influencia de la naturaleza de los fluidos empleados en los fenómenos físicos asociados al proceso microfluídico. La identificación y evaluación de los efectos asociados a la utilización de fluidos multifásicos, formación de estructuras complejas, interacción de moléculas y fluidos no newtonianos, permitirá tanto la profundización en las bases físicas del proceso, como en la modificación y adaptación de los dispositivos experimentales que permitan la ampliación del espectro de aplicaciones.
- Se desarrollará el procedimiento para la microencapsulación de un fármaco altamente hidrosoluble. Se pretende poner a punto un proceso que permita la incorporación estable de un fármaco a micropartículas producidas por la tecnología Flow Focusing, con un adecuado contenido en fármaco para su posterior empleo como sistemas de liberación controlada.
- Se desarrollará un procedimiento automatizado de análisis *multiplex* mediante la utilización de micropartículas codificadas con fluoróforos. La utilización de “arrays fluídicos” se está imponiendo como procedimiento de análisis *multiplex* de biomoléculas al permitir realizar múltiples ensayos en paralelo. El desarrollo de estos nuevos sistemas de diagnosis está estrechamente relacionado con las propiedades de las micropartículas que los componen, el rango de tamaños, su estabilidad y/o la uniformidad y capacidad para atrapar el marcaje fluorescente.

Debido a las propiedades únicas de la tecnología Flow Focusing, se empleará ésta como método alternativo para la obtención de micropartículas fluorescentes codificadas. Adicionalmente, se validarán estos sistemas multiparticulares para su empleo en sistemas de diagnóstico *multiplex* mediante el estudio de unión de biomoléculas a la superficie de las partículas codificadas.

- Continuando con la aplicación anterior, se desarrollaran micropartículas con propiedades paramagnéticas. Con ello se pretende básicamente facilitar su manejo, ya que, entre otros aspectos, se podrán eliminar los procesos de centrifugado.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

ASPECTOS GENERALES DE LA MICROENCAPSULACIÓN

1.1. MÉTODOS Y TÉCNICAS DE MICROENCAPSULACIÓN

El término microencapsulación es relativamente antiguo, sin embargo, su aplicación es relativamente reciente. Las primeras referencias que describen un proceso de microencapsulación (microesferas de gelatina preparadas mediante coacervación) datan de 1931 y ha sido en las últimas décadas cuando el interés por desarrollar micro- y nanopartículas biodegradables ha tenido su mayor crecimiento.

La microencapsulación de principios activos puede definirse desde el punto de vista tecnológico como un proceso de recubrimiento por el cual se obtienen sistemas multiparticulares que en función de su morfología y estructura interna pueden denominarse micropartículas, microesferas o microcápsulas, todos ellos tienen en común el tamaño de partícula que siempre es inferior a 1000 μm (Vila Jato, 1997; Palomo y cols. 1997a,b,c).

En la figura 1 se muestran los diferentes tipos de partículas que podemos obtener en función del método seleccionado.

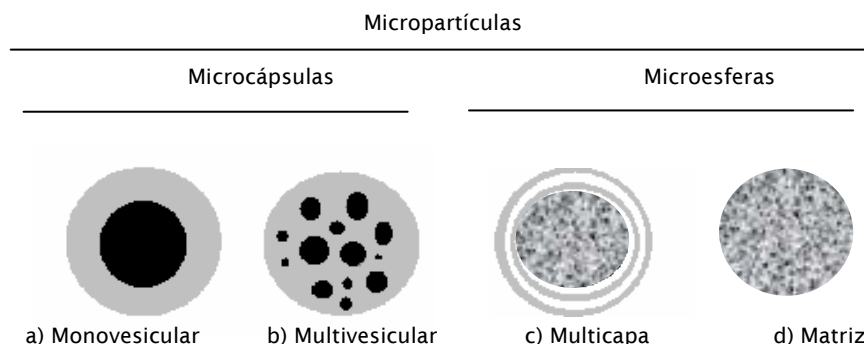


Figura 1. Clasificación de las micropartículas en función de su morfología: a) Microcápsula tipo mono-vesicular, b) Microcápsula tipo multi-vesicular, c) Microesfera tipo multi-capa, d) microesfera tipo matriz

La morfología interna de la partícula condicionará la liberación del principio activo por lo que es necesario su control. La morfología depende fuertemente del método de microencapsulación y el protocolo elegido.

1.1.1. Razones para la microencapsulación. Aplicaciones

Las razones para llevar a cabo un proceso de microencapsulación las podemos resumir en cuatro grupos:

- Inmovilización de células, enzimas, etc.

- Protección frente a procesos de degradación (O₂, luz, humedad, etc.), evitar la degradación en el estómago debido a la acidez del pH, enmascarar sabores y olores, etc.
- Liberación controlada de fármacos o de otro tipo de sustancias como olores, etc.
- Estructuración, generalmente se utiliza para retirar el solvente en una suspensión, de forma que se favorece el manejo del producto, se aumenta la vida media y se modifican sus propiedades (solubilidad, dispersión, higroscopicidad, reología, etc.)

Todas estas razones han hecho posible que la microencapsulación haya sido aplicada en numerosas sectores. Quizás su aplicación más conocida o cercana sea aquella aplicada en la industria farmacéutica para la liberación controlada de fármacos pero también es utilizada en este sector para enmascarar sabores y olores; dirigir un fármaco a una determinada zona del organismo o proteger al fármaco frente a la degradación en el estómago. En la industria alimentaria la microencapsulación está transformando los productos alimentarios incluso se ha llegado a intervenir en las tendencias de salud del consumidor mediante la encapsulación de probióticos o con la incorporación de otros ingredientes que mejoren la salud. Se han creado nuevas texturas, se han diferenciado y revalorizado algunos productos. Uno de los sectores con mayor potencial es la alimentación infantil con la incorporación de vitaminas, minerales, etc. En la industria textil la microencapsulación también ha supuesto una revolución dando lugar a los llamados “tejidos inteligentes”. Éstos incorporan en sus fibras partículas con determinadas características que pueden hacer que las prendas cambien de color en función de la luz o de la humedad, pueden llevar incorporadas sustancias desodorantes, fragancias, repelentes de insectos o sustancias cosméticas como alo vera (Nelson G., 2002).

Las micropartículas también han sido empleadas como sistemas modelos en medicina, bioquímica, química coloidal, tecnología de aerosoles, etc.; se utilizan como soporte para la síntesis de péptidos, para separación celular o incluso de metales pesados contaminantes (Kaminiski, M. D., 1999).

También tiene gran interés su empleo como patrones de calibración en equipos como citómetros de flujo, analizadores de partículas, microscopía confocal, etc. Otras aplicaciones son la medición de flujo en gases y líquidos (*Laser Doppler Anemometry* (LDA); *Particle Dynamics Analysis* (PDA); *Particle Image Velocimetry* (PIV)).

En el campo de la información y la imagen el primer éxito comercial fue el papel calco sin carbón desarrollado por National Cash Register Company en los años 50 para evitar los problemas de evaporación y difusión de la tinta en el papel. Hoy día se sigue

comercializando y el interés por desarrollar nuevos tipos de papel o *displays* va en aumento por sus propiedades ópticas y electrónicas. Las micropartículas empleadas en estos sistemas contienen pigmentos como el óxido de titanio o carbón negro, las partículas bi-color cargadas eléctricamente son orientables en presencia de un campo eléctrico generando la imagen deseada (Yoshizawa H., 2004). Las ventajas de estos sistemas son que pueden ser leídos con luz tenue, consumen poco y son fácilmente transportables. Actualmente existen productos desarrollados por Sony Corp. en los que se ha incorporado la tecnología de la tinta electroforética de E-ink Corp.

Las micropartículas han supuesto un gran avance en el uso sistemas de diagnóstico médico, sistemas *multiplex*, mejorando enormemente la eficacia y la resolución de los tradicionales (Vignali, 2000). El apartado siguiente se centra exclusivamente en esta aplicación ya que uno de los objetivos del presente trabajo es el diseño y producción de micropartículas para esta aplicación concreta.

1.1.2. Sistemas de diagnóstico: sistemas *multiplex*

Una vez completado la primera parte del Proyecto Genoma en 2001, el interés por obtener información a nivel biomolecular crece enormemente. De ahí, surge la necesidad de detectar más de un analito por muestra lo que lleva al desarrollo de sistemas diagnóstico múltiples. Los sistemas primitivos se limitaban a la obtención de un único resultado por muestra analizada. Cuando fue necesario obtener más de un resultado de un mismo espécimen los *tests* se agruparon en paneles. En los años 80 la industria de técnicas de diagnóstico con el objeto de simplificar estos *tests* empieza a concebir los ensayos *multiplex*, es decir, ensayos capaces de detectar simultáneamente más de un analito en el mismo volumen de muestra. Casi de forma paralela, los ensayos basados en citometría de flujo para análisis de antígenos en la superficie de células llevaron a los ensayos *multiplex* al campo de la investigación (Vignali, 2000; Kingmore, 2006, Wilson y cols., 2006).

La llegada de los arrays de DNA introdujo a los ensayos *multiplex* de alta resolución provocando un cambio. La subsiguiente extensión de éstos ensayos a proteínas llevó a centrarse en la detección de nuevos biomarcadores, muchos de ellos conteniendo múltiples analitos.

En la actualidad existen ensayos *multiplex* capaz de analizar 10^6 analitos por ensayo, sin embargo, el número de analitos en ensayos de rutina in vivo y en biomarcadores se limita a 2-100.

Existen distintas tecnologías que permiten ensayos múltiples:

- PCR. Es una técnica muy empleada en la actualidad, sin embargo, tiene muy limitado el nivel de multiplexación (≤ 5) y la sensibilidad. Para aumentar esta

sensibilidad surgió una modificación del método, PCR competitiva cuantitativa (Fuja y cols., 2004) sin embargo, su nivel de multiplexación sigue siendo muy limitado.

- Espectrometría de masas. Se combinan las tecnologías de chips de proteínas y la llamada SELDI-TOF (surface-enhanced laser desorption/ionization-time-of-flight) de forma que relacionándolas se pueden obtener diagramas de picos que representan fragmentos de péptidos. En la actualidad se utiliza, entre otros, en el diagnóstico de cáncer de ovarios.
- Microarrays fluidicos. Se diferencian dos categorías:
 - a) posicional o 2D
 - b) virtual o partículas codificadas o 3D (bead arrays)

El primero de ellos presenta un bajo nivel de multiplexación y la identificación de las moléculas se hace por su posición en el *array*. El segundo ha aumentado sensiblemente este nivel y ha mejorado la cinética de unión. Por otro lado, su fabricación es flexible, los componentes pueden ser producidos individualmente y luego ser mezclados convenientemente. En este caso la identificación de las moléculas se realiza leyendo el código de las partículas. Actualmente la empresa Luminex Corp. domina el mercado con 100 tipos diferentes de micropartículas. En la figura 2 se muestran los dos tipos de *arrays*.

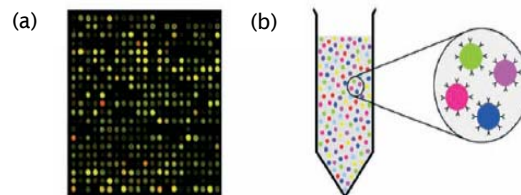


Figura 2. (a) *Microarray* convencional, posicional o 2D y (b) MBA, virtual o 3D (Wilson y cols., 2006)

La decodificación puede hacerse *in situ* mediante un citómetro de flujo convencional aunque en el caso de Luminex, se requiere un equipo especialmente diseñado y adaptado al tipo de micropartículas que han desarrollado.

Como ya hemos visto, la posibilidad de análisis múltiples de moléculas biológicas tiene un gran potencial dentro de sectores como la investigación y el diagnóstico, proporcionando una mayor exactitud, precisión y rendimiento. En la actualidad, la tecnología de *microparticles bead assays* (MBA) se emplea en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, en transplantes, fibrosis quística incluso en la identificación de grupos sanguíneos.

La utilización de *arrays* fluidicos de micropartículas fluorescentes codificadas para análisis múltiples de biomoléculas, se está imponiendo frente a otras técnicas tradicionales. En general, las ventajas de los sistemas MBA frente a otras tecnologías de multiplexación se pueden resumir en:

- fabricación más simple, barata y fácil
- permiten realizar numerosos ensayos en paralelo
- son más rápidos, ya que se mejora la cinética de unión
- son fáciles de almacenar, incluso en grandes cantidades
- la decodificación se puede hacer mediante citometría de flujo

La utilidad de estos *arrays* fluidicos está estrechamente relacionada con las propiedades de las micropartículas que los componen, como el rango de tamaños, su estabilidad y/o la uniformidad y capacidad para atrapar el marcaje fluorescente. En la figura 3 se muestra el principio de funcionamiento de estos microarrays fluidicos de partículas.

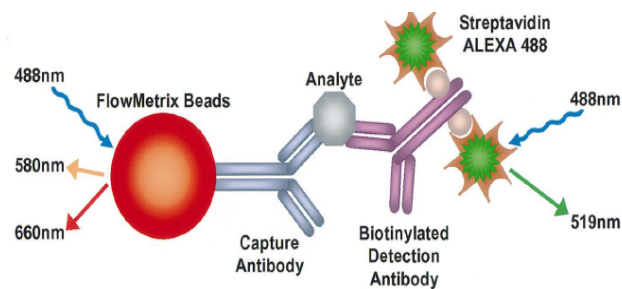


Figura 3. Principio de funcionamiento de un MBA (Vignali, 2000)

Básicamente, consiste en unir a la superficie de la partícula codificada, es decir, coloreada con un fluoróforo orgánico o inorgánico (quantum dots, QDs), una molécula (anticuerpo) capaz de interaccionar con el analito a detectar. El revelado de esa unión se hace a través de otra molécula, también capaz de interaccionar con el analito problema llamada anticuerpo secundario el cual está marcado fluorescentemente. La tecnología para “leer” el resultado es la citometría de flujo, originariamente desarrollada y pensada para la identificación de células basándose en el tamaño y fluorescencia.

1.1.3. Métodos y técnicas de obtención de micropartículas

Las posibles aplicaciones de las micropartículas han dado como resultado la aplicación de nuevas técnicas de microencapsulación y el desarrollo de nuevos

sistemas que faciliten la producción de estos sistemas microparticulares con una distribución de tamaños estrecha y de forma rápida, versátil y económica.

La elección de la técnica de microencapsulación se hace principalmente sobre la base de las características fisicoquímicas del polímero y del material a encapsular teniendo en cuenta los requerimientos siguientes (Jain, 2000):

- El rendimiento del proceso de obtención de micropartículas de tamaño deseado ha de ser alto
- La eficiencia de encapsulación del p.a. debe ser alta
- El p.a. debe mantener su actividad una vez encapsulado
- La reproducibilidad inter-lote debe estar dentro de unos límites concretos
- Las microesferas no deben agregarse y mantener su forma

Otros aspectos a tener en cuenta deberían ser los ambientales relacionados con los materiales, condiciones de fabricación y económicos.

No existe un determinado procedimiento para un material y un principio activo dados, en numerosos casos es posible elegir entre varias posibilidades.

En cuanto a la clasificación de los métodos de microencapsulación existe gran divergencia de opiniones entre los autores, sin embargo, las clasificaciones más aceptadas son las propuestas por A. Kondo (1979) y H.P. Merkle (1984) los cuales dividen los métodos en tres grandes grupos: fisicoquímicos, químicos y mecánicos. En la figura 4 quedan resumidos los métodos y/o técnicas de microencapsulación en función de cómo vaya vehiculizado el material a encapsular, así como, los pasos necesarios para obtener finalmente micropartículas sólidas.

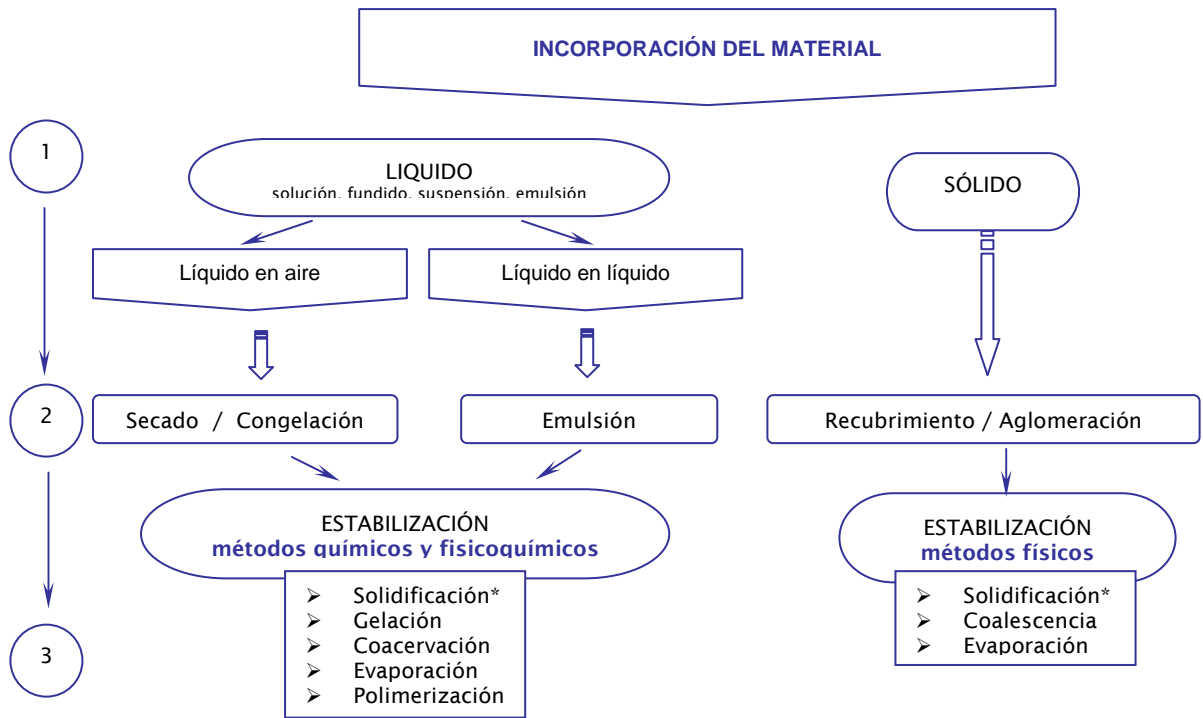


Figura 4. Clasificación de los métodos y técnicas de microencapsulación en función del estado del material a encapsular (** *spray congealing*)

A continuación, se describen de forma resumida cada uno de los métodos / técnicas de microencapsulación que podríamos calificar como “tradicionales”:

1.1.3.1. Métodos fisicoquímicos

Coacervación o separación de fases

Este término fue introducido por Bungenberg de Jong y Kruyt (1929) para describir el fenómeno de agregación macromolecular o separación de fases líquidas que tiene lugar en el seno de un sistema coloidal. Es una etapa intermedia entre disolución y precipitado. Fue el primer método empleado para obtener un producto comercial, papel carbón, un papel impregnado de partículas que contenían un colorante (1954). Gracias a que los materiales empleados, gelatina y goma arábiga, no presentaban toxicidad alguna el método se empleó rápidamente para la encapsulación de fármacos (Deasy, 1984).

Puede darse en fase acuosa u orgánica en función de la naturaleza del material a encapsular. Consiste en inducir la desolvatación del polímero ya sea por un cambio de temperatura, pH o la adición de un “no solvente”. Para ello se requiere la formación de

una emulsión y la adsorción del polímero sobre el núcleo (formación del coacervado) y el posterior endurecimiento del mismo.

En fase acuosa, podemos diferenciar dos procedimientos, simple o complejo.

- Simple: utilización de un único polímero, por ejemplo gelatina, para formar la cubierta, polímero soluble en agua, y una sal (por ejemplo, sulfato sódico o amónico) o un no solvente (por ejemplo, acetona, etanol).

El material a encapsular se encuentra disperso en la solución acuosa de gelatina.

- Complejo: coacervación espontánea cuando en un medio acuoso se mezclan dos o más coloides de cargas opuestas (gelatina con carga positiva o negativa, en función del pH, y goma arábica con carga negativa). La separación se induce por un cambio de pH.

En fase orgánica, para formar la cubierta se utilizan polímeros solubles en disolventes orgánicos de naturaleza apolar y el material a microencapsular se suspende o emulsifica en dicha solución, a continuación, se provoca la desolvatación por cualquiera de los tres procedimientos inductores mencionados.

Los principales inconvenientes de estas técnicas es la toxicidad de los disolventes empleados los cuales se utilizan en grandes cantidades, así como, la toxicidad de agentes reticulantes como glutaraldehído o formaldehído. Otros inconvenientes son la frecuente agregación de las partículas ya que no se usa ningún estabilizante y además nunca se llega a alcanzar un estado de equilibrio por lo que todas las variables del método afectan significativamente a la cinética del proceso y a las características finales de las partículas (Palomo, et al. 1997; Ramos Picos et al. 2001; Jain, 2000).

Extracción- evaporación del disolvente

Se trata de una de las técnicas más empleadas en la actualidad y que ha sufrido mayor número de modificaciones permitiendo encapsular gran variedad de sustancias tanto hidro- como liposolubles. Todas ellas tienen en común la formación de una emulsión de fase interna orgánica donde se solubiliza el polímero, el endurecimiento de las partículas se consigue eliminando el disolvente orgánico bien por difusión lenta hacia la fase externa y posterior evaporación precipitando de forma gradual del polímero o bien mediante la incorporación de un líquido (líquido extractor) que facilite la extracción, en este caso el endurecimiento es más rápido.

Es posible utilizar emulsiones simples o dobles de cualquier naturaleza: o/a, a/o, o/o, etc. Los principales inconvenientes es la baja eficacia de encapsulación y que la formación de las partículas se ve afectada por un gran número de factores (naturaleza y solubilidad del p.a., concentración, composición y peso molecular del polímero, proporción p.a./polímero, naturaleza del surfactante, temperatura, velocidad de

agitación, etc. (Palomo, et al. 1997; Ramos Picos et al. 2001; Jain 2000; Freiberg y Zhu, 2004).

1.1.3.2. Métodos químicos

Polimerización interfacial

Método basado en la reacción de Schotten-Barmann, en la que dos monómeros, uno lipófilo en una solución orgánica y el otro hidrófilo en una solución acuosa, forman una película polimérica en la interfaz de los dos líquidos inmiscibles. En general, la sustancia activa, en función de su solubilidad, se encuentra dispersado en una de las dos fases que contiene uno de los monómeros en disolución.

Algunos ejemplos de polímeros que pueden originarse: poliamidas, poliureas, poliésteres, polisulfonamidas, policarbonatos, policianoacrilatos, etc. En este caso, los monómeros y los agentes reticulantes se encuentran tanto en la fase continua como en la dispersa (Scher y cols., 1998; Cho y cols., 2002).

Polimerización in situ

Proceso en el que polímeros de bajo peso molecular o bien precondensados se polimerizan sobre la superficie de los núcleos de fármaco formando la película polimérica. En este caso, el material reactivo no está en contacto con el material a encapsular. La polimerización ocurre exclusivamente en la fase continua y en el lado de la interfase de ésta, originándose un pre-polímero de bajo peso molecular de forma que el tamaño de partícula aumenta por adición de un agente reticulante.

Los principales inconvenientes son que requiere varios pasos, control del pH, temperatura, etc. (Both y cols., 1999; Lee y cols., 2002; Brown y cols., 2003; Kim y cols., 2005).

Insolubilización rápida del polímero

En este caso la formación de las microcápsulas ocurre por insolubilización del polímero, de un polisacárido, por neutralización del punto isoeléctrico. Generalmente, se recurre a la gelificación de alginato sódico (anión) con cloruro cálcico (catión). El método consiste en vehiculizar el material a encapsular en una solución acuosa de alginato sódico la cual se adiciona mediante goteo sobre una solución acuosa de cloruro cálcico que se encuentra en agitación continua.

La gran ventaja de este método es que el proceso se lleva a cabo en condiciones muy suaves al no requerir el uso de disolventes orgánicos, calor, agitación enérgica ni agentes reticulantes perjudiciales. Por estas razones es el método de elección para la inmovilización de células (Orive y cols., 2002; Maguire, y cols. 2005; Wang y cols. 2006; Pereira, 2005).

Se trata de un método rápido y sencillo que permite combinar otros tipos de insolubilización como puede ser la térmica. En este caso el polímero de elección suele ser la agarosa la cual funde a 90 °C manteniéndose fundida a t.a. (Orive y cols. 2003; Cellesi y cols., 2004).

Otra variante del método sería emulsión / gelificación interna la cual permite la encapsulación de agentes lipófilos. En este caso se requiere la formación previa de una emulsión tipo a/o y el uso de sales de cloruro cálcicas insolubles en la disolución de alginato. En pasos posteriores se liberaran los iones Ca^{2+} que gelarán al alginato (Poncelt, 1999).

Emulsión - polimerización

Consiste en una polimerización aniónica iniciada por bases covalentes, por ejemplo, grupos OH^- provenientes de la disociación de H_2O . Ocurre en medio acuoso y finaliza con la adición de cationes que neutralizan las cadenas. Se lleva a cabo mediante el goteo del monómero en una solución acuosa acidificada con HCl (pH 1.0 - 3.5) conteniendo un surfactante y un estabilizador. La acidificación del medio produce polímeros de mayor peso molecular y por tanto micropartículas más estables lo que retarda la degradación de éstas (Ekman y Sjöholm, 1978; Soppimath y cols. 2001).

Permite la producción de partículas huecas para diferentes aplicaciones (McDonald y Devon, 2002), por ejemplo, para mejorar la calidad y resolución de pinturas ya que tienen menor densidad que los pigmentos inorgánicos y son capaces de dispersar la luz. También se emplean para recubrimientos de papel.

1.1.3.3. Métodos mecánicos

Atomización

Consiste en la atomización de la sustancia activa, previamente dispersada o disuelta en una solución constituida por el material de recubrimiento, en el seno de una corriente de aire. Se distinguen dos procesos:

- *spray drying*, donde se atomiza una disolución o una suspensión en el seno de una corriente de aire caliente
- *spray congealing* en este caso es atomizada una sustancia fundida en una corriente de aire frío.

En la figura 5 se presenta un esquema de un *spray drying*, actualmente estos equipos pueden ser adaptados para funcionar como *spray congealing* mediante un vaso de alimentación termoregulado, un dispositivo de calefactor y una válvula de alimentación

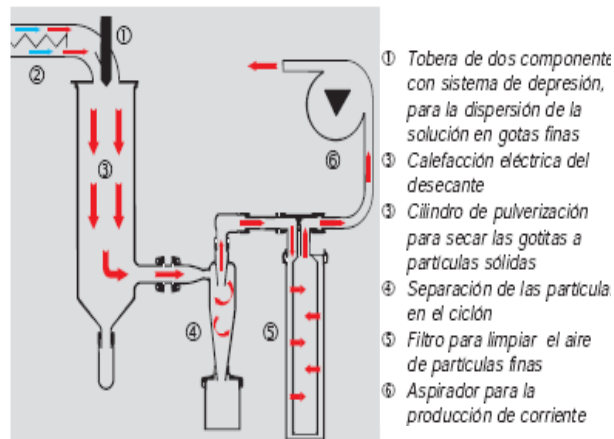
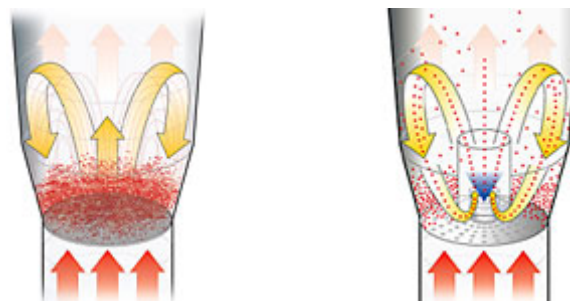


Figura 5. Esquema de un equipo de spray drying (www.buchi.com, enero 2007)

Se trata de uno de los métodos más empleados en la actualidad ya que es un método sencillo, reproducible y poco dependiente de las características de solubilidad del polímero y el material a encapsular. Sin embargo, el tamaño de partícula, así como, la monodispersión son parámetros difíciles de controlar. En este sentido TurboSonic Technologies Inc. y más recientemente, SonoTek Corp. han desarrollado nuevos atomizadores con el fin de controlar estos aspectos (Kwok y cols. 1991; www.sono-tek.com enero 2007) el segundo de ellos mediante el empleo de vibración.

Lecho fluido

Consiste en la atomización de la dispersión polimérica sobre el principio activo que está suspendido en una corriente de aire caliente, a medida que el solvente polimérico se elimina el polímero se deposita sobre las partículas (ver figura 6). Puede ocurrir que el núcleo sea inerte y sobre éste se atomice una solución del principio activo y el polímero. Al alcanzar las partículas un cierto peso, superior al que puede soportar la columna de gas, las micropartículas se deslizan por su propio peso hacia la zona de salida de la columna.



(a) Fluid Bed Drying

(b) Fluid Bed Coating

Figura 6. Esquemas de dos tecnologías de lecho fluido (www.glatt.com, enero 2007): (a) lecho fluido secado, (b) lecho fluido recubrimiento

Pan coating

Este es el método menos complejo de encapsulación utilizado hoy día. El proceso ocurre dentro de un recipiente giratorio dentro del cual se coloca un inyector que, mediante *spray*, vierte sobre la materia a encapsular el material encapsulante de manera uniforme. Se aplica calor en el recipiente de manera que se evapora el solvente del material encapsulante y se forma una capa dura. Si el aire caliente que se introduce es demasiado húmedo, entonces el tiempo de secado aumentará significativamente, disminuyendo el rendimiento. El factor crítico que controla el rendimiento es el secado del material encapsulante. Las desventajas de esta técnica son que se obtiene una distribución de tamaños poco uniforme y requiere una gran habilidad del operador. Por tanto este método está siendo menos empleado que otras técnicas.

1.1.3.4. Otros métodos

Una vez dada una visión general de los métodos “tradicionales” de microencapsulación, a continuación, se presentan otros métodos y técnicas no clasificadas en los grupos anteriores. Se trata de métodos / técnicas desarrolladas más recientemente para la microencapsulación de sustancias.

Liposomas

Los liposomas son vesículas que se forman cuando películas de fosfolípidos son dispersadas en un medio acuoso donde está solubilizada la sustancia activa, son un tipo de cápsula con propiedades más versátiles y menos frágiles que aquellas hechas de grasa.

Se emplean fundamentalmente para transportar principios activos de forma selectiva, han sido empleados para la liberación de vacunas, enzimas y vitaminas en el organismo y consisten de una o más capas de lípidos no tóxicos y aceptables en alimentos; la permeabilidad, estabilidad, actividad superficial y afinidad pueden variar con el tamaño y la composición del lípido.

Estructuralmente existen tres tipos de liposomas: multilamelar, vesículas de un compartimiento y macrovesículas. La sonicación permite la formación de un solo compartimiento de vesículas, mientras que las macrovesículas son formadas por inyección de soluciones de lípido en un tampón de fosfatos. Otros métodos de fabricación son evaporación en fase reversa, vaporización con disolvente, congelación-descongelación y extrusión, deshidratación-rehidratación (Balaguer-Fernández y cols., 2006)

Los liposomas pueden ser obtenidos con cargas positivas por la adición de aminos o con cargas negativas por la adición de fosfatidil serina o diacetil fosfato. Materiales

hidrofilicos e hidrofóbicos pueden ser atrapados en liposomas; los compuestos hidrofílicos son disueltos en agua y mezclados con una película lipídica para formar liposomas, mientras que los materiales hidrofóbicos son embebidos en una delgada película de lípido. La liberación del principio activo se realiza por difusión a través de la bicapa, por destrucción de la vesícula, por medio de una concentración crítica de iones calcio o por un cambio de pH. Las sustancias activas solubles en agua presentan una mejor eficiencia de encapsulamiento que las hidrófobas. Los liposomas son usados con éxito en la encapsulación de sistemas enzimáticos, sin embargo, el uso de disolventes orgánicos limita su uso.

En función de la naturaleza del fármaco su alojamiento en el liposoma será diferente (ver figura 7).

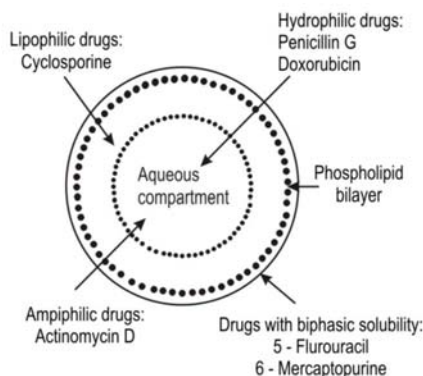


Figura 7. Esquema de la encapsulación de una sustancia hidrosoluble mediante el empleo de liposomas (<http://www.cinvestav.mx>, 2006)

Las principales ventajas de los sistemas liposomales son su capacidad de direccionamiento, su capacidad de interactuar con las células y posibilidad de introducir determinados compuestos en las células, así como su capacidad de actuar como reservorio y liberar lentamente el principio activo.

El principal inconveniente de estos sistemas es que son poco estables química y físicamente (escape-difusión, fusión, oxidación, hidrólisis), presentan baja solubilidad, baja capacidad de carga del material a encapsular, baja semivida plasmática y el proceso de producción resulta costoso no siendo fácil la producción a nivel industrial (Patil y cols., 2005, Balaguer-Fernández y cols., 2006).

Capa a capa (layer-by-layer, LBL)

Mediante la tecnología LBL (layer-by-layer) las microcápsulas son formadas en varios pasos, cada paso consiste en el ensamblaje de un polielectrolito cargado positiva o negativamente en el que va disuelto la sustancia que se desea encapsular formando

una fina película alrededor una partícula que actúa como núcleo, generalmente nanoesferas de sílice (Yang y cols. 2005) o poliestireno (Yang y cols., 2001), en otras ocasiones es la propia sustancia a encapsular la que actúa como núcleo (Ye, 2005). En el siguiente paso otro polielectrolito, de carga opuesta al anterior, interacciona electrostáticamente formando un complejo.

Por otro lado, el núcleo de la micropartícula puede ser modificado, puede disolverse obteniendo partículas huecas y/o rellenarse con moléculas funcionalizadas (Zhang, 2005).

Las ventajas más importantes de esta tecnología son que permite controlar el espesor de la pared y el tamaño de partícula, los principales inconvenientes son que la formación de la partícula requiere varios pasos, para obtener partículas de aspecto uniforme se requieren materiales de muy alta calidad y la eficacia de la incorporación del material es baja lo que supone un encarecimiento del proceso.

Hinchamiento

Este método de microencapsulación consiste en incorporar el material a encapsular a micropartículas previamente producidas, generalmente suelen ser a partículas de poliestireno. Para ello las MPs han de ser tratadas con disolventes orgánicos de esta forma se provoca un hinchamiento de la matriz polimérica permitiendo la entrada del material deseado. A continuación, se procede al secado de las partículas, retirando los disolventes con líquidos extractores (Mulvaney y cols., 2004) o simplemente calentando (Bradley y cols., 2005).

Los principales inconvenientes de esta técnica son que son necesarios múltiples pasos, la encapsulación poco eficiente y que el proceso es dependiente de los materiales de partida, sin embargo, puede ser ventajosa frente a otras técnicas en determinados casos, por ejemplo, en la encapsulación de QDs frente a polimerización *in situ* ya que se evita la formación de agregados (Bradley y cols., 2005).

Emulsificación mediante membranas porosas

La emulsificación mediante membranas es una técnica relativamente reciente para la producción controlada de partículas. Las primeras investigaciones son de los años 80 cuando Nakashima y Shimizu (1986) fabricaron unas particulares membranas de vidrio llamadas "Shirasu Porous Glass" (SPG) (Vladisavljevic y Williams, 2005).

Actualmente el material de la membrana puede ser: vidrio, cerámica, acero inoxidable y celulosas.

Esta técnica, permite la producción de emulsiones simples de los dos signos a/o y o/a y de emulsiones dobles tipo a/o/a (Ma y cols, 2004).

El funcionamiento de estos sistemas consiste en hacer pasar la fase dispersa a través de la membrana la cual se encuentra rodeada de fase continua circulando de forma constante (ver figura 8). Es importante que la membrana no sea mojada por la fase dispersa por lo que antes de su uso debe ser mojada por la fase continua así, por ejemplo, para la producción de emulsiones o/a utilizaríamos una membrana hidrofílica que mojaríamos con agua (Charcosset y cols., 2004).

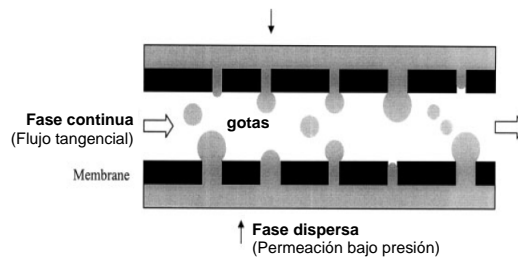


Figura 8. Esquema de funcionamiento de una membrana porosa (Charcosset y cols., 2004)

Las principales ventajas de esta técnica son que es posible controlar el tamaño de gota seleccionando adecuadamente la membrana, requiere poca energía en comparación con los métodos mecánicos convencionales y es fácil de escalar utilizando varias membranas por módulo. Actualmente existe un producto comercial producido con estas membranas “Yes light” un paté/pasta bajo en grasa de *Moringa Milk Industry Co.*, Japón (Charcosset y cols., 2004). Los principales inconvenientes son que no permite la producción de forma continua, ha de ser lote a lote, el tamaño de gota depende del tamaño de poro y los caudales de la fase dispersa son muy bajos por lo que la capacidad de producción es pequeña.

Fluidos supercríticos (Supercritical fluids, SCFs)

Se trata de una técnica de micronización usada ampliamente en la industria basada en la utilización de dos disolventes líquidos completamente miscible de forma que el soluto a micronizar sólo es soluble en uno de ellos. Así, la adición del antisolvente induce la formación de una solución de dos líquidos y la supersaturación y precipitación del soluto (Falk, 1997; Reverchon, 1999; Martín, 2001). La propiedad que caracteriza a los SFCs es que son una fase intermedia entre líquido y gas.

Esta única fase se consigue al someter al fluido a presiones y temperaturas cercanas a su punto crítico. Cerca de este punto crítico, pequeños cambios de presión o temperatura provocan cambios significativos en sus propiedades fisicoquímicas (por ejemplo: densidad, solubilidad, difusividad, etc.). Esta característica los hace especialmente útiles en procesos de síntesis, cromatografía, catálisis, etc. de forma que han desplazado a algunos disolventes orgánicos como los hidrocarburos

halogenados por su alta toxicidad siendo el dióxido de carbono supercrítico (sc-CO₂) una buena alternativa al no presentar toxicidad para el medioambiente ni para la salud (<http://pubs.acs.org/subscribe/journals/tcaw/11/i02/html/02regs.html>, enero 2007). Se utilizan nombres diferentes para describir este proceso, el más utilizado es “PCA” (precipitation by compressed antisolvent), sin embargo, algunos autores consideran que el más apropiado sería “SAS” (supercritical antisolvent) (Reverchon, 1999). En la figura 9 se muestra un esquema de estos equipos.

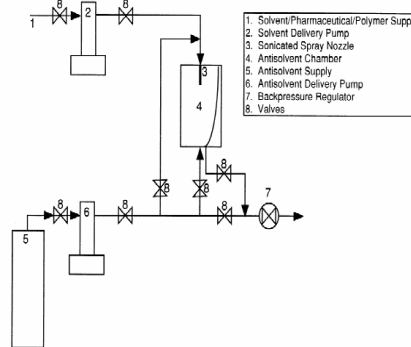


Figura 9. Esquema de un equipo de PCA (Falk y cols. 1997)

Su principal ventaja es que permite controlar la morfología de las partículas y reducir el uso de disolventes orgánicos. Permite trabajar en continuo o lote a lote, en función del montaje del dispositivo. La clave en los montajes en continuo es la inyección de líquido, generalmente se utilizan nebulizadores que generan pequeñas gotas por rotura de un chorro, otros dispositivos utilizados para la generación de gotas son la extrusión de líquido a través de capilares o la utilización de orificios sometidos a vibración.

Los principales factores que afectan tanto al tamaño como a la morfología de las partículas son: la velocidad de inyección del líquido, el tipo de inyector empleado, el proceso de lavado una vez finalizado el proceso (un mal lavado hará que no se elimine completamente el solvente y resolubilice al soluto), temperatura, volumen de expansión del solvente, etc. Uno de los principales inconvenientes de esta técnica es que el soluto entra en contacto con disolventes orgánicos lo que puede provocar la desnaturalización de biomoléculas, otro inconveniente es que el número de solventes está limitado y una gran mayoría de moléculas terapéuticas no son solubles en ellos. Para evitar el contacto de los solutos con los disolventes orgánicos se están utilizando nebulizadores concéntricos (Bustami, 2000).

Para finalizar este apartado y a modo de resumen, en la tabla 1 se han recogido las principales características de los métodos y/o técnicas de microencapsulación anteriormente expuestos.

MÉTODO QUÍMICOS / FÍSICOQUÍMICOS	VENTAJAS	INCONVENIENTES	Rango tamaños (µm) (*)
Polimerización interfacial	p.a. lipo o hidrosoluble	Material reactivo en contacto con p.a Ajuste proporciones reactivos	1 - 500
Polimerización <i>in situ</i>	Material reactivo no contacto con p.a. Producción masiva	Formación pre-polímero Control pH, T p.a. liposoluble Ajuste proporciones reactivos Múltiples pasos Baja versatilidad	1 - 500
Insolubilización rápida del polímero	Condiciones suaves Sencillo		
Coacervación o separación de fases	Protección a oxidación y volatilidad	Control pH, T Ajuste proporciones reactivos	1 - 500
Emulsión -extracción- evaporación del disolvente	Coste	Baja eficacia encapsulación Múltiples pasos	1 - 500
MÉTODO FÍSICOS O MECÁNICOS	VENTAJAS	INCONVENIENTES	Rango tamaños (µm)
Atomización	Escalable Sencillo	Alto consumo energía Posible deterioro p. termolábiles	20 - 150
Lecho fluido	Escalable		50 - 10000
Pan Coating	Alta producción	Poco control tamaño Dependiente del operario	> 500
OTROS	VENTAJAS	INCONVENIENTES	Rango tamaños (µm)
Liposomas	Direccionables Interacción con células	Inestables Costoso	0.1 - 1
Hinchamiento	No formación agregados	Múltiples pasos Encapsulación poco eficiente Proceso dependiente de los materiales de partida	
Membranas porosas	Control tamaño	Tamaño dependiente Ø poro No producción en continuo Baja productividad	
Capa a capa	Sencillo Control tamaño	Múltiples pasos Coste Proceso muy preciso y exacto sin margen de error	
SCF	Control morfología Reducción dvtes. orgánicos	Nº solventes limitados Posible desnaturalización biomoléculas	0.1 - (**)

(*) <http://www.swri.org/3pubs/brochure/d01/microen/microen.htm>, 2007-01-03

(**) Falk, 1997

Tabla 1. Tabla resumen de las técnicas y/o métodos de microencapsulación empleados en la actualidad

1.2. MÉTODOS DE GENERACIÓN DE GOTAS

Hasta el momento hemos expuesto los métodos y tecnologías existentes para la producción de micropartículas y hemos explicado qué fenómenos llegan a estabilizar esas partículas pero no se ha explicado cómo se originan realmente. En la mayoría de los casos el origen es una gota que luego por aplicación del proceso conveniente, solidifica originando una partícula sólida. Así, podemos decir que el paso determinante en la producción de las partículas es la generación de gotas el cual condicionará la distribución de tamaño de la partícula. El tamaño, la distribución de tamaños y la estructura de la partícula determinarán su utilidad en cada aplicación.

A continuación, se describen de forma resumida los métodos y sistemas actuales empleados para la generación de gotas implicadas en la producción de micropartículas. Los hemos divididos en tres grupos en función de su capacidad de controlar el tamaño de gota y su productividad.

1.2.1. Sistemas de alta productividad y bajo control del tamaño de gota

A nivel de producción, los sistemas más interesantes son aquellos métodos que producen gotas de forma masiva, con una elevada capacidad de producción. Entre ellos encontramos los sistemas de agitación y los mezcladores estáticos (Maa y Hsu, 1996; Wischke y Borchert, 2006).

Los primeros no trabajan en continuo mientras que los segundos sí (ver figura 10). Con estos equipos es posible emplear líquidos con valores de viscosidades y densidades muy diferentes.

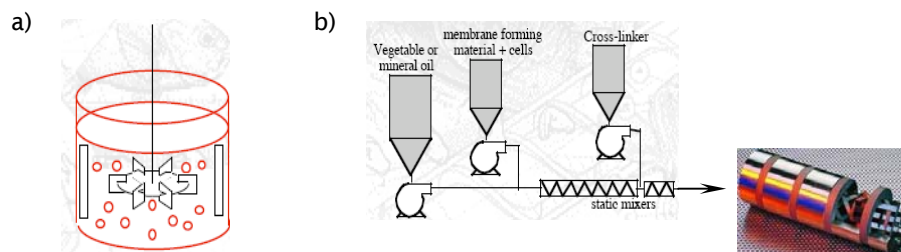


Figura 10. Equipos empleados para la formación de emulsiones en procesos de microencapsulación: a) equipo de agitación de palas y b) mezclador estático (Poncelet, 2007)

Otro sistema de generación de gotas es la utilizada por los equipos de *spray drying*, se trata de nebulizadores neumáticos capaces de atomizar grandes cantidades de volumen por unidad de tiempo pero con escaso control del tamaño de gota.

La estabilización de las gotas producidas por estos equipos se llevaría a cabo por los métodos de coacervación, emulsión- evaporación del disolvente, polimerización interfacial y gelificación iónica o térmica.

Las ventajas de estos sistemas son que son rápidos (dispersión en menos de 1 segundo), baratos, sencillos y de alto rendimiento (m^3/h). Sin embargo, el tamaño de partícula no es predecible y la distribución del tamaño de partícula es muy amplia.

1.2.2. Sistemas con baja productividad y alto control del tamaño de gota

Nos referimos los procesos de *dripping* o goteo. La formación de la gota ocurre por extrusión directa, una gota eventualmente se desprende dando lugar a la formación de una nueva gota, la caída de la gota se produce cuando las fuerzas de capilaridad se ven superadas por las fuerzas de gravedad. El fenómeno está gobernado por tres números adimensionales (número de Reynold, número capilar y número de Bond). La extrusión puede ser simple o compuesta donde varios líquidos son extruidos de forma simultánea en una disposición concéntrica (ver figura 11).

Otros serían la emulsificación mediante membranas porosas (Omi, 1996; Cui, 2004; Charcosset, 2004; Ma 2004) o la emulsificación mediante dispositivos de microfluídica (Quevedo y cols. 2005; Su y cols. 2005), estos últimos utilizados únicamente a nivel experimental.

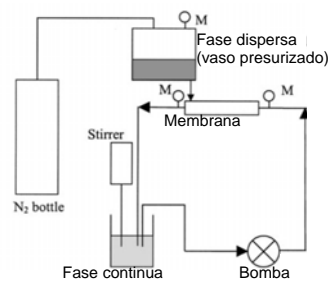


Figura 11. Dispositivo de funcionamiento de un equipo de membranas porosas

Estos sistemas, aunque son capaces de producir partículas monodispersas, producen un bajo número de partículas por unidad de tiempo, el tamaño es del orden del tamaño del orificio de salida (del capilar o del poro de la membrana) por lo que es muy difícil obtener partículas en la escala micrométrica. Una reducción del tamaño de partícula conlleva una reducción del tamaño del orificio de salida lo cual implica numerosos problemas en la fabricación del dispositivo, en su manejo, problemas de atascamiento, etc.

1.2.3. Sistemas con alta productividad y alto control del tamaño de gota

Otro grupo de tecnologías que generan gotas de forma masiva son aquellos relacionados con la rotura de chorros de líquido, técnicas de atomización. Existen numerosos tipos de inyectores capaces de inyectar líquidos con suficiente energía para provocar su rotura o atomización en pequeñas gotas. La aportación de energía puede llevarse a cabo por diferentes mecanismos: presión de líquido, presión de aire, rotación, vibración, campo eléctrico, etc.

Los mecanismos de generación del chorro y su rotura en gotas pueden ser diferentes pero todos tienen en común el control sobre el tamaño de gota y están basados en el fenómeno descrito por Lord Rayleigh a finales del siglo XIX el cual demostró que la rotura en gotas es el resultado de una inestabilidad hidrodinámica provocada por la tensión superficial (ver capítulo siguiente).

A continuación, se describen las técnicas de generación y rotura de chorros empleadas en la actualidad para la producción de micropartículas monodispersas basadas en este principio.

1.2.3.1. Vibración

Se trata de una de las técnicas más empleadas para la inmovilización de células. Se basa en la rotura de un chorro laminar por imposición de vibración. La frecuencia necesaria aumentará a medida que aumente la velocidad del chorro. Los parámetros de vibración óptima han de ser determinados utilizando una luz estroboscópica. Una vez determinados, éstos pueden ser reajustados de forma que el proceso llega a ser muy reproducible. Fuera del rango de frecuencia óptimo las gotas dejan de ser monodispersas por la aparición de satélites. A medida que la velocidad del chorro aumenta el rango de frecuencia óptimo es más amplio (Gotoh, 1991).

La tecnología, para la producción de micropartículas está comercializada por dos empresas suizas, Inotech Biotechnoly Ltd. Y Nisco Ltd.

El rango de tamaño de partícula que se puede obtener con este sistema es 0.10-1.50 mm con una baja dispersión (5-10 %). El funcionamiento es óptimo con fluidos de baja viscosidad. Los equipos permiten cargar las partículas que se van formando de forma que se evita la coalescencia. En la figura 12 se muestran el principio de funcionamiento (a) y un dispositivo múltiple (b).

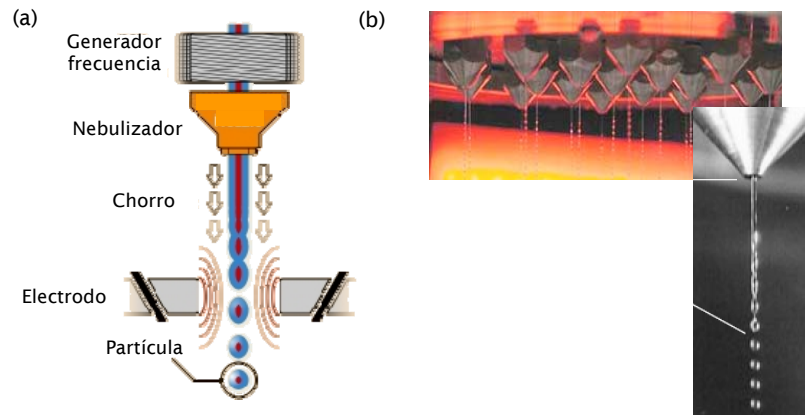


Figura 12. (a) Esquema de la rotura del chorro en pequeñas gotas por imposición de vibración (<http://www.gate2tech.com>) (b) dispositivo múltiple de Inotech y detalle de la rotura

El tamaño de partícula va a depender de la frecuencia de vibración, viscosidad, tensión superficial y densidad de la solución polimérica, así como de la velocidad de inyección. Las técnicas de solidificación aplicables son gelificación (Gotoh y cols., 1991; Del Gaudio y cols., 2005), coacervación, polimerización, emulsión-evaporación y solidificación de una sustancia fundida.

1.2.3.2. Jet Cutter

La generación de las gotas se produce al cortar un chorro de un fluido proveniente de un nebulizador con un *cutter* que va rotando a cierta velocidad (ver figura 13). El chorro es cortado en segmentos cilíndricos que se convierten en esferas debido a la tensión superficial en su camino hacia el baño de gelación. Manteniendo constantes la velocidad del fluido y la del *cutter* se obtendrán esferas monodispersas.

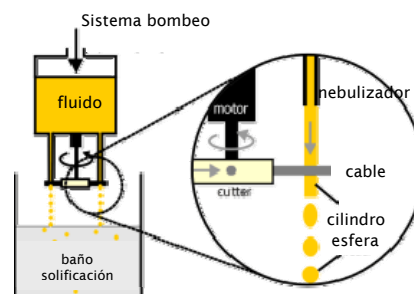


Figura 13. Principio básico de funcionamiento de un “jet cutter”

La tecnología, comercializada por GeniLab GmbH (Alemania) (www.genilab.de), está indicada para la producción de gotas monodispersas preferiblemente empleando fluidos viscosos. Dependiendo de la naturaleza del fluido la solidificación de las gotas podrá ser por gelificación, enfriamiento o por acción iónica en una solución apropiada de curado.

El rango de tamaños de partícula producidas con este sistema es 120 μm - 3 mm. Es posible utilizar fluidos con valores altos de viscosidad, sin embargo, existe un límite mínimo de viscosidad, entorno a 200 cP. La producción es de 10^4 partículas por segundo y nebulizador siendo fácilmente escalable.

Al cortar el chorro de la solución polimérica siempre hay una parte que se pierde que en principio puede ser reciclada. Esta pérdida se puede minimizar dando cierto ángulo a la herramienta de corte, existe un *software* para calcular el ángulo óptimo. Otra forma de reducir esa pérdida sería disminuyendo el grosor del *cutter*.

1.2.3.3. Disco rotatorio

En este caso la rotura del fluido se consigue aplicando fuerzas centrífugas, el líquido cae a cierta velocidad sobre un disco giratorio (ver figura 14). Gracias a la adhesión por humectación y por la viscosidad del fluido éste se extiende uniformemente por el disco. De esta forma y bajo ciertas condiciones el líquido abandona el disco rompiendo en gotas uniformes. Si la viscosidad del líquido es demasiado alta o el disco no es el adecuado se formarán hilos o incluso películas que serán desintegradas en gotas de diferentes tamaños (Senuma y cols., 2000).

Generalmente, se utiliza para recubrir partículas sólidas pero también permite la encapsulación de células (Senuma y cols., 2000). El proceso ocurre básicamente en tres pasos: distribución del líquido por el disco, formación de las gotas y solidificación de éstas.

El diseño y las dimensiones del disco son los puntos clave que condicionarán la formación de las gotas. El tamaño de gota dependerá de la densidad y viscosidad del fluido así como de la velocidad, de la aceleración y velocidad angular y del radio del disco. El diámetro de gota viene dado por la expresión:

$$dg = \frac{2.69r}{\sqrt{We}}$$

donde r es el radio del disco y We el número de Weber (Senuma y cols., 2000).

Se trata de un sistema barato, rápido, capaz de producir en continuo. Se requiere fluidos de alta viscosidad (5000-10000 cP), el tamaño mínimo de partícula que se puede obtener con este sistema está en torno a 100 μm .

Existen varias empresas que comercializan esta tecnología (PCT, SwRI, Niro) actualmente hay cuatro plantas comerciales y 6 prototipos de PCT.

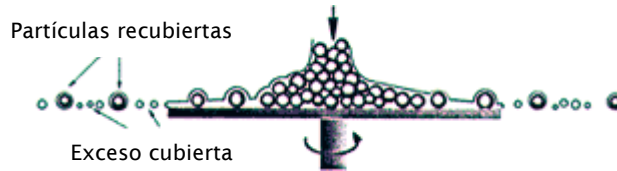


Figura 14. Esquema de funcionamiento de un disco rotatorio (PCT) (<http://www.pctincusa.com>, 2007)

1.2.3.4. Formación de gotas asistida por campo eléctrico

La atomización mediante el empleo de campo eléctrico o *electrospray* permite la obtención de aerosoles monodispersos en la escala nano- y micrométrica. Consiste en cargar el líquido colocando un electrodo en su interior, de forma que al crear un campo eléctrico suficientemente elevado ($U > U_{cr}$) éste deforma el líquido creando un menisco de forma cónica debido al balance entre fuerzas capilares y electrodinámicas (Taylor, 1964). La carga y la masa chorro son emitidas desde el vértice del cono en forma de un fino chorro el cual irá disminuyendo su diámetro a medida que se aleja del capilar, hasta que rompe en pequeñas gotas monodispersas (Barrero y cols., 1998). Al aplicar el voltaje aumenta la frecuencia a la que se forman las gotas y disminuye el tamaño de éstas. A medida que aumenta el potencial el chorro se hace más fino y las gotas más pequeñas.

El sistema puede trabajar también en modo *dripping* donde solo fragmentos del líquido son proyectados del capilar (ver figura 15a).

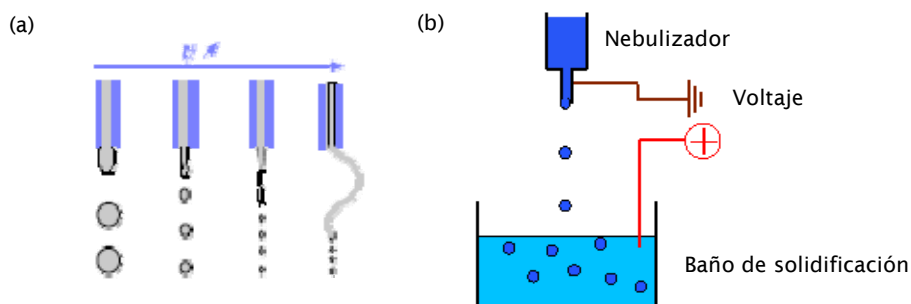


Figura 15. (a) Efecto del aumento de potencial eléctrico en la rotura del chorro y (b) montaje del dispositivo (www.nisco.ch, 2007)

En la actualidad, existen equipos comerciales que utilizan este principio para la producción de micropartículas. Uno de ellos es el comercializado y desarrollado por Nisco Engineering AG (Suiza) (www.nisco.ch) (Fig. 15b). Su principal uso es la inmovilización de células empleando el método de gelificación (Cui, 2004; Maguire, 2006). El diámetro del capilar puede variar entre 0.170 y 0.400 mm de diámetro hacia el baño de gelación.

Las principales partes del equipo son un generador capaz de proporcionar 0-10kV, una bomba de jeringa y un magnetoagitador. El equipo está diseñado para producir 2.400 partículas / min utilizando un único nebulizador. El rango de tamaños es de 200-1000 μm con una desviación del 3-6 %. Es posible utilizar soluciones de un amplio rango viscosidades, el tamaño de partícula dependerá del voltaje aplicado, distancia entre la salida del nebulizador y el baño (óptima 10mm), la viscosidad de la solución, caudal y tamaño nebulizador.

Los principales factores que afectan al tamaño de la partícula son la posición del electrodo, el diámetro del capilar, el voltaje, tensión superficial y viscosidad, caudal de inyección del fluido así como la distancia a la que se encuentre el baño de solidificación (Goosen, 1997; Poncelet, 1999; Nedović, 2001).

1.2.3.5. Técnicas de microenfocamiento fluídico: Flow Focusing

Mediante esta técnica la formación del chorro de un fluido ocurre en el seno de una corriente laminar de otro fluido altamente acelerado (ver figura 16). Los dos fluidos han de ser inmiscibles entre sí y a diferencia de todas las técnicas expuestas anteriormente el chorro sale a través de un orificio situado enfrente del capilar por el que es inyectado el fluido “interno” o “enfocado”. La tecnología conocida también como Flow Focusing fue desarrollada a principios de los años 90 por el grupo de investigación del Prof. Alfonso Gañán Calvo (Dpto. Ingeniería Aeroespacial y Mecánica de Fluidos, Universidad de Sevilla). Se trata de una técnica capaz de producir gotas monodispersas de forma masiva, en la escala micrométrica, con posibilidad de trabajar en varias configuraciones lo que permite adaptarla la mayoría de los métodos y técnicas de microencapsulación anteriormente expuestas.

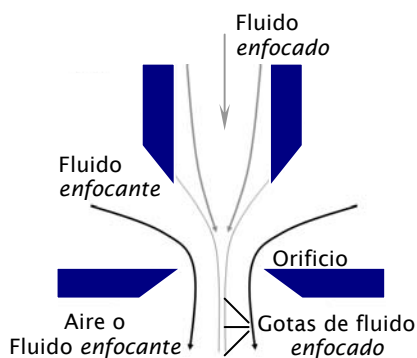


Figura 16. Esquema de la configuración básica de un nebulizador FF

La base de este trabajo es la aplicación de la tecnología Flow Focusing para la producción de micropartículas poliméricas por lo que el siguiente capítulo se dedicará exclusivamente a explicar la base de la tecnología, sus fundamentos físicos, así como las ecuaciones que la rigen.

A modo de resumen, en la tabla 2 se muestran las principales características de las distintas técnicas de generación de gotas con alta productividad y alto control del tamaño de gota.

Tecnología	Rango tamaños	Dispersión (%)	Producción (part./s)	Rango viscosidad	Casa comercial
Generador electroestático	200 -1000 μm	3 - 6	10^5 (*)	Amplio	Nisco
Jet Cutter	120 μm - 3 mm	5 - 10	10^4	200 cP mínimo	GeniLab
Vibración	0.1 - 1.5 mm	5 - 10	(**)	Baja (<100cP**)	Inotech, Nisco
Disco rotatorio	0.5 - 6 mm	5 - 25 (*)	g/min - ton/año (*)	5000-10000 cP	PCT, SwRI
Flow Focusing	0.5 - μm	< 10	10^6	Baja (<100 cP)	Ingeniatrics Tecnologías

(*) Senuma y cols. 2000; (**) Del Gaudio y cols. 2005

Tabla 2. Tabla resumen de las técnicas de generación de gotas empleadas en el campo de la microencapsulación con alta productividad y alto control del tamaño de gota

1.2.3.6. Otras

Otras técnicas de generación de gotas son las técnicas de inyección de tinta (“Ink jet printing”). Éstas han sido desarrolladas y han ido evolucionando de acuerdo con las necesidades de impresión tanto a nivel doméstico como industrial, sin embargo, en los últimos años han ido jugando un papel más importante en diferentes campos: química analítica, se han desarrollado métodos para la detección de moléculas fluorescentes, *arrays* de DNA, etc. Son capaces de manejar cantidades muy pequeñas de líquido a

gran velocidad por lo que son susceptibles de ser utilizadas para la producción de micropartículas (Basaran, 2002; Yeo y cols., 2003, Böhmer y cols., 2006).

En la figura 17 están representados tres técnicas diferentes de inyección de tinta.

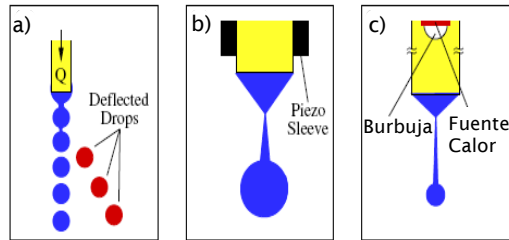


Figura 17. Representación de tres técnicas de inyección de tinta: (a) continua (CIJ), (b) a demanda controlada por temperatura (TIJ) y (c) a demanda controlada por la expansión de una gota de vapor (Basaran, 2002)

En la figura 17a está representada una técnica de inyección de tinta en continuo (*continuous ink jet*, CIJ) desarrollada en los años 70 y con aplicación meramente industrial. Las otras dos técnicas son sistemas que trabajan de forma discontinua, a demanda (*drop on demand*, DOD). En 17b el responsable de la formación de las gotas es un transductor piezoeléctrico el cual cuando se aplica una diferencia de potencial contrae / relaja el tubo capilar. En el último caso, 17c, la gota sale del nebulizador empujada por la expansión de una gota de vapor generada por un sistema de calefacción situado cerca de la salida del nebulizador.

En todos estos casos el tamaño de la gota es del orden del tamaño del nebulizador, el objetivo es reducir el volumen de la gota para aumentar la resolución durante la impresión y aumentar la densidad en los *arrays* de DNA.

Otra técnica es la conocida como "pin tool" empleada fundamentalmente en *arrays* de DNA. En este caso, el líquido se inyecta a través de cilindros los cuales sujetan una gota que pende y que posteriormente es depositada sobre una superficie (ver figura 18). El dispositivo se mueve cerca del sustrato hasta que se forma un puente de líquido, entonces el cilindro es elevado rompiéndose el puente (Basaran, 2002).

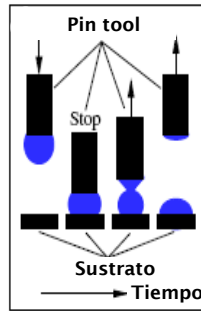


Figura 18. Esquema de funcionamiento de un sistema de cilindros o "pin tool" para la formación de gotas (Basaran, 2002)

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

MICROENFOCAMIENTO FLUÍDICO: FLOW FOCUSING

2.1. INTRODUCCIÓN

Como ya hemos apuntado en el capítulo anterior la tecnología Flow Focusing fue creada y desarrollada en los años 90 por el Prof. Gañán Calvo del actual Departamento de Ingeniería Aeroespacial y Mecánica de Fluidos de la Universidad de Sevilla. En el desarrollo intervinieron otros miembros de su grupo. La tecnología se encuentra en la actualidad protegida por más de una docena de patentes. Su descubrimiento permitió al Prof. Gañán Calvo junto con otros miembros especialistas en campos tan diferentes como biotecnología, electrónica, genética o propiedad intelectual, crear en el año 2002 una empresa tipo *spin-off*, Ingeniatics Tecnologías, para la explotación de esta tecnología. A lo largo de estos años el continuo estudio de la tecnología y sus posibles aplicaciones en diferentes áreas (biotecnología, industria automovilística, industria alimentaria, etc.) han resultado en el descubrimiento de nuevos fenómenos y en el desarrollo de nuevas tecnologías relacionadas como son *Flow Blurring* (FB) o *Electro Flow Focusing* (eFF).

En todas las técnicas de atomización hay tres propiedades de los fluidos que son relevantes: densidad, viscosidad y tensión superficial. Para la mayoría de líquidos la densidad (ρ) es del orden de 1000 Kg/m³, la tensión superficial (σ) es del orden de 10⁻² N/m y la viscosidad dinámica puede variar entre 10⁻⁴ a 1 Kg/ms. Los valores de ρ son prácticamente independientes de la temperatura o la presión, los de σ y μ , sin embargo, disminuirán al aumentar la temperatura y se ven poco afectados por la presión.

Las fuerzas que actúan en un proceso de atomización típicamente importantes son las derivadas de la gravedad, inercia, tensión superficial y fuerzas viscosas.

De estas fuerzas resultan una serie de grupos adimensionales bien conocidos que a continuación describimos:

- Número de Weber (We), mide la importancia relativa de las fuerzas debidas al incremento de presión ΔP_g y las fuerzas de tensión superficial (σ)

$$We = \frac{d_j \Delta P_g}{\sigma}$$

donde d_j es el diámetro del chorro (generalmente considerado a la salida del orificio).

- Número de Bond (Bo), mide la importancia relativa de la gravedad (g) y las fuerzas de tensión superficial (σ)

$$Bo = \frac{\rho g D^2}{\sigma}$$

donde D es el diámetro del orificio.

- Número capilar (Ca), relaciona la viscosidad (μ) con la tensión superficial (σ)

$$Ca = \frac{\mu v}{\sigma}$$

donde v es la velocidad media del fluido en el chorro (de nuevo, generalmente a la salida del orificio).

- Número de Ohnesorge (Oh), nos indica la importancia relativa de las fuerzas viscosas y las capilares

$$Oh = \frac{\mu}{(\rho \sigma d)^{1/2}}$$

- Número de Reynolds (Re), caracteriza el movimiento de un fluido permitiendo predecir si este será laminar o turbulento

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

Como ya hemos dicho en el capítulo anterior, en los procesos de atomización la aportación de energía puede llevarse a cabo por diferentes mecanismos: presión de líquido, presión de aire, rotación, vibración, campo eléctrico, etc. En el caso de la tecnología Flow Focusing (FF), la producción de gotas es el resultado de una combinación entre fuerzas hidrodinámicas y una geometría específica, no requiere la aplicación de fuerzas externas como vibración o campo eléctrico para producir gotas de forma masiva, monodispersas en la escala micrométrica (Gañán-Calvo, 1998a).

Se distinguen cuatro regímenes de operación para la rotura de chorros que podemos ver al representar en escala logarítmica los valores de Oh frente a Re o We frente a Re (ver figura 19).

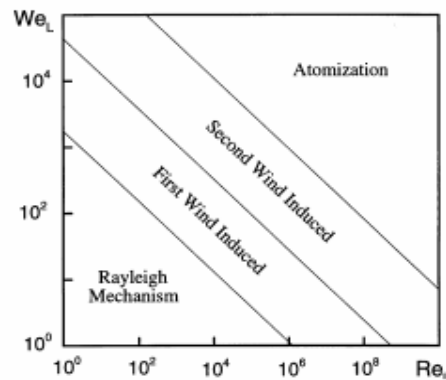


Figura 19. Modos de desintegración en función de los números de We y Re (Sirignano y Mehring, 2000)

El primero de ellos, para valores bajos de Oh y Re , el mecanismo de rotura es el descrito por Raileigh, rotura capilar. En este caso la interacción aerodinámica con el aire no es significativa. El crecimiento de una perturbación asiximétrica provoca la rotura del chorro cuando la amplitud se iguala al radio del chorro. En el segundo, no se producen oscilaciones asiximétrica y todavía el diámetro de gota es comparable al del chorro. En el tercer régimen, se producen gotas muy pequeñas mientras que en la zona de atomización se producen las gotas más pequeñas, para altos valores de Oh y Re . A medida que el número de We o de Oh aumenta la longitud de rotura tiende a disminuir y la rotura ocurre prácticamente a la salida del nebulizador.

El régimen de operación de FF sería el primero. FF se basa en la formación de un chorro de un fluido en el seno de una corriente laminar de otro fluido altamente acelerado, siendo los dos fluidos inmiscibles. Un nebulizador FF básico consiste en una cámara presurizada mediante la entrada continua de un fluido, fluido enfocante. Dentro de esta cámara otro fluido, fluido enfocado, es inyectado a través de un capilar cuyo extremo está enfrenteado al orificio de salida del nebulizador (ver figura 20). Utilizando esta geometría y bajo ciertas condiciones es posible obtener un chorro fino, estable, controlable, reproducible capaz de romper en gotas micrométricas monodisperas por inestabilidad capilar. Esta inestabilidad capilar está causada por pequeñas perturbaciones en el campo de flujo que construyen ondas sinusoidales en la interfaz del chorro provocando su rotura.

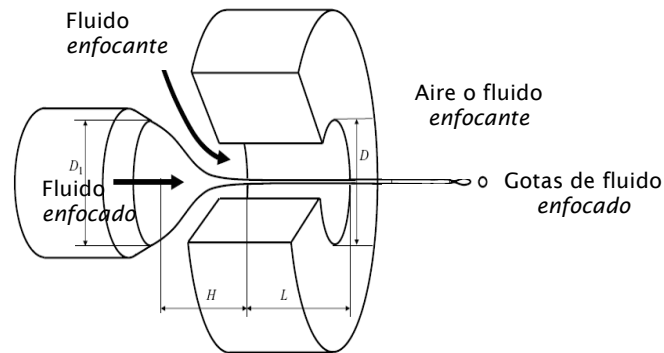


Figura 20. Esquema de la configuración básica de un nebulizador FF

2.2.1 Configuraciones posibles para un nebulizador FF

En función de la combinación de fluidos *enfocante* - *enfocado* que se emplee es posible tener las siguientes configuraciones y resultados (de aquí en adelante para facilitar la lectura las posibles combinaciones de fluidos se nombrarán desde el más externo al interno según el esquema de la figura 20):

- Gas - Líquido: en este caso un gas a presión rodea a un flujo de líquido dando lugar a la producción de microgotas del líquido *enfocado* de forma que el resultado final sería un aerosol muy fino de gotas del mismo tamaño (Fig. 21a) (Gañán-Calvo, 1998a,b; Gañán Calvo y Barrero, 1998, 1999; Almagro, 2004).
- Líquido-Gas: este sería el caso contrario al anterior, tendríamos un núcleo esférico de gas rodeado de líquido por lo que el resultado final sería la formación de microburbujas (Gañán-Calvo y Gordillo, 2001; Gañán-Calvo y cols. 2001; Gañán-Calvo, 2004; Gañán-Calvo y cols., 2004; Gordillo y cols., 2004; Lorenceau y cols., 2006)
- Líquido-Líquido: en esta situación el fluido *enfocante* es un líquido inmiscible con el *enfocado* de forma que se generarían gotas de líquido rodeadas de otro líquido, es decir una emulsión formada por gotículas del mismo tamaño (Fig. 21b). Las emulsiones son la base de la mayoría de los métodos de microencapsulación por lo que el presente trabajo se ha centrado en esta particular configuración (Anna y cols., 2003; Martín-Banderas y cols., 2005a).

Estas serían las configuraciones más simples que podríamos tener con un nebulizador FF pero es posible también utilizar capilares concéntricos de forma que dos fluidos serían enfocados por un fluido *enfocante*. El requisito mínimo que deben cumplir los tres fluidos es que sean inmiscibles entre ellos. De esta forma es posible obtener

verdaderas microcápsulas, así, controlando los caudales a los que se introducen los fluidos, es posible controlar tanto el espesor de la corteza como del núcleo (Fig. 21c)

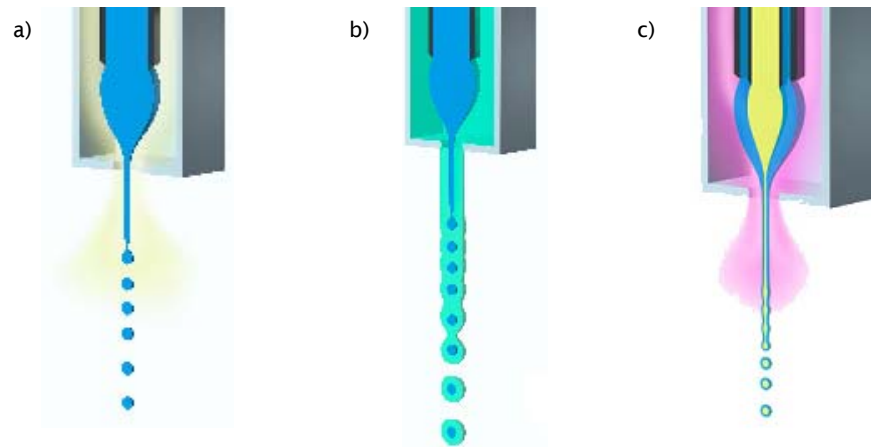


Figura 21. Posibles configuraciones para un nebulizador FF: a) simple gas-líquido, b) simple líquido - líquido y c) concéntrica

Hasta la fecha los trabajos de investigación del grupo del Prof. Gañán Calvo se han centrado básicamente en las configuraciones donde intervienen líquidos y gases. Ha sido en base a estas configuraciones a partir de las cuales se ha llevado a cabo todo el desarrollo matemático y experimental de forma que el fenómeno en estas configuraciones está perfectamente estudiado y validado mediante las ecuaciones que lo describen y los resultados experimentales obtenidos. En este capítulo expondremos cómo ocurre el microenfocamiento de fluidos, las ecuaciones que permiten predecir los tamaños de gotas, así como otras complementarias para poder entender cómo se desarrolla y qué características posee la generación de gotas mediante el enfocamiento de dos líquidos.

2.2.2. Características de la atomización mediante FF, parámetros geométricos

Consideremos una configuración simple de FF (Fig. 22) en la que un líquido sale de un tubo capilar de diámetro interior D_o que se encuentra a una distancia H de una pared de espesor L . En dicha pared hay un orificio de diámetro D (centrado con el tubo capilar) a través del cual fluye una corriente de gas. Todos estos parámetros (D_o , H , L y D) tienen dimensiones del orden de cientos de micras mientras que las gotas generadas con estos dispositivos son sólo de unas pocas micras.

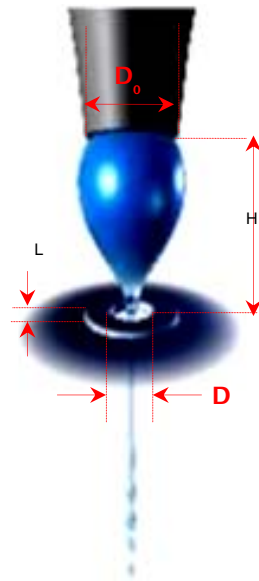


Figura 22. Parámetros geométricos para una configuración simple de FF

El líquido proveniente del tubo capilar se elonga en dirección al orificio de salida, cuando el incremento de presión (ΔP_g) que sufre el gas al atravesar el orificio supera las fuerzas que genera la tensión superficial en la interfaz líquido-gas, éste adopta forma de copa a una distancia crítica del orificio. En esta situación, si se suministra desde el tubo capilar un caudal constante (Q_l), se establece un estado estacionario (Fig.23a).

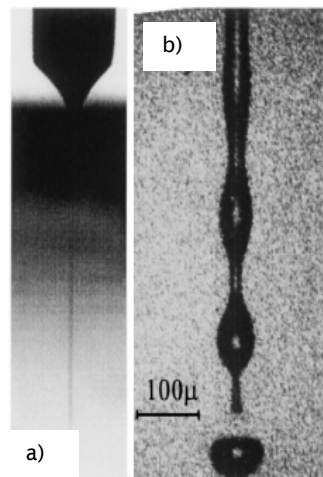


Figura 23. (a) Formación del cono y generación del micro-chorro estacionario y (b) Rotura del chorro siguiendo un patrón de rotura axisimétrico (Gañán-Calvo, 1998)

De este modo, se genera un micro-chorro estacionario de diámetro típico d_j que puede extenderse distancias del orden de milímetros dependiendo del caudal de líquido y el número de Reynolds de la corriente de gas que atraviesa el orificio. Más tarde ese chorro rompe en pequeñas gotas monodispersas por inestabilidad capilar (Fig. 23b).

Además de los parámetros geométricos del nebulizador, son críticos en generación de gotas las propiedades de los fluidos que intervienen. Las propiedades que debemos tener en cuenta son: densidad (ρ), viscosidad (μ) y tensión superficial (σ) tanto del fluido enfocante como del enfocado.

2.2.3. Tamaño del chorro

Una de las principales ventajas de la tecnología FF es el control que se tiene sobre el tamaño de las gotas generadas y la distribución de las mismas. Ello se debe a que es posible predecir el diámetro del chorro teniendo en cuenta una serie de variables externas fácilmente controlables. Para asegurar la correcta creación del micro-chorro y su posterior patrón regular de rotura se deben cumplir las siguientes condiciones:

1) El número de Bond ha de ser $Bo \ll 1$

$$Bo = \frac{\rho g D^2}{\sigma} \ll 1 \quad (1)$$

El número de Bond, como hemos dicho antes, mide la importancia relativa de la gravedad (g) y las fuerzas de tensión superficial (σ). Indica el grado de inestabilidad de un chorro de líquido debido a la aceleración provocada por la gravedad.

Este número permanecerá en valores mucho menores que la unidad siempre y cuando el diámetro del orificio de salida se mantenga inferior a 200 micras, lo cual nos permite despreciar los efectos de las fuerzas gravitatorias en el diámetro del chorro. En la figura 24 se muestra un esquema de un nebulizador FF indicando el diámetro del chorro (d_j) en el orificio de salida del nebulizador (D).

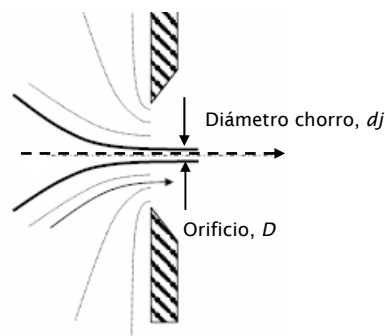


Figura 24. Esquema de formación de un chorro de diámetro d_j en un dispositivo FF de diámetro de orificio de salida D

2) El número de Weber ha de ser $We \gg 1$

$$We = \frac{d_j \Delta P_g}{\sigma} \gg 1 \quad (2)$$

El número de Weber mide la importancia relativa de las fuerzas debidas al incremento de presión ΔP_g y las fuerzas de tensión superficial (σ) de la siguiente forma:

$$We = \frac{1/2 \rho_g v_g^2 d_j}{\sigma} \approx \frac{d_j \Delta P_g}{\sigma} \quad (3)$$

donde v_g es la velocidad del gas medida en el orificio

Para llegar a la expresión del diámetro del chorro producido se supone que toda la energía potencial (E_p) que introducimos en forma salto de presión ΔP_g que sufre el gas al atravesar el orificio se transforma en energía cinética (E_c) del líquido. Sin embargo, la transformación de energía no es completa puesto que parte de la misma se invierte en crear superficie (al disminuir el diámetro del chorro aumenta la relación de superficie / volumen). Pese a ello, dicha expresión es bastante aproximada aunque el número de Weber no sea mucho más grande que la unidad. Por otro lado, flujos con altos números de Weber aumentan la polidispersión de la distribución de gotas.

Puesto que la tensión superficial actúa como una “resistencia” al movimiento (cuanto más importante es, menos energía cinética se transmite al chorro), tenemos un límite inferior teórico para el número de Weber que se alcanzará cuando la energía cinética impartida al chorro sea compensada por las fuerzas de tensión superficial, es decir, cuando $We = 1$. Imponiendo dicha condición, se obtiene, para un ΔP_g dado, el caudal mínimo Q_{min} que se puede atomizar de forma estable y el diámetro mínimo característico de chorro, d_0 , que se consigue en esas condiciones:

$$We = \frac{d_j \Delta P_g}{\sigma} = 1 \Rightarrow d_0 = \frac{\sigma}{\Delta P_g} \quad (4 \text{ y } 5)$$

$$Q_{min} = \left(\frac{\sigma d_0^3}{\rho} \right)^{1/2}$$

Por tanto, mientras el caudal de líquido suministrado sea $Q \gg Q_{min}$ podemos asegurar que se está cumpliendo $We \gg 1$.

3) Las fuerzas de viscosidad son despreciables frente al salto de presión

La validez de la expresión del diámetro del chorro pasa por despreciar el efecto de las fuerzas viscosas sobre el menisco de líquido al ser comparado con la energía cinética

que adquiere por causa del gradiente de presión ΔP_g . El término viscoso axial es del orden de $O[\mu Q/D^2 dj^2]$, puesto que el diámetro del orificio D es la distancia característica asociada con el flujo de gas en la entrada del orificio tanto en la dirección radial como en la axial. Este término es muy pequeño comparado con el salto de presión ΔP_g en las situaciones reales siempre que $\Delta P_g \gg \mu^2/D^2\rho$ (lo cual ocurre para líquidos con viscosidades mayores a 100 cP, usando orificios y saltos de presión tan pequeños como $D \sim 10 \mu\text{m}$ y $\Delta P_g \geq 0.1 \text{ bar}$).

Otra manera de comprobar esta condición es recurrir al número de Ohnesorge (ec. 6):

$$Oh = \frac{\mu}{(\rho\sigma d)^{1/2}} < 1 \quad (6)$$

que nos marca la importancia relativa de las fuerzas viscosas y las de tensión superficial. Por tanto si la tensión superficial es despreciable frente a la energía cinética, es decir, si se cumple $We \gg 1$, entonces es condición suficiente que el número de Ohnesorge sea menor que la unidad para asegurar lo mismo de las fuerzas viscosas.

Hasta el momento hemos señalado las condiciones que han de darse para el fluido enfocado, respecto al fluido enfocante la condición que ha de darse es que éste se halle en régimen laminar.

4) Flujo de gas en régimen laminar en el orificio

Debido a la pequeña área de paso que tiene el orificio, el gas pasa a gran velocidad por el mismo. Para evitar que a velocidades tan altas el gas establezca un régimen turbulento que perturbaría el chorro, se tiene que asegurar que el gas esté sufriendo una intensa aceleración en el orificio. Una fuerte aceleración produce una "laminarización" del flujo, de tal manera que la vorticidad creada por la alta velocidad en la dirección del flujo es absorbida por las fuerzas de viscosidad a escala pequeña.

El número adimensional que caracteriza el movimiento de un fluido permitiendo predecir si este será laminar o turbulento es el número de Reynold (Re):

$$Re = \frac{\rho D v}{\mu} \quad (7)$$

Generalmente, cuando el número de Reynolds (ec. 7) se encuentra por debajo de 2100 se sabe que el flujo es laminar, el intervalo entre 2100 y 4000 se considera como flujo

de transición y para valores mayores de 4000 se considera como flujo turbulento. Las ecuaciones que rigen el flujo laminar y turbulento son las ecuaciones de Navier-Stokes.

En las condiciones mencionadas el flujo de líquido es cuasi-isentrópico (el líquido casi se rige por la ecuación de Bernoulli) al contrario de lo que ocurre con la mayoría de los flujos micrométricos. Por tanto, integrando desde la región de remanso de ambos fluidos hasta la salida, se obtiene una expresión simple y universal del diámetro del chorro:

$$\left. \begin{aligned} Ec_1 &= \frac{1}{2} \rho v_1^2 = \Delta P_l \\ v_1 &= (4Q) / (\pi d_j^2) \end{aligned} \right\} \Delta P_l = \frac{1}{2} \rho [(4^2 Q_l^2) / (\pi^2 d_j^4)] \implies \boxed{d_j = \left(\frac{8\rho}{\pi^2 \Delta P} \right)^{1/4} Q_l^{1/2}} \quad (8)$$

donde Q_l es el caudal del líquido.

De forma, que para un valor dado de ΔP_g es independiente de parámetros geométricos (diámetros del tubo o el orificio, distancia tubo-orificio, etc.), de las viscosidades del líquido y del gas y de la tensión superficial en la interfaz líquido-gas.

Lo que ocurre es un acoplamiento entre los chorros de los fluidos enfocante y enfocado aguas abajo.

2.2.4. Tamaño de gota

Una vez que el chorro atraviesa el orificio, la presión en el líquido P_l se vuelve, al igual que la de gas P_g , prácticamente constante en dirección axial y el diámetro del chorro permanece virtualmente constante durante una cierta distancia hasta el punto en el que rompe por inestabilidad capilar.

Dicho chorro muestra un comportamiento robusto siempre que la caída de presión ΔP_g que sufre el gas sea suficientemente grande comparada con la máxima fuerza de tensión superficial, del orden de σ/d_j .

Una vez que el chorro se rompe se observan distintos patrones de rotura atendiendo al número de Weber. Aunque los rangos que separan a un patrón de otro no son muy claros y varían según algunos parámetros adicionales, podemos observar que a bajos números de Weber las fuerzas de tensión superficial son las más importantes. De esta forma la rotura se asemeja a la rotura Rayleigh pura (que se da para $We \ll 1$) según la cual las gotas se forman única y exclusivamente por las fuerzas de tensión superficial.

Rotura de Rayleigh o rotura capilar

Cuando las velocidades relativas líquido-gas son relativamente bajas hemos visto que el mecanismo de rotura está dominado por las fuerzas de tensión superficial. En este caso la rotura es muy regular y está originada por perturbaciones axisimétricas. El

efecto desestabilizador de la tensión superficial hace que éstas crezcan a lo largo del chorro, es decir, hace que la amplitud inicial de la perturbación crezca hasta provocar la rotura del chorro en gotas.

El incremento de presión chorro - medio exterior es inversamente proporcional al radio de curvatura de la perturbación, de forma que cuando ésta provoca la deformación del chorro la presión del líquido es máxima en la garganta y mínima en el estrechamiento reforzándose así el estrangulamiento del chorro, es decir, se produce un flujo de presiones desde la garganta hasta la zona de estrechamiento donde la presión es menor.

Esta perturbación causante de la rotura tendrá una determinada longitud de onda, λ , de forma que el volumen de las gotas producidas podrá expresarse del siguiente modo:

$$v_g = \left(\frac{\pi d_g^3}{6} \right) = \pi d_g^2 \frac{\lambda}{4}$$

Las principales conclusiones del estudio de Rayleigh fueron:

- Sólo crecen a lo largo del chorro las perturbaciones cuyas λ son: $\lambda > 2\pi (dj/2)$
- La perturbación que más rápidamente crece es: $\lambda_{opt} = 4.508 dj$
- El tamaño de gota producida cuando la rotura viene impuesta por la perturbación de máximo crecimiento será (igualando el volumen de un cilindro de altura $4.5d_j$ al de una esfera de diámetro d_g): $d_g = 1.89 dj$

Utilizando la expresión que FF ofrece para el diámetro del chorro (ec. 8) podemos calcular el tamaño de la gota generada para el caso teórico de rotura Rayleigh pura igualando el volumen de la gota al de un cilindro de altura λ :

$$V_g = \frac{\pi}{6} d_g^3 = \frac{\pi}{4} d_j^2 \lambda = \frac{\pi}{4} d_j^2 4.5d_j \quad \Rightarrow \quad d_{g,Rayleigh} = 1.89d_j \quad (9)$$

que también podemos expresar como $d_{g,Rayleigh} = 1.79Wed_0$, donde d_0 es el mínimo tamaño característico de gota que se puede obtener:

$$d_0 = \frac{\sigma}{\Delta P} \quad (10)$$

Estas expresiones son válidas para líquidos no viscosos, si incluimos el efecto de la viscosidad y la influencia de la inercia del aire (estudio realizador por Weber), la

formación de las gotas también estará influenciada por esta inercia para velocidades mayores de un cierto valor modificándose las condiciones de rotura capilar:

$$\lambda_{opt} = \sqrt{2\pi}d_j \left(1 + \frac{3\mu}{\sqrt{\rho\sigma d_j}} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (11)$$

Como ya se comentó anteriormente, la atomización con FF tiene un límite inferior teórico para $We = 1$, por tanto no estamos en el caso de rotura Rayleigh pura. Sin embargo, hasta valores entorno a $We = 8$ las fuerzas de tensión superficial son las dominantes y se observa experimentalmente que el patrón de rotura produce diámetros de gota que se ajustan con bastante precisión a la rotura de Rayleigh pura, caracterizándose por una gran monodispersión.

Para flujos de $We > 8$ las fuerzas aerodinámicas empiezan a tener importancia e introducen energía en el micro-chorro produciendo una reducción de la longitud de onda de rotura y, por tanto del tamaño de gota generado. Ello hace que la predicción de Rayleigh sobrevalore el tamaño de gota producido. Para flujos de $We < 12 - 15$ se observa que el patrón de rotura producido por estas perturbaciones es axisimétrico y la distribución de gotas se caracteriza por su monodispersión (ver figura 25a) siempre y cuando las fluctuaciones del gas no fomenten la coalescencia de las gotas.

Sin embargo, para flujos de $We > 12 - 15$ se vuelven aparentes unas perturbaciones no axisimétricas, que introducen un patrón de rotura helicoidal acoplado con el axisimétrico hasta alcanzar una distribución de gotas claramente polidispersa (figura 25b) una vez sobrepasado un cierto valor crítico de We ($We > We_c \sim 40$).

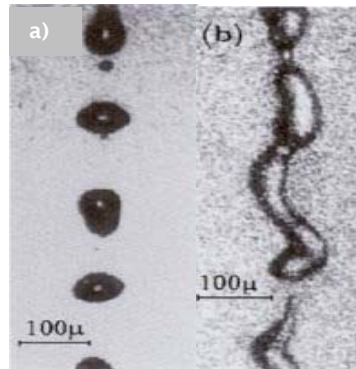


Figura 25. Patrón de rotura para: (a) $We < 12 - 15$ y (b) $We > We_c$ (Gañán-Calvo, 1998)

De este modo, si queremos garantizar la monodispersión del aerosol es necesario mantener We por debajo de un cierto valor y para garantizar la formación del chorro es necesario que sea mayor a la unidad ($\approx 40 > We > 1$) (Gañán-Calvo y Barrero, 1999). Si lo que nos interesa es tener una buena monodispersión del tamaño de gota, será conveniente utilizar regímenes con We bajos. Con We moderados se consigue un

tamaño de gota más pequeño a costa de aumentar la polidispersión de la atomización. Por ello, es más conveniente escoger valores de caudal de líquido y saltos de presión que nos produzcan un tamaño de chorro más pequeño y mantenernos siempre que sea posible en números de Weber lo más bajos posibles. En la figura 26, se representa el aumento de la polidispersión (*GSD, geometrical standard deviation*) en función de Q/Q_0 relación que se puede igualar a We^2 . La línea de puntos correspondería con el límite de monodispersión, $We = 20$, a partir del cual estaríamos en un régimen turbulento.

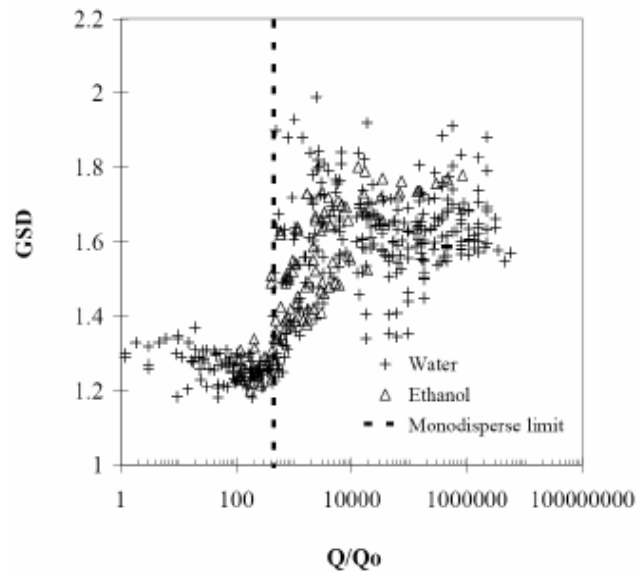


Figura 26. Dispersión del tamaño de gota para diferentes líquidos en función de Q/Q_0 donde $Q/Q_0 \sim We^2$ (la línea de puntos indica la transición a un régimen turbulento)

2.2.5. Predicción tamaño gota

Como hemos visto, mediante el uso de la tecnología FF es posible generar un aerosol fino, estable, monodisperso, reproducible y controlable, siempre y cuando se cumplan una conjunción de parámetros geométricos y físicos. Sin embargo, se observa que las dimensiones geométricas (D , H , D_0 , etc.) pueden variar dentro de un rango relativamente amplio obteniéndose resultados cualitativamente similares. Esto no hace sino recalcar la universalidad del principio de microenfocamiento capilar descrito por la tecnología FF.

Ahora bien, dentro de este rango de variación debemos escoger aquellos valores que produzcan un aerosol con las características particulares que deseemos (monodispersión, tamaño de gota, etc.). Hay que remarcar aquí la gran ventaja que

supone tener predictibilidad sobre el tamaño de gota producido, mediante el control de variables externas fácilmente modificables.

Dado un diámetro de gota d deseado, podemos calcular el caudal de líquido Q_l y el salto de presión necesarios, mediante una adecuada selección del número de Weber.

Así, si consideramos $We < 10$, para estar dentro del régimen monodisperso y asumiendo que el efecto de la tensión superficial es despreciable podemos calcular los valores de Q_l (11) y ΔP_g (12):

$$We = \frac{d_j \Delta P_g}{\sigma} < 10 \Rightarrow \Delta P_g < 10 \frac{\sigma}{d_j} \quad (11 \text{ y } 12)$$

$$d \cong 1.3 \left(\frac{\rho}{\Delta P_g} \right)^{1/4} Q_l^{1/2} \Rightarrow Q_l \approx 2 \left(\frac{\gamma d^3}{\rho} \right)^{1/2}$$

2.2.6. Caso práctico: microencapsulación de un antibiótico

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, como muestra de un caso práctico y experimental de microencapsulación mediante FF en una configuración gas-líquido.

Estos resultados corresponden a los primeros ensayos de microencapsulación del trabajo de investigación que aquí se presenta.

Para la microencapsulación del antibiótico, se seleccionó una configuración FF gas-líquido debido a que la mayor parte de los trabajos de investigación del grupo del Prof. Gañán Calvo se centran en esta configuración particular por lo que está perfectamente estudiada y validada.

El objetivo fue la producción de micropartículas poliméricas biodegradables conteniendo un antibiótico para el tratamiento de infecciones en enfermedades óseas.

En concreto, los resultados hacen referencia microesferas de un polímero biodegradable, PLGA 50:50 (Resomer® RG 502; Boehringer Ingelheim Pharma, Alemania), conteniendo un antibiótico hidrosoluble, sulfato de gentamicina (SG) (Sigma-Aldrich) obtenidas utilizando un nebulizador FF simple en la configuración gas-líquido (Martín-Banderas y cols., 2005a,b).

2.2.6.1. Producción de las micropartículas

2.2.6.1.1. Producción de microesferas

Para la producción de las microesferas, como fluido *enfocante* se utilizó aire comprimido y como *enfocado* una emulsión a/o conteniendo el polímero y el fármaco. La solidificación de las gotas y obtención de partículas sólidas se produjo por una

evaporación del disolvente (acetato de etilo) al producirse la atomización en el seno de una cámara termostatzada. En la figura 27 se muestra un esquema del dispositivo empleado.

2.2.6.1.2. Producción de microcápsulas

Para esta misma aplicación, la encapsulación de un antibiótico hidrosoluble y con objeto de poder modular la liberación de éste, se obtuvieron verdaderas microcápsulas, con una estructura tipo núcleo-corteza. Para ello se utilizó un nebulizador concéntrico en una configuración gas-líquido-líquido (ver figura 21c). En este caso el fluido enfocante fue el mismo, aire, y los fluidos enfocados fueron: externo, una solución de PLGA en acetato de etilo y enfocado interno, una solución acuosa del antibiótico. El procedimiento para el endurecimiento de las gotas fue el mismo que en el caso anterior.

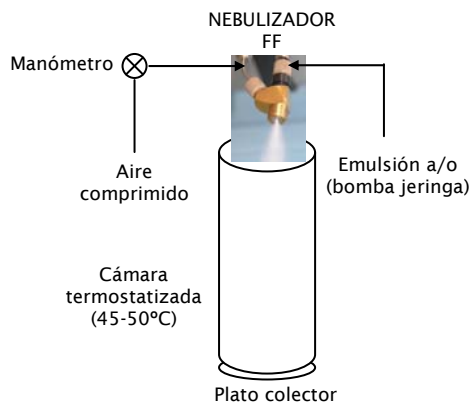


Figura 27. Esquema del dispositivo empleado para la producción de micropartículas de PLGA conteniendo sulfato de gentamicina

2.2.6.2. **Caracterización de las micropartículas**

2.2.6.2.1. Determinación del tamaño de partícula

El tamaño de partícula se determinó mediante microscopía óptica (Leica DM LS). Se tomaron imágenes de muestras de partículas en suspensión, las cuales fueron analizadas mediante el programa de análisis de imagen Image J 1.3v.

En las tablas 3 y 4 se muestran los resultados obtenidos tanto para las microesferas como para microcápsulas en función de los caudales de los fluidos enfocante y enfocado.

Enfocado P (mbar)	Enfocante Q (mL/h)	D _{media} ± DE (μm)	CV (%)
100	2	8,28 ± 1,16	18,72
170		6,69 ± 1,23	18,34
50	5	11,58 ± 2,12	18,29
100		9,96 ± 2,74	27,54
50	8	17,62 ± 3,56	20,24
60	12	20,51 ± 3,74	18,22

Tabla 3. Condiciones experimentales y diámetro medio obtenidos para las microesferas

Enfocante P (mbar)	Enfocado int, Q _{int} (mL/h)	Enfocado ext, Q _{ext} (mL/h)	D _{media} ± DE (μm)	CV (%)
80	0,2	5,5	11,94 ± 2,49	20,85
		8	15,64 ± 3,90	24,94
		10	16,27 ± 3,95	24,28
50	0,2	5,5	16,19 ± 3,94	24,34
65			14,92 ± 3,30	22,12
80			11,94 ± 2,49	20,85

Tabla 4. Condiciones experimentales y diámetro medio obtenidos para las microcápsulas

Como puede verse el mínimo porcentaje de del coeficiente de variación obtenido fue entorno al 20 % para las microesferas y de un 23 % para las microcápsulas. Reducir éstos porcentajes utilizando una configuración gas-líquido para la producción de las partículas, resulta realmente complicado debido a la diferencia de densidades y velocidades entre los fluidos enfocante (gas) y enfocado (líquido). Estas diferencias provocan que los efectos de cortadura o de cizalla entre las fases aumenten la dispersión del tamaño de partícula.

Por otro lado, se comprobó el ajuste, en cuanto a tamaño de partícula, de los datos experimentales obtenidos frente a los teóricos que la teoría FF predice.

El tamaño de gota teórico se calculó a partir de las expresiones (8) y (9) y a partir de éste el tamaño teórico de partícula teniendo en cuenta que la concentración del polímero era del 4 % p/v y su densidad en torno a 1.

En la gráfica de la figura 28, se representa el tamaño de partícula medio (d50) frente al caudal (Q_p), estos en forma adimensional utilizado d_o (10) y Q_o como referencia donde Q_o viene dado por:

$$Q_o = \left(\frac{\sigma^4}{\rho \Delta P^3} \right)^{1/2} \tag{13}$$

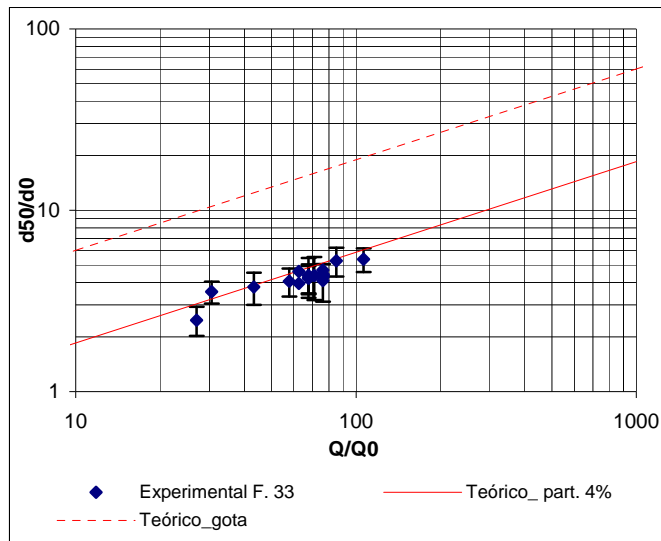


Figura 28. Ajuste de tamaños de partícula experimentales de microesferas de PLGA a los tamaños teóricos predichos por FF (barras de error: DE)

El rango de valores de Weber fue de 4,8 – 8,9, dentro del margen especificado en el apartado anterior para obtener partículas monodispersas. Para el número de Reynolds el rango fue de 19,3 – 66,0, bajos números par Re que favorecen también la monodispersión.

Como puede verse en la gráfica, la concordancia entre los valores teóricos y los resultados experimentales fue bastante estrecha, así como la distribución del tamaño de partícula (en la figura 28 se muestra la DE en forma de barras de error).

2.2.6.2.2. Aspecto y morfología

El aspecto y la morfología de las partículas fueron estudiadas mediante SEM (*scanning electron microscopy*).

A modo de ejemplo, en la figura 29 se muestra una imagen de SEM de una muestra de partículas liofilizadas de 11 μm de diámetro ($Q_f = 5 \text{ mL/h}$; $P = 50 \text{ mbar}$) de PLGA conteniendo sulfato de gentamicina. Todas ellas presentaron forma esférica y no agregadas.

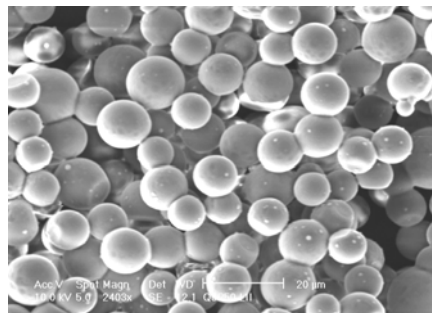


Figura 29. MPs de PLGA conteniendo sulfato de gentamicina obtenidas utilizando un nebulizador simple FF

2.2.6.2.2. Determinación del contenido en sulfato de gentamicina

El contenido de las micropartículas en SG se llevó a cabo mediante microanálisis. Se trata de una técnica analítica directa basada en la determinación del porcentaje de átomos de nitrógeno presentes en una muestra, en este caso correspondiente sólo al SG.

Las muestras fueron liofilizadas previamente y los ensayos fueron realizados por duplicado.

Los resultados obtenidos, tanto para las microesferas como par las microcápsulas, quedan recogidos en la tabla 5 en porcentajes de atrapamiento (% A) y eficacia de encapsulación (% EE):

$$\% A = \left(\frac{Q_i - Q}{Q_i} \right) * 100 \qquad \% EE = \left(\frac{Q}{Q_i} \right) * 100$$

	SG _{inicial} (% p/p)	D _{medio} ± DE (µm)	A ± DE (%)	EE ± DE (%)
Microesferas	33,33	6,69 ± 1,23	10,95	32,86
		11,58 ± 3,48	20,64 ± 0,16	61,92 ± 0,48
		20,51 ± 7,18	14,23 ± 0,06	42,70 ± 0,19
Microcápsulas	40	8,72 ± 3,88	23,4	58,6
	56	17,24 ± 5,84	26,2	46,7

Tabla 5. Resultados de atrapamiento (%) y eficacia de encapsulación (%) obtenidos mediante microanálisis para las muestras indicadas

En todos los casos el porcentaje de atrapamiento fue superior al 10 %. Estos resultados confirman la eficacia de la tecnología FF para el control tanto del tamaño de partícula como de la estructura interna de las mismas, poniendo de manifiesto que los dos métodos propuestos para la encapsulación del SG mejoraron los resultados hasta ahora obtenidos por otros autores (Blanco-Prieto y cols., 2002; Falk y Randolph, 1998; Friess y Schlapp, 2002a,b; Meyer y cols., 1998; Neut y cols., 2003; Prior y cols. 2000, 2002; Schlapp, Friess 2002a,b; Wang y cols., 2004).

2.2.6.2.3. Actividad antimicrobiana

Para concluir con la caracterización de las micropartículas, se llevaron a cabo ensayos para determinar la estabilidad del fármaco encapsulado.

Se comprobó la viabilidad del crecimiento de *Escherichia coli* DHα5 en placas de LB-agar. Para ello se utilizaron microesferas de SG-PLGA de 11.58 µm de diámetro y diversos controles (1mg de PLGA libre, un disco conteniendo 10 µL de tampón fosfato y un disco conteniendo 10 µL de una solución de SG al 6 % p/v). Todos ellos fueron

incubados a 37°C durante 17 h. Tras este tiempo se tomaron fotografías de las placas incubadas. Los resultados obtenidos para cada caso se muestran en la figura 30.

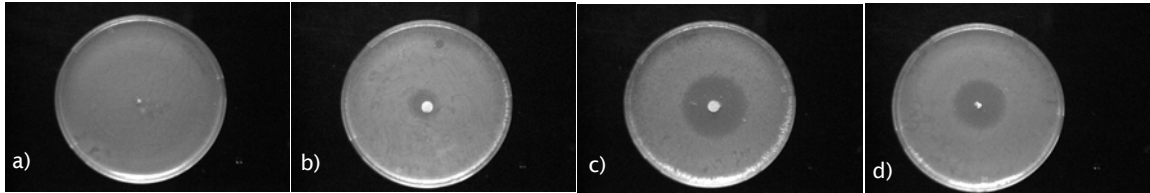


Figura 30. Efecto de diferentes controles y microsferas de SG-PLGA en la viabilidad del crecimiento de *E. coli* DH α_3 en placas de LB-agar: (a) 1 mg of PLGA 50:50; (b) disco con 10 μ L tampón fosfato (pH 6.2); (c) disco con 10 μ L de una solución al 6% p/v de SG y (d) 1.4 mg de microsferas de SG-PLGA

Como muestran las imágenes de la figura 30, el método empleado para la microencapsulación del SG no afectó a su actividad antimicrobiana *in vitro*.

Para finalizar este apartado, en la tabla siguiente se muestran de forma resumida, otros ejemplos de microencapsulación utilizando la tecnología FF llevados a cabo por Ingeniatics Tecnologías S.L. en colaboración con el grupo de investigación del Prof., Gañán Calvo a petición de diferentes clientes.

Polímero / p.a.	Configuración FF	Estabilización gotas (formación partículas)	Tamaño de partícula (μ m)	Desviación (%)
PLGA / Gentamicina	Simple gas-líquido	Secado (<i>spray-drying</i>)	3-25	<25
Fco. antidepressivo	Simple gas-líquido		1-3	<10
PLGA / Bacterias	Simple gas-líquido		9-25	<20
	Concéntrica gas-líquido-líquido			
Poliestireno / Fluoróforos	Simple líquido-líquido	Extracción y evaporación del disolvente,	2-15	<10
Poliestireno / Magnetita	Simple líquido-líquido		2-15	<10
Poliacrilamidas	Simple gas-líquido	polimerización	40-120	
	Concéntrica líq-líquido-líquido			
Celulosa / colorante	Concéntrica gas-líquido-líquido	Gelificación	40-90	<20
	Concéntrica líq-líquido-líquido		30-60	<20
DSPC-DSPA & PEG	Simple líquido-líquido	Formación de liposomas	3-5	<10

Tabla 6. Algunos ejemplos de aplicaciones de la tecnología FF en el campo de la microencapsulación

2.2.7. Ventajas frente a otras técnicas de atomización

Las principales ventajas que FF presenta en cuanto a herramienta para la generación de gotas son:

- Controla tanto el diámetro de las gotas como la homogeneidad de las mismas sin recurrir a otros mecanismos más complejos de excitación del chorro
- Predice el tamaño de gota
- Permite fijar las condiciones experimentales de presión y caudal para obtener el tamaño de gota deseado
- Es una técnica robusta, reproducible y versátil, capaz de generar aerosoles aceptables dentro de un rango amplio de condiciones experimentales
- Permite producir gotas en la escala micrométrica mucho más pequeñas que el orificio de salida a diferencia de otras técnicas donde el tamaño de gota está condicionado al del orificio de salida
- Gracias a su especial configuración geométrica, la atomización ocurre bajo condiciones muy suaves lo que permite atomizar fluidos de muy diversa naturaleza
- Sus diferentes configuraciones, permiten obtener distintos tipos de gotas: simples o compuestas y burbujas
- No existe contacto entre el fluido interno y el orificio de salida, con lo cual se evitan los problemas de los grandes esfuerzos de cortadura asociados a la extrusión directa
- Los problemas de obturación se reducen al mínimo ya que el fluido interno no entra en contacto con el orificio
- El rendimiento energético conseguido es superior al de otras técnicas de nebulización
- Produce gotas a una alta frecuencia
- Puede utilizarse en procesos de producción a gran escala mediante la construcción de matrices de atomizadores operando en paralelo (Fig. 30)

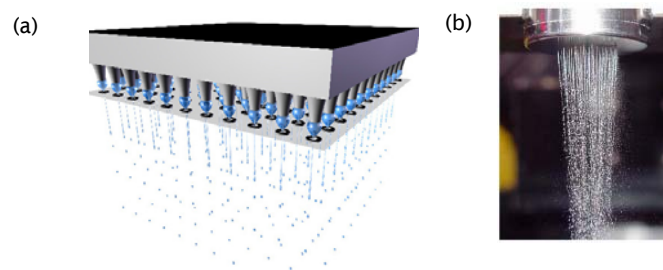


Figura 31. (a) Esquema de una plataforma con múltiples nebulizadores FF para la producción masiva de gotas, (b) Imagen de un prototipo compuesto por 55 nebulizadores simples FF en funcionamiento

2.2.8. Otras geometrías Flow Focusing

A lo largo de éstos últimos años, la tecnología FF ha sido reconocida como una tecnología muy ventajosa en la producción de micro y nano-partículas, Por este motivo, numerosos grupos de investigación, no pertenecientes a la Universidad de Sevilla, han dedicado sus esfuerzos tanto al estudio teórico mediante simulaciones numéricas etc., como al desarrollo de nuevas geometrías para la formación de burbujas, emulsiones micropartículas, etc.

Con relación a las posibles geometrías que puede adoptar un dispositivo FF, a continuación, se describen algunas desarrolladas por otros investigadores. La mayoría de ellas han sido desarrolladas y publicadas en 2006.

Recordemos que la tecnología fue desarrollada y patentada por el Prof. Gañán Calvo y su grupo de investigación en los años 90. En la figura 31, se muestran dos imágenes de la sección transversal de un nebulizador simple comercializado por Ingeniatics Tecnologías en la actualidad.

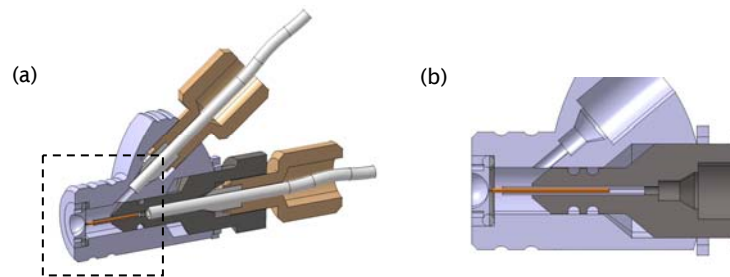


Figura 32. Dispositivo FF axisimétrico comercializado por Ingeniatics Tecnologías S, L, (modelo comercial *Avant*): (a) nebulizador con conectores estándar para la alimentación de los fluidos y (b) detalle de la cámara presurizada y orificio de salida

Actualmente, el grupo de investigación del Prof. Gañán Calvo e Ingeniatics tecnologías, en colaboración con el Dpto. de Ingeniería Electrónica de la US, están desarrollando nuevos dispositivos FF con el objetivo de perfeccionar su geometría.

En concreto, nos referimos al desarrollo de *chips* fabricados íntegramente en silicio mediante técnicas estándar de microfabricación. Se trata de dispositivos tridimensionales fácilmente integrables en *arrays* bidimensionales.

Por el momento, han sido probados para la producción de emulsiones de tamaño de gotícula controlado obteniéndose resultados muy prometedores en cuanto al control de del tamaño como de la distribución de tamaño de gota.

Respecto a otras geometrías FF utilizadas y desarrolladas por otros autores, a continuación se muestran aquellas más destacables.

Uno de los primeros grupos en utilizar una geometría FF, fueron los grupos de investigación de los profesores G. M. Whitesides y H. A. Stone de la Universidad de Harvard. En este caso emplearon dispositivos 2D planos fabricados en un material polimérico, PDMS, poly-dimethylsiloxano (Anna y cols., 2003; Takeuchi y cols., 2005). En la figura 32 se muestra una imagen del dispositivo 2D empleado.

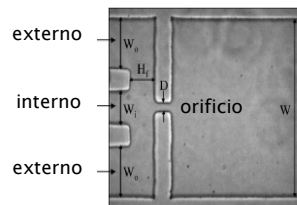


Figura 33. Dispositivo FF 2D fabricado en PDMS (Anna y cols., 2003)

El principal inconveniente de estos dispositivos es el mojado de los canales debido a la hidrofilia / hidrofobia del material empleado en la fabricación. De este modo, dispositivos fabricados con material hidrofóbico sólo serán útiles para producir emulsiones tipo a/o. Para evitar estos problemas, la mejor solución es utilizar una geometría axisimétrica donde el fluido interno está rodeado por el externo y nunca toca las paredes del dispositivo.

Por otro lado, en una configuración 2D, el enfocamiento del fluido interno se debe a una constricción impuesta por la anchura de las paredes de los canales de modo que el estrechamiento del fluido interno ocurre solamente desde los lados. En una geometría FF, un aumento de los caudales fuerza eventualmente el fluido interno hacia un confinamiento axisimétrico definido por el fluido externo. En estos dispositivos 2D esta transformación ocurre a flujos relativamente altos que en muchas ocasiones provocan fugas de en el dispositivo. Lo ideal sería una constricción circular que oprima el fluido radialmente en todas las direcciones en un punto a lo largo del canal (Davidson y cols., 2005; Huang y cols., 2006),

En otros diseños, la salida del nebulizador consiste en un tubo colector de longitud determinada, en vez de un orificio practicado en una placa (Utada y cols., 2005, Lorenceau y cols., 2006; Yobas y cols., 2006).

En el caso del trabajo de Sakai y cols. (2006) (Fig. 33), estudian el efecto del estrechamiento del tubo colector respecto al tubo de alimentación del fluido enfocante (externo), lo que supondría una geometría tipo FF.

De forma resumida, el efecto de utilizar un tubo colector de menor diámetro es el mismo que tendría aumentar la velocidad del fluido externo, es decir, una disminución

del tamaño de partícula debido a un mayor estrechamiento del chorro interno. Así, para los mismos caudales de fluido externo, la velocidad del fluido externo en la salida varía de 2,6 cm/s a 4,6 cm/s en el caso de utilizar un tubo de diámetro reducido.

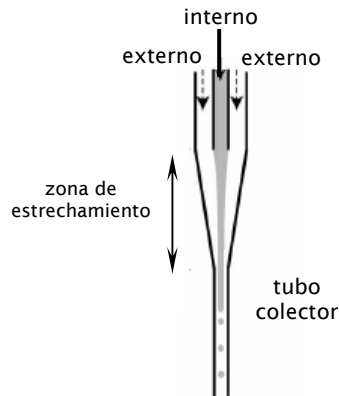


Figura 34. Geometría FF empleada por Sakai y cols. (2006)

En el caso del trabajo de Lorenceau y cols. (2006) (Fig. 34), el dispositivo consiste en un capilar cilíndrico enfrentado a otro cuadrado. El final del tubo interno presenta una reducción de diámetro de forma que obtienen constricciones axisimétricas con diámetros de orificio (" b ") que varían entre 50 y 350 μm .

Esta reducción de diámetro en el tubo interno permite la producción de burbujas a una frecuencia mucho mayor que la descrita en trabajos anteriores (Gañán-Calvo y Gordillo 2001; Gañán-Calvo y cols., 2004) donde la formación de la burbuja ocurre en modo goteo a la salida del dispositivo. Con esta nueva geometría, la formación de las burbujas ocurre en tres etapas: en primer lugar se forma un chorro en el tubo interno el cual al alcanza el tubo colector y empieza a formarse la burbuja, ésta va creciendo hasta colapsar la salida del tubo, en ese momento el líquido enfocante estruja el chorro de gas, finalmente, cuando alcanza un tamaño suficientemente grande se hace inestable y rompe. La frecuencia de formación de las burbujas está controlada por el caudal de líquido enfocante.

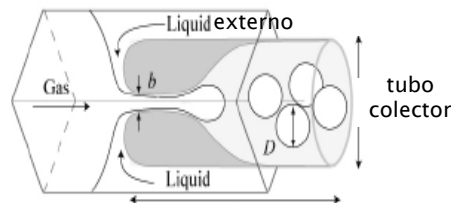


Figura 35. Geometría FF axisimétrica desarrolladas por Lorenceau y cols. (2006) para la generación de burbujas

En el trabajo de Huang y cols. (2006) describen un novedoso dispositivo monolítico 3D plano. El material del dispositivo es una resina epoxi (SU-8) que polimeriza por fotopolimerización catiónica. Consiste en tres capas de resina dispuestas de tal forma que forman un orificio rectangular a través del cual sale el fluido enfocado (ver figura 35) el cual romperá posteriormente en gotas monodispersas. El diámetro del orificio varía entre 50 y 200 μm .

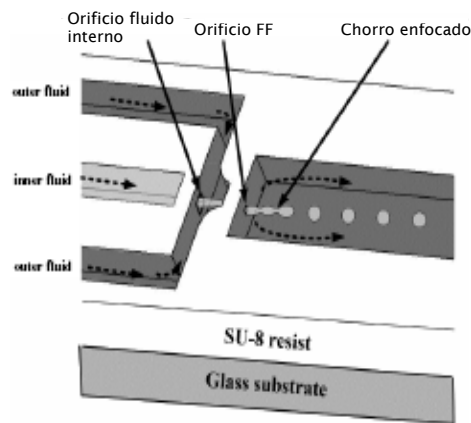


Figura 36. Dispositivo FF axisimétrico monolítico 3D plano fabricado en resina epoxi (Huang y cols., 2006)

Tanto la geometría como el material del dispositivo no presentan problemas de mojado ni de incompatibilidad con disolventes orgánicos, por otro lado, permite el funcionamiento como sistema cerrado o abierto.

Debido a su configuración asiximétrica, el dispositivo permite la formación de emulsiones de ambos signos, w/o y o/w. Por otro lado, controlando el diámetro del orificio y los caudales de los fluidos interno y externo es posible controlar el tamaño de gota. Sin embargo, una modificación de los caudales supone una desestabilización del sistema; según los autores, es necesario esperar al menos 10 minutos para que el sistema se estabilice de nuevo.

Otros dispositivos FF empleados para la generación de gotas consisten en una combinación de geometrías, una en forma de "T" para los canales por donde fluyen los fluidos enfocante y enfocado y una configuración en forma de "volcán" para el orificio de salida (ver figura 36).

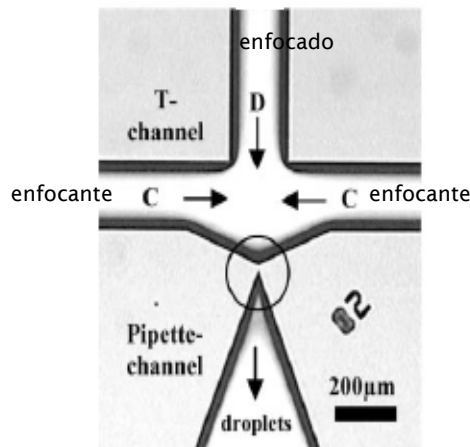


Figura 37. Vista planar del dispositivo FF desarrollado por Yobas y cols.(2006)

No se trata de una geometría asimétrica verdadera, debido a la naturaleza hidrofílica del material empleado en la fabricación del dispositivo, la formación de emulsiones tipo a/o requieren un pre-tratamiento de la superficie para evitar problemas de mojado. Por otro lado debido a la configuración en T se requieren tres sistemas de alimentación para los fluidos, en vez de dos como ocurre en los otros dispositivos. Según los autores las principales ventajas del dispositivo son la producción de gotas a una alta frecuencia ($10^4/s$ para emulsiones a/o y $10^3/s$ para o/a) así como, la producción de gotas incluso a bajos números capilares (Ca).

Una geometría FF también puede ser útil en la generación de micropartículas no esféricas, es decir, partículas en forma de discos o cilindros, etc. Éstas son aplicables en distintos campos como pueden ser la producción de partículas para *displays* de cristal líquido o simulación de células o creación de nuevos materiales (Liu y cols., 2006).

En la imagen se muestra un esquema de un dispositivo plano diseñado por Liu y cols. (2006). Éste consiste en dos dispositivos FF fabricado en PMDS y unidos por un canal de salida. Como modelo, para la producción de partículas, utilizaron alginato sódico que gela en presencia de iones di- o tri-valentes (en este caso la sal empleada fue cloruro cálcico). Para producir las micropartículas, generaron de forma independiente gotas de alginato y gotas de cloruro utilizando para ello un fluido oleoso como enfocante. Las gotas así generadas, entran en contacto en la unión de los dos dispositivos FF (marcado en la figura 38 con un círculo). Una vez que entran en contacto pasan por el canal de gelación donde se mezclan y ocurre la gelación.

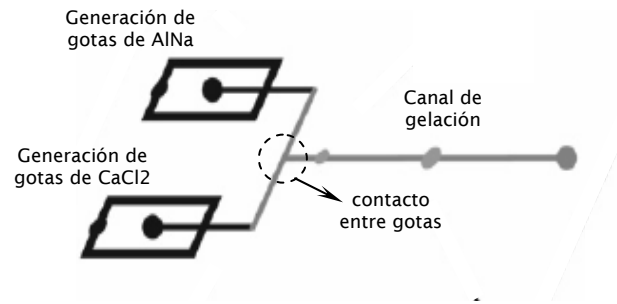


Figura 38. Módulo compuesto por dos dispositivos FF para la generación de partículas con forma controlada

En función de los caudales empleados para la fase dispersa y continua es posible controlar la forma de la partícula. Así, para bajos caudales de fase continua, enfocante, se obtendrán partículas en forma de cilindros, al aumentar éste se obtendrán partículas en forma de discos y a cierto valor se obtendrán partículas esféricas y aumentando éste se obtendrán partículas esféricas de menor diámetro. A medida que aumenta el caudal de enfocante aumenta la frecuencia de rotura del chorro pudiéndose controlar la forma de la partícula.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3

PRODUCCIÓN DE MICROPARTÍCULAS

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. Selección de polímeros para la producción de MPs como herramienta de diagnóstico

Los polímeros destinados a este tipo de aplicaciones han de cumplir una serie de requisitos mínimos:

- (1) deben ser ópticamente transparentes para una detección óptica
- (2) la temperatura de fusión debe estar por encima de aquellas que sean necesarias durante su aplicación
- (3) no deben tener fluorescencia o ésta debe ser mínima
- (4) deben tener un bajo coeficiente de expansión térmica
- (5) el material ha de tener un bajo coste, así como su procesamiento

Este último requisito limita enormemente las posibilidades de elección. En cuanto al requisito (4), éste implica temperaturas de transición vítrea (T_g) bastante elevadas, generalmente mayores a 120°C y elevada densidad (bajo volumen molar). Afortunadamente, la mayoría de los polímeros son ópticamente transparentes, sin embargo, muchos de ellos son fluorescentes, en particular aquellos con grupos aromáticos los cuales suelen tener altas T_g s. Por otro lado, independientemente del material y el método de unión, debe haber un mínimo de biomoléculas unidas en superficie, algunos autores apuntan a que al menos debería ser de 3×10^7 moléculas / μm^2 (Ivanova y cols., 2002).

Otro factor a tener en cuenta es la hidrofobicidad de la superficie (elevada cuando la tensión superficial es pequeña). Este factor tendrá un gran impacto en la inmovilización de oligonucleótidos / DNA ya que una elevada hidrofobicidad favorecerá la adsorción de las bases. Cuando el método de unión sea por unión covalente este factor será irrelevante.

El método de unión más fácil es por adsorción física, ya sea basada en la hidrofobicidad o interacción electrostática. Sin embargo, para este tipo de aplicación se requiere, en la mayoría de los casos, una unión estable y fuerte, por lo que es preferible la unión covalente.

En este sentido, una selección lógica de polímeros incluiría aquellos con grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ o $-\text{COOH}$.

En el estudio de Ivanova y cols. de 2002, en relación a la viabilidad de polímeros para aplicaciones de microPCR, seleccionaron 42 homo-polímeros de 660 de la base de datos de SciPolymer 3.0 (SciVision) en base a los criterios anteriormente expuestos. De estos 42 preseleccionados, en función del tipo de grupo reactivo se rechazaron aquellos con grupos $-NH_2$ por presentar menor densidad (mayor volumen molar) que aquellos con grupos $-OH$ ó $-COOH$ y porque aquellos con elevadas T_g s tienen los grupos $-NH_2$ cerca de anillos aromáticos, lo que dificulta la unión covalente. Sólo poliacrilamida podría ser útil pero presenta una elevada hidrofilia. Los polímeros con grupos $-OH$ también son rechazados ya que la mayoría forman hidrogeles o resultan altamente inflamables (celulosas). Por lo tanto, la mejor elección parece ser polímeros con grupos $-COOH$.

En base a estos criterios y haciendo un sondeo de micropartículas existentes en el mercado, el polímero seleccionado en nuestro trabajo para la producción de micropartículas poliméricas destinadas a sistemas de diagnóstico y aplicaciones relacionadas fue el poliestireno. Se seleccionaron 6 tipos de poliestireno, tres de ellos con grupos carboxilos y tres sin grupos reactivos de diferente peso molecular. En la tabla 7 se recogen sus principales características (información procedente de las fichas técnicas de cada producto) y sus estructuras químicas en la figura 39.

Nombre	Tipo	Abreviatura	Peso molecular	Densidad (g/mL)	Tg (°C)
Poliestireno	Normal	PS	45.000 media*	1.06	-
Poliestireno estándar	Estándar	PS 20.000	19.300	-	-
Poliestireno estándar	Estándar	PS 200.000	197.000	-	-
Poliestireno monocarboxilado	Reactivo	PS-COOH	≈ 200.000	0.909	-
Poly(styrene-co-maleic acid), partial isobutyl/methyl ester	Reactivo	PSMiso	180.000	1.15	230 - 235
Poly(styrene-co-maleic acid), partial secbutyl/methyl ester	Reactivo	PSMsec	105.000	1.15	175- 180

Tabla 7. Tipos de poliestireno empleados en la producción de MPs (** mezcla 50:50 de dos componentes (PM 4.000 + 200.000))

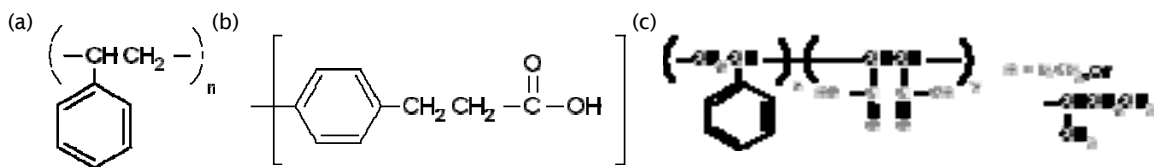


Figura 39. Estructura de diferentes tipos de PS empleados: (a) Estireno (monómero); (b) PS-COOH y (c) PSM

Una vez seleccionados los polímeros, se procedió a la preparación de disoluciones de diferente concentración de poliestireno y a su caracterización en cuanto a tensión superficial e interfacial (agua-disolución polimérica) y a viscosidad.

Los disolventes comúnmente empleados en el método de encapsulación emulsión-extracción y evaporación del disolvente son diclorometano (DCM), cloroformo (CHL) y acetato de etilo (EA). Debido a los problemas de contaminación ambiental y seguridad son preferibles aquellos disolventes no clorados por lo que el EA suele ser el de elección. En el presente trabajo también se utilizó DCM, más apolar que el EA y menos tóxico que el CHL (ver tabla 8) (Sah, 1997; Wang y Wang, 2002, The Index Merck, 2002).

Disolvente	PM	LD50* (mL/Kg)	Pto. Eb. (°C)	ρ (Kg/m ³) (20°C)	Solubilidad (%v/v)	
					Dvte. en agua	Agua en dvte.
EA	88.11	11.3	77	902	1/10	3.3
DCM	84.93	1.6	39.75	1325.5	1/50	0.24
CHL	119.38	2.8	61.7	1498.45	1/200	0.2

Tabla 8. Propiedades de algunos disolventes empleados ((* oral en ratas)) (The Index Merck, 2002)

3.2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente capítulo es establecer las condiciones experimentales necesarias para la producción de micropartículas poliméricas monodispersas para ensayos *multiplex*.

Para establecer éstas condiciones se llevarán a cabo los siguientes estudios:

- Estudio de la influencia de los parámetros geométricos que definen a un nebulizador simple FF, así como de la naturaleza del material de algunas de sus partes en la generación de micropartículas
- Estudio de la influencia de las propiedades fisicoquímicas del fluido enfocado, fluido “polimérico”
- Estudio de la influencia del tipo de polímero empleado en cuanto a peso molecular, grados de hidrofilia / hidrofobicidad, etc.
- Estudio de la influencia de los caudales de los fluidos enfocado y enfocante en el tamaño final de partícula.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Materiales

- Acetato de etilo PRS (*Panreac Química S.A.*, Montcada i Reixac, Barcelona, España)
- Ácida sódica (Sigma-Aldrich)
- Alcohol polivinílico 72.000 (Sigma-Aldrich)
- Diclorometano 99.9% grado HPLC (Sigma-Aldrich)
- Poliestireno ($M_w = 4.000-200.000$) (Sigma-Aldrich)
- Poliestireno estándar ($M_w = 20.000$) (Sigma-Aldrich)
- Poliestireno estándar ($M_w = 200.000$) (Sigma-Aldrich)
- Poliestireno monocarboxilado ($M_w \approx 200.000$) (Sigma-Aldrich)
- Poly(styrene-co-maleic acid), partial isobutyl/methyl ester (Sigma-Aldrich)
- Poly(styrene-co-maleic acid), partial secbutyl/methyl ester (Sigma-Aldrich)

3.3.2. Métodos

3.3.2.1. **Caracterización fluidos**

Previo al diseño y evaluación de los sistemas multiparticulares se procedió a la caracterización de los distintos fluidos involucrados en la generación de micropartículas mediante la tecnología Flow Focusing teniendo en cuenta aquellas propiedades más relevantes y condicionantes.

3.3.2.1.1. Medición de la viscosidad

Para la determinación del valor de viscosidad de las distintas soluciones poliméricas ensayadas se utilizó un viscosímetro DV-E Viscosimeter (Brookfield)) con un *spindle* 00. Diferentes cantidades de polímero fueron disueltas en acetato de etilo o diclorometano. La viscosidad de las disoluciones de poliestireno se midieron a t.a. con un *spindle* número 5 (s00) a diferentes r.p.m.. El valor de viscosidad, calculado en centipoise (cP), viene dado por la cantidad de fuerza necesaria para hacer girar el *spindle* en el seno de la solución polimérica.

Cada medida se realizó por triplicado.

3.3.2.1.2. Medición de la tensión superficial e interfacial

Las medidas de tensión superficial e interfacial se llevaron a cabo mediante el método de la gota pesada. Éste consiste en determinar el perfil de una gota de un fluido suspendido en otro fluido en equilibrio mecánico. El perfil de la gota es determinado por el balance entre las fuerzas de gravedad y tensión superficial. La ecuación de

Bashforth y Adams, basada en la ecuación de Laplace, relaciona el perfil de la gota con la tensión superficial a través de una ecuación diferencial no lineal.

El equipo (CAM 100, KSV Instruments) consiste en una celda experimental, una fuente de iluminación y un sistema para visualizar y adquirir los datos y deducir los valores de tensión a partir del perfil de la gota.

Las medidas se llevaron a cabo por triplicado a t.a. usando una jeringa Hamilton de 1000 μL con una aguja de 0.71 mm de diámetro exterior para hacer gotear la fase pesada sobre la ligera. Los resultados se expresaron como la media de las tres medidas en milinewtons por metro (mN/m).

3.3.2.2. Nebulizadores Flow Focusing

Para la producción de las micropartículas se emplearon dos modelos de nebulizadores FF simples: *Reid* y *Avant-2* (ver figura 40).

El primero, es un modelo más simple que permite modificar sus dimensiones geométricas de forma rápida y sencilla. Es el modelo que se usa para investigación a nivel de laboratorio.

El segundo, *Avant-2*, es un modelo más sofisticado en el que los sistemas de alimentación de los fluidos se realiza a través de conexiones estándar. También permite modificar sus parámetros geométricos pero cualquier modificación implica una serie de reajustes que no son tan sencillos como en el caso anterior. Se trata de uno de los modelos comercializados por Ingeniatrix Tecnológicas.

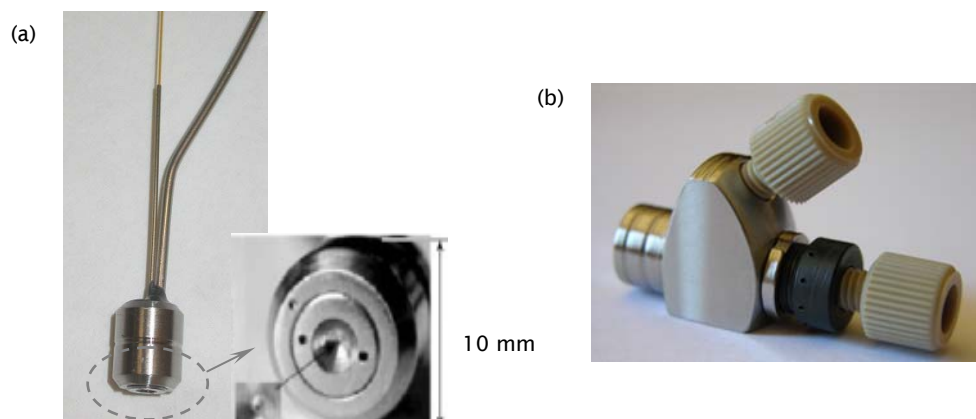


Figura 40. Imágenes de los dos modelos de nebulizadores FF simples empleados para la producción de MPs: (a) modelo *Reid* y (b) modelo comercial *Avant-2*

En la tabla 9, se muestran las dimensiones geométricas empleadas con cada modelo de nebulizador.

Modelo nebulizador	D (μm)	D _a (μm) (ext/int)	H (μm)
<i>Reid</i>	50	360 / 75	100
	100	360 / 150	100
	150	360 / 150	100
	170	360 / 150	100
<i>Avant-2</i>	200	360 / 150	100

Tabla 9. Modelos de nebulizadores y dimensiones geométricas empleadas para la producción de MPs

3.3.2.3. Producción de micropartículas

Para la producción de las micropartículas se empleó la tecnología FF en una configuración simple líquido-líquido, es decir, tanto el fluido enfocante como el enfocado fueron líquidos.

La tecnología se adaptó el método tradicional de emulsión extracción y evaporación del disolvente (ver Capítulo 1) como método de solidificación y estabilización de las gotas (ver figura 41).

De esta forma, se empleó un nebulizador Flow Focusing para la formación controlada de las gotículas de una emulsión tipo o/a. Como fase oleosa, fluido enfocante, se utilizó una solución de poliestireno y como fase acuosa, fluido enfocado, se utilizó agua destilada. La inyección de los fluidos en el nebulizador se llevó a cabo mediante una bomba de jeringa (Harvard Apparatus, mod. "44" programable 55-1144) para el fluido enfocado y una bomba de HPLC (Shimadzu Corp. mod. LC-10AD vp) para el fluido enfocante.

Para evitar la posible coalescencia de las gotas o su deformación, la emulsión o/a se llevó 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 2-3 horas hasta la total evaporación del disolvente. Finalmente, las gotículas una vez solidificadas y convertidas en micropartículas sólidas se lavaron tres veces con agua destilada, centrifugando a 4000 r.p.m (Orto Alresa, mod. Digicen 20) durante 10 minutos. Posteriormente se almacenaron liofilizadas en forma de polvo seco o suspendidas en agua con acida sódica al 0.2% p/v para evitar el crecimiento bacteriano a 4°C.

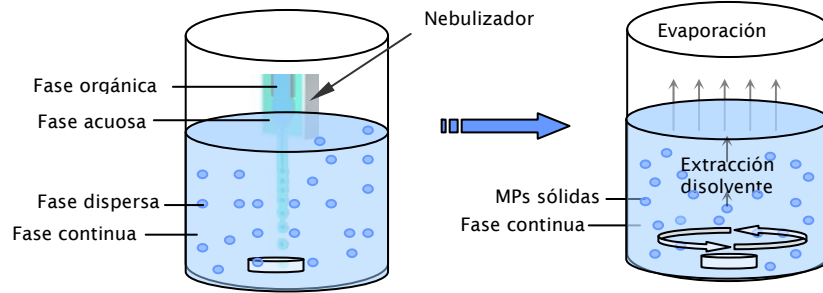


Figura 41. Producción de MPs de poliestireno utilizando un nebulizador FF

3.3.2.4. Caracterización micropartículas

Una vez elaboradas las micropartículas estas se sometieron a distintos ensayos para su caracterización.

3.3.2.4.1. Determinación del tamaño de partícula y distribución de tamaño

El tamaño de partícula fue determinado mediante microscopía óptica (Leica DM LS). Se tomaron imágenes de muestras de partículas en suspensión, las cuales fueron analizadas mediante el programa de análisis de imagen Image J 1.3v. Por cada muestra se midieron entre 400 y 1000 partículas. Una vez obtenidos los datos proporcionados por el programa de análisis de imagen estos fueron procesados adecuadamente obteniendo el análisis estadístico de los mismos.

Los resultados se expresaron como tamaño medio (D_m), desviación estándar (DE), porcentaje del coeficiente de variación ($CV\%$) y desviación geométrica estándar (GSD).

3.3.2.4.2. Aspecto y morfología

El aspecto y morfología de las micropartículas, así como su superficie fueron determinadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Philips XL30). Para ello muestras de partículas liofilizadas montadas sobre *pins* con cinta adhesiva de carbón, fueron sometidas a un proceso de *sputtering*, recubrimiento con oro bajo vacío.

3.3.2.4.3. Estabilidad de las micropartículas

Una vez elaboradas las MPs y caracterizadas sus principales propiedades se procedió a realizar distintos ensayos de estabilidad. Se estudió el efecto de la temperatura, pH del medio y tiempo sobre el aspecto y la morfología de las MPs, así como sobre su fluorescencia. Se llevaron a cabo ensayos cortos para validar su utilidad como herramienta en sistemas de detección *multiplex*.

Las condiciones exactas a las que fueron sometidas la micropartículas quedan recogidas en la tabla 10.

Medio	pH	T (°C)	Tiempos (h)	
PBS	7	37	2	4
MES	6	37	2	4
PBS-BSA	7.4	37	2	4
DENHART	8	90	10 min	-
		55	2	4

Tabla 10. Condiciones experimentales de ensayos de estabilidad de las MPs

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Caracterización de las disoluciones poliméricas

3.4.1.1. Medición de la viscosidad

Los valores de viscosidad reflejados en la tabla 11, corresponden a disoluciones de PS en acetato de etilo (EA) de diferente concentración en porcentaje peso / volumen. Las medidas se hicieron a t.a. utilizando en todos los casos un volumen de 16 mL de disolución. El valor del par motor del equipo (% esfuerzo), para que la medida sea fiable ha de estar, aproximadamente, entre 10 y 90% (ver Material y Métodos).

Concentración (% p/v)	Velocidad (r.p.m)	Esfuerzo (%)	Viscosidad, $\mu_t \pm DE$ (cP)	$\beta = \mu_t / \mu_d$
1	100	17.7	0.76 ± 0.01	1.32
4	100	19	0.97 ± 0.02	1.03
8	30	15.4	2.99 ± 0.01	0.33

Tabla 11. Valores de viscosidad obtenidos para diferentes concentraciones de PS (μ_t viscosidad fluido enfocante; μ_d viscosidad fluido enfocado)

En todos los casos se hicieron medidas a diferentes velocidades de giro del *spindle*, entre 12 y 100 r.p.m, encontrándose que el valor de viscosidad fue independiente de la velocidad de giro, lo que indica que las disoluciones tienen un comportamiento newtoniano, requisito indispensable para que se cumplan las predicciones teóricas de la tecnología Flow Focusing.

3.4.1.2. Medición de la tensión superficial e interfacial

Se midió a t.a. tanto la tensión superficial como la interfacial de disoluciones de PS en EA a diferentes concentraciones, así como de PSM al 4% en EA para evaluar el efecto de la presencia de grupos carboxilos en la estructura del polímero. Los resultados obtenidos quedan recogidos en las tablas 12 y 13.

Fase	$\sigma \pm DE$ (mN/m)
agua	70.74 ± 1.63
EA	22.05 ± 0.04
PS 1% EA	21.76 ± 0.03
PS 4% EA	19.86 ± 0.04
PS 6% EA	21.54 ± 0.09
PS 8% EA	21.35 ± 0.10
PSM 4% EA	21.26 ± 0.11

Tabla 12. Valores de tensión superficial para las soluciones indicadas

Para todas las soluciones de poliestireno el valor de la tensión superficial resultante fue en torno a 21 mN, excepto para aquella solución elaborada al 4% p/v.

En este caso concreto el valor de la tensión superficial fue algo menor, 19.9 mN, valor que queda dentro del error y la precisión del equipo.

Fase ligera	Fase pesada	$\sigma \pm DE$ (mN/m)
EA	agua	12.12 \pm 0.03
PS 1% EA	agua	12.05 \pm 0.26
PS 4% EA	agua	13.44 \pm 0.07
PS 6% EA	agua	14.03 \pm 0.06
PS 8% EA	agua	14.20 \pm 0.14
PSM 4% EA	agua	13.17 \pm 0.15

Tabla 13. Valores de tensión interfacial para las fases indicadas

Como era esperable la concentración del polímero no influenció los valores ni de tensión superficial ni interfacial. Por otro lado, la presencia de grupos carboxilos en PSM, que en teoría harían que el polímero fuera menos hidrófobo que el PS, tampoco influenció estos valores (ver estructuras, figura 39). Por ello se procedió a medir los volúmenes de las gotas de las dos disoluciones poliméricas en el agua. Para un mismo valor de tensión interfacial, el volumen de gota debería ser menor para aquella solución menos hidrofóbica.

Fase ligera	Fase pesada	$\sigma \pm DE$ (mN/m)	V gota $\pm DE$ (μ L)
PS 4% EA	agua	13.44 \pm 0.07	7.86 \pm 0.15
PSM 4% EA	agua	13.17 \pm 0.15	7.24 \pm 0.43

Tabla 14. Valores de tensión interfacial y volumen de gota para las fases indicadas

Como puede verse en la tabla 14 el volumen de gota para PSM fue menor que para PS, para un mismo valor de σ , es decir, el volumen que soporta el agua es menor en el caso de PSM lo cual nos indica una mayor interacción o mezclado con el agua, es decir, menos hidrofobia que en el caso de PS.

Para confirmar estos resultados, ya que la diferencia entre los volúmenes de gota fue mínima, se procedió a medir el ángulo de contacto.

Medición del ángulo de contacto (AC)

La medición del ángulo de contacto (AC) se llevó a cabo por el método de la gota pendiente utilizando el mismo equipo que para la medición de la tensión superficial. Se trata de un método óptico utilizado para determinar las propiedades de mojado de un

sólido. Se mide el ángulo formado entre la línea base de la gota y la tangente con la superficie de la gota (ver figura 42).

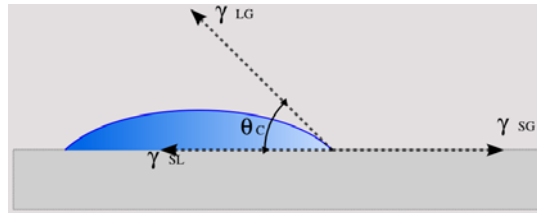


Figura 42. Esquema de la medición del ángulo de contacto de un líquido sobre una superficie

Para ello hay que considerar que las tres fases que intervienen están en equilibrio termodinámico (líquido (L), sólido (S), gas o vapor (V)). Pudiendo ser la fase de gas o vapor otro líquido inmiscible.

En equilibrio, el potencial químico de las tres fases será el mismo. La expresión que satisface este equilibrio se conoce como la ecuación de Young:

$$0 = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} - \gamma \cos \theta$$

donde θ es el ángulo de contacto experimental.

En primer lugar, se intentó hacer una medición del AC de las soluciones de poliestireno sobre agua destilada. Sin embargo, esto no fue posible debido a la rápida evaporación del acetato de etilo a t.a. y a la precipitación del poliestireno, favorecida al entrar en contacto con el agua.

En la figura 43 se muestra la evolución de una gota de la solución de PSM 4% en EA con el tiempo.

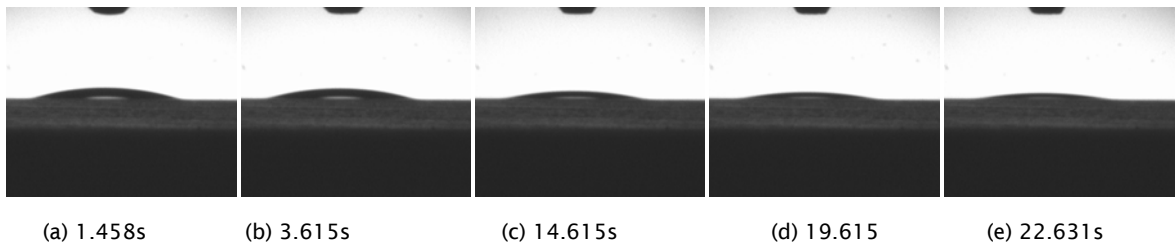


Figura 43. Evolución de una gota de la solución de PSM 4% EA con el tiempo sobre una superficie de vidrio a t.a.

Por este motivo, se llevaron a cabo medidas del AC para los tres líquidos de forma independiente sobre una superficie de vidrio ($\rho = 2,4 \text{ g/cm}^3$).

Para ello, se utilizó un *porta* sobre el que se depositó cuidadosamente una gota de líquido con ayuda de una jeringa Hamilton de 500 μL .

Los resultados obtenidos se recogen en la figura 44.

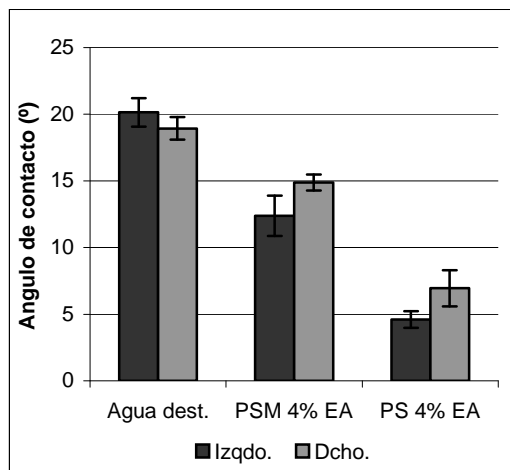


Figura 44. Resultados de las medidas de los ángulos de contacto (°) obtenidos sobre vidrio para los líquidos señalados (barra error: DE)

Como se muestra en la figura los mayores valores de AC fueron para el agua seguidos de la solución de PSM, siendo menores los obtenidos para la solución de PS. Es decir, la solución de PS fue la que menos mojó la superficie de vidrio y la que más se alejó de los valores de AC obtenidos por el agua lo que nos indica una menor hidrofilia.

3.4.2. Producción de MPs blancas

Como ya se indicó en el apartado de Material y Métodos, para la producción de las micropartículas se empleó la tecnología FF en una configuración simple líquido-líquido, adaptándola el método tradicional de emulsión-extracción y evaporación del disolvente como método de solidificación y estabilización de las gotas (ver Introducción). En la figura 45 se recoge un esquema del dispositivo empleado.

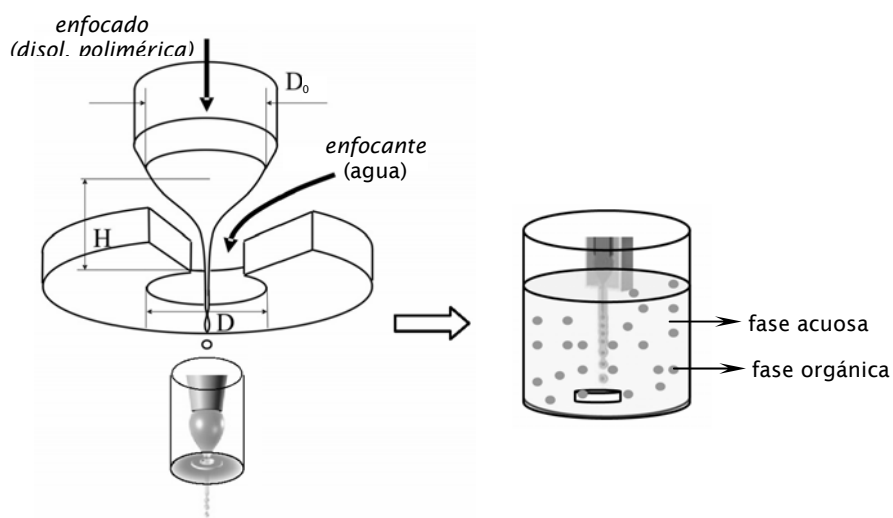


Figura 45. Esquema del sistema de producción de las MPs

En primer lugar se procedió al estudio de diferentes variables con el objeto de comprobar si la teoría que describe el fenómeno en una configuración gas-líquido es viable para la descripción del fenómeno en una configuración líquido-líquido. Por otro lado, se pretende fijar las condiciones experimentales adecuadas para obtener partículas monodispersas en un rango de tamaño de 1 - 25 μm de diámetro. Las variables a estudiar fueron:

- diámetro del orificio de salida del nebulizador (D)
- caudal de enfocado (Qd)
- caudal de enfocante (Qt)
- concentración del polímero (C)

Se mantuvieron fijos otros parámetros como son:

- la distancia entre el capilar y orificio de salida, H , fijada en 100 μm y
- el diámetro interno del capilar D_o , fijado en 150 μm , excepto para $D = 50 \mu\text{m}$ donde D_o se redujo a 75 μm .

Para el cálculo del tamaño de partícula, se tuvo en cuenta la concentración del polímero, así como, su densidad. De este modo, a partir del tamaño de gota que predice FF (d_g), el tamaño de partícula se calculó según la siguiente ecuación:

$$d_p = \left(\frac{C/10}{\rho_p} \right)^{1/3} * d_g \quad (14)$$

donde C es la concentración de la disolución polimérica en v/v (m^3/m^3) y ρ_p es la densidad del polímero (Kg/m^3).

3.4.2.1. Búsqueda condiciones de monodispersión

Con el objeto de obtener partículas monodispersas dentro del rango de tamaño deseado, se han ensayado diversas combinaciones de caudales entre la fase interna y la externa utilizando para ello cuatro nebulizadores diferentes. La diferencia fundamental entre ellos fue el diámetro del orificio de salida, D .

Los valores de D ensayados fueron: 200, 170, 150 y 100 μm . Como se indica en el apartado anterior, el resto de parámetros geométricos característicos de un nebulizador FF se mantuvieron constantes (H y D_o).

El tipo de poliestireno seccionado para este estudio fue PS y la concentración fue del 4% p/v en EA.

En la tabla 15 se especifican las condiciones experimentales ensayadas, así como, los diámetros de partículas obtenidos para cada una de ellas. El análisis de tamaño de

partícula se realizó mediante microscopía óptica con ayuda de un procesador de imágenes (ver Material y Métodos).

D (µm)	Qt (ml/min)	Qd (ml/h)	dp _{exp} (µm)	DEp _{exp} (µm)	CV (%)	GSD
100	4	0,25	4,73	0,99	20,93	1,23
	4	0,5	3,78	0,41	10,85	1,12
	4	5	26,69	8,60	32,22	-
	3	3	6,37	2,11	33,12	1,43
	3	2	7,40	0,27	11,40	1,14
	3	1	5,60	0,46	8,21	1,08
	3	0,5	5,18	0,83	16,02	1,16
	3	0,25	3,82	0,58	15,25	1,15
	2,5	2	8,56	0,69	8,06	1,08
	2	3	10,12	2,13	21,08	1,30
	2	2	9,47	0,87	9,19	1,09
	2	1	6,66	0,84	12,61	1,13
	2	0,5	5,04	0,79	15,67	1,16
	1,5	3	12,79	2,80	21,92	1,27
	1,5	2	11,72	1,27	10,84	1,14
1,5	1	8,09	1,04	12,86	1,13	
150	4	2,5	10,01	2,09	20,88	1,40
	3	2,5	10,86	3,34	30,76	-
	3	2	11,03	1,89	17,12	1,31
	3	1	8,23	3,71	45,08	-
	2,5	2	11,66	2,62	22,49	-
	2	2	15,90	1,41	8,89	1,09
170	3	3	17,64	3,75	21,26	1,34
	3	2	14,80	3,50	23,65	1,29
	3	1,5	12,89	1,93	14,97	1,17
	2,5	3	14,61	1,95	13,35	1,12
	2,5	2	12,49	1,59	12,73	1,14
	2,5	1,5	10,77	1,38	12,81	1,15
	2,5	1	9,49	1,45	15,28	1,17
200	4	3	14,29	1,70	11,90	1,18
	4	2	12,28	1,17	9,53	1,14
	4	1	8,71	1,52	17,45	1,12
	3,5	1	8,27	1,30	15,72	1,15
	3,5	2	14,94	2,79	18,67	1,19
	3,5	3	21,38	10,82	50,61	-

Tabla 15. Resultados de tamaños de partículas obtenidos en función de *Qt*, *Qd*, y *D* (en negrita, condiciones donde se han obtenido MPs monodispersas)

En los anexos I a IV se recogen las imágenes de muestras de partículas suspendidas en agua destilada tomadas con el microscopio óptico, una vez retirado el disolvente orgánico. Las imágenes fueron captadas utilizando un objetivo de 20X y se presentan

de forma secuencial en función de Q_t y Q_d , de este modo es posible apreciar el efecto de estos parámetros tanto en el tamaño de partícula como en la distribución de tamaños.

Mediante este barrido de condiciones, se obtuvieron partículas entre 3.7 y 26.7 micras de diámetro. En todos los casos se obtuvieron partículas de 1/4 a 1/30 veces menor que el diámetro del orificio. En la figura 46 se puede ver la variación del tamaño de partícula en función del tamaño del orificio (D) para cada combinación de caudales *enfocado/enfocante* ensayada.

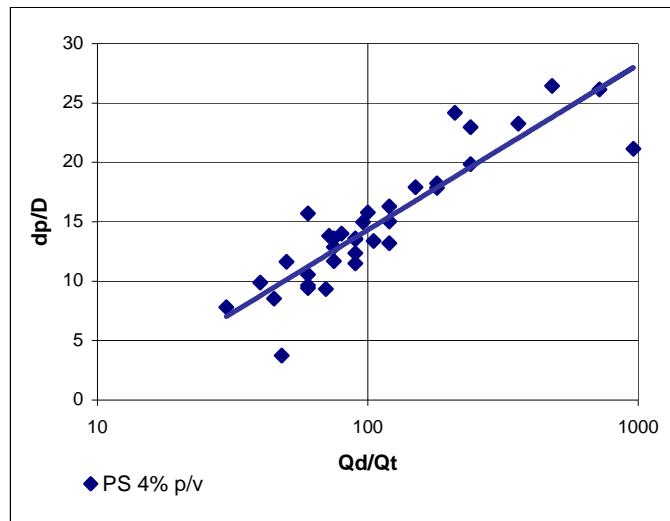


Figura 46. Variación del tamaño de partícula en función de D para cada combinación de Q_d/Q_t ensayada

En el gráfico de la figura 46, la línea azul representa los valores teóricos que FF predice. Sólo en algunos casos los valores experimentales se desvían considerablemente de los teóricos.

Esta situación puede ser debida a un mal funcionamiento del nebulizador, sólo en éstos casos concretos, por ejemplo, por una mala limpieza del nebulizador o por la presencia de algún tipo de impureza en el orificio de salida por lo que no han de tenerse en consideración.

De entre todas las condiciones ensayadas se seleccionaron aquellas en las que se obtuvieron partículas con una estrecha distribución de tamaños.

Los parámetros estadísticos más comunes para medir la dispersión o el ancho de una curva, son el CV (%), *span* y *GSD* los cuales vienen dado por las siguientes expresiones:

$$CV(\%) = \frac{DE}{d_{50}} * 100$$

$$span = \frac{d_{90} - d_{50}}{d_{50}}$$

$$\sigma_g = GSD = \left[\frac{\sum_{ni} (\ln di - \ln dg)^2}{N - 1} \right]$$

En el presente trabajo se utilizó tanto el coeficiente de variación (CV %) como el *GSD* el cual, en una distribución log-normal tiene el mismo significado que la desviación estándar (DE) para una curva con distribución normal (Hinds, 1982).

Debido a que el principal interés de este trabajo es la producción de partículas para sistemas de diagnóstico *multiplex*, los límites máximos admitidos para considerar una distribución de tamaño monodispersa y obtener un producto comercial final competitivo fueron fijados en torno a un 12 % máximo para CV (%) y en torno a un 1.12 máximo para *GSD*.

En la figura 47, se representan las distribuciones de tamaño de partícula obtenidas para las condiciones seleccionadas según el criterio anteriormente expuesto. Como se observa, en todos los casos se obtuvieron distribuciones muy estrechas, nótese que en la gráfica se representa el tamaño en escala lineal, no logarítmica. Sólo en los casos Qd2Qt2_D150 y Qd2Qt1.5 se obtuvieron distribuciones algo más anchas lo que puede deberse a un mal funcionamiento del nebulizador en estos casos concretos.

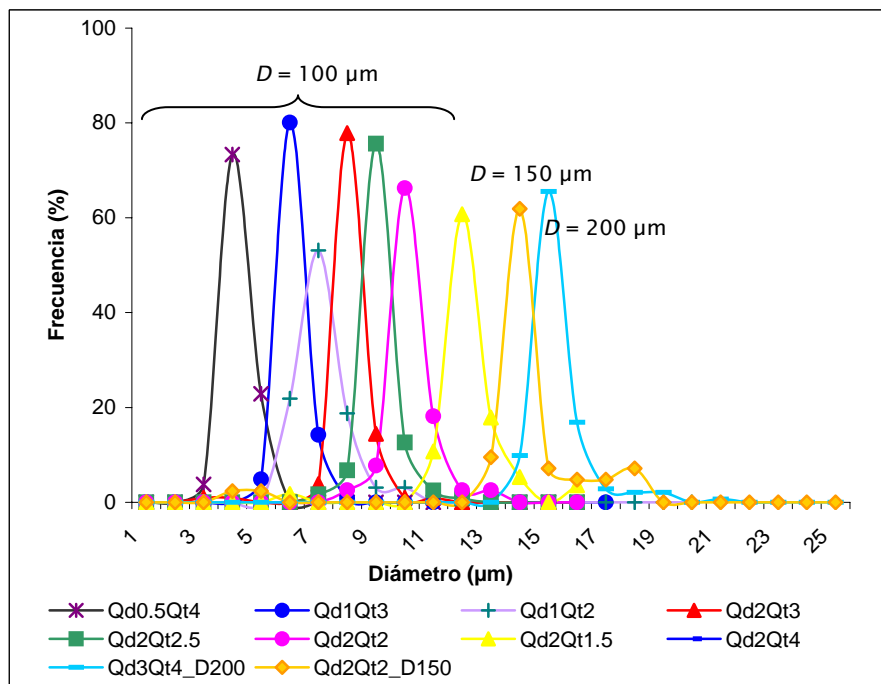


Figura 47 Distribución de tamaños de partículas obtenidos para las condiciones señaladas (Qd mL/h; Qt mL/min)

Por otro lado, mediante este estudio, se pone de manifiesto la versatilidad del sistema de forma que utilizando un único nebulizador es posible obtener diferentes tamaños de partículas. Así, modificando únicamente los caudales de los fluidos *enfocado* y *enfocante* es posible ir modificando el tamaño de partícula prácticamente de micra en micra pudiéndose tener un control exhaustivo del tamaño de partícula.

Utilizando sólo fuerzas hidrodinámicas y un diseño geométrico adecuado FF se presenta como una técnica robusta y controlable.

El tamaño de partícula también es posible controlarlo modificando la concentración de la disolución polimérica, en nuestro caso el fluido enfocado. En la figura 48 se representa el efecto de la concentración para dos combinaciones de caudal enfocado-enfocante para un nebulizador con D igual a $100\ \mu\text{m}$.

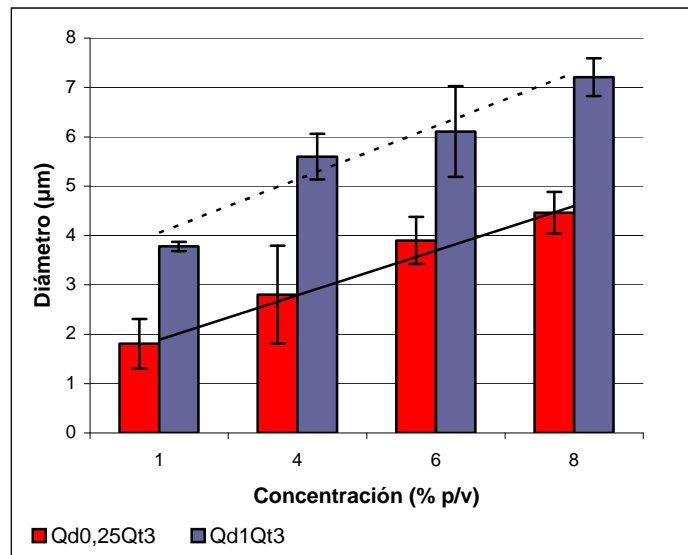


Figura 48. Influencia de la concentración polimérica en el tamaño de partícula (barra error: DE (μm); Qd (mL/h); Qt (mL/min))

Como se puede ver el aumento del tamaño de partícula con la concentración siguió un ajuste lineal. Las ecuaciones de las rectas de mejor ajuste para cada condición fueron:

$$\text{Qd1Qt3: } d = 0.9049C + 0.9797$$

$$r^2 = 0.984$$

$$\text{Qd0.25Qt3: } d = 1.081C + 2.9709$$

$$r^2 = 0.950$$

3.4.2.2. Influencia del material del capilar

Los nebulizadores empleados en el presente trabajo fueron fabricados en acero inoxidable. Sin embargo, el material del capilar por el que circula el líquido enfocado

fue en todos los casos de sílica recubierta de una capa de poliamida (Polymicro Technologies, EE.UU).

Para el montaje de los nebulizadores, estos capilares de sílica son afilados de forma que la capa de poliamida es eliminada en la punta del capilar (ver figura 49).

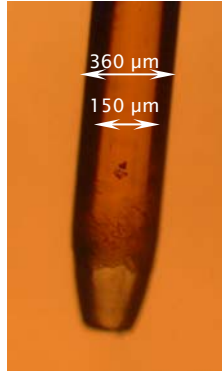


Figura 49. Capilar de sílica afilado empleado para la producción de micropartículas de poliestireno

La ventaja fundamental de utilizar este material es su fácil manejo lo que favorece el afilado. Por otro lado, su relativa fragilidad supone una ventaja adicional en determinadas situaciones.

Concretamente, nos referimos a las operaciones de montaje y lavado. Éstas implican abrir y cerrar la placa, por lo que en caso accidental de posicionar la placa a una distancia $H < 0$, la punta del capilar se rompería deformándose, quedando un borde irregular, no afilado pero sin deformar la placa en el entrono del orificio.

En otras ocasiones se requiere un material más resistente como el acero inoxidable, sobre todo para el montaje de nebulizadores múltiples que implican más de un capilar. El inconveniente del acero inoxidable, es que en caso de $H < 0$, no se deformaría el capilar si no la placa en el entrono del orificio. En este punto el espesor de la placa es sumamente delgado ($\sim 100 \mu\text{m}$). Esta deformación implicaría la fabricación de una nueva placa por un operario especializado.

Con objeto de escalar el proceso de producción y emplear capilares de acero inoxidable en un nebulizador múltiple, se llevó a cabo un breve estudio de la influencia del material del capilar del nebulizador para la producción de micropartículas de poliestireno.

Se compararon los resultados obtenidos en cuanto a tamaño de partícula y distribución de tamaño para tres combinaciones de caudales diferentes. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 50.

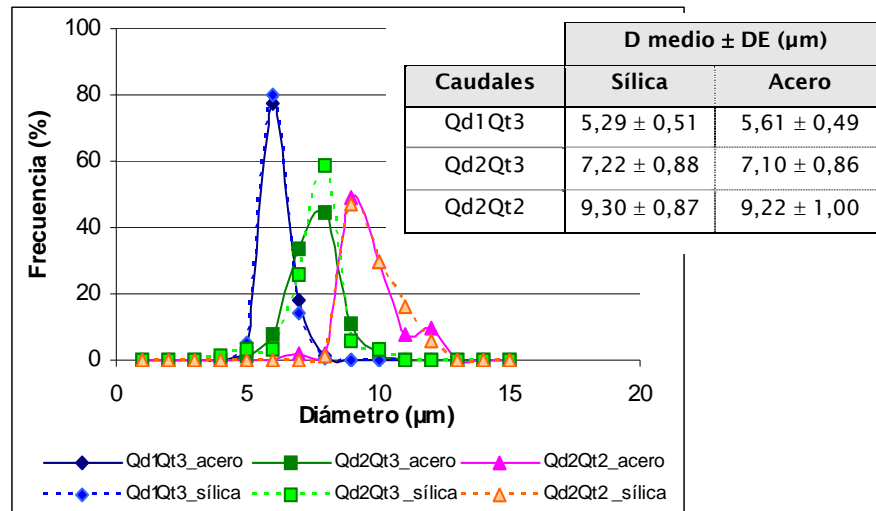


Figura 50. Resultados obtenidos en cuanto a tamaño y distribución de tamaño para partículas de PS elaboradas con capilares de sílica (línea discontinua) o acero inoxidable (línea continua)

Como puede verse, en las tres condiciones se obtuvieron tamaños y distribuciones de tamaños similares a pesar de presentar los capilares empleados distinta naturaleza. La sílica podemos considerarla como vidrio de naturaleza hidrofílica mientras que el acero inoxidable es de naturaleza típicamente hidrofóbica (hidrofobicidad media) (Guillemot y cols., 2006).

Los resultados obtenidos muestran que en ningún caso hubo problemas de mojado y que el material del capilar empleado no afectó ni al tamaño de partícula ni a la distribución de tamaño.

3.4.2.3. Reproducibilidad del proceso

Una vez realizado el barrido de condiciones experimentales utilizando distintos nebulizadores y habiéndose fijado unos valores para Qd y Qt para la obtención de micropartículas de distinto tamaño monodispersas, se procedió a estudiar la robustez y la reproducibilidad del sistema. Para ello se elaboraron una serie de lotes de partículas bajo las mismas condiciones. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla 16.

D (μm)	Qd (mL/h)	Qt (mL/min)	dp _{inter-lote} (μm)	DE (μm) Inter-lote	CV (%) Inter-lote	n
100	0,5	4	3,30	0,27	8,10	3
	1	3	5,60	0,46	8,21	18
	2	3	7,26	0,19	2,62	5
	2	2	9,28	0,27	2,86	5
150	2	2	14,74	1,64	11,13	2
	2	2,5	11,83	0,31	2,66	2
	2	3	10,81	0,31	2,91	2
200	2	4	11,62	0,55	4,76	3
	3	4	14,63	0,96	6,53	18

Tabla 16. Tamaños de partícula medio contemplando la variabilidad inter-lote para las condiciones indicadas

Como puede verse la variabilidad entre lotes, expresada en CV (%), para las diez condiciones ensayadas fue siempre inferior al 10 %, excepto para uno de los casos en que fue de 11,1 %. Estos resultados ponen de manifiesto que el proceso de obtención de micropartículas mediante FF es un proceso totalmente reproducible.

3.4.2.4. Ajuste de los resultados experimentales a los teóricos

Para realizar el ajuste entre los resultados experimentales y los teóricos, se utilizó la expresión (ec. 8) para el cálculo del diámetro del chorro (Gañán-Calvo, 1998a).

$$d_j = \left(\frac{8\rho_d}{\pi^2 \Delta P} \right)^{1/4} Q_t^{1/2} \tag{8}$$

donde ρ_d es la densidad del fluido enfocado, Q_t es el caudal el fluido enfocante e ΔP viene determinado por Q_t y la geometría del orificio (D, L, H, D_o). Esta expresión es válida para fluidos poco viscosos y números de We suficientemente altos.

El tamaño de la gota dependerá de los números adimensionales de Weber (relación entre la presión aplicada ΔP y las fuerzas de tensión superficial) y Ohnesorge (relación entre fuerzas viscosas y tensión superficial).

Para valores de We pequeños ($\sim 40 > We > 3$), el tamaño teórico de gota se puede calcular asumiendo que el chorro permanece constante una vez que sale por el orificio y considerando que la rotura del chorro sigue la predicción de Weber (Teng y cols., 1995) de forma que:

$$\frac{d_g}{d_j} = \left(\frac{3\pi}{\sqrt{2}} \right)^{1/3} (1 + Z^*)^{1/6} = X \quad (15)$$

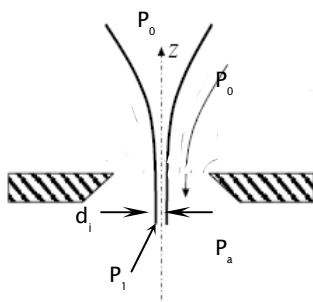
donde Z^* es el numero de Ohnesorge modificado,

$$Z^* \equiv \frac{(3\mu_d + \mu_t)}{(d_0 \rho \sigma)^{1/2}} \quad (16)$$

y μ_d y μ_t son las viscosidades de los fluidos *enfocado* y *enfocante* respectivamente.

En nuestro caso, como fluido enfocante se ha usado agua destilada con densidad similar a la de la solución polimérica, *enfocado*, de forma que se puede considerar que no existen diferencias en cuanto a velocidad entre las dos fases ($v_d = v_t$), ya que las dos presentan la misma inercia en FF. Por lo tanto, el único parámetro relevante será la relación de viscosidades y tensión superficial entre las dos fases, es decir, el número de Ohnesorge.

La presión dentro del nebulizador será la misma (P_0). La zona del orificio dentro del chorro, se considera la zona de menor estrechamiento o "vena contracta", en este punto se puede considerar que la presión local ejercida por el enfocante es igual a la ambiental (P_a). La rotura del chorro siempre se deberá a los efectos de la tensión superficial. Por otro lado, siempre que los valores de We sean suficientemente altos frente a los de tensión superficial podremos igualar las velocidades para los dos fluidos y por tanto las energías cinéticas. De este modo podemos deducir la expresión (17) para el diámetro del chorro.



Enfocante: $\Delta P = P_0 - P_a$

Enfocado: $\Delta P = P_0 - P_1 = \frac{1}{2} \rho \left(\frac{4Q}{\pi d_j^2} \right)^2$

$$\left. \begin{aligned} v_d &= \frac{4Q_t}{\pi(D^2 - d_j^2)} \\ v_t &= \frac{4Q_d}{\pi d_j^2} \end{aligned} \right\} Ec_t = Ec_d = \frac{1}{2} \rho v^2 \Rightarrow$$

$$\rho_t v_t^2 = \rho_d v_d^2 \Rightarrow \left(\frac{\rho_t}{\rho_d} \right)^2 = \frac{Q_d}{Q_t} \frac{d_j^2}{(D^2 - d_j^2)}$$

$$d_j = D \left[1 + \left(\frac{\rho_t}{\rho_d} \right)^{1/2} \frac{Q_t}{Q_d} \right]^{-1/2} \quad (17)$$

Una vez conocida la expresión para el diámetro del chorro (d), se puede calcular el diámetro de gota a partir de (14) y (15):

$$d_g = X * d_j$$

$$d_p = d_g * \left(\frac{C/10}{\rho_p} \right)^{1/3} = X * d_j * \left(\frac{C/10}{\rho_p} \right)^{1/3} \quad (18)$$

donde C es la concentración del polímero en v/v (m^3/m^3) y ρ_p (Kg/m^3) la densidad del polímero.

Utilizando una geometría FF la formación del chorro tendrá lugar siempre que las fuerzas de inercia superen a las fuerzas de tensión superficial, es decir, se requieren números de Weber suficientemente grandes.

En la gráfica de la figura 51, se representa el tamaño de partícula medio (d_{50}) frente al caudal (Q), éstos en forma adimensional utilizando d_0 y Q_0 como referencia (Gañán-Clavo, 1998a):

$$d_0 = \frac{\sigma}{\Delta P} = \frac{\sigma}{Ec} = \quad (10); \quad Q_0 = \left(\frac{\sigma^4}{\rho \Delta P^3} \right)^{1/2} \quad (13)$$

donde d_0 hace referencia al mínimo diámetro de gota posible y Q_0 al mínimo caudal de líquido que se puede inyectar para obtener un chorro estacionario.

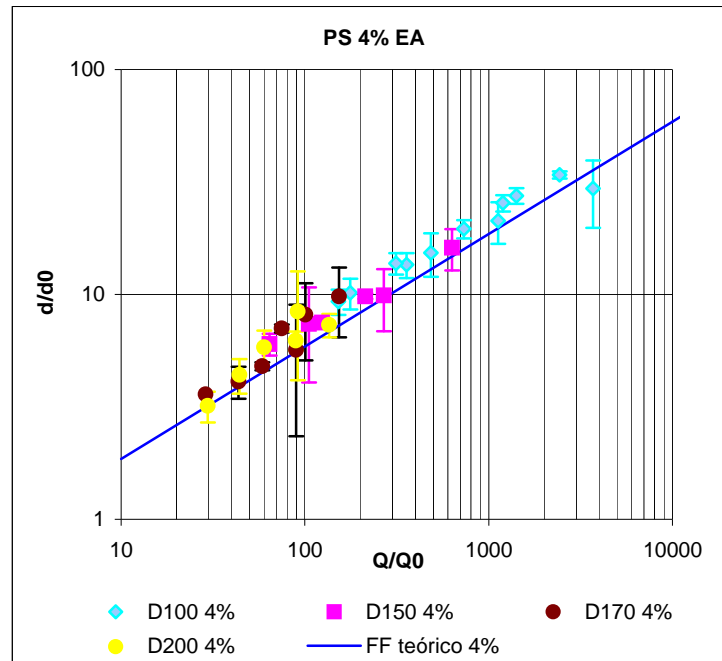


Figura 51. Ajustes entre datos experimentales y valores teóricos para diferentes valores de D y C igual 4% p/v (barras error: DE/d_0)

Como puede verse para todos los valores de D (100, 150, 170 y 200 μm) se obtuvo un buen ajuste entre los valores teóricos y los experimentales.

El rango de valores de Weber fue de 115 - 5, sin embargo, se obtuvieron partículas monodispersas para valores de $We \sim 47 - 6$. Para el número de Reynolds el rango fue de 866 - 314, números de Re moderadamente altos, que permiten una alta producción de partículas, del orden de $10^5 - 10^6$ MPs /s a través de un solo orificio.

Se observa un valor mínimo y máximo de We y un valor máximo de Re para los que se obtienen partículas monodispersas (ver figura 52b): $We_{\text{mín}} \sim 6$ y $We_{\text{máx}} \sim 50$; $Re_{\text{máx}} \sim 650$. Superponiendo la gráfica obtenida al representar los valores de We frente a Re para cada D (PS 4% p/v) a la gráfica de zonas de desintegración que recoge el trabajo de revisión de Sirignano y Mehring (2000) sobre desintegración de chorro de líquidos, vemos que todos los datos experimentales obtenidos experimentalmente quedan en la zona de rotura de Rayleigh, sólo dos datos experimentales sobrepasan esta zona de rotura.

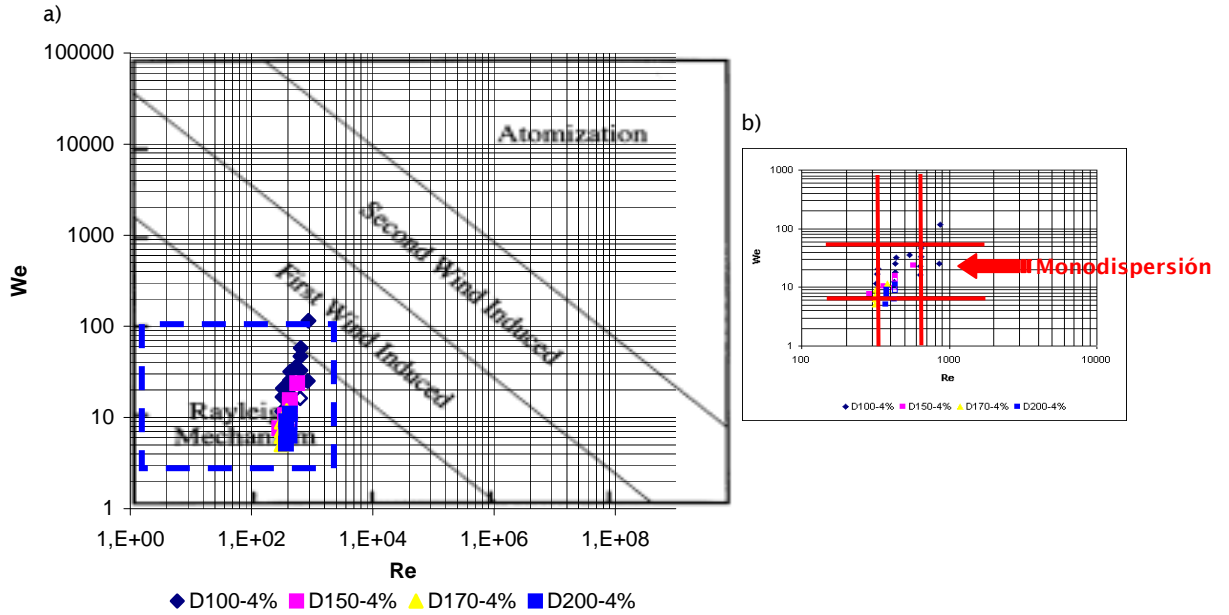


Figura 52. (a) Zonas de desintegración de líquidos en el rango de We frente a Re (Sirignano y Mehring, 2000) y datos experimentales correspondientes a MPs monodispersas en función de D (PS 4% p/v); (b) ampliación de la gráfica marcada en azul

Respecto a la dependencia del GSD con el número de We , podemos ver en la gráfica de la figura 53 que para la mayoría de los datos experimentales se cumple que los valores de GSD aumentan con el número de We , sólo en ciertos casos no se cumple esta tendencia, resultado que se podría asociar a un incorrecto funcionamiento del sistema.

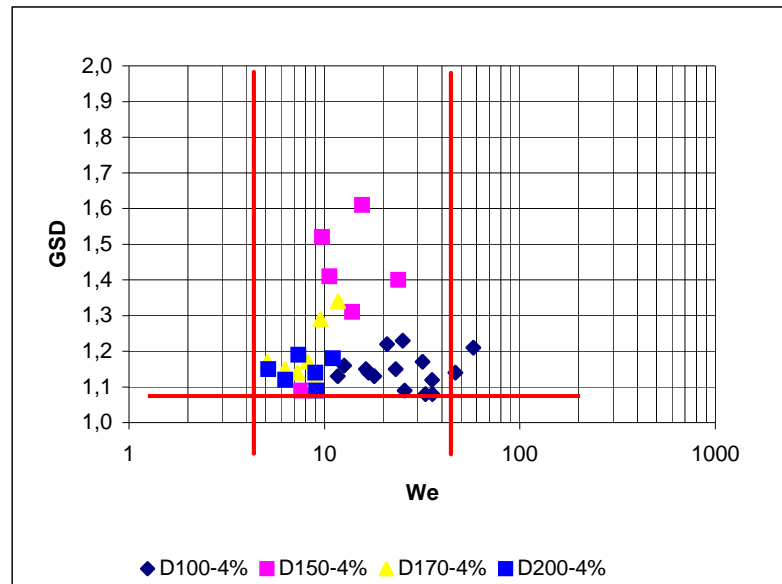


Figura 53. Dispersión del tamaño de partícula en función del número de Weber

Para el número de Oh se obtuvieron siempre valores mucho menores que la unidad ($Oh \sim 0.1 - 0.3$) lo que nos indica que las fuerzas de viscosidad son despreciables frente a la tensión superficial. En la tabla 17 se recogen los valores de los tres números adimensionales para cada condición ensayada.

D (μm)	Qt (ml/min)	Qd (ml/h)	We _d	Oh _d	Re _t
100	4	0,25	25,10	0,28	849,71
		0,5	35,56	0,24	850,59
		5	115,42	0,13	866,51
	3	3	57,74	0,14	647,23
		2	46,78	0,16	643,69
		1	32,82	0,19	640,16
		0,5	23,12	0,22	638,39
	2,5	0,25	16,31	0,26	637,50
		2	35,70	0,15	537,59
	2	3	31,79	0,13	435,02
		2	25,66	0,14	431,49
		1	17,93	0,17	427,95
		0,5	12,61	0,20	426,18
	1,5	3	20,89	0,12	328,92
2		16,80	0,13	325,38	
1		11,69	0,16	321,85	
150	4	2,5	23,83	0,13	571,43
	3	2,5	15,56	0,12	429,96
		2	13,86	0,13	428,85
		1	9,72	0,15	426,63
	2,5	2	10,58	0,12	358,12
2	2	7,60	0,12	287,38	
170	3	3	11,75	0,11	380,36
		2	9,52	0,12	378,40
		1,5	8,21	0,13	377,42
	2,5	3	8,98	0,10	317,94
		2	7,27	0,12	315,99
		1,5	6,26	0,12	315,01
200	4	1	5,09	0,14	314,03
		3	11,05	0,11	429,41
		2	8,97	0,12	427,74
	3,5	1	6,30	0,14	426,08
		1	5,16	0,14	373,03
		2	7,35	0,12	374,69
		3	9,06	0,10	376,36

Tabla 17. Valores números adimensionales We, Oh y Re para las condiciones ensayadas (PS 4% p/v) (en negrita, condiciones donde se han obtenido MPs monodispersas)

El ajuste de los valores experimentales obtenidos en función de la concentración del polímero también fue bastante estrecho con los datos teóricos como puede verse en la figura 54.

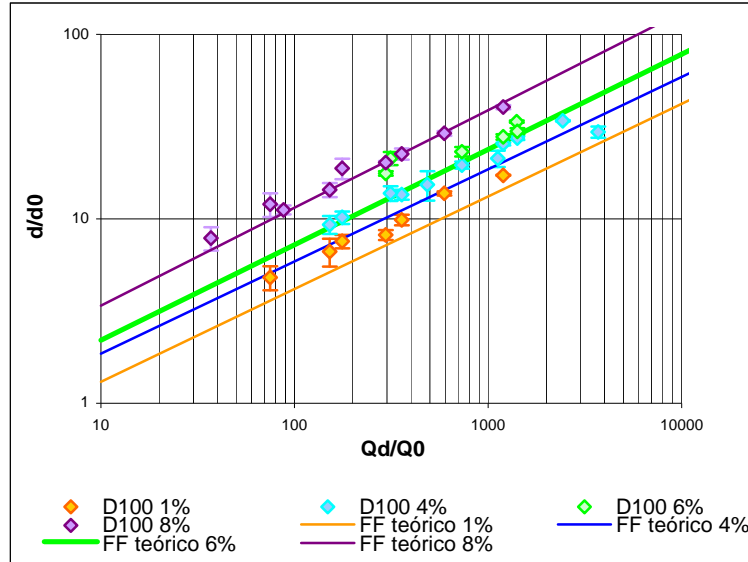


Figura 54. Ajuste de los diámetros teóricos y experimentales obtenidos en función de la concentración del polímero: \blacklozenge 1, \blacklozenge 4, \blacklozenge 6 y \blacklozenge 8% p/v para $D = 100 \mu\text{m}$ (barras de error: DE)

En todos los casos los valores experimentales fueron ligeramente superiores a los teóricos. Al estudiar la relación entre la desviación y la concentración de polímero empleada, se encontró que el porcentaje de desviación decrece de forma exponencial con la concentración del polímero. En la figura 55 se muestra la tendencia de la desviación con la concentración.

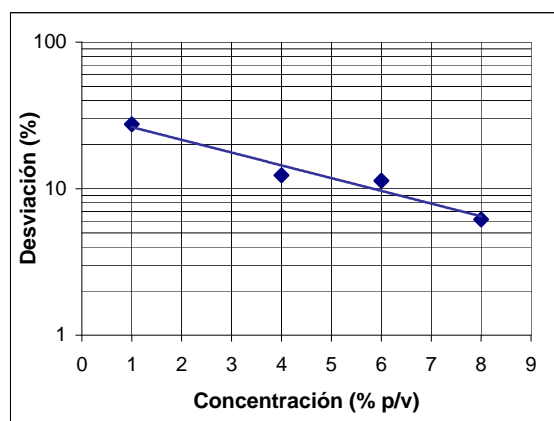


Figura 55. Desviación de los valores experimentales respecto a los teóricos en función de la concentración de polímero empleada

Estos resultados pueden tener dos posibles explicaciones. Para $C = 1 \%$ p/v, se obtuvieron los menores tamaños de partícula, siendo el rango de partícula producido de 2-5 μm de diámetro, por lo que es posible que los errores a la hora de determinar el tamaño de partícula mediante microscopía óptica sean mayores.

Por otro lado, una menor concentración del polímero, implica una mayor cantidad de disolvente a extraer desde la gota. El procedimiento de secado para todas las concentraciones de polímero empleadas fue el mismo, por lo que es posible que el secado sea menos efectivo a menor concentración polimérica quedando una mayor cantidad de disolvente residual en la matriz polimérica.

3.4.2.5. Determinación del caudal mínimo de fluido enfocado

Como se ha mostrado en capítulos anteriores, mediante la tecnología FF es posible obtener partículas monodispersas en la escala micrométrica utilizando dispositivos de dimensiones mucho mayores (escala micrométrica).

El interés en determinar el caudal mínimo posible para obtener partículas monodispersas dentro de esa escala micrométrica es establecer una posible transición entre los regímenes de *dripping* o goteo y *jetting*.

En una situación de *dripping* el tamaño de las gotas producidas es del orden del tamaño del orificio por lo que estaríamos en una situación desfavorable para la producción de partículas para su utilización en *arrays*, donde se prefieren partículas de diámetro medio menor a 20 μm .

Experimentalmente, se observa la existencia de un caudal mínimo para el enfocado (Qd_{min}) por debajo del cual el chorro no es estable. Analizando los resultados experimentales obtenidos, se advierten dos fenómenos: (I) para un Qd dado la formación del chorro no es posible y por tanto tampoco la generación de gotas y (II) por otro lado, por debajo de un Qd dado se pierde la monodispersión.

En la tabla 18 se recogen las condiciones experimentales donde se observan estos dos fenómenos.

C (%p/v)	Geometría Nebulizador			Caudales			Números adimensionales	
	D0 (μm)	D (μm)	H (μm)	Qt (mL/min)	Qd (mL/h) transición		We	Re
4	75	50	100	2	0,5	0,25	100,67	636,62
				3	0,1	0,05	82,71	954,93
	150	100	100	3	< 0,25		16,31	637,50
	150	170	100	3	< 1		8,21	377
	150	150	150	3	2	1	13,86	428,85
	150	200	100	4	2	1	8,97	427,74
1	150	100	100	3	0,5	0,25	23,12	638,28

Tabla 18. Posibles valores de Qd mínimo para las condiciones especificadas

Actualmente, el Prof. Gañán Calvo, junto con otros miembros de su grupo de investigación, están trabajando en este campo. Se trata de un tema complejo y en investigación (Gañán-Calvo y Riesco-Chueca, 2006). A continuación, describiremos brevemente los tipos de inestabilidad que podemos encontrar.

Tipos inestabilidad

Se diferencian dos tipos de inestabilidades en la rotura de un chorro. Inestabilidad absoluta o *dripping* e inestabilidad convectiva o *jetting*.

Para que el chorro avance es necesario vencer los efectos de la tensión superficial. El chorro estará gobernado por el frente de propagación de la perturbación, uno aguas abajo y otro aguas arriba, como se indica en el esquema representado en la figura 56.

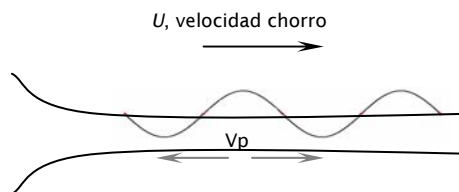


Figura 56. Esquema del frente de propagación de la perturbación en un chorro

Si la velocidad del frente de propagación, V_p , aguas arriba es menor que la velocidad del chorro, U , la perturbación desaparecerá y estaremos en una situación de inestabilidad convectiva o *jetting*.

Si el caudal disminuye hasta cierto valor, el chorro disminuirá su velocidad y aumentará la V_p e irá aguas arriba parando el chorro debido a los efectos de la tensión superficial. En estas condiciones estaremos en una situación de inestabilidad absoluta o *dripping*.

3.4.2.6. Reducción tamaño de partícula (escala nanométrica)

En general, las nanopartículas las podemos clasificar en dos grupos, aquellas diseñadas y creadas con una serie de propiedades específicas para una aplicación concreta y aquellas generadas de forma no intencionada como pueden ser las derivadas de la combustión. En la actualidad el primer tipo de nanopartículas juegan un importante papel en numerosos campos como pueden ser el diseño de nuevos materiales, ingeniería de tejidos, terapia génica, estudios de fagocinética, bio-detección de patógenos, etc. Son campos en los que sólo tienen cabida este tipo de partículas. Con este estudio se pretende reducir el tamaño de partícula hasta la escala nanométrica con el objeto de aumentar las posibilidades de aplicación de la producción de partículas poliméricas.

Para ello se adoptaron dos estrategias:

- reducir el diámetro del orificio a 50 micras y
- modificar la geometría de la salida del nebulizador. En este último caso, la salida del nebulizador no fue un orificio sino un tubo capilar

Con este estudio se pretenden obtener partículas con diámetros inferiores a 1 micra. Para medir estos tamaños, la técnica empleada hasta el momento, microscopía óptica no presenta la suficiente resolución para obtener valores fiables en algunas de las condiciones ensayadas por ello se ha recurrido a otras técnicas como son PCS (*photon correlation spectroscopy*), también llamada DLS (*dynamic light scattering*), basada en la observación del movimiento browniano.

El ritmo y la amplitud de movimiento son inversamente proporcionales al tamaño de partícula (las más pequeñas se moverán de forma más rápida). Este movimiento es detectado analizando las fluctuaciones en el tiempo de la luz dispersada por las partículas cuando son iluminadas con un láser.

Las fluctuaciones de concentración y densidad de una muestra provocan cambios en la constante dieléctrica local. Esto provoca fluctuaciones en la frecuencia y en la intensidad de la luz dispersada. Midiendo la función de auto-correlación de la luz dispersada se puede obtener información de la dinámica del sistema.

Cuando partículas monodispersas son expuestas a una luz monocromática, con simetría radial, aparece un plano focal de una lente proyectora del espectro de difracción de Fraunhofer, el cual consiste en un círculo luminoso rodeado por otros círculos luminosos y oscuros, concéntricos con el primero, cuyos diámetros se correlacionan con el tamaño de partícula. Éstos son captados y analizados por un fotodetector.

Combinaciones de distintas poblaciones de tamaño de partícula dan una combinación espectral que correlaciona con la distribución de tamaño a través de una operación de deconvolución.

Los equipos usados fueron un Malvern Zetasizer (PCS) cuyo rango de medida es de partículas de 0.02 a 2 μm de diámetro y un Sympatec HELOS/BF-MAGIC cuyo rango de medida es de 0.5 a 80 μm .

3.4.2.6.1. Reducción tamaño orificio salida (D)

Recordemos que los diámetros de orificio usados hasta el momento habían sido de 100, 150, 170 y 200 micras y ahora se ha reducido el tamaño a 50 μm . Al igual que para los otros diámetros de partícula se hizo un barrido de condiciones experimentales para Qd y Qt.

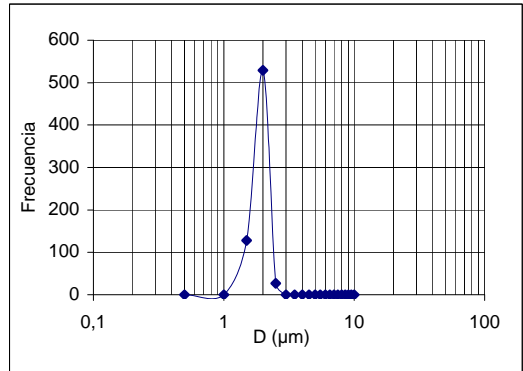
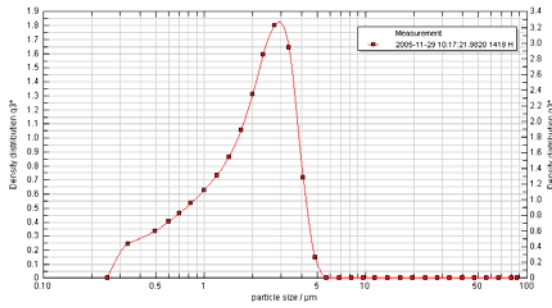
En la tabla 19 quedan recogidos los resultados obtenidos para cada condición ensayada en función del método de medida empleado y comparados con los tamaños teóricos que FF predice, así como los valores de los principales números adimensionales (We y Re).

Qd (mL/h)	Qt (mL/min)	We	Re	D teór. (μm)	D exp (μm)	GSD	Técnica medida
0.05	3	58.481	954.927	0.502	0.77	1.78	sympatec
0.1	1.5	29.241	477.464	1.004	1.11	1.53	sympatec
	2	45.019	636.618	0.870	1.087	1.34	sympatec
	3	82.705	954.927	0.710	0.71	1.78	sympatec
0.25	1.5	46.233	477.464	1.588	1.66	1.39	sympatec
	2	71.181	636.618	1.375	1.668	1.112	óptico
					2.049	2.04	sympatec
3	130.768	954.927	1.123	0.906	-	zeta	
0.50	1.5	65.384	477.464	2.246	2.23	2.83	sympatec
	2	100.665	636.618	1.945	2.411	1.131	óptico
	3	184.933	954.927	1.588	1.313	1.76	sympatec
1	1.5	92.467	477.464	3.176	2.63	1.164	óptico
	2	142.362	636.618	2.751	3.30	1.276	óptico
					2.751	2.43	sympatec
3	261.535	954.927	2.246	1.562	2.10	sympatec	

Tabla 19. Resultados obtenidos para D 50 μm para cada técnica de medida y valores de We y Re para cada condición ensayada

Para algunas condiciones (Qd0.25 Qt2 y Qd1 Qt2) se compararon los resultados experimentales obtenidos utilizando las dos técnicas de medida (ver figura 57).

(a) Qd0.25 Qt2



(b) Qd1 Qt2

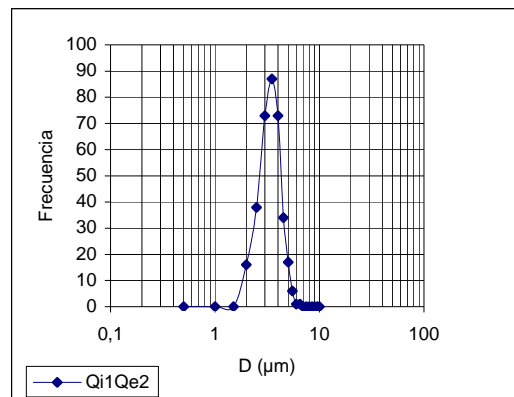
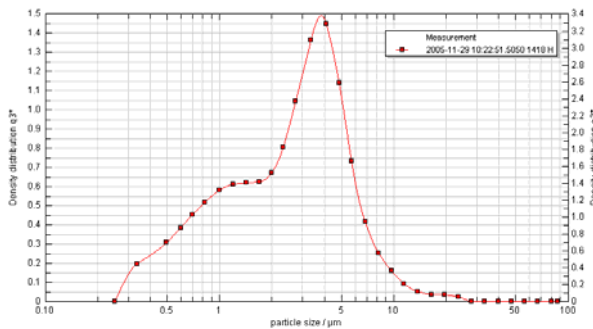


Figura 57. Distribución tamaños de partícula obtenidos para: (a) Qd0.25 Qt2 y (b) Qd1 Qt2 en función de la técnica de medida (DLS (izqda.) y óptico (dcha.))

En el caso de las curvas obtenidas mediante DLS aparecen colas para los tamaños inferiores ($D < 1 \mu\text{m}$). El límite inferior de detección del equipo es de $0.5 \mu\text{m}$, por lo que la distribución de tamaños puede no ser fiable y por lo tanto los valores de GSD no han de tenerse en consideración. Por otro lado, hay que en cuenta que cada técnica proporciona diferentes medidas del diámetro, así como diferentes propiedades de la partícula.

En la figura 58 se muestran dos imágenes de SEM para aquellas partículas de menor tamaño obtenidas reduciendo el tamaño del orificio de salida del nebulizador.

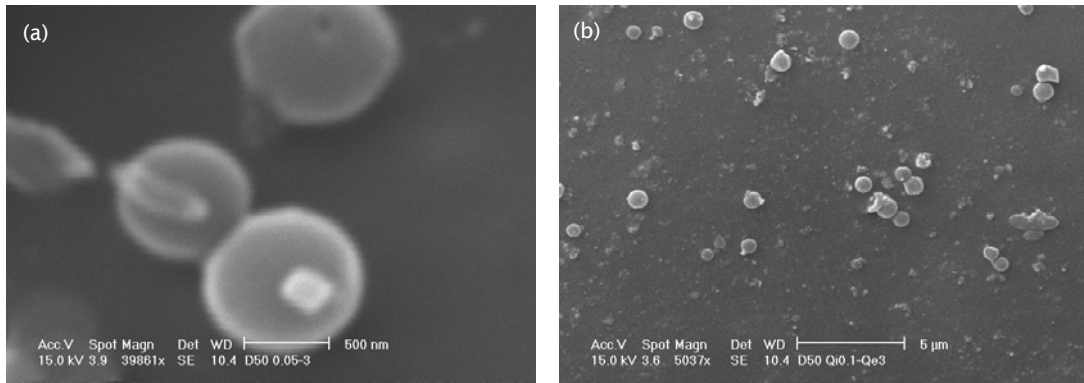


Figura 58. Imágenes de SEM de partículas nanométricas obtenidas con un nebulizador con $D = 50 \mu\text{m}$: (a) 770 nm (Qd0.05 Qt3) y (b) 710 nm (Qd0.1 Qt3)

En estas condiciones se obtuvieron partículas con diámetros 65 y 70 veces menores que el tamaño del orificio de salida del nebulizador.

3.4.2.6.2. Modificación de la geometría de la salida del nebulizador

En este caso la salida del nebulizador no fue un orificio de espesor L sino un tubo capilar de longitud λ . Para comprobar el efecto del cambio de geometría se utilizó una solución de PS al 4 % en EA y se compararon los resultados obtenidos para $D = 100 \mu\text{m}$ y para un tubo capilar de diámetro interno $100 \mu\text{m}$ y longitud $\lambda = 1.78 \text{ mm}$.

En la tabla 20 se resumen los resultados obtenidos para cuatro combinaciones de caudales ensayadas.

Salida nebulizador	Qd (mL/h)	Qt (mL/min)	D medio (μm)	DE (μm)	CV %	GSD	Reducción D medio (%)	Reducción CV (%)
orificio	0,5	2	5,04	0,79	15,71	1,16	19,66	27,4
capilar			4,05	0,46	11,40	1,11		
orificio	0,5	3	5,18	0,83	16,02	1,16	53,57	37,1
capilar			2,41	0,24	10,08	1,12		
orificio	1	3	5,29	0,51	9,61	1,20	31,10	5,9
capilar			3,64	0,33	9,04	1,10		
orificio	2	3	7,22	0,88	12,23	1,14	40,92	-62,7
capilar			4,26	0,85	19,90	1,28		

Tabla 20. Efecto modificación geometría del nebulizador en el tamaño de partícula y en la distribución de tamaños (diámetro de salida $100 \mu\text{m}$)

Los cambios producidos en la geometría supusieron un aumento del espesor del orificio de 17.8 veces, es decir, la formación del chorro y su posterior rotura ocurrieron dentro de un espacio confinado. Como puede verse éstos cambios en la salida del nebulizador se tradujeron en una importante reducción del diámetro medio de partícula, de al menos un 20 % (en el mejor de los casos fue de un 50%). Por otro lado,

también se consiguieron distribuciones de tamaño de partícula más estrechas reduciéndose los valores del CV entre 5-37 %, excepto para una condición donde éste aumentó (Qd2Qt3_capilar). El número de We para este caso concreto fue de 47, teniendo en cuenta que el We máx observado experimentalmente para obtener partículas monodispersas fue de ~50, este aumento en el CV (%) puede deberse a que estamos en una situación límite. En la figura 59, se muestra el efecto en el tamaño de partícula del cambio en la geometría del nebulizador.

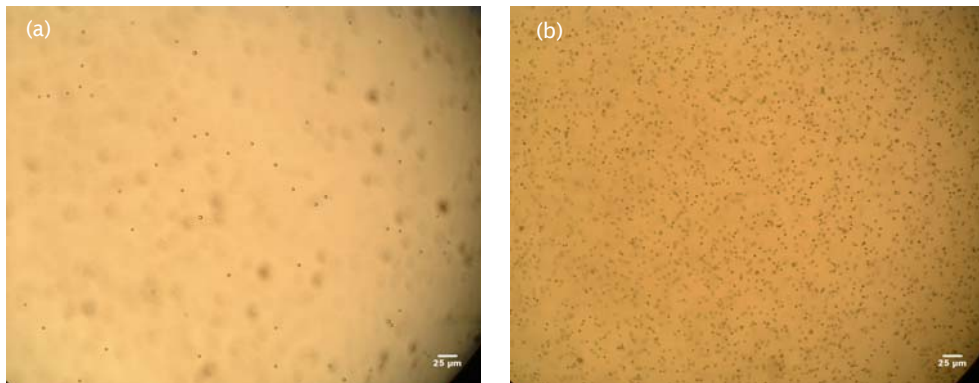


Figura 59. Efecto del cambio de geometría de la salida del nebulizador para Qd0.5 Qt3: (a) orificio y (b) tubo capilar

Estos resultados en cuanto a reducción del tamaño y de la dispersión, se deben a dos factores. Por un lado, a un aumento de la velocidad relativa del fluido enfocado al encontrarse en un espacio limitado lo que se traduce en una reducción del tamaño y por otro que las longitudes que crecen más rápidamente disminuyen de tamaño.

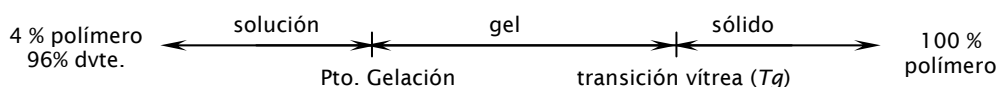
3.4.2.7. Formación de las micropartículas combinando FF y el método de extracción / evaporación del disolvente

A pesar de ser el método de extracción / evaporación del disolvente uno de los más empleados, la metodología de encapsulación se basa fundamentalmente en ensayo y error. Para conocer como afectan las condiciones experimentales a las propiedades finales de las micropartículas se han publicado diferentes trabajos que intentan explicar el fenómeno de formación de las micropartículas mediante este método. En la mayoría de ellos, la formación de la emulsión se realiza mediante algún sistema de agitación y el polímero implicado suele ser un biopolímero de ácido láctico y/o glicólico (Wang y Schwendeman, 1998; Li y cols 1995a,b, Rosca y cols., 2004, Liggins y Burt, 2004).

En el presente trabajo se ha empleado un nebulizador FF para generar la emulsión en vez de un sistema de agitación mecánica, el resto del proceso se llevó a cabo de forma

convencional. De esta forma, el proceso de formación de las partículas lo podemos dividir en dos pasos. En el primero, debido a la geometría propia de un nebulizador FF, hay que tener en cuenta las posibles interacciones entre los tres componentes del sistema (agua, disolvente, polímero) en el menisco generado dentro del nebulizador. En el segundo, se considerarán las interacciones entre la fase continua (acuosa) y la dispersa (orgánica) dentro del baño de agitación.

Los estados físicos por los que pasará la solución polimérica durante el proceso serán:



Cuando la solución polimérica se va concentrando debido a la progresiva transferencia de masa del EA, el polímero se va haciendo más viscoso en la fase dispersa alcanzando la zona de gelación. Este comportamiento se puede describir como gelación termoreversible donde las largas y flexibles cadenas del polímero tienden a elongarse y a atraerse unas a otras debido a las fuerzas de valencia secundaria (Li y cols., 1995a,b).

En el menisco

Para describir lo que ocurre en el menisco se ha recurrido al trabajo de Anna y Mayer de 2006.

En dicho estudio emplean un nebulizador FF fabricado en PMDS y observan la formación de un chorro de naturaleza acuosa conteniendo partículas fluorescentes al enfocar con un aceite mineral.

Lo que se observa es que durante la formación del chorro, la interfase agua-aceite permanece en estado estacionario adoptando una forma triangular perfecta presentando un ángulo característico ($2\alpha = 49^\circ$) (ver fig. 60).

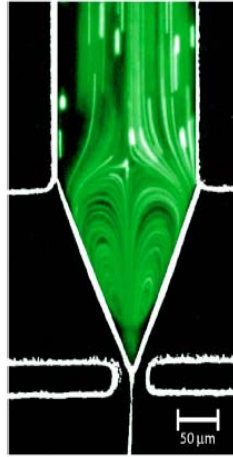


Figura 60. Imagen de las líneas de flujo del fluido enfocante conteniendo partículas fluorescentes durante la formación del chorro en una configuración líquido-líquido (Anna y Mayer, 2006)

Las imágenes de fluorescencia indican además, que en el cono, el fluido enfocado recircula pudiéndose observar dos vórtices simétricos al eje del dispositivo.

La transferencia de masa comenzaría en el momento en que las dos fases entraran en contacto, durante la formación del menisco. Sin embargo, experimentalmente, durante la formación de las partículas de poliestireno, se observa que esta transferencia de masa debe ser mínima ya que en este punto no hay problemas de obturación del dispositivo. Es probable que se forme una delgada película polimérica en la interfase la cual no impide la formación del chorro y su posterior rotura en gotas.

En el baño de agitación

La transformación de gota a partícula sólida se debe fundamentalmente a la salida del disolvente desde la fase interna o dispersa hacia la externa o continua. Esta transferencia de masa puede estar inducida por una extracción por dilución debido a un gradiente de concentración o por evaporación (gradientes de presión y temperatura).

Existen numerosos trabajos que describen la cinética de formación de la partícula (Li y cols. 1995a,b; Wang y Schwendeman, 1999; Bahl y Sah, 2000; Rosca y cols., 2004; Nagai y cols., 2000). Sin embargo, ninguno de ellos describe exactamente los fenómenos que ocurren en el método descrito en el presente trabajo. Las diferencias fundamentales son la utilización de un no-solvente para provocar la solidificación o la adición continuada de solvente para evitar una prematura separación de fases.

En el presente trabajo, debido al método particular empleado para la generación de las partículas, la proporción de fase continua (FC) frente a fase discontinua (FD) podemos considerarla despreciable. Partimos de un baño en agitación conteniendo 25 mL de FC

sobre el que se va añadiendo conjuntamente FD y FC, hasta obtener un volumen final en el baño de 100 mL. La velocidad de adición de la FC respecto a la FD es del orden de 10^2 superior, y el volumen final de la fase continua, V_{FC} frente al volumen final de la fase dispersa, V_{FD} , es entre 50 y 1000 veces mayor. Por este motivo, se considera que el fenómeno predominante en el endurecimiento de las gotas es la difusión del disolvente de la fase dispersa hacia la fase continua debido a un gradiente de concentración.

En estos sistemas, para una adecuada selección del disolvente es crucial tener en cuenta su solubilidad en agua. El proceso está gobernado por la cinética de disolución del disolvente en la fase acuosa externa más que por la presión de vapor del disolvente en el inicio antes de que la fase orgánica pierda su fluidez (Nagai y cols., 2000).

Por otro lado, en el caso de emplear polímeros de alto peso molecular la difusión del disolvente, será más lenta que en el caso de emplear polímeros de bajo peso molecular, sin embargo, la precipitación del polímero durante la dilución del disolvente en la FD será más rápida, por lo que es esperable que la formación de las partículas sea rápida (Bodmeier y cols., 1994).

En cuanto al grado de contracción que sufre la gota hasta la formación de la partícula sólida, se han calculado los factores de contracción en función de la concentración de polímero empleada. El factor de contracción, α , se define como la relación entre tamaño de gota inicial (d_g) y tamaño de partícula final (d_p):

$$\alpha = \left(1 + \frac{100\rho_{polimero}}{C_{polimero}} \right)^{1/3}$$

donde ; $\rho_{polimero}$ (g/mL) y $C_{polimero}$ (% p/v)

En la tabla 21 se recogen los resultados obtenidos para los factores de contracción teóricos ($\alpha_{teórico}$) y experimentales ($\alpha_{experimental}$), éstos calculados a partir de los tamaños teóricos que FF predice y los observados experimentalmente.

C (% p/v)	$\alpha_{teórico}$	$\alpha_{teórico}$	$\alpha_{experimental}$
1	4.43	4.65	4.72
4	2.83	3.23	2.94
6	2.50	2.57	2.60
8	2.29	2.34	2.36

Tabla 21. Factor de contracción teórico y experimental del tamaño de MPs en función de la concentración de polímero empleada

Como puede observarse existe la correlación entre los datos, teóricos y experimentales, fue muy estrecha.

3.4.3. Caracterización de las micropartículas

3.4.3.1. Estudio de la influencia del tipo de poliestireno y el tamaño de partícula en la morfología

La influencia del tipo de poliestireno empleado en la producción de las micropartículas, así como el tamaño final de las mismas fue estudiado con el objeto de explicar el fenómeno de extracción y evaporación del disolvente el cual provoca la solidificación de las gotas de fluido *enfocado* (Martín-Banderas y cols., 2005a).

Para ello, las disoluciones poliméricas se prepararon en acetato de etilo (EA) o en diclorometano (DCM) al 4% p/v, excepto en el caso del PSM que es insoluble en DCM. Los dos son disolventes apolares, siendo el DCM cinco veces más apolar que el EA (ver tabla 8). Los tamaños de partícula seleccionados fueron 5 y 15 micras de diámetro.

En el proceso de solidificación intervienen dos fases: interna u orgánica compuesta por el soluto y el solvente y externa o acuosa consistente en agua destilada (ver figura 61). El proceso estará gobernado por dos tiempos característicos asociados a los coeficientes de difusión (Δ) de cada uno de los líquidos que intervienen en el proceso (solvente \leftrightarrow agua destilada). Estos tiempos serán:

- (1) aquel necesario para que la gota solidifique, es decir, el necesario para la extracción del solvente desde la gota y
- (2) aquel necesario para que el soluto, el polímero, difunda y se concentre en el centro de la gota

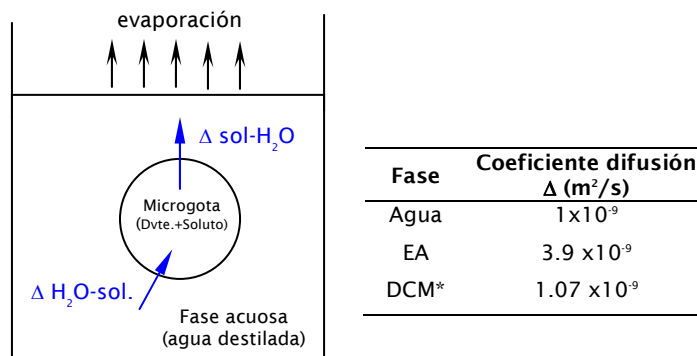


Figura 61. Esquema del proceso de solidificación de las gotas y valores de coeficiente de difusión (Δ) para las diferentes fases que intervienen ((*) Li y cols., 1995b)

El proceso de separación de fases es el resultado de un proceso de transferencia de masa entre el disolvente orgánico y el agua, lo que provoca una disminución de la

solubilidad del polímero en el solvente. Una separación instantánea entre fases, estará favorecida si el disolvente del polímero es soluble en agua hasta cierto valor (Yeo y cols., 2003).

De forma que cuánto más lento sea el proceso de secado de la gota, de solidificación, el polímero difundirá más suavemente hacia el centro de la gota haciéndola cada vez más densa y proporcionando una superficie lisa. Por el contrario, si el proceso es demasiado rápido, el polímero se acumulará cerca en la superficie de la gota, en la primera línea de secado y a medida que ocurra la evaporación del disolvente, éste será desplazado hacia la cara interna de la línea de secado provocando imperfecciones en la superficie de la partícula como reflejado en la figura 62.

En el proceso no sólo hay que tener en cuenta los fenómenos de difusión sino también la solubilidad de cada fase en la otra.

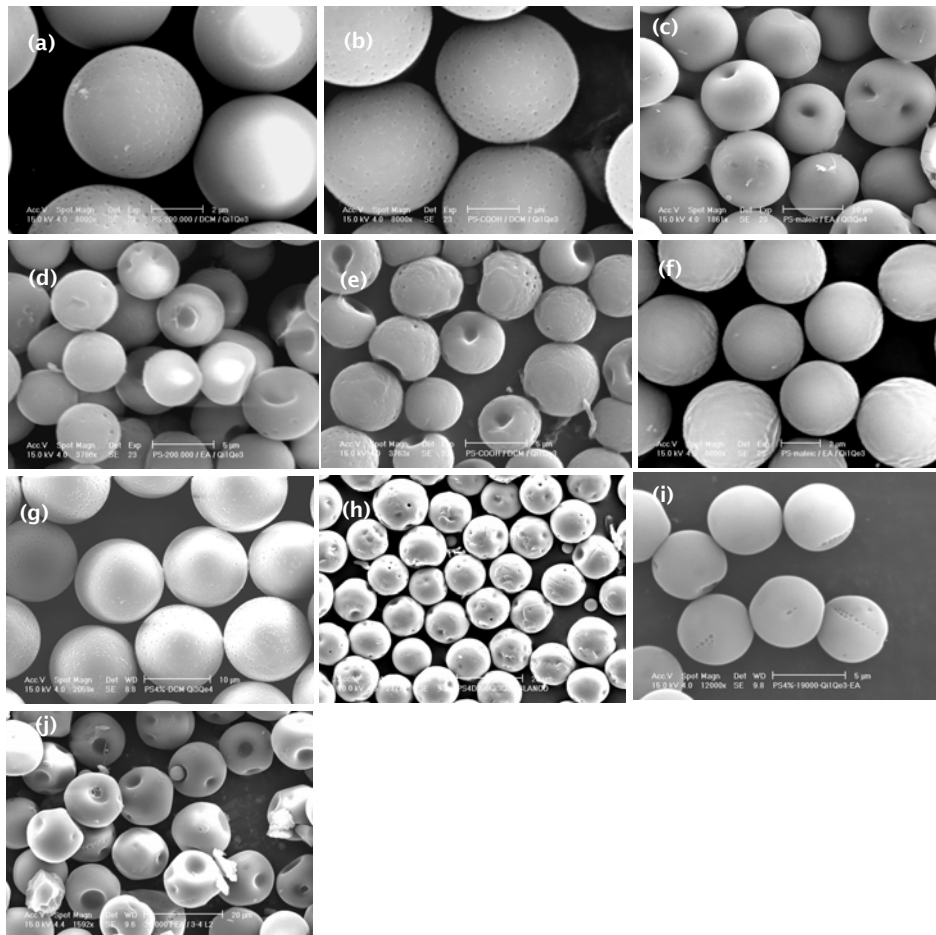


Figura 62. Morfología de micropartículas de poliestireno al 4% p/v. Efecto disolvente: DCM (5µm: a-c; 15 µm: g), EA (5µm:d-f; 15 µm: h). Efecto tamaño partícula: 5 µm (f, i) y 15 µm (c, j). Efecto hidrofobia: PS-COOH (e) y PSM (f). Efecto peso molecular, PS estándar: PM 200.000 (d) y PM 20.000 (i)

En los casos en que se empleó se utilizó EA como disolvente, más soluble en agua que el DCM, las micropartículas de menor tamaño (Figura 62d-f) presentaron una superficie lisa y uniforme, las de mayor tamaño (Figura 62h) presentaron hoyuelos en su superficie. Por el contrario, en los casos en que se utilizó DCM el aspecto de las micropartículas no se vio influenciado por el tamaño siendo en ambos casos muy regular (Figura 62a-c, g).

La naturaleza y las propiedades de los distintos tipos de poliestireno también influenciaron el aspecto final de las micropartículas. A medida que la hidrofobia del polímero disminuye (Figura 62e-f), la entrada de agua en la matriz polimérica se ve favorecida y por lo tanto el intercambio agua-solvente desde la gota de naturaleza orgánica hacia la fase acuosa es óptimo por lo que el gradiente de concentración de la partícula es suave proporcionando un aspecto liso, regular, sin imperfecciones.

Las micropartículas producidas con poliestireno de menor peso molecular (PM) (Figura 62i) presentaron también un aspecto más regular que aquellas producidas con polímeros de mayor PM (Figura 62d), esto es debido a que la salida del agua que pudiera entrar en la gota se ve favorecida.

3.4.3.2. Estudio de estabilidad de las MPs elaboradas

Llegados a este punto y antes de continuar con la producción de micropartículas codificadas para ensayos *multiplex*, se llevó a cabo un breve estudio de estabilidad de las MPs elaboradas.

El objeto de este estudio es comprobar si las partículas son estables al ser sometidas a condiciones de temperatura y pH necesarias durante alguno de los pasos en los procesos de unión más habituales en ensayos *multiplex*. Para ello las MPs fueron suspendidas en distintos medios en agitación continua y observadas al microscopio óptico a intervalos de tiempos prefijados.

Los tipos de partículas sometidas a estos ensayos fueron partículas elaboradas con mezclas binarias de los polímeros PS y PSMiso ó PSMsec en distintas proporciones. Para las mezclas PS:PSMiso, las proporciones ensayadas fueron: 30:70; 50:50 y 70:30. para las mezclas PS:PSMsec, las proporciones ensayadas fueron: 0:100; 30:70; 50:50 y 70:30.

En todos los casos, las micropartículas fueron resistentes a las condiciones a las que fueron sometidas, excepto en el medio Denhart a 90°C, donde sólo fueron estables aquellas partículas elaboradas con PSMsec 100%. El resto de partículas ensayadas, presentaron un halo de disolución como se muestra en la imagen de la figura 63.



Figura 63. Imagen del estado de MPs elaboradas con PS o mezclas de PS:PSM iso ó sec tras 10 min en medio Denhart a 90°C

3.5. CONCLUSIONES

1. En función a una serie de criterios, se ha llevado a cabo una selección del polímero más adecuado para la producción de micropartículas destinadas a sistemas de diagnóstico *multiplex*, resultando ser éste el poliestireno - maleico sec butilo (PSMsec) el más apropiado.
2. Se han establecido los parámetros geométricos que caracterizan a un nebulizador FF (D , D_o , H) para la producción de micropartículas monodispersas de diámetro menor a 25 μm fijándose éstos en: $H=100 \mu\text{m}$, $D_o = 150 \mu\text{m}$ y $D = 100, 150, 170$ y $200 \mu\text{m}$; en el caso de $D = 50 \mu\text{m}$, $D_o = 75 \mu\text{m}$, llegando a producir partículas en la escala nanométrica ($D_{\text{partícula}} = 0.71 \mu\text{m}$).
3. Se han establecido las condiciones de caudales para los fluidos enfocante y enfocado para producir partículas monodispersas en función de la geometría del nebulizador y de la concentración del polímero empleada.
4. De las condiciones anteriores se seleccionaron tres concretas para la producción de partículas codificadas ($C = 4\% \text{ p/v}$).

D (μm)	Qd (mL/h)	Qt (mL/min)	D partícula \pm DE (μm)	CV (%)
50	0.25	2	1.70 \pm 0.19	10.60
100	1	3	5.60 \pm 0.46	8.21
	2	2	9.47 \pm 0.87	9.19

5. Se ha demostrado que se trata de un proceso totalmente reproducible obteniéndose coeficientes de variación inter-lote entre 2.7 y 8.2 % para un rango de diámetro de partícula de 3 - 15 μm .
6. Se ha establecido un modelo teórico para la predicción del tamaño de partícula encontrándose un estrecho ajuste con los datos experimentales. El porcentaje de variación entre los datos experimentales y los teóricos fue mínimo y dependiente de la concentración de polímero empleada. Éste disminuye de forma exponencial al aumentar la concentración del polímero: $\text{Desvc. (\%)} = 32.17 e^{-0.2C}$ ($r^2 = 0.952$).
7. Se han identificado los fenómenos de transporte implicados en la solidificación de las gotas para la producción de las partículas. El fenómeno predominante es la difusión del disolvente desde la fase dispersa hacia la fase continua debido a un gradiente de concentración en el baño de solidificación durante la agitación.
8. El grado de contracción (α) que sufren las gotas en el proceso de solidificación varió en el rango de 4.4 - 2.3, ($C = 1, 4, 6, 8 \% \text{ p/v}$) encontrándose un buen ajuste entre los valores teóricos y los experimentales.

9. Se llevó a cabo un análisis morfológico de las partículas producidas en función del tipo de poliestireno y el disolvente empleados. Encontrándose importantes diferencias morfológicas en función del peso molecular del polímero, grado de hidrofobicidad de éste y solubilidad del disolvente en la fase continua.

CAPÍTULO 4

CAPÍTULO 4

PRODUCCIÓN DE MICROPARTÍCULAS CODIFICADAS

4.1. INTRODUCCIÓN

Como ya hemos explicado en el Capítulo 1, cada vez es mayor la necesidad de detectar y analizar de forma paralela distintas moléculas biológicas presentes en una muestra. Con este objeto, se han desarrollado diversas estrategias para la codificación individual de micropartículas de forma que sea posible identificar fácilmente qué molécula está unida a qué partícula. Las diferentes técnicas de codificación empleadas incluyen: codificación química, coloides fluorescentes, *transponders* de frecuencia, *Raman fingerprint*, fluoróforos orgánicos, fluoróforos inorgánicos, etc. (O’Brien y cols., 2003).

En el presente capítulo se describe la producción de micropartículas codificadas ópticamente. Esta tecnología de codificación se basa en las propiedades de fluorescencia que presentan distintos tipos de fluoróforos y en la producción de micropartículas conteniendo estos fluoróforos en cantidades precisas y de forma uniforme.

De forma resumida, se trata de desarrollar pequeñas microestructuras que además de tener capacidad de reconocimiento molecular estén codificadas ópticamente para una identificación rápida. Así, una partícula conjugada, por ejemplo, con un oligonucleótido o un anticuerpo y con un código de identificación en su interior se puede considerar como un pequeño “laboratorio químico” capaz de detectar y analizar una secuencia única o un compuesto en el seno de una mezcla compleja.

En la figura 64 se representa de forma esquemática el principio de codificación en base a la intensidad y a la longitud de onda de emisión de fluorescencia.

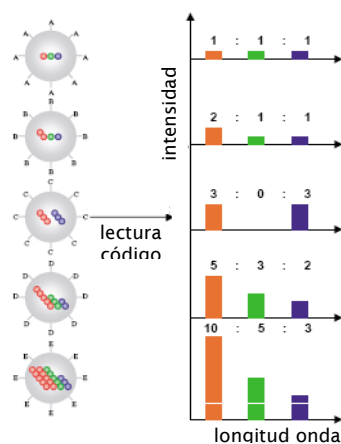


Figura 64. Esquema de codificación basado en la intensidad de la fluorescencia y la longitud de onda (Han y cols., 2001)

El número de códigos crece de forma exponencial al combinar colores, longitudes de onda e intensidades. De forma general, n niveles de intensidad combinados con m colores generarán $n^m - 1$ códigos.

4.1.1. Selección de los fluoróforos

En la actualidad, existen dos tipos de fluoróforos susceptibles de codificar las micropartículas: fluoróforos orgánicos y fluoróforos inorgánicos o *quantum dots*. Cada tipo presenta una serie de ventajas e inconvenientes que a continuación resumimos.

4.1.1.1. Fluoróforos orgánicos

Se trata de moléculas orgánicas que presentan un grupo funcional fluorescente capaz de absorber energía de una longitud de onda específica y re-emitirla a otra longitud de onda, también específica. Existen gran variedad de fluoróforos de muy diversa naturaleza y solubilidad.

Debido a sus propiedades de emisión de fluorescencia, resultan de gran importancia en estudios de bioquímica y en particular en el estudio de proteínas (ensayos de inmunofluorescencia o inmunohistoquímica).

El principal inconveniente de los fluoróforos orgánicos es que presentan una vida media corta (tiempo que la molécula permanece excitada antes de emitir un fotón); son sensibles a la luz, presentan *photobleaching*; son sensibles a fenómenos de *quenching*, es decir, a fenómenos que disminuyen la intensidad de fluorescencia como puede ser transferencia de energía, formación de complejos, etc. El oxígeno molecular y el ión yoduro son *quenchers* comunes.

Otro inconveniente, es que si los fluoróforos empleados tienen diferentes longitudes de onda de excitación serán necesarios diferentes láseres, lo que puede encarecer el equipo de decodificación. Por otro lado, recordemos que para una detección múltiple se requiere un fluoróforo de revelado, esto implica que la región del espectro de emisión de este “revelador” no debe ser ocupada por las partículas codificadas.

Además, los fluoróforos orgánicos, en general, suelen ser de elevado coste, aunque es posible encontrar algunos con precios asequibles.

4.1.1.2. Fluoróforos inorgánicos o *quantum dots*

En cuanto a los fluoróforos inorgánicos, los *quantum dots* y/o nanocristales fluorescentes han supuesto una gran revolución sobre todo en aplicaciones biológicas (Han y cols., 2001, Chan y cols., 2002, Dubertret y cols., 2002, Michalet X. y cols., 2005, Larson y cols., 2003). Se trata de cristales semiconductores de tamaño nanométrico. Durante su síntesis es posible controlar tanto la forma como el tamaño del cual dependerán sus propiedades de fluorescencia (ver figura 65).



Figura 65. Fluorescencia emitida por quantum dots de seleniuro de cadmio (CdSe) al exponerlos a la luz ultravioleta (<http://en.wikipedia.org/wiki/Fluoresce>, 2007)

Sus principales ventajas frente a los fluoróforos estándar son:

- estabilidad, al ser compuestos inorgánicos presentan una elevada estabilidad química
- sensibilidad al medioambiente, debido a que las cubiertas que presentan no se ven afectadas por cambios en pH, disolventes, etc.
- estrecho espectro de emisión comparado con los fluoróforos orgánicos, es posible tener anchos de banda de 12 nm para un nanocrystal
- ancho espectro de excitación, los nanocrystalales pueden ser excitados a muchas longitudes de onda. Esto tiene la ventaja de que varios nanocrystalales pueden ser excitados al mismo tiempo por una fuente con una longitud de onda única
- intensidad, emiten fluorescencia mucho más intensa que los fluoróforos orgánicos
- la superficie química puede ser modificada para que sean solubles tanto en agua como en disolventes orgánicos

Los principales inconvenientes que presentan es que su fabricación no es totalmente reproducible, son caros, pueden presentar fenómenos de agregación y no todos los equipos comerciales de citometría de flujo están preparados para detectar sus emisiones. Por otro lado, al igual que en el caso de los fluoróforos orgánicos, el empleo de un "revelador" también es necesario para ensayos *multiplex* por lo que su zona del espectro de emisión ha de quedar libre.

Para la producción de micropartículas codificadas de poliestireno, se tuvieron en cuenta las propiedades anteriormente expuestas para cada tipo de fluoróforo. Se llevaron a cabo ensayos con los dos tipos, sin embargo, los estudios más detallados en cuanto a propiedades de fluorescencia, estabilidad, etc. se llevaron a cabo sólo con fluoróforos orgánicos por presentar menor coste y ser posible su detección en un citómetro de flujo comercial.

Actualmente, las técnicas empleadas para la producción de micropartículas codificadas ópticamente requieren numerosos pasos, bien por que el proceso de obtención de la

partícula en sí es complejo o bien por que la incorporación del fluoróforo ocurre en una etapa posterior al de obtención de la partícula.

Los métodos de encapsulación de fluoróforos que podemos encontrar en la bibliografía tanto para los fluoróforos orgánicos como para los inorgánicos son:

- Emulsión polimerización (Han y cols., 2001, Lelu y cols., 2003)
- LBL (Evans y cols., 2003, Gaponik y cols., 2003, Rogach y cols., 2002; Zhang y cols., 2002)
- Liposomas (Dubertret y cols., 2002)
- Hinchamiento (Wang y cols., 2003, Mulvaney y cols., 2004; Bradley y cols., 2005)
- Suspensión polimerización (O´Brien y cols., 2003)

Los materiales empleados como matriz o soporte de los fluoróforos en los trabajos citados anteriormente son de muy diversa naturaleza: fosfolípidos, poliestireno, acrilatos (PMMA), sílica, polietilenglicol, fosfatidilcolina, alginato, quitosano, dextrano, etc.

En nuestro caso el material seleccionado fue el poliestireno atendiendo a una serie de criterios que debe tener la micropartícula final indicados en el Capítulo 3.

El procedimiento para la encapsulación de los fluoróforos se describe con detalle en el apartado 4.3. de Material y Métodos.

4.2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente capítulo es el diseño y producción de micropartículas codificadas mediante el empleo de fluoróforos y validación de las mismas para su empleo en ensayos *multiplex*.

Las partículas finales deberán presentar propiedades de fluorescencia que permitan su diferenciación mediante el empleo de técnicas analíticas estándar así como presentar una superficie reactiva que permita la unión de biomoléculas.

Para ello se estudiará la influencia de diferentes variables tales como:

- tipo de fluoróforo empleado,
- tamaño de partícula,
- método de unión de biomoléculas,
- etc.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Materiales

- Acetato de etilo PRS (*Panreac Química S.A.*, Montcada i Reixac, Barcelona, España)
- Ácida sódica (Sigma-Aldrich)
- Alcohol polivinílico 72.000 (Sigma-Aldrich)
- Azul Nilo A (*Panreac Química S.A.*, Montcada i Reixac, Barcelona, España)
- Diclorometano 99.9% grado HPLC (Sigma-Aldrich)
- Fluoresceína isómero I (Sigma-Aldrich)
- Poliestireno ($M_w = 4.000-200.000$) (Sigma-Aldrich)
- Poly(styrene-co-maleic acid), partial isobutyl/methyl ester (Sigma-Aldrich)
- Poly(styrene-co-maleic acid), partial secbutyl/methyl ester (Sigma-Aldrich)
- Rodamina B (Sigma-Aldrich)
- Sulforodamina Q (Sigma-Aldrich)
- Quantum dots: CdSe y CdSe/ZnS (NN Labs, EE.UU.)

4.3.2. Métodos

4.3.2.1. Producción de micropartículas codificadas

Para la codificación de las partículas se emplearon distintos fluoróforos, tanto orgánicos como inorgánicos.

Las estructuras de los *fluoróforos orgánicos* empleados se recogen en la figura 66 y en la tabla 22 sus principales propiedades.

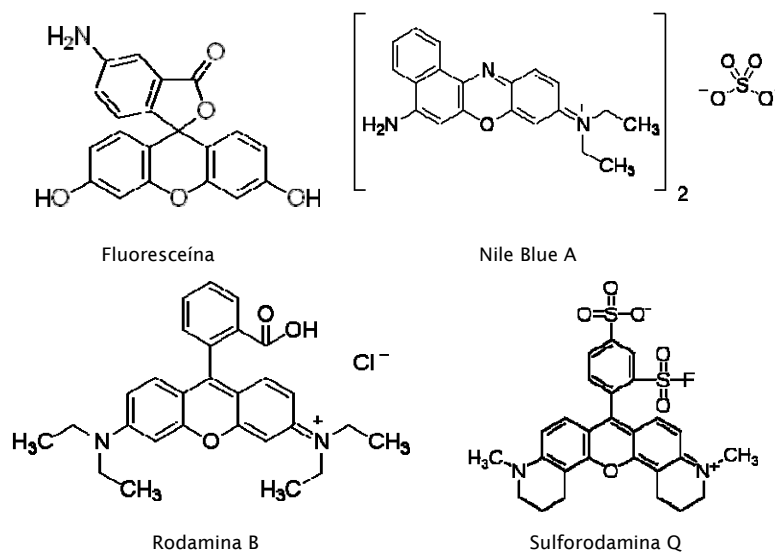


Figura 66. Estructuras químicas de los fluoróforos orgánicos empleados

Fluoróforo orgánico	λ exc (nm)	λ ems (nm)	Peso Molecular	Solubilidad	
				EA	DCM
Fluoresceína	495	520	347.32	media	media
Rodamina B	556	576	479.01	media	alta
Nile Blue A	636	686	353.85	baja	-
Sulforodamina Q	584	599	556.63	media	alta

Tabla 22. Principales propiedades de los fluoróforos orgánicos empleados

Los espectros tanto de excitación como de emisión de los cuatro fluoróforos orgánicos ensayados se recogen en la figura 67, considerando una excitación a 488 nm.

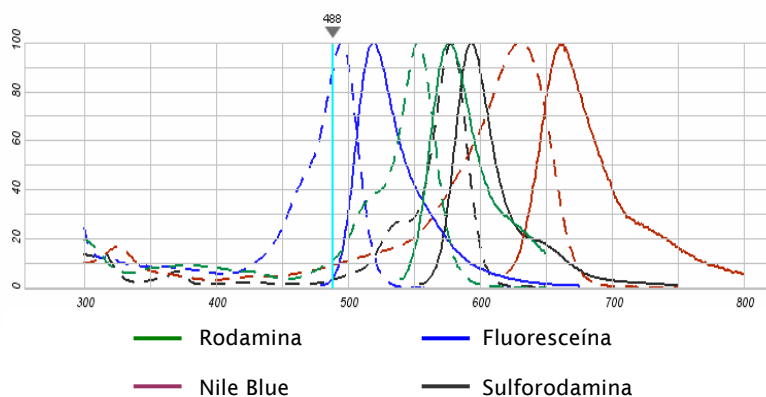


Figura 67. Espectros de excitación y emisión de los fluoróforos orgánicos empleados (excitación a 488 nm)

Los *fluoróforos inorgánicos* (NN Labs, EE.UU.) ensayados fueron de dos tipos: CdSe y CdSe/ZnS, ambos sintetizados en DCM. Las estructuras para cada tipo quedan recogidas en la figura 68.

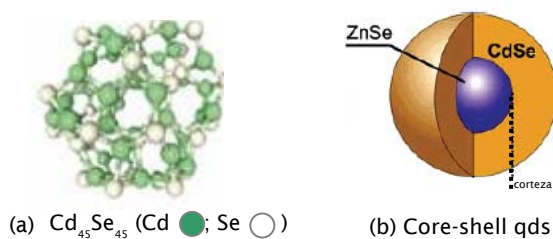


Figura 68. Estructura de los dos tipos de QDs ensayados: (a) CdSe y (b) CdSe/ZnS

Sus principales características de emisión se recogen en la tabla 23.

Tipo QD	Pico UV (nm)	Tamaño (nm)	Rango emisión (nm)	λ emisión (nm)
CdSe	480 ± 10	2.1 - 2.3	481 - 502	483
	520 ± 10	2.4 - 2.6	525 - 542	525
	540 ± 10	2.6 - 3	543 - 562	558
	580 ± 10	3.5 - 4	573 - 594	590
	600 ± 5	4.3 - 4.7	612 - 617	616
	640 ± 10	6.2 - 7.7	639 - 653	640
CdSe/ZnS	500 ± 10	2.3 - 2.4	503 - 524	505
	580 ± 10	3.5 - 4	573 - 594	585
	620 ± 10	5.2 - 6.2	628 - 638	634

Tabla 23. Propiedades de emisión de los QDs ensayados (NN Labs, EE UU)

La producción de micropartículas fluorescentes se llevó a cabo mediante el mismo método que las partículas “blancas”, detallado en el apartado 3.2. de Material y Métodos del Capítulo 3.

La diferencia fundamental en la elaboración de este tipo de partículas fue la solubilización de distintos fluoróforos junto con los polímeros formadores de la partícula. Para ello, se prepararon disoluciones madres de los fluoróforos utilizando en cada caso concreto el disolvente más apropiado. A continuación, se añadió el volumen necesario de la disolución madre a la disolución polimérica para obtener la concentración deseada tanto de fluoróforo como de polímero.

Una vez preparadas las disoluciones de polímero y fluoróforo, se procedió del mismo modo que en el caso de las partículas “blancas”.

El nebulizador empleado para la producción de éste tipo de partícula fue el modelo *Reid*. Los principales parámetros geométricos del mismo fueron fijados en: $D = 100 \mu\text{m}$, $D_o = 150 \mu\text{m}$ y $H = 100 \mu\text{m}$.

4.3.2.2. Caracterización de las micropartículas

Una vez elaborados los distintos tipos de micropartículas, éstas se sometieron a distintos ensayos para su caracterización.

Entre ellos, se determinó el tamaño de partícula mediante microscopía óptica y un programa de análisis de imagen y se estudió tanto el aspecto como su morfología mediante SEM. Estos ensayos quedan detallados en el apartado de Material y Métodos del Capítulo 3.

El estudio de caracterización de las partículas codificadas se completó mediante el estudio de las propiedades finales de fluorescencia.

4.3.2.2.1. Determinación de las propiedades de fluorescencia

Las propiedades de fluorescencia de las micropartículas fueron determinadas mediante tres técnicas:

Microscopía de fluorescencia

El microscopio de fluorescencia empleado está provisto de una lámpara de mercurio como fuente de excitación de energía (OSRAM lámpara óptica (HBO 103 W/2). El conjunto de filtros empleados está recogido en la tabla 24. Las imágenes fueron tomadas con una cámara Leica DC 350F.

Filter cube	Filtro excitación	Filtro supresión
+L5	BP 480/40	BP 527/30
+N3	BP 546/12	BP 600/40

Tabla 24. Descripción de los filtros empleados con el microscopio de fluorescencia (BP: filtro bandpass; +: specially for multi-parameter fluorescence)

Microscopía confocal

La distribución de los diferentes fluoróforos empleados en el interior de las MPs fue determinado mediante microscopía confocal (Leica TCS-SP2) equipado con láser de argón. Las imágenes fueron tomadas usando una excitación de 488 nm.

Citometría de flujo

Debido a la gran importancia en el diagnóstico clínico y en la investigación básica, se ha empleado la citometría de flujo como técnica bien establecida y conocida para la diferenciación de las micropartículas codificadas.

La citometría de flujo permite la diferenciación de poblaciones en función del tipo y de la intensidad de fluorescencia la cual la podemos modificar en base a la concentración del fluoróforo en el interior de la partícula o bien controlando el tamaño de la partícula, como hemos visto en los apartados anteriores.

Debido a la complejidad del equipo, a continuación, se describe brevemente el principio de funcionamiento de un citómetro de flujo. En la figura 69 se muestra un esquema del equipo.

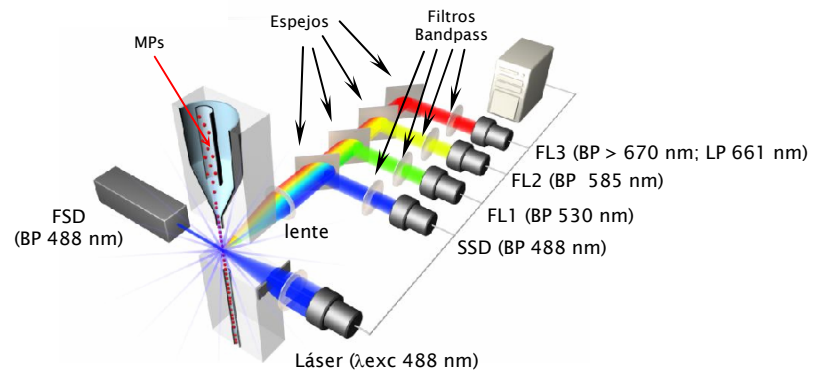


Figura 69. Esquema de un citómetro de flujo (FSD detector de tamaño; SSD detector de forma; BP filtro *bandpass*; LP filtro *longpass*)

En un equipo de citometría las partículas son forzadas a pasar a través de una célula de flujo de una en una, a su paso son iluminadas por un láser, normalmente de longitud de onda $\lambda = 488 \text{ nm}$. La luz que resulta dispersada, llega por un lado a un detector específico capaz de proporcionarnos información sobre el diámetro (FSD) y por otro lado, a un detector que nos dará idea de la granularidad o forma de las partículas (SSD). Al mismo tiempo, el equipo es capaz de detectar la fluorescencia emitida por las partículas. Estas emisiones, mediante un conjunto de lentes, espejos y filtros, servirán para clasificar partículas similares en regiones de densidad de partículas. El equipo cuenta eventos o micropartículas los cuales pueden ser representados en histogramas que relacionan la intensidad de fluorescencia y el número de micropartículas.

Mezclas de micropartículas blancas y conteniendo los distintos fluoróforos o sus mezclas fueron analizadas utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) equipado con un láser azul (488 nm). Los detectores empleados para diferenciar las distintas poblaciones quedan recogidos en la tabla 25.

Detector Fluorescencia	Filtros
FL1	BD 530 ± 15 nm
FL2	BD 585 ± 15 nm
FL3	BD > 670 nm; LP 661 nm

Tabla 25. Filtros y detectores empleados con el citómetro de flujo (BP: filtro *bandpass*; LP: filtro *longpass*)

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1. Caracterización de las micropartículas

4.4.1.1. Distribución de tamaños de partícula

Los diámetros de las micropartículas fueron determinados mediante microscopía óptica y confirmados mediante SEM.

Para la producción de las micropartículas codificadas se emplearon aquellas combinaciones de caudales en las que se obtuvieron estrechas distribuciones de tamaño y una concentración del 4% p/v de polímero. Estas combinaciones de caudales fueron fijadas a partir de los resultados obtenidos en el Capítulo 3. Recordemos que la utilidad de los *arrays* fluidicos está estrechamente relacionada con las propiedades de las micropartículas que los componen, tanto en tamaño como en propiedades de fluorescencia.

A continuación, se analizan los resultados obtenidos en cuanto a tamaño de partícula atendiendo a los posibles efectos de las distintas variables de la formulación de la fase dispersa, fluido enfocado. Las variables evaluadas fueron:

- Tipo de fluoróforo y concentración
- Tipo de poliestireno

4.4.1.1.1. Influencia del tipo de fluoróforo y su concentración

Como se puede ver en la tabla 26 ni el tipo de fluoróforo ni la concentración de éste influyó en el tamaño final de la micropartícula. Los datos corresponden a una combinación de caudales Q_d 1 mL/h y Q_t 3 mL/min.

Fluoróforo	Conc. (mM)	Dm (μm)	DE (μm)	CV (%)	GSD
Fluoresceína	1	5,35	0,74	13,78	1,15
	0,1	5,32	0,69	13,04	1,13
	0,001	5,22	0,52	9,99	1,10
Nile Blue	saturac.	5,41	0,45	8,33	1,09
	0,2	5,21	0,44	8,42	1,09
	0,09	6,69	0,73	10,85	1,11
Rodamina B	0,6	5,30	0,56	10,66	1,11
	0,06	5,46	0,61	11,23	1,11
	0,006	5,29	0,50	9,45	1,10
Fluoróforo	Conc. (mM)	Dm (μm)	DE (μm)	CV (%)	GSD
QDs 505	1,742	5,82	0,56	9,60	1,11
	0,171	5,72	0,51	8,90	1,09
QDs 585	2,608	6,41	1,25	19,54	1,23
QDs 590	1,742	5,57	0,54	9,78	1,11
	0,171	5,84	0,56	9,52	1,10
QDs 639	1,742	5,92	0,44	7,37	1,08
	0,171	6,02	0,61	10,10	1,10

Tabla 26. Tamaño de partículas obtenidos en función del tipo de fluoróforo y su concentración para Qd1Qt3

Las concentraciones de los fluoróforos empleados variaron entre $1 \cdot 10^{-3}$ mM, en el caso del NB la concentración máxima empleada fue una concentración a saturación del fluoróforo en la disolución polimérica en EA.

En el caso de la preparación de micropartículas conteniendo *quantum dots* se utilizó una mezcla de disolventes EA:DCM 1:1 ya que los nanocristales fueron sintetizados en DCM.

En la figura 70a se recogen las distribuciones de tamaños obtenidas para partículas codificadas con diferentes concentraciones de rodamina B y producidas utilizando una combinación de caudales Qd1Qt3.

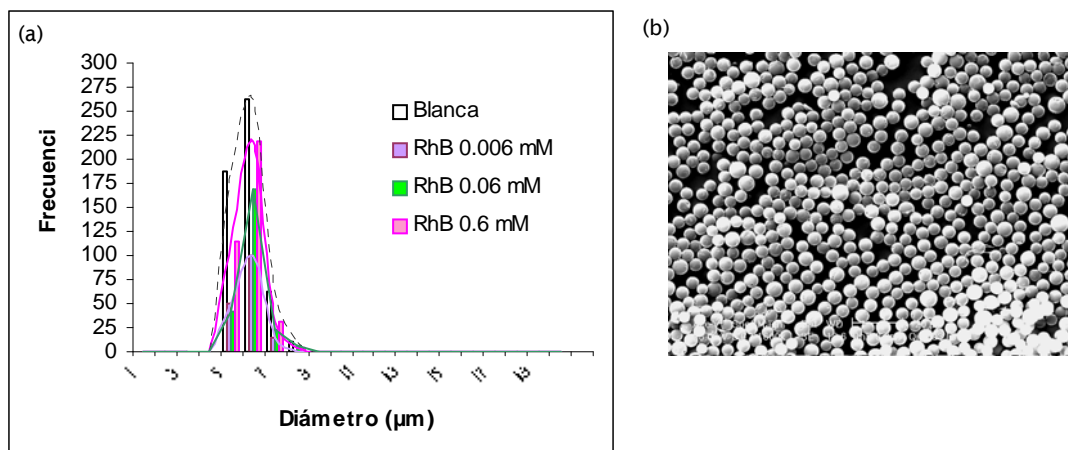


Figura 70. (a) Distribución tamaños de partículas codificadas con Rodamina comparada con micropartículas blancas para Qd1Qt3. (b) Imagen de SEM de MPs de rodamina 0.06 mM

En todos los casos se obtuvieron estrechas distribuciones de tamaño y partículas con diámetro medio reproducible.

4.4.1.1.2. Influencia del tipo de poliestireno

Los dos tipos de poliestireno evaluados fueron PS y PSM. El primero de interés para la producción de micropartículas fluorescentes con aplicación en el calibrado de equipos como citómetros de flujo, etc., el segundo al tener grupos reactivos $-\text{COOH}$, para técnicas de ensayos *multiplex*.

En la tabla 27 se recogen los resultados obtenidos.

Fluoróforo	Polímero	Conc. (mM)	Dm (μm)	DE (μm)	CV (%)	GSD
Fluoresceína	PS	1	5,64	0,64	11,38	1,12
	PSMiso	1	5,57	0,49	8,86	1,09
	PSMsec	1	5,30	0,53	10,00	1,10
Rodamina	PS	0,6	5,38	0,52	9,65	1,10
	PSMiso	0,6	5,79	0,76	13,19	1,15

Tabla 27. Tamaño de partículas obtenidos en función del tipo de poliestireno (4% p/v) para Qd1Qt3

Como puede verse, el tipo de poliestireno empleado no influyó el tamaño final de las micropartículas para Qd1Qt3. Los tamaños obtenidos, así como las desviaciones estándar están dentro de los rangos obtenidos para partículas blancas (ver apartado 3.4.2.1.) y acorde con los diámetros teóricos que predice FF.

4.4.1.2. **Aspecto y morfología**

Los distintos tipos de micropartículas codificadas fueron evaluadas mediante SEM una vez liofilizadas. Todas ellas presentaron forma esférica, no agregadas y no porosas, si

bien, en algunos casos pequeñas imperfecciones aparecieron en la superficie, fundamentalmente debidas a la naturaleza del disolvente empleado, como ya se indicó en el apartado 3.4.3.1.

Las imágenes de la figura 71 corresponden a micropartículas elaboradas a partir de disoluciones en EA, más polar que el DCM. En este caso las micropartículas blancas presentaron mayor irregularidad en la superficie. Como puede verse en el caso de partículas codificadas con rodamina o fluoresceína se obtuvieron superficies similares a las obtenidas en el caso de partículas blancas, sin embargo, cuando se empleó Nile Blue a concentración saturada estas imperfecciones fueron más pronunciadas (Fig. 71e).

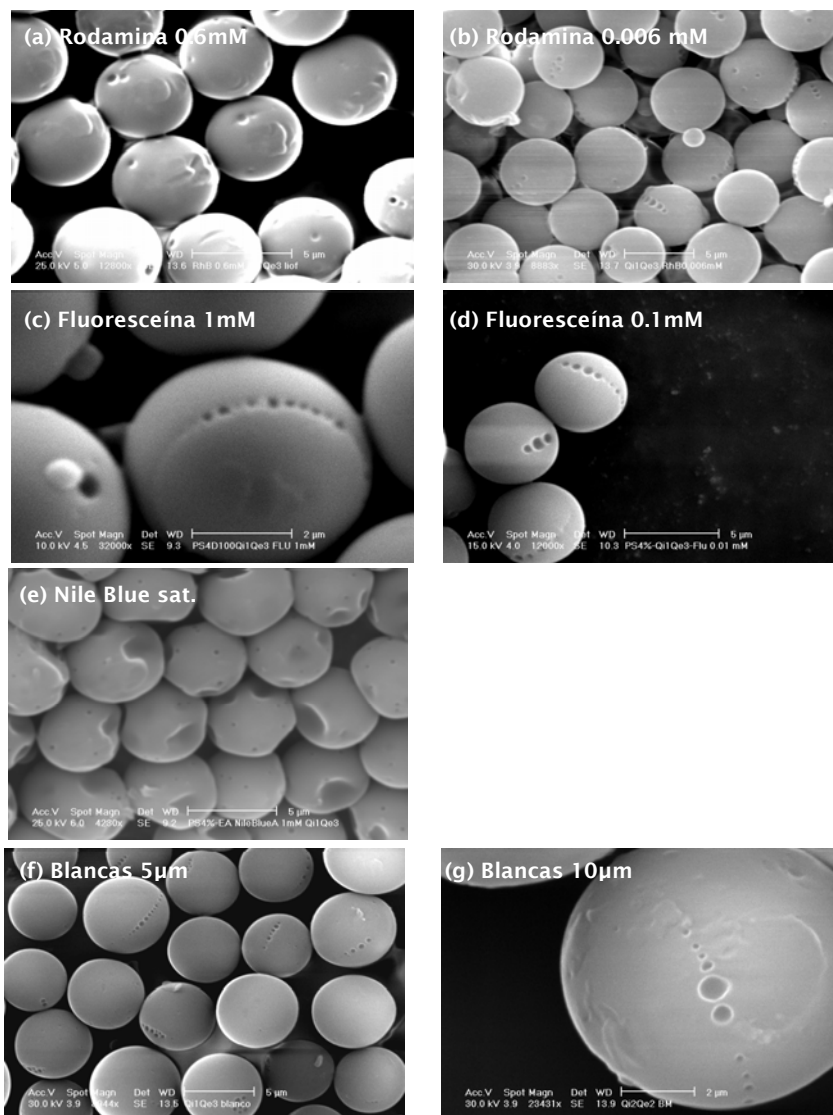


Figura 71. Aspecto de micropartículas codificadas con distintos fluoróforos a diferente concentración de 5 µm de diámetro comparadas con MPs “blancas” de 5 y 10 µm de diámetro. (a) Rodamina 0.6 mM; (b) Rodamina 0.06 mM; (c) Fluoresceína 1 mM; (d) Fluoresceína 0.1 mM (e) Nile Blue sat.; (f) Blanca 5 µm y (g) Blanca 10 µm

En todos los caso se obtuvieron partículas con superficie lisa, presentando una serie de “hoyuelos” distribuidos en línea debido al efecto del disolvente empleado, EA. En el caso de partículas conteniendo NB, se obtuvieron partículas con irregularidades más evidentes.

4.4.1.3. Propiedades de fluorescencia

Las propiedades de fluorescencia fueron evaluadas en función de:

- Tipo de fluoróforo empleado (color de la partícula)
- Concentración del fluoróforo (intensidad de fluorescencia)
- Tamaño de la micropartícula (intensidad de fluorescencia)

Para ello se emplearon tres técnicas de análisis: microscopía de fluorescencia, microscopía confocal y citometría de flujo.

4.4.1.3.1. Microscopía de fluorescencia

Esta técnica de análisis no requiere una preparación especial de las muestras por lo que fue empleada para determinar de una forma rápida y sencilla si las muestras presentaban o no fluorescencia y comprobar si era viable la diferenciación de poblaciones en función del color y la intensidad de la fluorescencia.

En la figura 72 se muestran las fotos obtenidas para partículas de 5 μm de diámetro conteniendo tres cantidades diferentes de rodamina (0.6, 0.06 y 0.006 mM; Fig. 72a, b); partículas de rodamina 0.6 mM de 5 y 10 μm de diámetro (Fig. 72c) y una mezcla de partículas de 5 μm de diámetro conteniendo fluoresceína o rodamina (Fig. 72d).

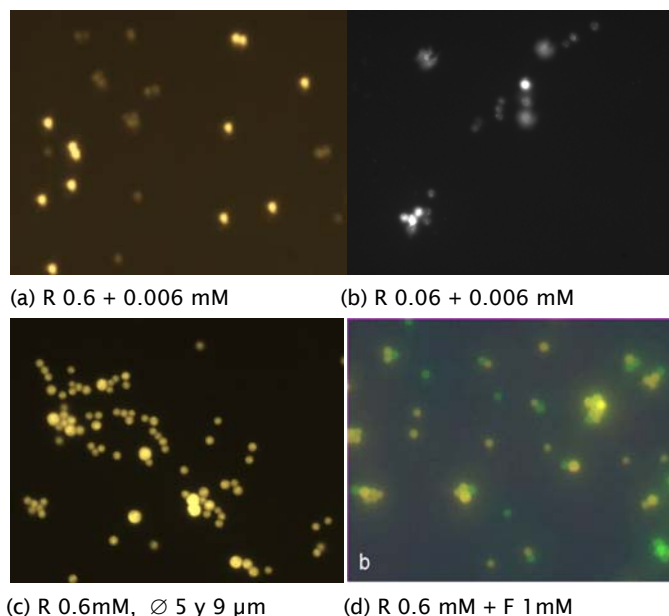


Figura 72. Diferenciación de MPs fluorescentes en función de: (a) y (b) concentración de fluoróforo; (c) tamaño de partícula y (d) tipo de fluoróforo

Las imágenes del microscopio de fluorescencia ponen de manifiesto la posibilidad de diferenciar poblaciones de partículas fluorescentes elaboradas mediante la tecnología FF en función del color y la intensidad de la fluorescencia, bien sea modificando la concentración del fluoróforo o el tamaño de partícula.

4.4.1.3.2. Microscopía confocal

Durante la preparación de las micropartículas, tanto el polímero como el fluoróforo son disueltos en la misma disolución constituyendo una única fase homogénea. Mediante la microscopía confocal es posible determinar la distribución del fluoróforo en el interior de la partícula.

Distribución de los fluoróforos orgánicos en el interior de la partícula

Los resultados obtenidos para partículas conteniendo rodamina, fluoresceína y Nile Blue se muestran en la figura 73. En la parte derecha de la figura se muestra la misma imagen obtenida bajo luz visible.

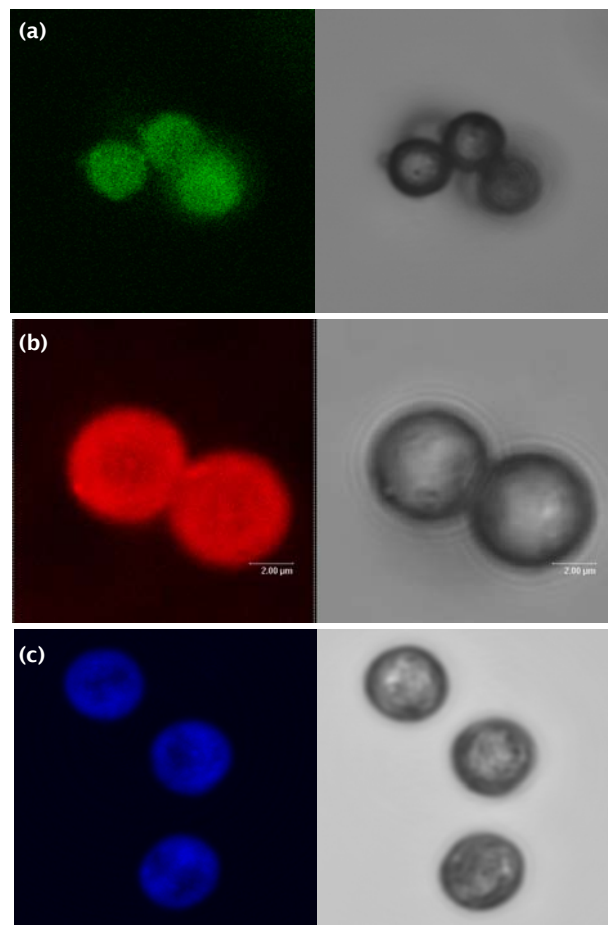


Figura 73. Imágenes del microscopio confocal para partículas de 5 µm de diámetro conteniendo: (a); Fluoresceína 1 mM (b) Rodamina 0.6 mM y (c) Nile Blue sat.

Como puede verse en todos los casos el fluoróforo se distribuyó homogéneamente por la partícula, de forma que éstas mantuvieron las propiedades de fluorescencia que presentaron las disoluciones iniciales no suponiendo el proceso de solidificación o secado de las gotas un fenómeno crítico que provoque la formación de agregados de fluoróforos en el interior de las partículas.

En la figura 74 se muestra con más detalle la distribución de rodamina en la partícula. Se presentan imágenes correspondientes a una secuencia de cortes realizados en la partícula en los ejes xyz .

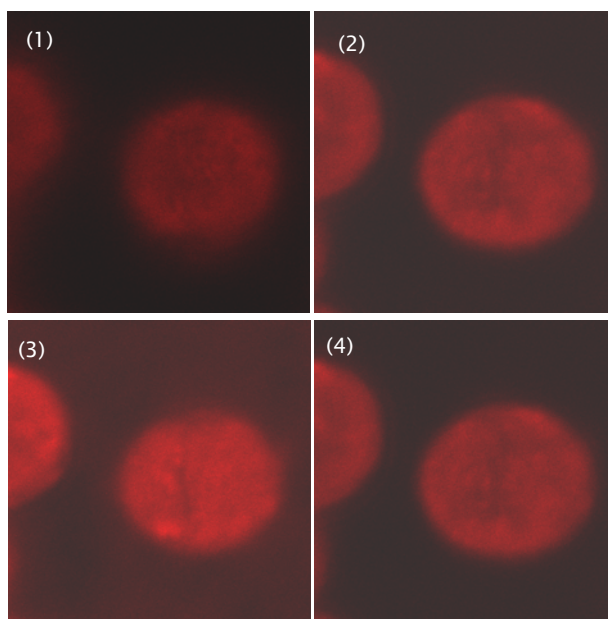


Figura 74. Secuencia de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en xyz de micropartículas de Rodamina 0.6 mM de 5 μm de diámetro

Como se observa en la figura, la rodamina quedó distribuida de forma homogénea a lo largo de toda la partícula confirmando los resultados anteriores.

Distribución de los fluoróforos inorgánicos en el interior de la partícula

En el caso de la encapsulación de *quantum dots*, se obtuvieron resultados muy diferentes. En primer lugar, no fue posible en todos los casos excitar / detectar la emisión de los nanocristales con los láseres del microscopio confocal y en segundo lugar, a diferencia de los fluoróforos orgánicos, la distribución de los QDs en la micropartícula no fue homogénea, en todos los casos aparecen agregados.

En la figura 75 se muestran imágenes obtenidas del microscopio confocal para micropartículas de 5 μm de diámetro conteniendo nanocristales tipo CdSe en cuyo interior es posible apreciar los agregados.

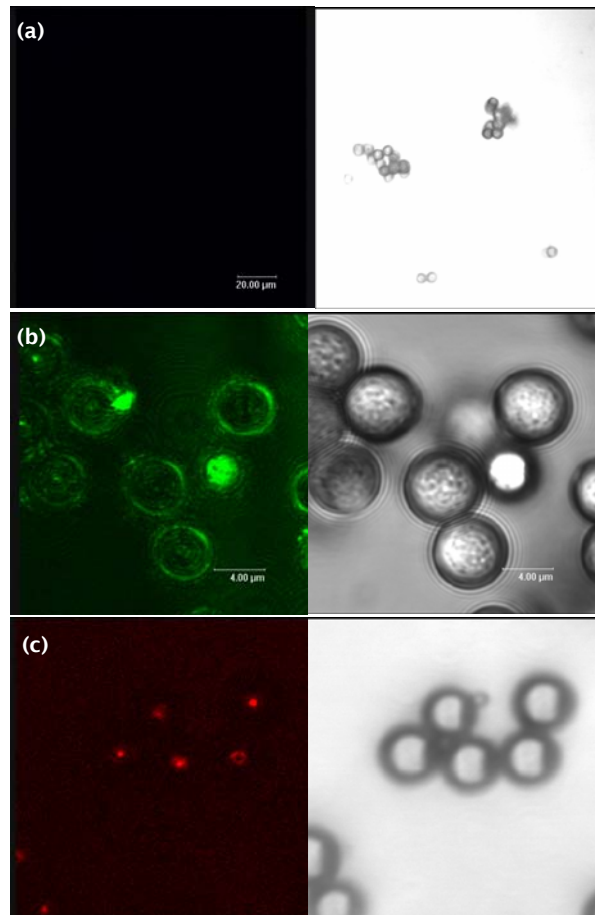


Figura 75. Imágenes de microscopía confocal para micropartículas de 5 μm de diámetro conteniendo QDs de CdSe: (a) 483 nm; (b) 525 nm y (c) 616 nm

Como se aprecia en las imágenes (Fig. 75) para QDs 483 nm no fue posible su detección, en los otros dos casos los cristales aparecieron agregados, no presentando las partículas una fluorescencia homogénea.

En la figura 76 se muestran imágenes de micropartículas de 5 μm de diámetro conteniendo nanocristales tipo CdSe-ZnSe. En este caso, los nanocristales al presentar una estructura tipo *core-shell*, teóricamente son más estables, sin embargo, sólo en el caso de QDs 505 nm se obtuvo una distribución homogénea de los nanocristales en el interior de las micropartículas. En los otros casos, éstos aparecieron agregados en el centro de la partícula (Fig. 76b). Otro problema fue, como es el caso de QDs 634 (Fig. 76c), que la intensidad de fluorescencia fue mínima.

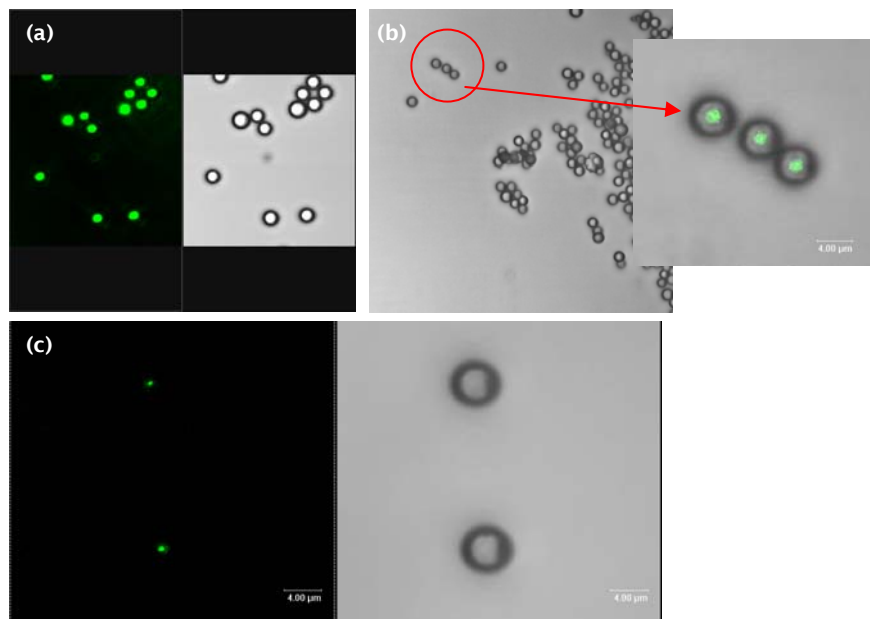


Figura 76. Imágenes de microscopía confocal para micropartículas de 5 µm de diámetro conteniendo QDs de CdSe/ZnSe: (a) 505 nm; (b) 587 nm y (c) 634 nm

Los problemas de formación de agregados que presentaron los dos tipos de QDs en el interior de las partículas, no se debieron al proceso en sí de producción de las partículas sino a problemas de estabilidad que presentaron los nanocristales en sus disoluciones de partida. Éstas, a pesar de ser manipuladas y conservadas siguiendo las especificaciones del fabricante, presentaron fenómenos de precipitación. Los QDs aparecieron claramente sedimentados en el fondo del vial transcurridos pocos días de ser recibidos. En la figura 77 podemos ver una imagen del microscopio de fluorescencia para QDs 558 donde se aprecian claramente los agregados, la imagen fue tomada tras recibir las muestras de QDs.

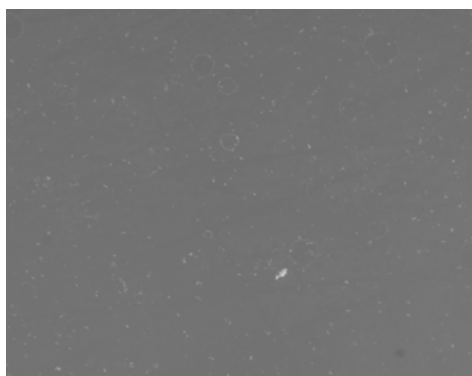


Figura 77. Imagen del microscopio fluorescencia mostrando la presencia de agregados de QDS 558 nm en DCM

Resultados similares en cuanto a la distribución de QDs en el interior de micropartículas, se han encontrado en MPs de poliestireno sintetizadas por suspensión – polimerización (Bradley y cols., 2005). En este caso los agregados se forman durante el proceso de polimerización debido a un aumento progresivo tanto de la concentración como del peso molecular del polímero.

Por otro lado, cuando la incorporación de los QDs se lleva a cabo por un proceso de hinchamiento de las micropartículas de poliestireno sintetizadas a partir de estireno y divinilbenceno, la distribución de los QDs va depender enormemente del grado de entrecruzamiento entre los monómeros, es decir, de la porosidad de las partículas. Así, para que la incorporación de los QDs sea efectiva y la distribución sea uniforme será necesario controlar numerosos parámetros como son el tiempo de contacto entre las partículas y el disolvente, tipo de disolvente empleado o mezclas de ellos, grado de entrecruzamiento entre monómeros, etc. Si el control sobre éstos parámetros no es exhaustivo, los QDs se distribuirán sólo en la superficie de la partícula a modo de corona (Bradley y cols., 2005).

4.4.1.3.3. Citometría de flujo

Para obtener el mayor número posible de poblaciones diferenciables mediante esta técnica, se han elaborado partículas de tamaños diferentes para cada fluoróforo orgánico, para los fluoróforos inorgánicos el tamaño de partícula fue fijado en 5 μm de diámetro.

Por otro lado, con el objeto de diferenciar el máximo número de poblaciones en base a la intensidad de fluorescencia se ensayaron numerosas concentraciones de fluoróforos las cuales quedan recogidas en el Anexo V.

Los fluoróforos orgánicos fueron empleados por separados o en combinaciones binarias o ternarias entre ellos. De esta forma se pretende obtener el mayor número de colores diferentes.

Cada tipo de fluoróforo presenta un máximo de intensidad de fluorescencia en un filtro determinado. Sin embargo, parte de esa emisión de fluorescencia llega a los otros filtros en porcentajes variables. Para tener una estimación de la cantidad de fluorescencia que llega a los otros filtros, simulamos las condiciones experimentales en un visor virtual de fluorescencia (<http://www.bdbiosciences.com/spectra/>, 2007).

Debido a que los fluoróforos empleados en el presente trabajo no formaban parte de la base de dato del simulador, éstos fueron sustituidos por otros con propiedades de excitación y emisión similares, indicados entre paréntesis en la tabla 28 donde se recogen los resultados de la simulación.

Fluoróforo	Detector Fluorescencia		
	FL1	FL2	FL3
Fluoresceína (FITC)	Primario 47.2 %	0.3 %	0 %
Rodamina (TMRho)	12.5 %	Primario 57.8 %	0 %
Nile Blue (TO-PRO-3)	0 %	3.9%	Primario 28.5 %

Tabla 28. Distribución emisión fluorescencia para cada fluoróforo (excitación 488 nm) según el simulador virtual

Teniendo en cuenta estas consideraciones, la intensidad de fluorescencia en función de la concentración y del tamaño de partícula fue analizada para cada fluoróforo. Para ello se representó el número de eventos o número de partículas frente la intensidad de fluorescencia en el filtro primario (ver figura 78).

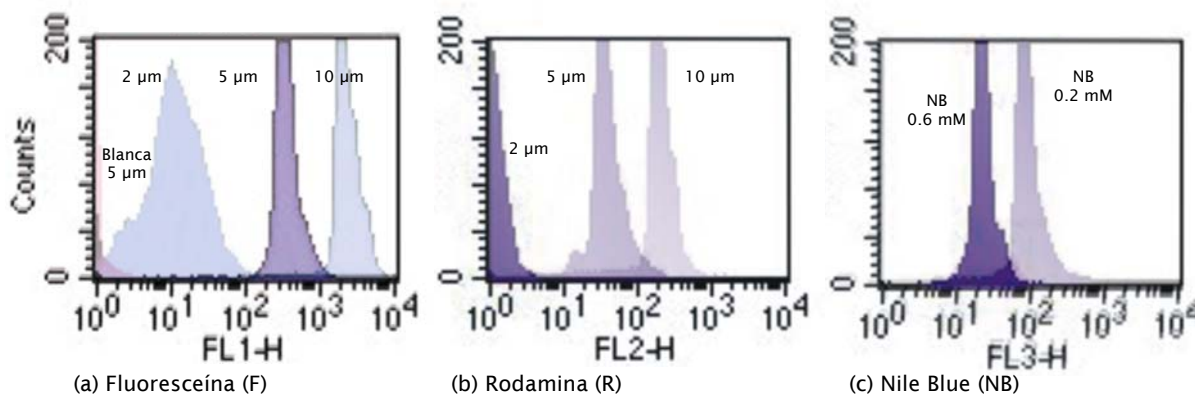


Figura 78. Número de partículas frente a intensidad de fluorescencia en el filtro primario para los distintos fluoróforos en función del tamaño de partícula o la concentración: (a) F 0.2 mM de 2, 5 y 10 μm de diámetro y blanca de 5 μm, (b) R 0.0004 mM para partículas de diámetros 2, 5 y 10 μm, (c) NB 0.2 y 0.6 mM, partículas de 5 μm de diámetro

Como muestran los gráficos, es posible diferenciar distintas poblaciones de partículas en función de la intensidad de la emisión de la fluorescencia. Esta diferenciación va a depender también de los *settings* del detector, la ganancia del amplificador, etc. Para tener una comparación más fiable habría que diferenciar las poblaciones a partir de una mezcla de ellas, no individualmente.

Por otro lado, hay que tener en cuenta la intensidad de fluorescencia para cada fluoróforo en los filtros secundarios. Esto condicionará el uso de uno u otro fluoróforo a la hora del “revelado”.

En la figura 79 se recogen las emisiones de fluorescencia en los filtros secundarios para cada fluoróforo, el tamaño de partícula en todos los casos fue de 5 μm de diámetro.

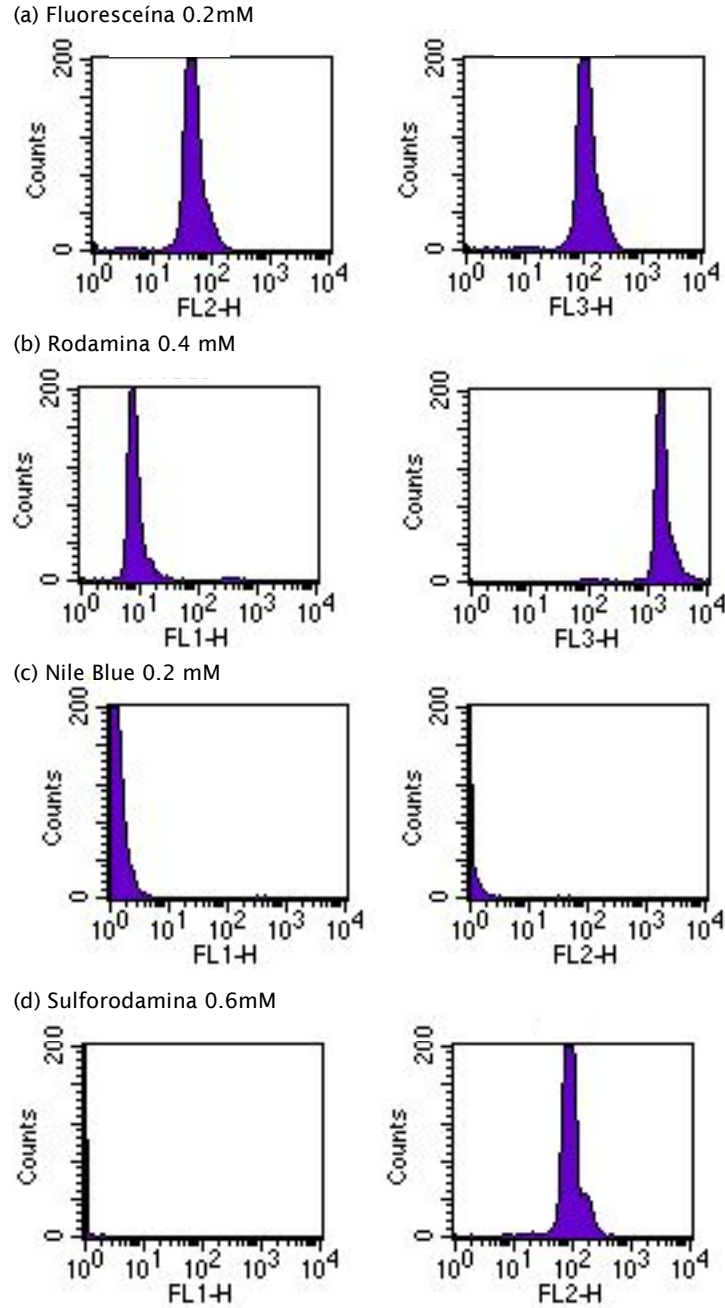


Figura 79. Número de partículas frente a intensidad de fluorescencia en filtros secundarios para MPs conteniendo los distintos fluoróforos empleados (tamaño de partícula : 5 μm de diámetro)

Como se observa, todos los fluoróforos empleados presentaron emisión de fluorescencia en al menos uno de los filtros secundarios.

Sólo en los casos de caso de la sulforodamina la emisión de fluorescencia en el filtro secundario FL1 fue cero. Esto complicará la diferenciación de poblaciones y el “revelado”, sin embargo, como ya hemos dicho antes, el modo fiable de saber si nuestros sistemas multiparticulares servirán como sistema de detección *multiplex* es analizar simultáneamente una mezcla de poblaciones de partículas con distintos códigos cada una. Para ello se analizó una mezcla de 4 códigos diferentes. En la figura 80 se muestran los resultados obtenidos, en este caso el *gate set* empleado fue diferente al fijado en los casos anteriores.

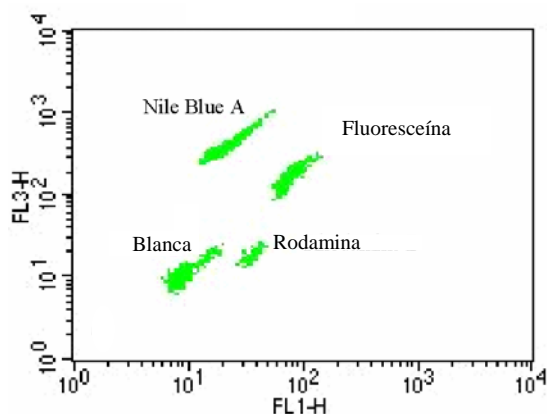


Figura 80. Ejemplo de un diagrama de dispersión generado por el citómetro a partir de un MBA (eje X: intensidad de fluorescencia relativa en FL1; eje Y: intensidad de fluorescencia relativa en FL3)

Como puede verse, en este caso, fue posible diferenciar poblaciones de partículas empleando 4 códigos partículas diferentes, basados sólo en el color.

En base a estos primeros resultados se procedió a un estudio más completo de diferenciación de partículas basado tanto en el color como en el tamaño de partícula.

Diferenciación de poblaciones de partículas en base al color

A) MPs codificadas con Rodamina B (RhB):

Para ello se procedió a la elaboración de diferentes lotes de partículas de 5 micras de diámetro empleando PSMsec como matriz polimérica y disoluciones de rodamina de diferente concentración.

Para favorecer la solubilidad de la rodamina y así obtener un mayor rango de concentraciones, se preparó una disolución madre de rodamina B en DCM 0.8mM. A partir de esta disolución madre, se prepararon las disoluciones indicadas en la tabla 29 mezclándolas con los volúmenes adecuados de la disolución polimérica preparada en EA y siempre en agitación para evitar la precipitación del polímero (insoluble en DCM).

En la tabla 29 se recogen las concentraciones de rodamina empleadas para la codificación de las MPs, así como los diámetros y coeficientes de variación obtenidos en cada caso.

Código MPs N°	RhB C (mM)	D medio (µm)	CV (%)
1	0.6	5,19	10,1
2	0.2	5,2	10,6
3	0.055	5,07	8,18
4	0.01	4,8	10,1
5	0.003	5,19	10,1
6	0.0004	5,04	9,95

Tabla 29. Lotes de MPs de 5 micras de diámetro codificadas con Rodamina B

A continuación, se procedió a su evaluación en el citómetro de flujo. Los resultados obtenidos en tanto en el filtro FL2 como en FL3 se muestran en la figura 81.

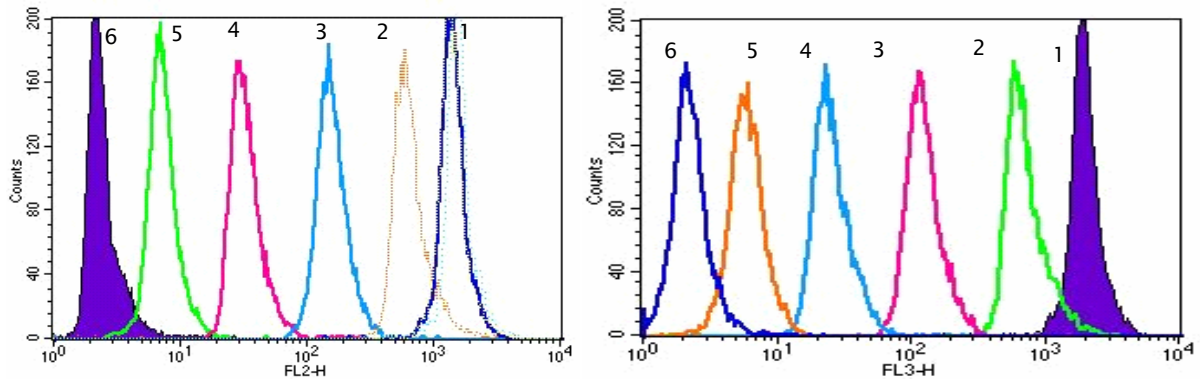


Figura 81. Intensidad de fluorescencia en filtros FL2 y FL3 para MPs conteniendo diferentes cantidades de RhB (*settings I*)

Como puede verse en la figura 81, adecuando los *settings* del citómetro, fue posible diferenciar los seis tipos de partículas ensayadas codificadas con rodamina. A medida que aumentó la concentración de rodamina empleada junto con la disolución polimérica aumentó la intensidad de fluorescencia en los dos filtros.

La fluorescencia presentada por estas partículas en el filtro FL1 fue mínima dejándolo libre para ser usado por el “revelador”.

B) MPs codificadas con Fluoresceína isómero I (F):

Para este ensayo se elaboraron diferentes lotes de partícula conteniendo fluoresceína a distintas concentraciones. En este caso tanto el fluoróforo como el polímero se

disolvieron en EA. Para preparar las diferentes disoluciones se partió de una disolución madre 1 mM.

En la tabla 30 se recogen las concentraciones de fluoresceína empleadas para la codificación de las MPs así como los diámetros y coeficientes de variación obtenidos en cada caso.

Código MPs N°	F C (mM)	D medio (µm)	CV (%)
1	1	5,2	10,5
2	0.7	5,35	10,6
3	0.4	5,07	9,3
4	0.08	5,58	11,7
5	0.05	5,22	8,42
6	0.01	5,26	10,07
7	0.001	5,2	10,7

Tabla 30. Lotes de MPs de 5 micras de diámetro codificadas con Fluoresceína isómero I

Los resultados obtenidos de su evaluación en el citómetro se muestran en la figura 82.

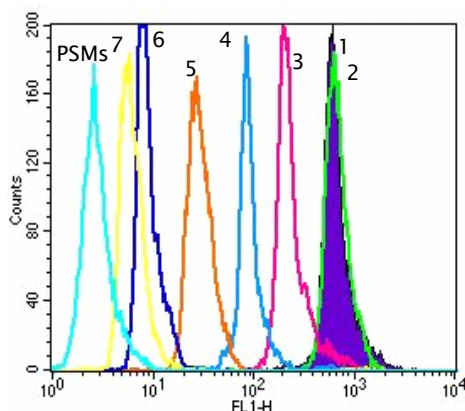


Figura 82. Intensidad de fluorescencia en el filtro FL1 para MPs conteniendo diferentes cantidades de F (*settings* II)

En este caso, para diferenciar el mayor número de poblaciones, los *settings* del citómetro fueron modificados aumentándose la sensibilidad del detector. De este modo también fue posible diferenciar partículas “blancas”, no codificadas con ningún fluoróforo. Sin embargo, no fue posible diferenciar partículas elaboradas a partir de las concentraciones 1 y 0.7 mM, los picos de intensidad, como muestra la figura 82 aparecen solapados para las dos poblaciones.

Al igual que en el caso anterior, el empleo de concentraciones crecientes de fluoróforo en las disoluciones de partida, se tradujo en intensidades crecientes de emisión de fluorescencia de las partículas.

Para los ensayos *multiplex*, en principio, se emplearía como “revelador” un fluoróforo que emitiera principalmente en FL1. Fluoresceína, presenta sus máximos de emisión

en este filtro, sin embargo, también presenta una fluorescencia importante en FL2 lo que dificultaría la identificación de poblaciones de partículas de forma simultánea ya que las emisiones de fluorescencia se solaparían, por ejemplo, con aquellas codificadas con rodamina.

Por otro lado, la posibilidad de identificar diferentes poblaciones de MPs utilizando un mismo fluoróforo a diferentes concentraciones, hace útiles estos sistemas multiparticulares para otro tipo aplicaciones como pueden ser el calibrado de equipos no sólo de citometría sino también de microscopía de fluorescencia, etc.

C) MPs codificadas con Nile Blue (NB):

En el caso del Nile Blue, la diferenciación de poblaciones fue más complicado que en los casos anteriores debido a la baja solubilidad que presenta este fluoróforo tanto en EA como en DCM. En la figura 83 se muestran los resultados de citometría para lotes de partículas obtenidos empleando EA o DCM para la disolución del NB.

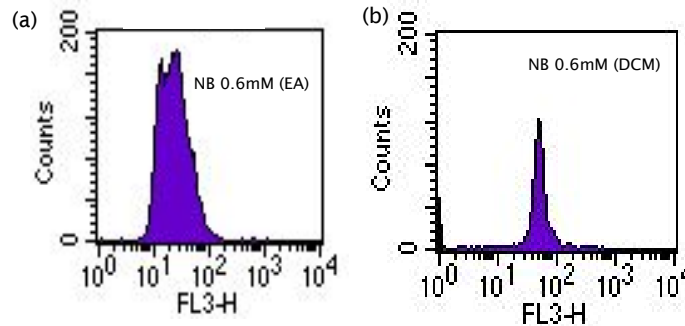


Figura 83. Intensidad de fluorescencia en el filtro FL3 para MPs conteniendo NB 0.6mM partiendo de disoluciones en: (a) EA y (b) DCM (*settings II*)

Como se muestra en la figura, el máximo de fluorescencia ($<10^2$) se obtuvo cuando se empleó DCM como disolvente, sin embargo, en esas condiciones las partículas presentaron intensidades de fluorescencia importantes en los filtros secundarios FL1 y FL2.

Con objeto de mejorar la solubilidad del NB y obtener el mayor número de poblaciones diferenciables en función de la concentración, se elaboraron disoluciones madre utilizando mezclas de EA con disolventes más polares llegando a una mezcla óptima, tanto para su disolución como para la producción de las MPs, de 15:1 EA:Metanol. De este modo, fue posible diferenciar dos poblaciones de partículas en FL3, sin recibir señal de fluorescencia en los otros dos filtros (FL1 y FL2). En la figura 84, se muestra el resultado del análisis en el citómetro de MPs elaboradas a partir de una disolución madre de NB 1 mM en EA:MeOH 15:1.

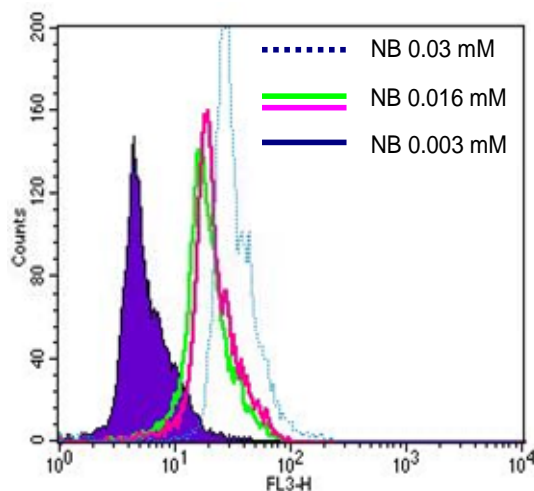


Figura 84. Intensidad de fluorescencia en el filtro FL3 para MPs conteniendo NB a diferentes concentraciones partiendo de una disolución de NB en EA:MeOH

Como alternativa al NB, se empleó también Sulforodamina Q (SRQ), fluoróforo que presenta su máxima emisión a 599 nm. Para comparar los resultados, se preparó una disolución madre en EA siendo la concentración final de 0.6 mM. Los resultados del análisis en el citómetro se muestran en la figura 85.

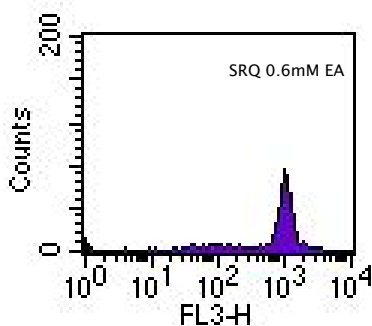


Figura 85. Intensidad de fluorescencia en el filtro FL3 para MPs conteniendo SRQ 0.6 mM

Como puede verse en la figura, se obtuvo el máximo de fluorescencia en trono a 10^3 , resultado muy superior a los obtenidos con NB en sus diferentes versiones. Utilizando éstos *settings*, la SRQ no presentó emisión de fluorescencia en FL1, dejando este espacio del espectro libre para el fluoróforo “revelador”.

El inconveniente de este fluoróforo fue el precio, el cual resulta 200 veces más caro que NB.

Diferenciación de poblaciones de partículas en base al tamaño de partícula

Con objeto de identificar diferentes poblaciones de MPs en función del tamaño de partícula, se seleccionaron dos concentraciones de las anteriormente evaluadas para cada fluoróforo y se produjeron partículas en tres tamaños diferentes, aproximadamente de 2, 5 y 10 micras de diámetro medio.

A continuación, fueron evaluadas en el citómetro de flujo. Los resultados se recogen en las figuras 86-88 donde se muestran mapas de fluorescencia combinando los resultados obtenidos en los tres filtros del equipo.

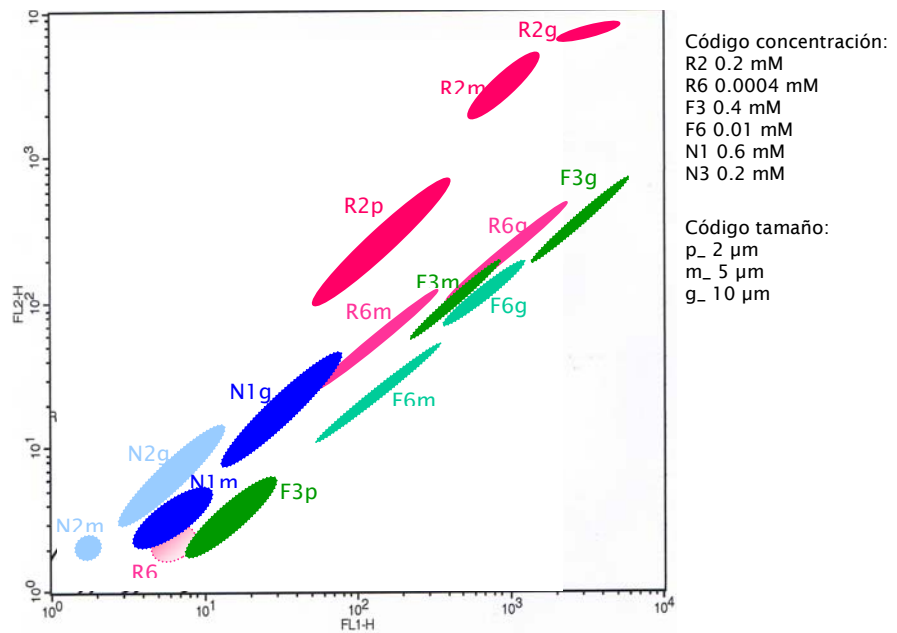


Figura 86. Identificación de diferentes poblaciones de MPs codificadas con R, F y NB en función del tamaño de partícula en los filtros FL2/FL1 (*settings* III)

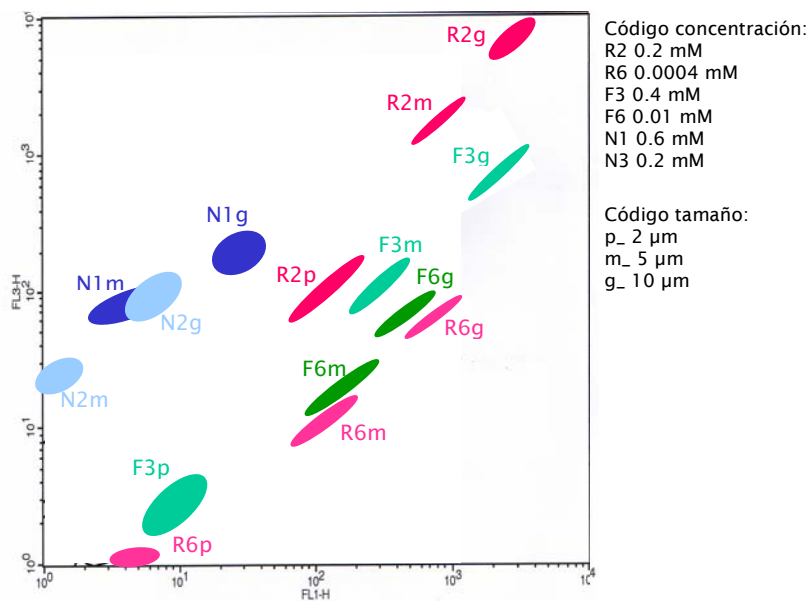


Figura 87. Identificación de diferentes poblaciones de MPs codificadas con R, F y NB en función del tamaño de partícula en los filtros FL3/FL1 (*settings* III)

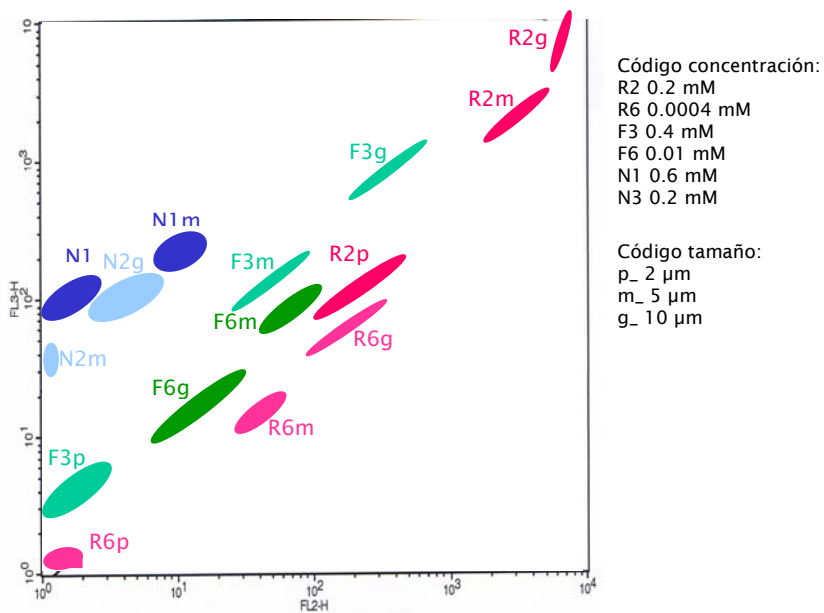


Figura 88. Identificación de diferentes poblaciones de MPs codificadas con R, F y NB en función del tamaño de partícula en los filtros FL3/FL2 (*settings* III)

Como puede verse adecuando los *settings* del equipo y combinando partículas codificadas en base al color y el tamaño fue posible identificar, en este caso concreto, 15 poblaciones diferentes de una forma rápida y sencilla.

En la actualidad, Ingeniatics Tecnologías, sigue trabajando en el desarrollo de este tipo de partículas tanto para aplicaciones de ensayos de diagnóstico *multiplex* como para patrones de calibración. En el primer caso, obtener poblaciones de partículas diferenciables resulta mucho más complejo, ya que se producen solapamientos entre partículas codificadas con distintos fluoróforos al presentar todos ellos (excepto sulforodamina Q) emisión de fluorescencia, no sólo en su filtro primario, sino también en los filtros secundarios.

Por otro lado, el gran número de poblaciones diferentes producidas (ver tabla Anexo IV) y evaluadas en el citómetro, hace casi imposible determinar el número exacto de poblaciones actualmente diferenciables. Aproximadamente, podemos estimar que son identificables un 70 % de las poblaciones ensayadas pero llegados a este nivel de complejidad se considera necesario el empleo de un *software* específico para el análisis de los resultados.

4.4.2. Validación del MBA diseñado para ensayos de hibridación e inmunoensayos

Para comprobar la efectividad del MBA diseñado en el presente trabajo para la unión covalente de moléculas se ensayaron distintos tipos de biomoléculas: amino-oligonucleótidos fluorescente modificados, proteína fluorescente GFP y anticuerpo de ratón IgG.

Estos ensayos fueron llevados a cabo por el doctorando D. Román González, antiguo miembro del grupo de investigación del Prof. Gañán Calvo y colaborador de Ingeniatics Tecnologías.

A continuación, se muestran de forma resumida, los resultados obtenidos con el fin de demostrar la viabilidad de los sistemas elaborados como herramientas en sistemas de diagnóstico.

Unión de biomoléculas en la superficie de las MPs

Para la unión de las biomoléculas se utilizaron micropartículas con grupos carboxilos en la superficie. El tipo de unión empleada fue covalente y para ello se siguió la estrategia de la carbodiimida.

Las carbodiimidias ($R-N=C=N-R$), cuya funcionalidad es la de deshidratar, se utilizan para activar grupos carboxilos para la formación de amidas.

Los grupos carboxilos en las MPs, activados por la carbodiimida 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDAC), hidrosoluble, reacciona con los grupos aminos libres de las biomoléculas formando uniones tipo amidas.

La conjugación de los ligandos fluorescentes se llevó a cabo en la superficie de micropartículas “blancas” de diámetro medio de partícula igual a 5 μm . La unión fue

determinada analizando la intensidad de fluorescencia en un microscopio de fluorescencia (Gañán-Calvo y cols., 2006b)

En la figura 89 se muestra las imágenes obtenidas de partículas conjugadas con los tres tipos de biomoléculas ensayadas.

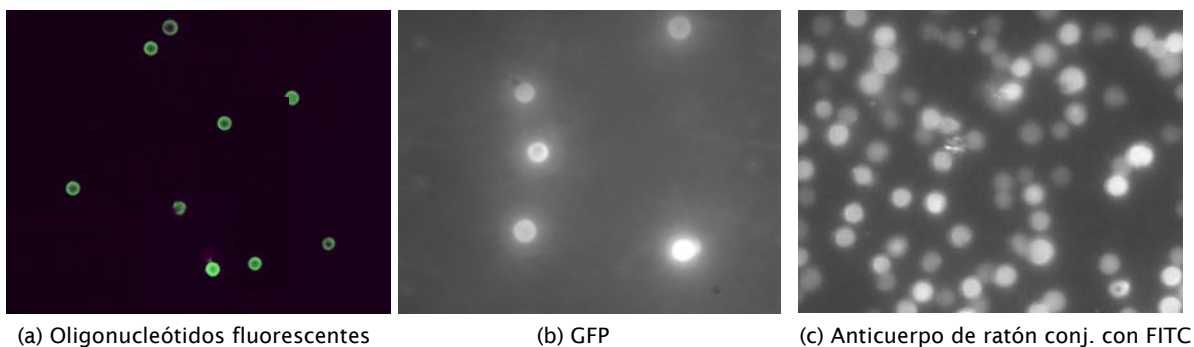


Figura 89. Imágenes del microscopio de fluorescencia de MPs de PSM de 5 μm de diámetro con diferentes moléculas fluorescentes unidas covalentemente en superficie: (a) oligonucleótidos, (b) GFP y (c) anticuerpo de ratón IgG

Validación del MBA diseñado para ensayos de hibridación e inmunoensayos

Una vez optimizada la unión de los ligandos a la superficie de las MPs, se evaluó la capacidad del MBA diseñado para análisis de hibridación e inmunoensayos.

Para ello se utilizaron partículas codificadas con una mezcla de NB (0.2mM) y RhB (0.003mM). La detección de la interacción de los analitos se llevó a cabo mediante citometría de flujo.

En las figuras 90 y 91 se muestran las gráficas obtenidas en el citómetro de flujo para cada tipo de ensayo.

En el primer caso (fig. 90), para detectar la unión se utilizó SYBER-Green I, un tinte fluorescente capaz de unirse a la doble cadena de DNA. Como control negativo de la unión se utilizó un *oligo* no complementario. De este modo, es posible detectar la unión del *oligo* complementario ya que la emisión de fluorescencia de SYBER-Green I aumenta unas 100 veces.

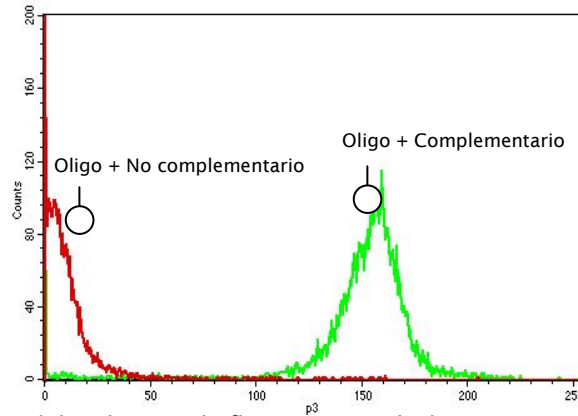


Figura 90. Resultados del citómetro de flujo para partículas reactivas conjugadas con un oligo tras ser incubadas con el oligo complementario (en verde) y el oligo no complementario (en rojo)

En el segundo caso (fig. 91) dos poblaciones diferentes de partículas reactivas fueron conjugadas una con anticuerpo de ratón IgG y otra con un péptido modelo. Posteriormente las dos poblaciones fueron incubadas con el anticuerpo anti-ratón IgG. Los resultados del citómetro muestran una mayor intensidad de fluorescencia en el caso en que el anticuerpo es conjugado con las micropartículas que tienen conjugado su ligando específico (en verde).

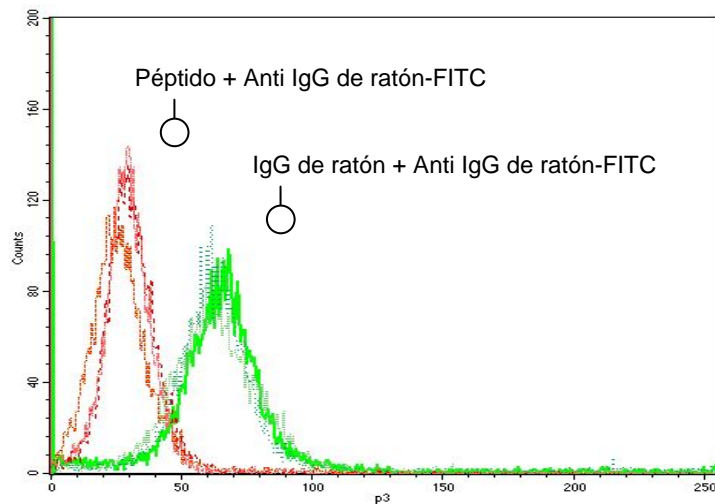


Figura 91. Resultados del citómetro de flujo para el análisis de especificidad de la unión entre el anticuerpo anti-ratón IgG conjugado con: partículas reactivas conjugadas con un péptido (rojo) y con partículas reactivas conjugadas con el anticuerpo de ratón IgG (en verde)

Como muestran estos primeros resultados, FF se confirma como una alternativa de bajo coste para la producción de MBAs.

4.5. CONCLUSIONES

1. Se han elaborado diferentes lotes de partículas de diámetro controlado y estrecha distribución de tamaño ($CV < 10\%$) codificadas tanto con fluoróforos orgánicos como inorgánicos.
2. Cuando se emplearon fluoróforos orgánicos, éstos se distribuyeron de forma homogénea en el interior de la partícula. En el caso de los fluoróforos inorgánicos, debido a su estado inicial, éstos aparecieron agregados en el interior de las partículas.
3. Micropartículas codificadas con fluoróforos orgánicos presentaron propiedades de fluorescencia que permitieron su diferenciación en función del tipo de fluoróforo, concentración del mismo y tamaño de partícula.
4. Mediante citometría de flujo, fue posible la diferenciación de, aproximadamente, el 70% de los lotes de partícula codificadas con sólo 3 tipos de fluoróforos (Rodamina B, Nile Blue y Fluoresceína).
5. Se elaboraron micropartículas con superficie reactiva que permitieron la unión de biomoléculas mediante enlaces covalentes siguiendo la estrategia de la carbodiimida.
6. Los sistemas elaborados fueron validados para ensayos tanto de hibridación como inmunoensayos.
7. Para determinar el número exacto de poblaciones de partícula diferenciables mediante citometría de flujo se considera necesario el empleo de un *software* específico para el análisis de los resultados.

CAPÍTULO 5

CAPÍTULO 5

PRODUCCIÓN DE MICROPARTÍCULAS CON PROPIEDADES PARAMAGNÉTICAS

5.1. INTRODUCCIÓN

Se denominan partículas paramagnéticas aquellas que en presencia de un campo magnético se orientan en la misma dirección en la que el campo es aplicado. Una vez retirado el campo, las partículas vuelven a su estado original quedando libres.

5.1.1. Aplicaciones de las partículas paramagnéticas

Estas partículas presentan un gran atractivo, ya que pueden ser aplicadas en campos muy diversos tales como la medicina, bioquímica, medioambiente, materiales, etc. Pero, probablemente, su mayor auge y relevancia se encuentre dentro del campo de la biomedicina. Los primeros trabajos de producción de micropartículas paramagnéticas se deben a John Ugelstad en 1979, cuyo método fue comercializado por Dynal dando lugar a las conocidas Dyna-Beads®.

Dentro del campo de la biomedicina, sus aplicaciones se pueden clasificar en dos grupos en función de si su acción ocurre fuera o dentro del organismo (Tartaj y cols., 2003, Gupta y Gupta, 2005):

<i>In vivo</i>		Terapéutico		Hipertermia Liberación de fármacos
		Diagnóstico	-	Imagen (resonancia magnética)
<i>In vitro</i>		Terapéutico	-	Magnetofección
		Diagnóstico		Separación Magnetorelaxometría

5.1.1.1. Aplicaciones *in vivo*

HIPERTERMIA. Se trata de un procedimiento terapéutico novedoso para el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Consiste en elevar la temperatura en la zona concreta del organismo en donde se localiza el tumor, de forma que las células cancerosas mueren a 41-42°C. Mediante el empleo de partículas paramagnéticas, generalmente nanopartículas, es posible elevar la temperatura a 42-43°C mediante la aplicación de un campo magnético externo (Hergt y cols., 1998).

LIBERACIÓN DE FÁRMACOS. El objetivo es dirigir hacia una zona concreta del cuerpo partículas magnéticas cargadas con fármacos, generalmente quimioterápicos muy tóxicos. Estas nanopartículas magnéticas se distribuyen por la circulación sistémica

dirigiéndose y concentrándose en un punto concreto del organismo donde liberan el fármaco que vehiculizan (Rudge y cols., 2000).

DIAGNÓSTICO. El avance en las técnicas de diagnóstico ha supuesto la aparición de nuevos productos farmacéuticos llamados magnetofarmacéuticos. Éstos, administrados al paciente, pueden mejorar el contraste entre el tejido sano y el dañado y/o indicar el estado de funcionamiento de un órgano o el flujo sanguíneo. De esta forma, las partículas superparamagnéticas se constituyen como una alternativa a los agentes de contraste de NMR, al concentrarse a niveles elevados por endocitosis o por diferencias en la composición de los tejidos permitiendo su observación por contraste.

5.1.1.2. Aplicaciones *in vitro*

MAGNETORELAXOMETRÍA. Se trata de un nuevo método para evaluar inmunoensayos. Mide la viscosidad magnética, es decir, cómo se relaja un sistema de micropartículas paramagnéticas una vez retirado el campo magnético, de forma que en base al comportamiento magnético es posible diferenciar conjugados libres y unidos (Lange y cols., 2002).

MAGNETOFECCIÓN. Es un método por el que nanopartículas magnéticas portador de un vector de DNA son capaces de transferir la carga genética al interior de las células mediante la aplicación de un campo magnético externo. Son aplicables tanto a vectores virales como no virales debido a su extraordinaria rapidez, simplicidad y a que la transfección alcanza niveles de saturación a dosis bajas.

SEPARACIÓN. Hace referencia a técnicas de separación celular, extracción de DNA, inmovilización de proteínas, anticuerpos, detección de bacterias, etc. En los ensayos de inmunoseparación, estas partículas se utilizan para separar células sanguíneas procedentes de la médula ósea, etc. Son especialmente útiles en la separación de células T, B, proteínas o ácido nucleico, entre otros (Rudershausen y cols., 2002; Gijis, 2004; Gupta y Gupta, 2005). Para ello, estas micropartículas han de presentar una superficie reactiva de forma que sea posible modificar su superficie mediante la unión de biomoléculas; así, éstas interaccionarán de forma selectiva con la célula / biomolécula deseada al igual que ocurriría con las partículas codificadas descritas en el capítulo anterior. Por otro lado, una vez producida la unión, se requiere un sistema de identificación; para ello, generalmente se recurre a codificar la partícula mediante fluoróforos. Esta codificación o marcaje de la partícula ocurre siempre en un paso posterior a la síntesis de la partícula bien por hinchamiento-difusión (Mulvaney y cols., 2004), bien por unión covalente de fluoróforos a la superficie de la partícula (Rudershausen y cols., 2002).

La principal ventaja de éstas partículas con propiedades paramagnéticas es su fácil manejo, ya que, entre otros aspectos, se sustituyen los procesos de centrifugado de forma que mediante el uso de un separador magnético apropiado es posible separar las micropartículas del sobrenadante.

En la figura 92 se muestra la secuencia de trabajo para el aislamiento de una proteína utilizando este tipo de micropartícula.

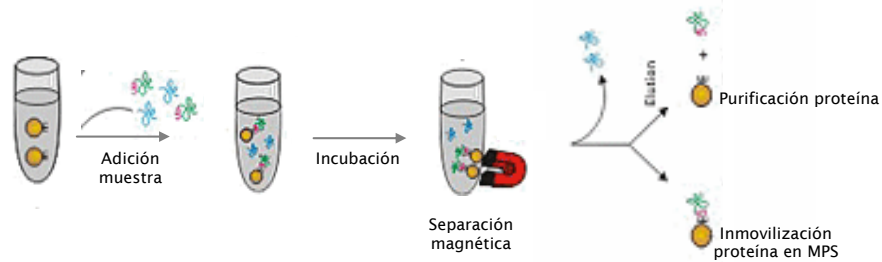


Figura 92. Esquema de aislamiento de una proteína utilizando MPs paramagnéticas (www.invitrogen.com, 2007)

5.1.2. Formación y estabilización de suspensiones magnéticas

Los métodos actuales para la producción de partículas paramagnéticas incluyen:

- emulsión polimerización (Wang y cols., 1998; Shang y cols., 2006)
- dispersión polimerización (Hora ´k y cols., 2004)
- hinchamiento (Ugelstad, 1979)
- emulsión-evaporación del disolvente (Tanylaça y Özdural, 2000)
- membranas porosas (Omi y cols., 2001)
- recubrimiento de núcleos de poliestireno con capas de óxido de hierro (Spherotec Inc.)

El tipo de polímero a emplear dependerá de la aplicación final. Los usos habitualmente son: polietilenglicol, poli(acrilamidas), polivinilalcohol y poliestireno y, más recientemente, nitrocelulosa (Tanylaça y Özdural, 2000).

Para producir este tipo de micropartículas mediante la tecnología Flow Focusing, ésta se ha adaptado al método de encapsulación emulsión-evaporación del disolvente, requiriéndose un paso previo: la producción de una suspensión de nanopartículas de magnetita. Por ello, en este apartado se detallan las propiedades que ha de tener una suspensión así como las propiedades de los agentes estabilizadores más empleados en la elaboración de este tipo de sistema disperso heterogéneo.

Como se ha mencionado, el método de encapsulación seleccionado requiere elaborar previamente una suspensión de nanopartículas de magnetita. Esta suspensión ha de ser estable durante un tiempo tal que la producción de las micropartículas resulte ser un proceso reproducible, proporcionando así partículas con un contenido en magnetita

mínimo y homogéneo. En general, se puede decir que una suspensión es estable cuando cumple las siguientes condiciones:

- permanece homogénea durante un cierto tiempo, establecido previamente
- el sedimento que forma durante el almacenamiento es fácilmente resuspendible
- la viscosidad está equilibrada de manera que permita una fácil manipulación y evite la sedimentación
- el tamaño de partícula es pequeño y homogéneo

Como ha quedado reflejado, las suspensiones magnéticas juegan un papel importante en numerosas aplicaciones por lo que el estudio de estabilidad de las mismas así como el de sus propiedades reológicas ha llegado a ser objeto de numerosos trabajos de investigación (Choi y cols., 2000; de Vicente y cols., 2002; Viota y cols, 2005; López-López y cols, 2005, 2006).

Se trata de fluidos complejos que ante la presencia de un campo magnético externo pueden modificar de forma significativa sus propiedades reológicas. Se clasifican en dos grupos: ferrofluidos y fluidos magnetoreológicos. En el primer caso, el tamaño de partícula en suspensión es del orden de nanómetros. Los segundos, se dan cuando el tamaño de partícula es lo suficientemente grande como para que varíen sus propiedades de flujo de manera rápida y significativa al ser sometidos a un campo magnético moderado. Ésta característica los hace especialmente interesantes en multitud de aplicaciones técnicas como amortiguación de vibraciones periódicas y no periódicas, frenado, embragues, protección antisísmica de estructuras, etc. (Iglesias, 2007).

Respecto a la estabilidad de estas suspensiones, se han investigado numerosos métodos, empleándose fases continuas de naturaleza tanto polar como apolar: adición de agentes tixotrópicos, medios viscoelásticos, emulsiones w/o, etc. (Viota y cols., 2005).

En el presente trabajo, para producir y estabilizar estas suspensiones se han ensayado distintos agentes estabilizadores, tanto en medio acuoso como en medio orgánico.

En el primer caso (medio acuoso), el nebulizador FF a emplear debe presentar una configuración concéntrica (ver Capítulo 2), de modo que la suspensión de magnetita en fase acuosa estará rodeada de una disolución orgánica del polímero y la micropartícula final presentará una estructura tipo *core-shell*.

En el segundo caso (medio orgánico), se empleará un nebulizador FF en una configuración simple, por lo que la magnetita quedaría suspendida en la propia

disolución orgánica del polímero, constituyendo así una única fase y generando micropartículas cuya estructura sería una matriz homogénea.

En cualquier caso, ya sea en medio acuoso u orgánico, el problema principal que se genera para preparar la suspensión de magnetita, ya sea en un medio u otro, es la diferencia de densidades entre las dos fases (fase continua, baja densidad; fase dispersa, elevada densidad). Por ello, los efectos de la gravedad suponen un gran inconveniente, exigiendo el uso de estabilizadores.

5.1.2.1. Agentes estabilizadores

En general, los agentes empleados para la estabilización de suspensiones van a actuar de dos modos diferentes, bien favoreciendo la humectación de las partículas en suspensión o bien modificando la viscosidad de la fase continua. A continuación, se relacionan los principales agentes estabilizantes y su mecanismo de acción (Vila Jato, 1997).

5.1.2.1.1. Agentes humectantes

El objetivo es que el líquido humecte a las partículas del sólido, especialmente importante en el caso de que haya una gran diferencia en la polaridad entre las fases. Se trata de que el líquido desplace al aire en contacto con el sólido y se pueda situar a su alrededor. La capacidad de humectación de un sólido por un líquido se mide mediante el ángulo de contacto y no es más que una consecuencia de la relación entre las tensiones superficiales de ambas fases y la tensión interfacial. Los agentes humectantes más habituales son:

- Tensioactivos. Suelen utilizarse aquellos que presentan un HLB entre 7 y 9. Dependiendo de su naturaleza las cadenas hidrofóbicas o hidrofílicas se adsorberán a las partículas sólidas, orientando la otra porción de la molécula hacia la fase continua. Los más habituales son los tipo Tween® y Span®, en concentraciones nunca superiores al 0.5 % p/v.
- Coloides. Se utilizan polímeros o silicatos de aluminio y magnesio o sílice coloidal. Éstos se disponen alrededor del sólido formando capas multimoleculares aportándole a las partículas un carácter más hidrofóbico / hidrofílico.
- Disolventes. Es posible utilizar disolventes miscibles con la fase continua capaces de reducir la tensión superficial, favoreciendo así la humectación al modificar la constante dieléctrica del sistema.

5.1.2.1.2. Agentes viscosizantes

Normalmente, se pretende que las suspensiones posean propiedades pseudoplásticas y tixotrópicas, es decir, que en reposo posean una estructura viscosa, que fluidifique

con relativa facilidad mediante agitación recuperando su estructura interna una vez queda en reposo.

Dentro de los agentes viscosizantes destacan:

- Polisacáridos, como alginatos, goma arábica o almidón.
- Celulosas. Ha de tenerse en cuenta su solubilidad frente al pH y la temperatura, así como su carácter iónico, ya que pueden presentar problemas de incompatibilidad con otros componentes iónicos de la suspensión.
- Silicatos. Son capaces de absorber hasta 12 veces su peso en agua formando geles con propiedades tixotrópicas.
- Sílice coloidal. Forma redes tridimensionales al dispersar en agua y suele ser de elección en suspensiones no acuosas
- Derivados del ácido poliacrílico (Carbopol®)

5.1.2.1.3. Electrolitos

Con la adición de electrolitos se pretende modificar las fuerzas de atracción y repulsión interparticulares. Estas fuerzas se establecen a consecuencia de la doble capa eléctrica (Teoría DLVO) y su magnitud se relaciona con el potencial electrocinético de las partículas.

El efecto de la adición de electrolitos va a depender tanto de su valencia como de la concentración a la que se use. La eficacia aumenta con la valencia (regla de Schulze-Hardy), de manera que un ión divalente es 10 veces más eficaz que uno monovalente y un trivalente 100 veces más que un monovalente. No obstante, su toxicidad también aumenta con la valencia, por lo que es necesario llegar a un compromiso en la relación de los niveles de estas dos variables.

5.2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente capítulo es diseñar y producir de micropartículas con propiedades paramagnéticas y propiedades de fluorescencia similares a las descritas en el Capítulo 4 para su empleo en sistemas de diagnóstico *multiplex*.

Para ello, se han llevado a cabo distintos estudios:

- Estudio de la estabilidad de suspensiones de nanopartículas paramagnéticas tanto en medio acuoso como orgánico
- Estudio de la influencia de la composición de la suspensión inicial en el tamaño y aspecto de la partícula final
- Comportamiento de las partículas elaboradas en presencia de un campo magnético
- Determinación del contenido final en hierro

5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1. Materiales

- Acetato de etilo PRS (*Panreac Química S.A.*, Montcada i Reixac, Barcelona, España)
- Ácido oleico (Sigma-Aldrich)
- Aerosil® 200 Pharma (*Degussa AG*, Barcelona, España)
- Alcohol polivinílico 72.000 (Sigma-Aldrich)
- Alginato sódico (Sigma-Aldrich)
- Azul Nilo A (*Panreac Química S.A.*, Montcada i Reixac, Barcelona, España)
- Carbonato cálcico, Ca (HCO₃)₂
- Cloruro sódico, NaCl (Sigma-Aldrich)
- Diclorometano 99.9% grado HPLC (Sigma-Aldrich)
- Ethocel® (The Dow Chemical Company)
- Eudragit RS PO (*Degussa AG*, Barcelona, España)
- Eudragit S100 (*Degussa AG*, Barcelona, España)
- Ferrita SrFe₁₂O₁₉, 99.8% (Sigma-Aldrich)
- Fluoresceinamina isómero I (Sigma-Aldrich)
- Klucel®
- Laurilsulfato sódico (Acofarma, España)
- Magnetita Fe₃O₄ 98% (Sigma-Aldrich)
- Methocel® (The Dow Chemical Company)
- Poliestireno (M_w = 4.000-200.000) (Sigma-Aldrich)
- Polietilenglicol 8000 (Sigma-Aldrich)
- Poly(styrene-co-maleic acid), partial isobutyl/methyl ester (Sigma-Aldrich)
- Poly(styrene-co-maleic acid), partial secbutyl/methyl ester (Sigma-Aldrich)
- Rodamina B (Sigma-Aldrich)
- Span® 60 (Sigma-Aldrich)

5.3.2. Métodos

El polímero empleado para elaborar de las micropartículas paramagnéticas fue poliestireno.

Se ensayaron dos materiales paramagnéticos diferentes: magnetita (óxido de hierro, II, III) y ferrita (SrFe₁₂O₁₉). Sus principales propiedades se recogen en la tabla 31.

Material paramagnético	Fórmula	Forma	Tamaño partícula (nm)	Superficie específica (m ² /g) (BET)	Pto. Fusión (°C)	Densidad (g/mL)
MAGNETITA	Fe ₃ O ₄	Cristalina (octaedro), esférica	20-30	> 60	1538	4.8 - 5.1
FERRITA	SrFe ₁₂ O ₁₉	Cristalina (hexagonal)	< 40	10 -20	> 450	5.8

Tabla 31. Principales propiedades del material paramagnético ensayado

5.3.2.1. Elaboración de la suspensión de magnetita

Se han elaborado diferentes suspensiones de nanopartículas paramagnéticas tanto en medio acuoso (Tabla 32) como en medio orgánico (Tabla 33) siguiéndose en ambos casos el mismo procedimiento.

Estabilizante	Categoría	Disolvente	Estabilizante (% p/v)	Magnetita / Estabilizante
Alginato sódico (AlNa)	viscosizante	agua	0.1	1 / 10
Laurilsulfato sódico (SLS)	viscosizante / tensioactivo	agua	0.1	1 / 10
Alcohol polivinílico (PVA)	tensioactivo	agua	1	1 / 1
NaCl	electrolitos	agua	0.9	1.1 / 1
Ca(HCO ₃) ₂		agua	1	1 / 1

Tabla 32. Agentes estabilizantes ensayados en medio acuoso

Estabilizante	Categoría	Disolvente	Estabilizante (% p/v)	Magnetita / Estabilizante		
Span® 60	Tensioactivo	acetato etilo	0.1	1/1		
			1	1/10		
Polietilenglicol (PEG)	Polímero (acrilatos)	acetato etilo	0.1	1/1		
Eudragit® RS PO		etanol	1	1/1		
Eudragit® S100	Celulosa	acetato etilo	0.5	1.2/1		
Ácido oleico					20 % v/v	
Methocel®						
Ethocel®						
Klucel®						
HPMC						
Aerosil®200Pharma	Sílice coloidal	acetato etilo	1	1/1		

Tabla 33. Agentes estabilizantes ensayados en medio orgánico

Una vez disuelto el material estabilizante en el medio deseado, se añadió una cantidad determinada de material paramagnético, sonicándose durante 5 minutos y observándose su comportamiento en el tiempo determinado de 60 minutos. En los casos en que se empleó ferrita, no se pudo obtener una dispersión homogénea tras ser

sonicada a diferentes tiempos, por lo que este material fue descartado para elaborar las micropartículas.

En la figura 93 se muestra un esquema del procedimiento seguido para elaborar las suspensiones.

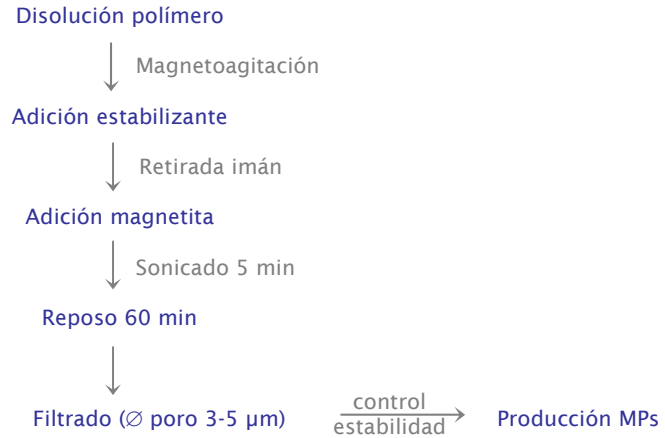


Figura 93. Esquema de elaboración de una suspensión de magnetita en medio orgánico

5.3.2.2. Caracterización de las suspensiones

La caracterización de las suspensiones elaboradas se centró en su estabilidad con el tiempo. Para su seguimiento, se tomaron imágenes de las suspensiones elaboradas con los distintos agentes estabilizantes a diferentes tiempos (0, 10, 30 y 60 minutos).

5.3.2.3. Producción de micropartículas paramagnéticas

La producción de las micropartículas paramagnéticas se llevó a cabo del mismo modo que las micropartículas “blancas” descritas en el Capítulo 3 y las codificadas descritas en el Capítulo 4. La diferencia en este caso concreto fue que el fluido enfocado es una suspensión de magnetita (fase dispersa) en una disolución de poliestireno (fase continua).

5.3.2.4. Caracterización de las micropartículas con propiedades paramagnéticas

Una vez elaboradas las micropartículas, éstas se sometieron a distintos ensayos para su caracterización.

La determinación del tamaño, así como su aspecto y morfología se llevó a cabo de igual modo que en los otros dos tipos de partículas elaboradas (ver aparatado de Material y Métodos del Capítulo 3).

5.3.2.4.1. Comportamiento de las micropartículas paramagnéticas en presencia de un campo magnético

Las suspensiones de partículas paramagnéticas elaboradas a partir de diferentes formulaciones fueron sometidas a campos magnéticos externos. Para ello se utilizaron separadores magnéticos comerciales empleados comúnmente en operaciones de separación de células, aislamiento de proteínas, etc. Se emplearon dos tipos de separadores magnéticos, Dynal MPC-S y Merck ref. 69964-3 (ver figura 94).

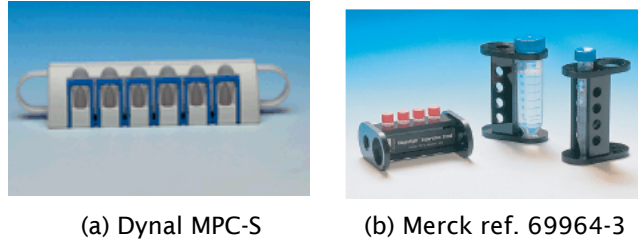


Figura 94. Modelos de separadores magnéticos empleados

5.3.2.4.2. Estabilidad de las partículas paramagnéticas

Se estudió el efecto de la temperatura, pH del medio y tiempo sobre el aspecto y la morfología de las MPs obtenidas. Se llevaron a cabo ensayos en condiciones diferentes de medio, pH, temperatura y tiempo para validar su utilidad como herramienta en sistemas de detección *multiplex*. Los valores de estas condiciones quedan recogidas en la tabla 34.

Medio	pH	T (°C)	Tiempos (h)	
PBS	7	37	2	4
MES	6	37	2	4
PBS-BSA	7.4	37	2	4
DENHART	8	90	10 min	-
		55	2	4

Tabla 34. Condiciones experimentales de ensayos de estabilidad de las MPs paramagnéticas

5.3.2.4.3. Cuantificación del contenido en magnetita

La cuantificación del contenido en magnetita se llevó a cabo midiendo el contenido en Fe presente en muestras de partículas liofilizadas por espectrometría por acoplamiento de plasma inductivo (ICP) (Fisons, modelo ARL-3410).

El ICP es una fuente de ionización a presión atmosférica que permite introducir de forma continua muestras líquidas (mediante nebulización), sólidas (mediante ablación láser) o gaseosas (acoplamiento Cromatografía de Gases ICP-MS o generación de hidruros). La muestra introducida en el plasma de argón sufre temperaturas superiores a los 6000 °C, lo que conlleva la ruptura de todos los enlaces químicos (atomización) y la ionización de los elementos en función de su potencial de ionización. El plasma ICP

produce de forma casi exclusiva iones monoatómicos y monopositivos (M+) que posteriormente se extraen a un Espectrómetro de Masas para su análisis.

Para el análisis de las muestras, éstas se digirieron primero en un digestor de microondas (Anton Para, mod. 3000) con ayuda de 6 mL de ácido nítrico y 1 mL de agua oxigenada. Tras la digestión se trasvasó a un matraz aforado donde se enrasó con agua ultrapura hasta 25 mL. A continuación, se midió en ICP en la línea de Fe que corresponde a 259.940 nm

El contenido en magnetita se expresó como porcentaje de eficacia de encapsulación:

$$\% EE = \left(\frac{Q}{Q_i} \right) * 100$$

donde Q es la cantidad de magnetita encapsulada y Q_i la cantidad de magnetita inicial empleada.

5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1. Caracterización de las suspensiones elaboradas

Como se indicó, la caracterización de las suspensiones se centró en el estudio de su estabilidad con el tiempo. Se considerará estable, aquella suspensión cuyo grado de sedimentación sea mínimo transcurridos 60 minutos desde su elaboración.

5.4.1.1. Estabilidad de suspensiones elaboradas en medio acuoso

Los resultados obtenidos para las diferentes suspensiones elaboradas en medio acuoso se muestran a continuación.

A tiempo 0 min, la turbidez de las suspensiones, en orden descendiente, fue:

$$\text{SLS} > \text{AlNa} > \text{PVA}$$

Éste orden se mantuvo durante los 60 minutos que duró la observación. En la imagen 95 se muestra el aspecto de las tres suspensiones y su evolución con el tiempo.

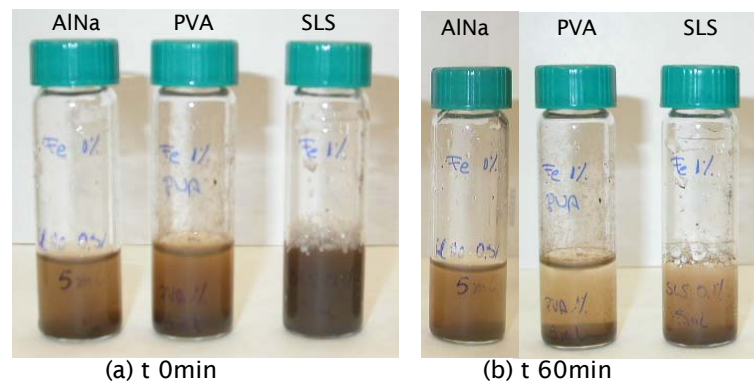


Figura 95. Variación del aspecto con el tiempo de diferentes suspensiones de magnetita elaboradas en medio acuoso tras sonicar: (a) 0 min y (b) 60 min

Como puede verse, en ninguno de los tres casos se obtuvo una suspensión suficientemente estable. Tras los 10 primeros minutos, prácticamente el total de las partículas de magnetita habían sedimentado.

En todos los casos el sedimento fue fácilmente resuspendible excepto cuando se empleó alginato sódico como estabilizante.

5.4.1.2. Estabilidad de suspensiones elaboradas en medio orgánico

Los resultados obtenidos para cada tipo de estabilizante empleado fueron diferentes.

Tensioactivos

En el caso de los *tensioactivos*, ninguno de ellos, a las concentraciones ensayadas, estabilizaron las suspensiones durante el tiempo estimado como suficiente (ver figura 96).

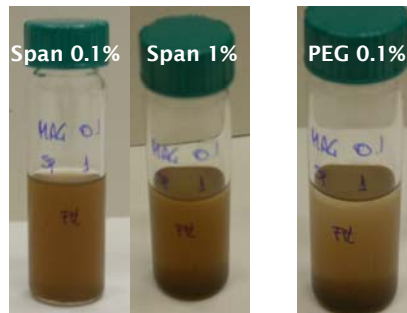


Figura 96. Aspecto de diferentes suspensiones de magnetita elaboradas en medio orgánico empleando tensioactivos como estabilizantes tras 60 min de sonicar

Los mejores resultados se obtuvieron con Span 60 al 1% p/v; sin embargo, no se consideró estable debido al importante grado de sedimentación que presentó tras permanecer 60 minutos en reposo. Estas formulaciones fueron descartadas para la producción de micropartículas.

Acrilatos

En el caso de los *acrilatos*, se obtuvieron buenos resultados cuando se empleó Eudragit RS PO. La suspensión no modificó su aspecto incluso tras 60 minutos después de ser sonicada, ser filtrada y permanecer en reposo otros 60 minutos. En el caso del Eudragit S100 la suspensión no fue estable tras los 10 primeros minutos. En la figura 97 se muestra el aspecto que presentaron tras 30 minutos de ser sonicadas y permanecer en reposo.

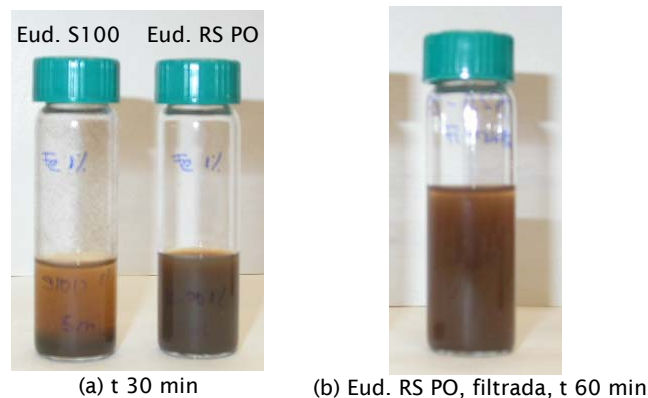


Figura 97. Aspecto de dos suspensiones de magnetita elaboradas con polimetilacrilatos en medio orgánico: (a) tras 30 min de sonicar y (b) Eud. RS PO tras 60 min una vez filtrada

La formulación elaborada con Eudragit S100 fue desechada para la producción de micropartículas. Con Eudragit RS PO se elaboraron diferentes lotes de micropartículas.

Ácido oleico

El *ácido oleico* es un surfactante que presenta cargas en su superficie. El grupo polar carboxílico forma complejos con iones metálicos y se une a la superficie de las partículas en medios alcalinos (Horák y cols., 2004). Por otro lado, su cola hidrofóbica puede prevenir los fenómenos de agregación debida a su afinidad por el disolvente (fig. 98).

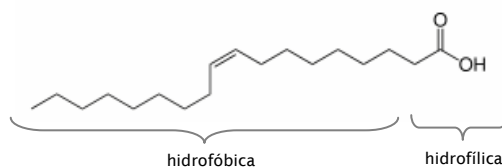


Figura 98. Estructura química del ácido oleico

Generalmente, el ácido oleico se utiliza para prevenir la formación de agregados durante la síntesis de nanopartículas magnéticas. En nuestro caso se ensayó como estabilizante de la suspensión de magnetita en la disolución de poliestireno con pH ~ 8. Para ello se añadió 1 mL de ácido oleico a 4mL de una disolución de polímero al 4% p/v y 25 mg de magnetita.

El aspecto de la suspensión tras 40 minutos después de ser sonicada se muestra en la figura 99.



Figura 99. Aspecto de una suspensión de magnetita tras 40 min en reposo preparada utilizando ácido oleico como estabilizante

Celulosas

En este caso, tanto el Klucel® como la HPMC (hidroxipropilmetil celulosa) no se disolvieron en acetato de etilo. El Klucel se hinchó visiblemente pero no llegó a disolver. En el caso de Methocel, la suspensión no resultó ser estable tras 60 minutos en reposo. Sólo para la formulación elaborada con Ethocel se obtuvieron buenos resultados en cuanto a la estabilidad de la suspensión, no modificando ésta su aspecto tras 60 minutos en reposo (ver figura 100).

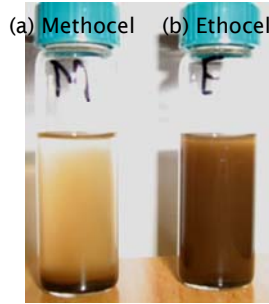


Figura 100. Aspecto de dos suspensiones de magnetita elaboradas con celulosas en medio orgánico tras 60 minutos en reposo: (a) Methocel y (b) Ethocel

Esta formulación fue pre-seleccionada para la producción de las micropartículas.

Sílice coloidal

Para el caso del sílice coloidal, Aerosil 200 Pharma, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con Eudragit RS PO y Ethocel. En la imagen de la figura 101 se muestra el aspecto de una suspensión elaborada con Aerosil tras 24 horas de reposo. Esta formulación también fue seleccionada para la producción de micropartículas.



Figura 101. Aspecto de una suspensión de magnetita elaborada con Aerosil en medio orgánico tras 24 horas en reposo

En resumen, las formulaciones elaboradas en medio acuoso fueron todas descartadas para la producción de micropartículas por no ser estables durante 60 minutos, tiempo establecido como suficiente para poder producir las micropartículas. En el caso de las elaboradas en medio orgánico, las formulaciones seleccionadas fueron las elaboradas con Aerosil®, Eudragit® RS PO y Ethocel®.

5.4.2. Caracterización de las micropartículas elaboradas

5.4.2.1. Determinación del tamaño de partícula

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en cuanto a tamaño de partícula para las primeras formulaciones seleccionadas, es decir, aquellas elaboradas con

Eudragit RS PO, Aerosil y Ethocel. La formulación exacta en cada caso se muestra en la tabla 35 (todos los componentes fueron disueltos en 10 mL de acetato de etilo). Los caudales empleados durante la producción, con un nebulizador simple, fueron Qd 1mL/h para el fluido enfocado (suspensión) y Qt 3mL/min para el fluido enfocante (agua destilada).

Estabilizante	Formulación	Estabilizante (mg)	Poliestireno (mg)	Magnetita (mg)
Eudragit RS PO	F2	60	100	40
Aerosil	F1	60	100	40
Ethocel	E2	150	400	60

Tabla 35. Composición de las primeras formulaciones ensayadas para la elaboración de MPs paramagnéticas

Los resultados obtenidos tanto respecto al tamaño de partícula como de la distribución, se recogen en la figura 102. Como puede observarse, en los tres casos se obtuvieron distribuciones de tamaño estrechas. Con Ethocel, a pesar de haber empleado la misma combinación de caudales que con los otros dos estabilizantes, se obtuvieron tamaños de partícula mayores debido a que la concentración de polímero empleada fue superior (1% p/v frente a 5.5% p/v).

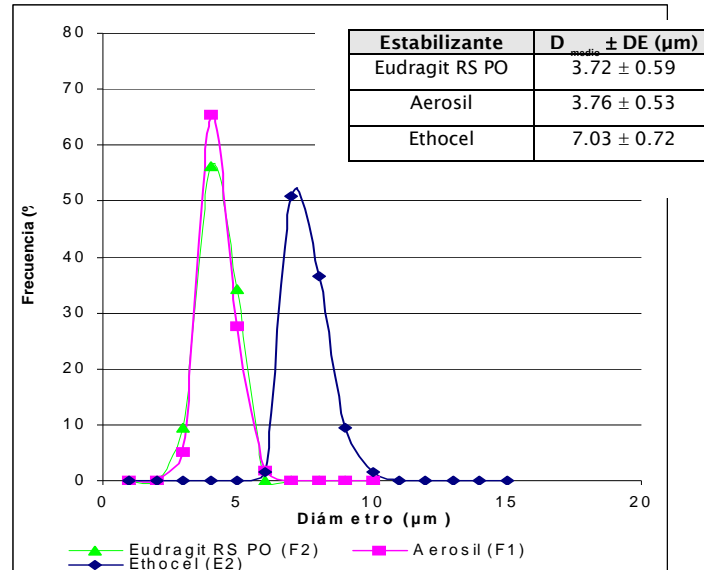


Figura 102. Distribución de tamaño de partícula obtenida para MPs paramagnéticas elaboradas con los estabilizantes indicados

5.4.2.2. Determinación del aspecto y morfología de las partículas

En cuanto al aspecto, en la figura 103 se muestran imágenes de SEM de partículas elaboradas a partir de las 3 formulaciones anteriores.

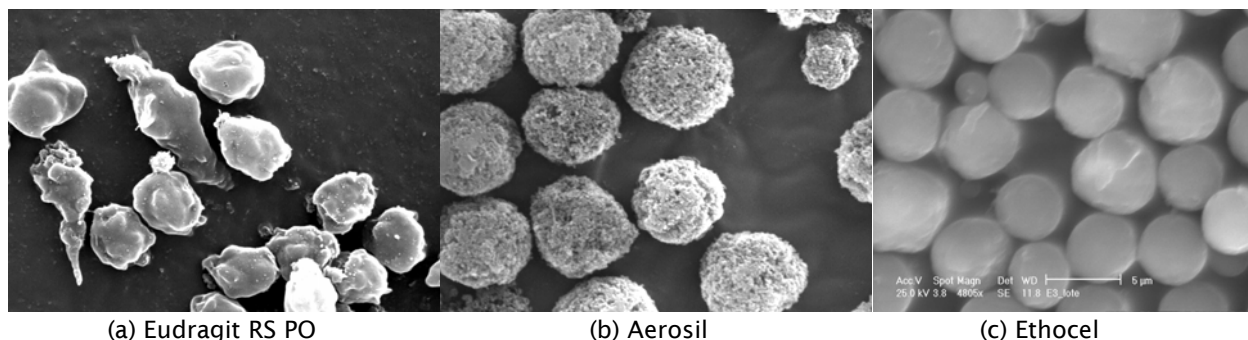


Figura 103. Imágenes de SEM de MPs paramagnéticas elaboradas con distintos agentes estabilizantes (Qd 1 mL/h Qt 3 mL/min)

Como se muestra en las imágenes de la figura 103, las micropartículas elaboradas con Eudragit® RS PO (fig. 103a) no presentaron una forma totalmente esférica, presentando algunas una forma acicular. Sobre la base de estos resultados esta formulación fue descartada para producir MPs paramagnéticas.

En los otros dos casos (Aerosil y Ethocel) (fig. 103b,c), se obtuvieron partículas esféricas, aunque con características superficiales totalmente diferentes. Esto es debido, según se verá más adelante, a que la proporción relativa magnetita / polímero fue diferente para cada caso (ver tabla 33).

Para ambas formulaciones, se ensayaron variaciones en las proporciones relativas de los tres componentes (poliestireno, estabilizante y magnetita), con el objeto de (I) obtener partículas con un contenido en magnetita tal que las hiciera susceptibles de ser atraídas por los separadores magnéticos comerciales y (II) presentaran una superficie lisa que evite fenómenos de adsorción inespecífica de moléculas.

En los dos apartados siguientes se detallan las formulaciones ensayadas con cada estabilizante (apartado 5.4.3 para Aerosil y 5.4.4. para Ethocel), así como los resultados obtenidos para cada tipo de partícula elaborada en cuanto a tamaño de partícula, aspecto, estabilidad, contenido en hierro, etc.

5.4.3. Micropartículas elaboradas con Aerosil® 200 Pharma

Se ensayaron diez formulaciones elaboradas con Aerosil®, cuyas composiciones se recogen de forma detallada en la tabla 36.

Formulación	Composición:	mg	% p/p	%p/v
A1	PS	-	-	-
	PSM iso	100	50,00	1
	Magnetita	40	20,00	0,4
	Aerosil	60	30,00	0,6
A2	PS	50	25,00	0,5
	PSM iso	50	25,00	0,5
	Magnetita	40	20,00	0,4
	Aerosil	60	30,00	0,6
A3	PS	140	46,67	1,4
	PSM iso	60	20,00	0,6
	Magnetita	40	13,33	0,4
	Aerosil	60	20,00	0,6
A4	PS	140	42,42	1,4
	PSM iso	60	18,18	0,6
	Magnetita	40	12,12	0,4
	Aerosil	90	27,27	0,9
A5	PS	400	80,00	4
	PSM iso	-	-	-
	Magnetita	40	8,00	0,4
	Aerosil	60	12,00	0,6
A6	PS	280	56,00	2,8
	PSM iso	120	24,00	1,2
	Magnetita	40	8,00	0,4
	Aerosil	60	12,00	0,6
A7	PS	280	45,16	2,8
	PSM iso	120	19,35	1,2
	Magnetita	40	6,45	0,4
	Aerosil	90	14,50	0,9
A8	PS	280	45,16	2,8
	PSM iso	120	19,35	1,2
	Magnetita	40	6,45	0,4
	Aerosil	180	29,03	1,8
A9	PS	280	45,16	2,8
	PSM sec	120	19,35	1,2
	Magnetita	40	6,45	0,4
	Aerosil	180	29,03	1,8
A10	PS	-	-	-
	PSM sec	400	64,52	4
	Magnetita	40	6,45	0,4
	Aerosil	180	29,03	1,8

Tabla 36. Formulaciones elaboradas con Aerosil® 200 Pharma

A continuación, se describen los resultados obtenidos para cada formulación ensayada.

5.4.3.1. Estudio de la influencia del tipo polímero y su concentración

Los polímeros empleados para elaborar las micropartículas magnéticas fueron PS, PSM iso ó sec en distintas proporciones, fijando la concentración de magnetita en 0.4% p/v

y la de Aerosil en 0.6% p/v. Así, comparando las formulaciones A2, A5 y A6 podemos estudiar el efecto del tipo de polímero empleado. Las proporciones PS:PSM en cada caso fueron:

<u>Formulación</u>	<u>PS:PSM</u>
A5	100:0
A2	50:50
A6	70:30

En cuanto a estabilidad de las suspensiones, los resultados las tres formulaciones se consideraron estables de acuerdo a los criterios establecidos no suponiendo ninguna influencia la presencia de grupos carboxilos presentes en PSM.

Ante estos resultados y teniendo en cuenta que el objetivo final es producir MPs para ensayos *multiplex* donde se requiere la unión de biomoléculas, es conveniente aumentar al máximo la presencia de grupos reactivos en la superficie de las micropartículas, por ello se seleccionaron aquellas formulaciones elaboradas con PSM. Para comprobar el efecto del tipo de PSM, sec o iso, se compararon las formulaciones A7 y A9 donde la concentración de Aerosil aumentó de 0.6% a 1.8 % p/v, manteniéndose la de magnetita en 0.4 %p/v.

Los resultados obtenidos para las partículas elaboradas con PSM sec o iso fueron similares en todos los aspectos: morfología, magnetismo, etc., excepto en la estabilidad como veremos más adelante. MPs elaboradas con PSM iso resultaron ser inestables en algunas de las condiciones a las que fueron sometidas durante los ensayos de estabilidad (ver apartado 5.4.3.3.).

En cuanto a la concentración del polímero, las concentraciones ensayadas para elaborar las micropartículas fueron 1, 2 y 4 % p/v en acetato de etilo. Las formulaciones correspondientes a estas concentraciones son las formulaciones A2, A3 y A6. En los tres casos la matriz polimérica consistió en una mezcla de PS:PSM iso, siendo las concentraciones de Aerosil y magnetita 0.6 y 0.4 % p/v, respectivamente.

En este caso, los resultados, en cuanto a la estabilidad de las suspensiones, fueron similares para las tres formulaciones, encontrándose diferencias significativas en cuanto a morfología y a magnetismo.

En la figura 104 se muestran imágenes de SEM de las partículas elaboradas con distintas concentraciones de polímero.

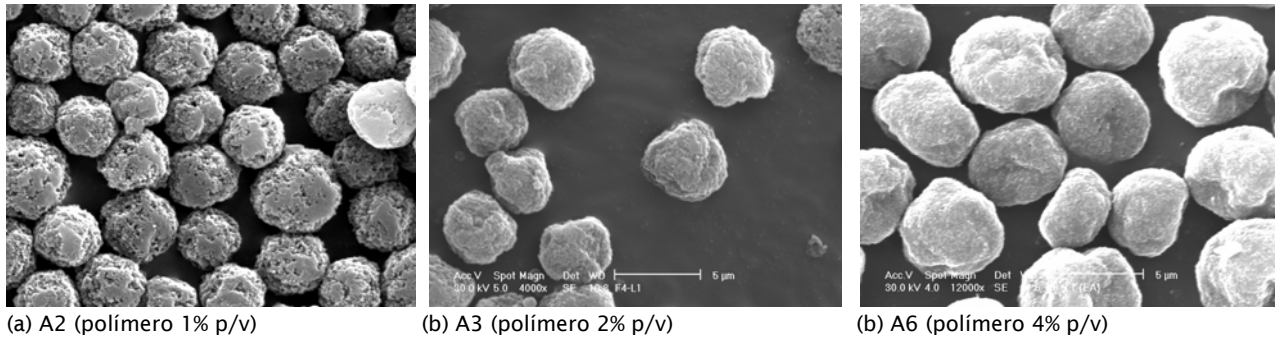


Figura 104. Imágenes de SEM de MPs paramagnéticas elaboradas utilizando distintas concentraciones de polímero: (a) 1% p/v, (b) 2% p/v y (c) 4 % p/v

Como puede observarse, al aumentar la concentración del polímero se disminuye la rugosidad superficial de la partícula, lo que reduce la posibilidad de unión de moléculas de forma inespecífica.

Sin embargo, al someter estas tres formulaciones a la influencia de un campo magnético externo (separadores magnéticos comerciales, Merck o Dynal), se observa que la atracción de las partículas es menor a medida que aumenta la concentración del polímero. Esto se explica porque al aumentar la concentración del polímero, fijando las de Aerosil y magnetita, el porcentaje de magnetita en peso disminuye ($A2 > A3 > A6$).

Por lo tanto, habrá que llegar a una situación de compromiso de forma que las propiedades de partícula final sean óptimas en cuanto a aspectos granulométricos, estabilidad y comportamiento frente al imán y sea posible su uso en la aplicación final.

5.4.3.2. Estudio de la influencia de la concentración de Aerosil® 200 Pharma

La concentración de Aerosil empleada tuvo un importante efecto en cuanto a la estabilización de la suspensión. Las nanopartículas de Aerosil forman una red tridimensional alrededor de las nanopartículas de magnetita, reduciendo así la velocidad de sedimentación (de Vicente y cols., 2002). En la figura 105a se muestra el aspecto de dos suspensiones de magnetita elaboradas con una concentración de polímero del 2% p/v. En la Figura 105b se muestran dos suspensiones elaboradas utilizando una concentración de poliestireno del 4% p/v.

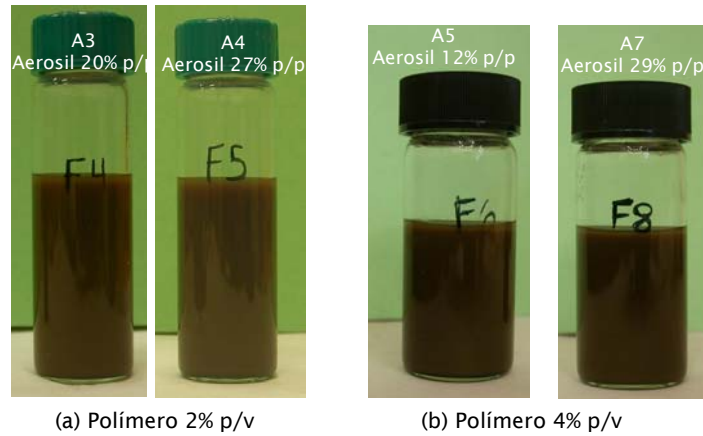


Figura 105. Aspecto de las suspensiones tras 60 min de reposo elaboradas con distintas cantidades de Aerosil y concentración de polímero: (a) 2% p/v y (b) 4% p/v

Como se muestra en las imágenes, el aspecto de las cuatro suspensiones fue similar transcurridos 60 minutos después de ser sonicadas y permanecer en reposo. Sin embargo, el grado de sedimentación (no apreciable en las fotografías) fue mayor cuando la cantidad de Aerosil empleada fue menor. Esto se traduce en un menor contenido en magnetita en la partícula y por lo tanto en una menor atracción de las partículas por el imán. El magnetismo o la susceptibilidad de las partículas para ser atraídas por los separadores magnéticos comerciales fue evaluado observando el movimiento de las micropartículas al ser sometidas al campo magnético.

La diferencia del contenido en magnetita también fue apreciable en el aspecto que presentaron las superficies de las micropartículas. Un mayor contenido en magnetita hace que las partículas presenten una superficie más rugosa. En la figura 106 se muestran imágenes de SEM de partículas elaboradas a partir de las formulaciones anteriores utilizando una concentración de polímero del 4% p/v.

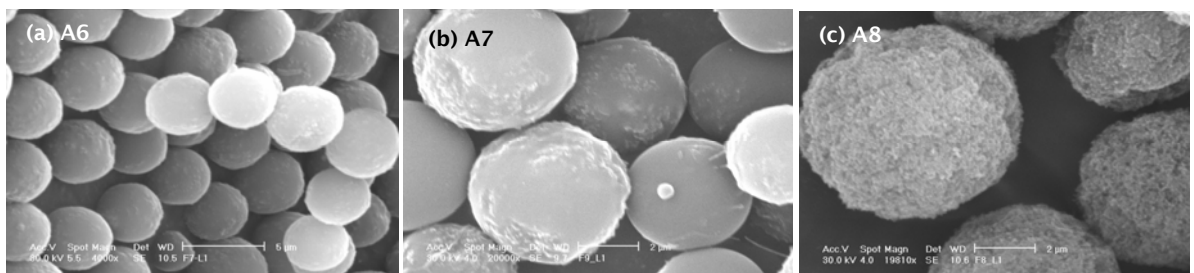


Figura 106. Imágenes de SEM de MPs paramagnéticas de 5 µm de diámetro mostrando el efecto de la concentración de Aerosil en la morfología de las partículas: (a) A6 - 12% p/p; (b) A7 - 14.5% p/p y (c) A8 - 29% p/p

Como se muestra en la figura 106, a medida que aumenta la concentración de Aerosil aumenta la rugosidad de la partícula.

Estos resultados concuerdan con lo observado en cuanto a estabilidad de las suspensiones y al magnetismo de las micropartículas. El volumen de partículas sedimentadas fue menor a medida que aumentó la concentración de sílice. Esto se tradujo en un mayor contenido en magnetita en el interior de la partícula y por lo tanto, al ser sometidas a un campo magnético externo fueron atraídas a mayor velocidad.

Llegados a este punto, se puede concluir que la formulación óptima hasta el momento es la formulación A8 (ver tabla 37). La única diferencia con las formulaciones siguientes, A9 y A10, fue el tipo de polímero empleado

Formulación	Composición:	mg	% p/p	%p/v
A8	PS	280	45,16	2,8
	PSM iso	120	19,35	1,2
	Magnetita	40	6,45	0,4
	Aerosil	180	29,03	1,8

Tabla 37. Composición detallada de la formulación A8

En el caso de la formulación A8 se empleó una mezcla de poliestirenos PS:PMSiso 70:30. Para la formulación A9 se empleó la misma proporción pero se sustituyó PSMiso por PSMsec y para A10 se empleó PSMsec 100%. El comportamiento tanto de las suspensiones como de las micropartículas frente al campo magnético fue similar, encontrándose importantes diferencias en cuanto a la estabilidad de las partículas al ser sometidas a ciertos valores de pH y temperatura como se verá más adelante.

A continuación, se detallan las condiciones del ensayo de estabilidad y los resultados obtenidos para cada tipo de partícula.

5.4.3.3. Estudio de estabilidad de MPs paramagnéticas elaboradas con Aerosil® 200 Pharma

Las condiciones experimentales a las que fueron sometidas las micropartículas quedan recogidas en la tabla 34.

El objetivo de este estudio es comprobar si las partículas son estables al ser sometidas a determinadas condiciones de temperatura y pH, condiciones a las que se verán sometidas en alguno de los pasos necesarios de los protocolos de unión más habituales en ensayos *multiplex*. Para ello las MPs fueron suspendidas en distintos medios en agitación continua y observadas al microscopio óptico a intervalos de tiempos prefijados.

Para comprobar la influencia de la composición de la matriz polimérica sobre la estabilidad de estas micropartículas, se compararán los resultados obtenidos para las formulaciones A6, A9 y A10:

Formulación	PS:PSM
A6	70:30 PSMiso
A9	70:30 PSMsec
A10	0:100 PSMsec

Los resultados obtenidos se recogen en la figura 107 donde se presenta el aspecto de las partículas en las condiciones indicadas.

Como muestran las imágenes los tres tipos de partículas no modificaron su morfología tras ser sometidas a distintos medios de incubación a 37°C.

Cuando las partículas fueron incubadas en medio Denhart, tanto a 90°C como a 55°C, partículas producidas con PSMsec (formulaciones A9 y A10) no modificaron su aspecto. Sin embargo, las elaboradas con PSMiso (formulación A6) no fueron estables en este medio a ninguna de las temperaturas ensayadas. Las partículas obtenidas a partir de la formulación A6, presentaron un halo transparente tanto a 55°C como a 90°C, las partículas en este medio comenzaron a disolverse e hincharse, aumentando el tamaño medio.

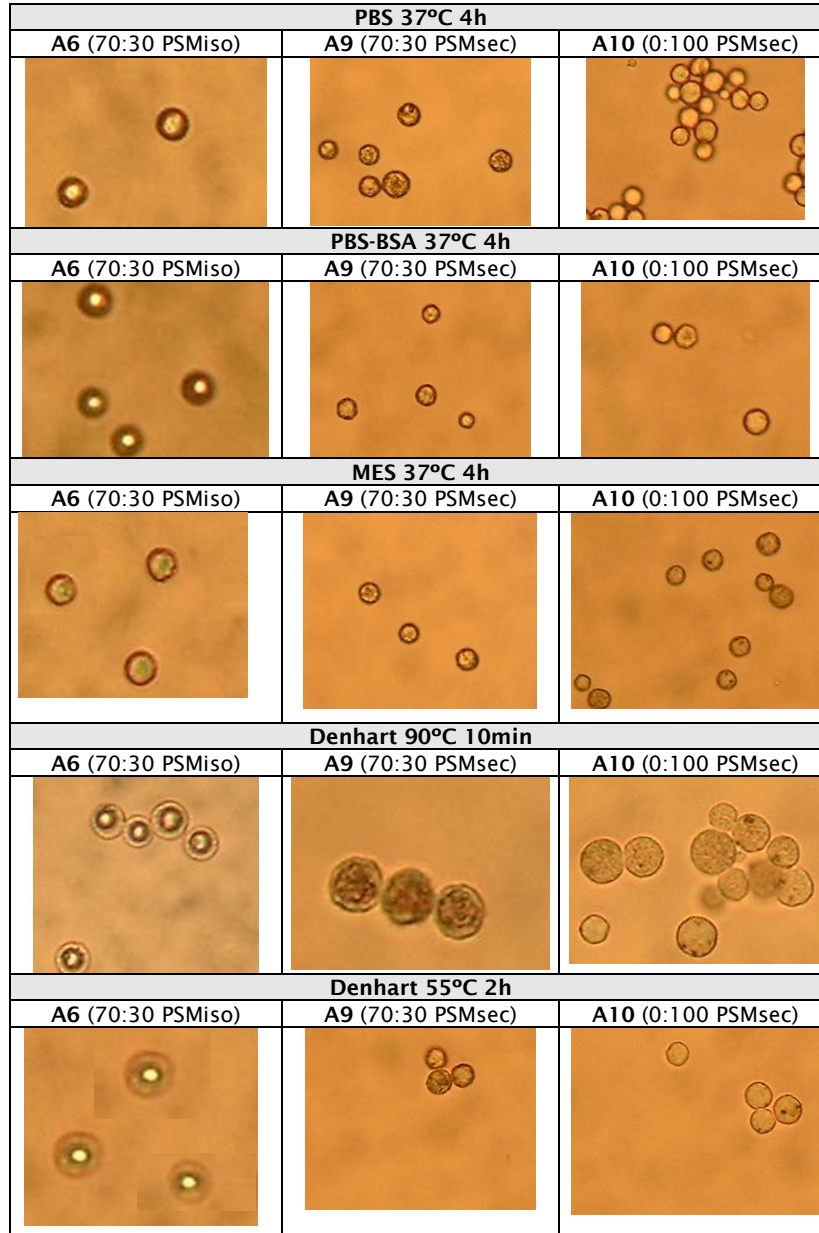


Figura 107. Imágenes de MPs paramagnéticas de 5 µm de diámetro (aumento 100X) elaboradas con las formulaciones A6, A9 y A10 tras ser sometidas en distintos medios de incubación a los tiempos y temperaturas indicadas

Ante los resultados de estabilidad obtenidos, las formulaciones seleccionadas para la producción de MPs paramagnéticas corresponden a A9 y A10. Se debe recordar que la finalidad de este tipo de partículas, al igual que las descritas en el capítulo anterior, es ser una herramienta en los sistemas de diagnóstico *multiplex*, por lo que se prefieren partículas con una alta densidad de grupos reactivos en superficie. Así, la formulación seleccionada para esta aplicación fue la formulación A10 cuya composición detallada queda recogida en la tabla 38.

Formulación	Composición:	mg	% p/p	%p/v
A10	PS	-	-	-
	PSM sec	400	64,52	4
	Magnetita	40	6,45	0,4
	Aerosil	180	29,03	1,8

Tabla 38. Composición detallada de la formulación optimizada para la producción de MPs paramagnéticas

5.4.3.4. Codificación de las MPs paramagnéticas

Una vez seleccionada la formulación optimizada para la producción de micropartículas paramagnéticas, formulación A10, se procedió a la codificación de éstas mediante el empleo de fluoróforos orgánicos. Para ello, se disolvieron distintas cantidades de los fluoróforos anteriormente empleados (rodamina, fluoresceína y Nile Blue) en la fase continua, junto al polímero y al estabilizante.

Los resultados obtenidos para cada fluoróforo fueron muy diferentes.

La codificación de las partículas mediante rodamina no presentó ningún problema durante la producción. En la figura 108 se muestra una imagen de partículas paramagnéticas conteniendo rodamina al 0.2 mM obtenida por el microscopio de fluorescencia.

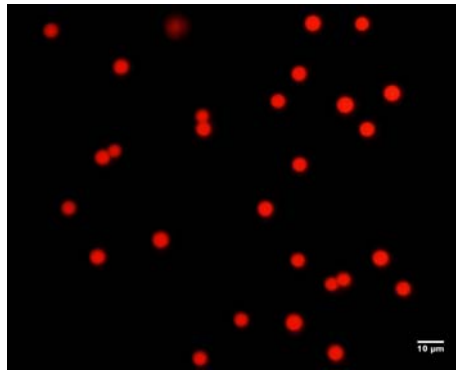


Figura 108. Imagen del microscopio de fluorescencia de MPs paramagnéticas (formulación A10) codificadas con Rodamina B (0.2mM)

Sin embargo, la producción de MPs codificadas con Nile Blue o fluoresceína no fue posible debido a la formación de agregados interparticulares durante la elaboración de las suspensiones. No obstante, el comportamiento de estos sistemas fue diferente en función del fluoróforo empleado.

En el caso de Nile Blue (figura 109), las micropartículas no presentaron un tamaño homogéneo apareciendo, aunque en pequeñas proporciones, partículas de diámetro superior no esféricas.

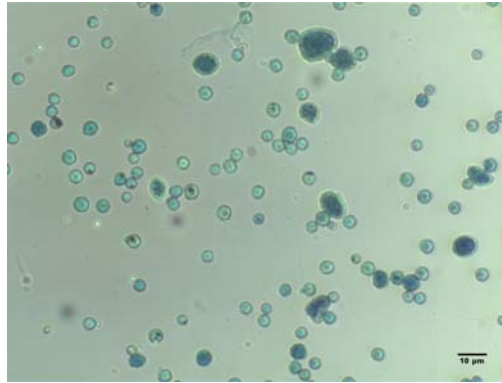


Figura 109. Imagen del microscopio de fluorescencia de MPs paramagnéticas (formulación A10) codificadas con Nile Blue (0.2mM)

Empleando fluoresceína, la producción de las micropartículas no fue posible. El grado de agregación fue tal que provocó el atascamiento del sistema de alimentación del nebulizador impidiendo la producción de las micropartículas.

Estas circunstancias, probablemente, se deban a algún tipo de interacción entre los componentes de la formulación. Con objeto de determinar qué componentes interaccionan entre sí se llevaron a cabo dos pruebas: (I) se eliminó la magnetita de la formulación y (II) se modificó la cantidad de Aerosil.

En el primer caso, eliminar la magnetita de la formulación no solucionó el problema, observándose la formación de grumos en la propia suspensión que provocó el atasco del sistema de alimentación hacia el nebulizador.

En el segundo caso, la reducción de la concertación de Aerosil, aproximadamente a la mitad (de 29% p/p a 14.5% p/p) (formulación A11), permitió producir MPs de tamaño homogéneo (ver figura 110) conteniendo Nile Blue. No obstante, esto ocurre a costa de comprometer la estabilidad de la suspensión, por lo que el contenido final de magnetita en la partícula disminuirá.

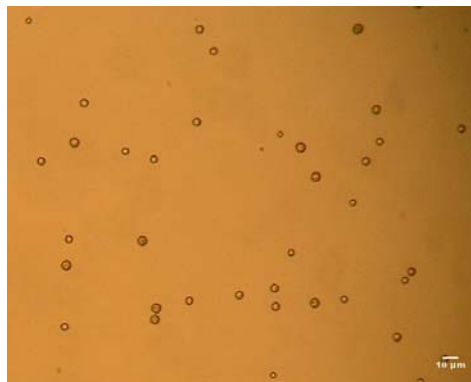


Figura 110. Imagen del microscopio óptico de MPs paramagnéticas, formulación A11, conteniendo Nile Blue 0.2 mM

Por lo tanto, a modo de conclusión preliminar, se determina que (I) la concentración de Aerosil juega un papel crítico en la estabilidad de la suspensión y por lo tanto, en el contenido en magnetita de las micropartículas finales y (II) ha sido posible la codificación de micropartículas con propiedades granulométricas óptimas con rodamina, haciéndolas viables para ensayos de diagnóstico *multiplex*.

5.4.4. Micropartículas elaboradas con Ethocel®

De acuerdo a los resultados obtenidos con las formulaciones elaboradas con Aerosil, se procedió a la elaboración de MPs paramagnéticas utilizando Ethocel® como agente estabilizador de la suspensión.

Ethocel está indicado como agente estabilizador de suspensiones coloidales tanto en medios acuosos como orgánicos. Actúa como agente espesante, la viscosidad dependerá del peso molecular, tipo de polímero y concentración.

Según indicaciones del fabricante (Dow Chemical Company), Ethocel® está indicado para modificar ciertas propiedades de otros polímeros, pudiéndose mezclar a una concentración de hasta el 50 %. Su compatibilidad está limitada con polímeros del tipo vinil acetato o vinil butirato y es incompatible con polímeros tipo cloruro de vinilo. Por otro lado, Ethocel no reacciona con pigmentos o tintes siendo compatible con sus disoluciones siempre que se preparen en un disolvente compatible.

En la figura 111 se muestra su estructura química.

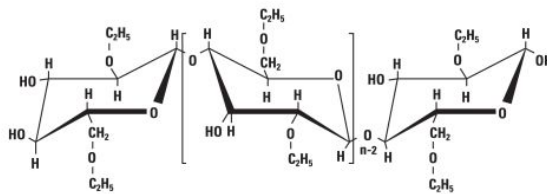


Figura 111. Estructura química de Ethocel

Las formulaciones ensayadas utilizando este tipo de celulosa se recogen en la tabla 39. En todos los casos el tipo de poliestireno empleado fue PSMsec a una concentración del 4 % p/v en acetato de etilo.

Formulación	Composición:	mg	% p/p	%p/v
E1	PSMsec	400	71,43	4
	Magnetita	60	10,71	0,6
	Aerosil	-	-	-
	Ethocel	50	8,93	0,5
E2	PSMsec	400	71,43	4
	Magnetita	60	10,71	0,6
	Aerosil	-	-	-
	Ethocel	100	17,86	1
E3	PSMsec	400	65,57	4
	Magnetita	60	9,84	0,6
	Aerosil	-	-	-
	Ethocel	150	24,59	1,5
E4	PSMsec	400	63,49	4
	Magnetita	80	12,70	0,8
	Aerosil	-	-	-
	Ethocel	150	23,81	1,5
E5	PSMsec	400	64,52	4
	Magnetita	60	9,68	0,6
	Aerosil	60	9,68	0,6
	Ethocel	100	16,13	1

Tabla 39. Formulaciones ensayadas empleando celulosas como agentes estabilizadores de la suspensión de partículas magnéticas

En ninguno de los cinco tipos de formulaciones ensayadas hubo problemas de incompatibilidad entre los componentes y siempre se obtuvieron partículas monodispersas. En el caso de la formulación E5, se utilizó una mezcla Ethocel - Aerosil para estabilizar la suspensión.

Las micropartículas elaboradas a partir de estas cinco formulaciones se sometieron al campo magnético proporcionado por los separadores comerciales empleados anteriormente con objeto de seleccionar aquella que presentara un comportamiento óptimo, es decir, fueran atraídas con mayor rapidez.

En base al comportamiento observado, micropartículas elaboradas con la formulación E3 fueron las seleccionadas para continuar con los ensayos.

5.4.4.1. Determinación del tamaño de partícula

En las formulaciones elaboradas con Ethocel, el tamaño de partícula final fue mayor que en las elaboradas con Aerosil, empleando las mismas combinaciones de caudales para los fluidos enfocante y enfocado. Esto se debe a que la celulosa, participa en la

estructura de la matriz polimérica de la partícula, por lo que su concentración ha de ser tomada en cuenta a la hora de obtener el tamaño de partícula deseado.

De este modo, empleando un caudal de 1 mL/h para el fluido enfocado (suspensión magnética, Qd) y de 3 mL/min para el enfocante (agua destilada, Qt) se obtuvieron distintos tamaños de partícula en función del contenido en Ethocel.

Para aclarar esta idea, en la figura 112 se recogen los histogramas obtenidos para las formulaciones A10, E3 y E5 donde se aprecia la influencia de la concentración de Ethocel empleada sobre el tamaño medio de partícula.

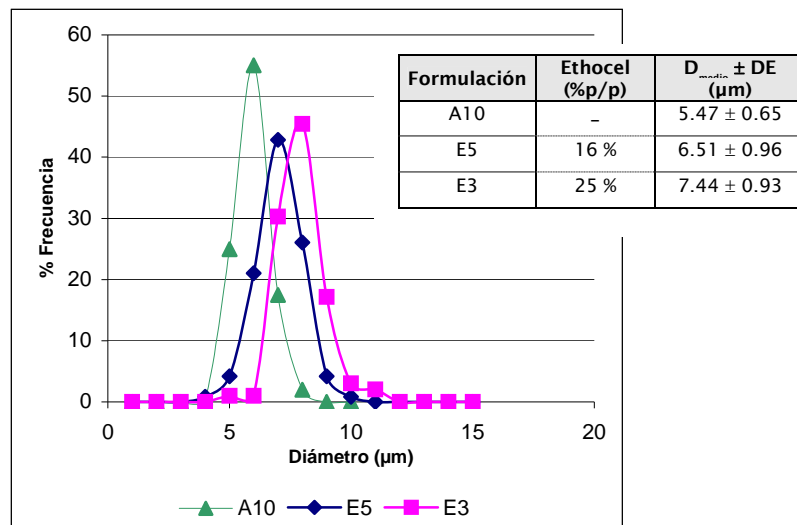


Figura 112. Distribución de tamaño de partícula para las formulaciones A10, E3 y E5 obtenidas para una combinación de caudales Qd1Qt3 y tamaño medio de partícula en función del contenido en Ethocel

Como se muestra, la presencia de Ethocel aumentó el tamaño medio de partícula un 19% en el caso de la formulación E5 y un 36 % en el caso de la formulación E3 respecto al tamaño medio obtenido para el caso de la formulación A10, que no contiene Ethocel.

Por ello y con objeto de obtener partículas de 5 μm de diámetro aproximadamente, los caudales para los fluidos enfocante y enfocado fueron modificados de Qd 1 mL/h y Qt 3 mL/min a Qd 0.8 mL/h y Qt 4 mL/min. De este modo el diámetro medio de partícula fue de 5.39 ± 0.55 (CV = 10.26 %).

5.4.4.2. Aspecto y morfología

A modo de ejemplo, en la figura 113 se muestran imágenes de SEM de partículas elaboradas con algunas de estas formulaciones.

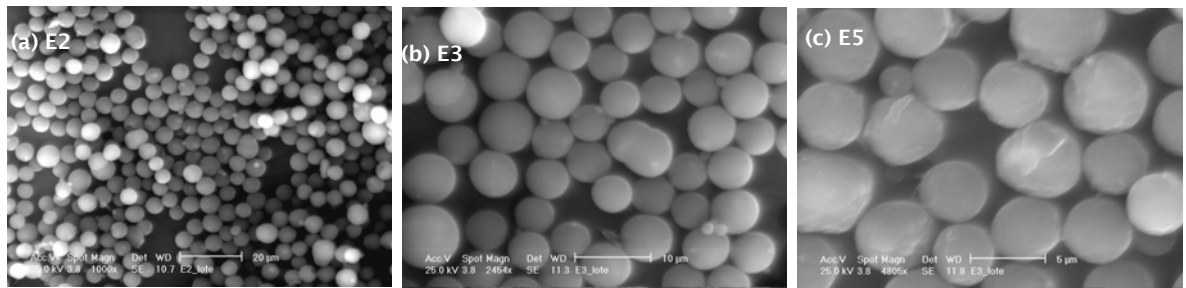


Figura 113. Imágenes de SEM de MPs paramagnéticas elaboradas con las formulaciones: (a) E2, (b) E3 y (c) E5

Como se observa, en todos los casos se obtuvieron partículas esféricas, no agregadas y con superficie lisa.

5.4.4.3. Estudio de estabilidad de MPs paramagnéticas elaboradas con Ethocel®

Al igual que en el caso de las partículas elaboradas a partir de las formulaciones que contenían Aerosil, se realizó un breve estudio de estabilidad para comprobar si las partículas eran resistentes a las condiciones requeridas durante los procesos de unión de biomoléculas necesarios en sistemas de diagnóstico *multiplex* (ver tabla 34).

El tamaño medio de partícula fue de 6-7 µm de diámetro. Las imágenes de las partículas tras ser sometidas a estas condiciones se recogen en la figura 114 (aumento 100X).

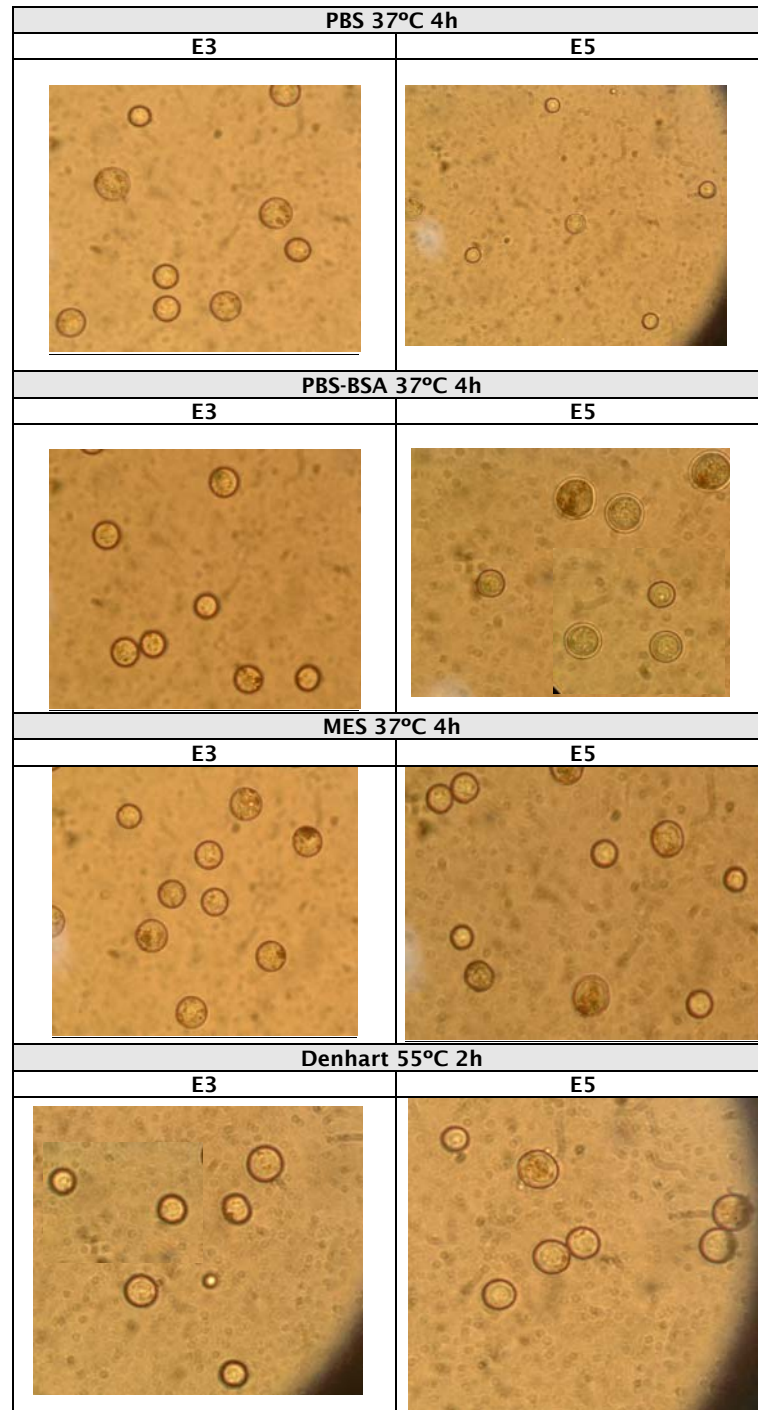


Figura 114. Imágenes de MPs paramagnéticas de 6-7 μm de diámetro (aumento 100X) elaboradas con las formulaciones E3 y E5 tras ser sometidas a distintos medios de incubación a los tiempos y temperaturas indicadas

Como muestran las imágenes del microscopio óptico, en ninguno de los dos casos las micropartículas modificaron su aspecto tras ser sometidas a distintos medios de incubación a las temperaturas y tiempos especificados, por lo que la formulación E3 fue seleccionada para continuar con el estudio.

El siguiente paso, es codificar este tipo de partículas con fluoróforos orgánicos y comprobar su comportamiento en el citómetro de flujo.

5.4.5. Determinación del contenido en hierro

Una vez caracterizadas y seleccionadas aquellas MPs elaboradas con Aerosil y Ethocel que mejor se ajustaron a las necesidades de la aplicación final en cuanto a propiedades granulométricas, comportamiento frente al imán, etc., la caracterización de las micropartículas se completó determinando el contenido en hierro.

Para ello, se empleó un espectrómetro de emisión atómica por plasma (ICP) sometiendo las muestras, previamente liofilizadas, a un proceso de digestión con microondas.

Los resultados del contenido en Fe (tabla 40), se expresan como contenido real en porcentaje peso / peso y como eficacia del proceso de encapsulación, es decir, cantidad de magnetita encapsulada referida a la usada inicialmente.

Formulación	Fe teórico (% p/p)	Fe experimental (% p/p)	Eficacia encapsulación EE (%)
Magnetita	70,91	69,20 ± 2,90	-
A7	4,57	0,605	13,23
A8	4,57	3,09	67,57
A10	4,57	1,61 ± 0,33	35,28 ± 7,22
E2	6,98	1,22	17,48
E3	6,98	1,22 ± 0,50	17,05 ± 7,63
E5	6,86	1,02 ± 0,28	14,86 ± 4,12

Tabla 40. Resultados obtenidos del contenido en Fe para MPs elaboradas a partir de las formulaciones indicadas

Como puede verse, los mejores resultados se obtuvieron para aquellas formulaciones elaboradas con Aerosil® 200 Pharma obteniéndose una eficacia de encapsulación del 35 %. Para las formulaciones elaboradas con Ethocel®, el contenido en hierro fue similar en los tres tipos de formulaciones cuantificadas, presentando una eficacia de encapsulación en torno al 17 %.

A modo de resumen, las suspensiones elaboradas con Ethocel presentaron mayores problemas de estabilidad que las elaboradas con Aerosil, viéndose disminuido el contenido final de magnetita en la partícula. Por otro lado, Ethocel participa en la estructura de la partícula provocando un aumento en el tamaño medio. Esto hace que la combinación de caudales de los fluidos enfocado y enfocante empleada durante la producción tenga que ser reajustada para mantener el tamaño de partícula deseado.

En base a estos resultados, los ensayos de codificación mediante el empleo de fluoróforos orgánicos no fueron llevados a cabo con estas formulaciones.

5.5. CONCLUSIONES

1. Se han puesto a punto diferentes suspensiones de nanopartículas paramagnéticas formuladas en medio orgánico.
2. Las suspensiones elaboradas empleando sílice coloidal (Aerosil 200 Pharma) o etil-celulosa (Ethochel) como agentes estabilizadores permanecieron estables durante al menos 1 hora.
3. En las condiciones ensayadas se ha conseguido producir micropartículas paramagnéticas de tamaño controlado y estrecha distribución de tamaño (D medio $\sim 5\mu\text{m}$ y $\text{CV}<10\%$)
4. Respecto a las características granulométricas, las micropartículas obtenidas presentaron forma esférica y superficie lisa y siendo además estables en las condiciones de pH, temperatura y tiempo necesarias para realizar ensayos de unión e hibridación.
5. Considerando la influencia del tipo de estabilizante empleado, las micropartículas elaboradas con Aerosil 200 Pharma (formulación A10), presentaron un comportamiento óptimo frente a un campo magnético externo, siendo su comportamiento comparable a micropartículas paramagnéticas comerciales (Dynabeads®). Las micropartículas elaboradas con Ethocel (formulación E3), presentaron una menor atracción por los imanes comerciales que las elaboradas a partir de la formulación A10
6. Micropartículas elaboradas con la formulación A10, presentaron un contenido en Fe del $1,61 \pm 0,33 \%$ con una eficacia de encapsulación del $35,28 \pm 7,22 \%$
7. Las micropartículas elaboradas con la formulación A10 fueron codificadas con Rodamina B. Su codificación con Fluoresceína o Nile Blue no fue posible debido a interacciones entre estos fluoróforos y el Aerosil.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el presente trabajo de investigación se ha puesto de manifiesto la utilidad de la tecnología Flow Focusing como herramienta para la producción de micropartículas sólidas poliméricas con distintas aplicaciones.

Se trata del primer trabajo de investigación donde se ha empleado esta tecnología, desarrollada en los años 90, para la producción tanto de micropartículas biodegradables con aplicación en el campo de la industria farmacéutica como de micropartículas no biodegradables con aplicaciones en biomedicina.

Para ello, la tecnología se empleó en dos configuraciones distintas, adaptándola en cada caso a los actuales métodos y/o técnicas de microencapsulación.

FF en una configuración gas-líquido

1. Utilizando FF en una configuración gas-líquido y adaptándola al método tradicional de microencapsulación de *spray drying*, se han producido micropartículas de PLGA conteniendo un antibiótico altamente hidrosoluble, sulfato de gentamicina, para su liberación de forma sostenida, controlando tanto el tamaño de partícula (diámetros de partícula en el rango de 5-25 μm y CV < 25%) como la estructura interna de la micropartícula (matriz homogénea o cápsula).
2. Se obtuvieron porcentajes de atrapamiento de fármaco en la partícula por encima del 10%, el resultado superior publicado hasta la fecha.
3. Para su cuantificación se empleó una técnica directa, el análisis elemental, presentándose como alternativa real a las técnicas indirectas empleadas hasta el momento, y sobresaliendo la precisión cuantitativa de aquella.
4. La actividad del fármaco, una vez encapsulado, no se vio afectada ni por el proceso de atomización ni por el de secado. La actividad antimicrobiana, una vez encapsulado, se comprobó *in vitro*.
5. Debido a que la producción de las micropartículas ocurre en condiciones muy suaves, la tecnología FF se confirma como una alternativa para la microencapsulación de compuestos lábiles en esta configuración.

FF en una configuración líquido-líquido

El grueso del trabajo experimental del presente trabajo de investigación, se ha realizado utilizando la tecnología FF en una configuración líquido-líquido. Esto ha supuesto una gran novedad dentro del grupo de investigación del Prof. Gañan, centrado básicamente en configuraciones donde intervine un gas (gas-líquido / líquido-gas).

En este caso, la tecnología se adaptó al método de microencapsulación de extracción- evaporación de disolvente. A continuación, se exponen las principales aportaciones de este trabajo en este campo:

1. Se han establecido las características geométricas de un nebulizador FF simple para la producción de micropartículas poliméricas monodispersas.
2. Se han establecido las condiciones de concentración de polímero y caudales de líquido para la producción de las micropartículas, fijándose unas condiciones de caudal mínimo para el fluido enfocado.
3. Se han identificado los valores de los principales números adimensionales en un proceso de atomización ($6 < We < 50$, $Re < 650$ y $Oh \ll 1$) en los que se obtuvieron partículas monodispersas.
4. Se obtuvieron micropartículas menores de 25 micras de diámetro de forma controlada con una estrecha distribución de tamaño ($CV < 10\%$). Es necesario destacar aquí que la homogeneidad conseguida en los sistemas líquido-líquido estudiados ha resultado muy superior a la que se consigue en sistemas enfocados por gas usando los mismos dispositivos. La razón física parece recaer en la baja o nula diferencia de velocidades que se produce entre las fases líquidas (enfocante-enfocado), contrariamente a la gran diferencia de velocidades que ocurre entre enfocante y enfocado en sistemas gas-líquido.
5. Se ha llevado a cabo el desarrollo completo de un nuevo procedimiento de encapsulación de fluoróforos en partículas poliméricas presentando una estructura interna homogénea.
6. Mediante la adecuada selección de polímeros, se han obtenido partículas con una superficie reactiva apta para la unión de biomoléculas de forma estable mediante enlaces covalentes.
7. El proceso completo, producción de micropartículas y unión de biomoléculas, ha sido validado mediante ensayos de hibridación e inmunoensayos, presentándose la

tecnología FF como una alternativa, viable, sencilla, rápida y de bajo coste para la producción de micropartículas para su uso en sistemas *multiplex*.

8. Actualmente, gracias en buena parte al trabajo realizado en esta tesis, el proceso de microencapsulación de fluoróforos se encuentra totalmente estandarizado, lo que ha permitido la elaboración de protocolos detallados de producción para uso interno de Ingeniatics Tecnologías S.L..
9. Esto ha permitido llegar a un acuerdo comercial con la empresa sevillana de biotecnología Biomedal S. L. (www.biomedal.es) para la distribución de los diferentes tipos de partículas desarrollados bajo el nombre comercial de FLOWBeads®.
10. Gracias a la difusión de los resultados obtenidos en el presente trabajo, distintas empresas y centros de investigación, han mostrado su interés en por este tipo de partículas, no sólo como herramienta en sistemas de diagnóstico. Por ejemplo, en formato de partículas paramagnéticas, pueden emplearse como inmunobiosensores para la detección de diferentes sustancias, partículas fluorescentes de superficie no reactiva empleadas en la mejora de técnicas de láser confocal combinadas con técnicas de fluorescencia, etc.

FUTURO Y PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Dada la suavidad de esta tecnología, Flow Focusing se trata de un procedimiento de encapsulación óptimo para su utilización con compuestos biológicos lábiles, microorganismos, etc. En esta línea se han realizado ya los primeros trabajos utilizando distintas proteínas y microorganismos probióticos confirmándose que mantienen su viabilidad tras el proceso de microencapsulación.

En la actualidad existen distintos proyectos y acuerdos entre el grupo de investigación del Prof. Gañan, Ingeniatics Tecnologías y otras compañías para el desarrollo de nuevos procesos de microencapsulación tanto de microorganismos como de células.

En cuanto a la producción de micropartículas para ensayos *multiplex*, actualmente Ingeniatics Tecnologías está optimizando el proceso de producción de los diferentes tipos de micropartículas comercializadas bajo el nombre FlowBeads® con objeto de obtener el mayor número posible de partículas discriminables en un citómetro de flujo, producirlas masivamente, y cubrir las necesidades del mercado.

Se están llevando a cabo ensayos de estabilidad de las micropartículas a largo plazo para determinar las condiciones óptimas de conservación. Atendiendo a los primeros resultados, la principal novedad y/o ventaja frente a las existentes en el mercado es que permiten la conservación a temperaturas inferiores a 0°C.

En cuanto a las micropartículas con propiedades paramagnéticas, se están optimizando las formulaciones para obtener suspensiones de nanopartículas paramagnéticas estables durante largos periodos de tiempo que aseguren la homogeneidad del producto final. Al mismo tiempo, se están ensayando distintos fluoróforos que sean compatibles con la formulación de la suspensión, y proporcionen propiedades de fluorescencia a la partícula final similares a las que poseen partículas que no contienen material paramagnético.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Almagro Fernández, B., A. M. Gañan-Calvo, A. 2004. Canals. Preliminary characterization and fundamental properties of aerosols generated by a Flow Focusing pneumatic nebulizer. *J Anall Atomic Spectrometry*, **19**(10), 1340-1346
- Anna, S. L., N. Bontoux, H. A. Stone. 2003. Formation of dispersions using “flow Focusing” in microchannels. *Appl Phys Lett* **82**(3), 364-366
- Anna, S. L., H. C. Mayer. 2006. Microscale tipstreaming in a microfluidic flow focusing device. *Phys Fluid* **18**, 121512
- Balaguer Fernández, C., A. Femenía, T. Blat Marco, E. Castillo García y A. López. Castellano. 2006. Formas farmacéuticas liposomales. *Tec Farm* **128**, 48-62
- Barrero, A., A. M. Gañán-Clavo, J. Dávila, a. Palacio, E. Gómez-González. 1998. Low and high Reynolds number flows inside Taylor cones. *Phys Rev E* **58**(6), 7309-7314
- Basaran, O. Small-scale free surface flow with breakup: drop formation and emerging applications. 2002. *AIChE J* **48**(9), 1842-1848
- Blanco-Prieto, M.J., Lecaroz, C., Renedo, M.J., Kunkova, J., Gamazo, C. 2002. In vitro evaluation of gentamicin released from microparticles. *Int. J. Pharm.* **242**, 203-206
- Bodmeier, R., KL Oh, H. Chen. 1989. The effect of addition of low molecular weight poly(DL-lactide) on drug release from poly(DL-lactide) systems. *Int J Pharm* **51**, 1-8, 1989
- Böhmer, M. R., R. Schroeders, J. A. M. Steenbakkers, S. H.P.M. de Winter, P. A. Duineveld, J. Lub, W. P.M. Nijssen, J. A. Pikkemaat, H. R. Stapert 2006. Preparation of monodisperse polymer particles and capsules by ink-jet printing. *Colloids Surfaces A*: **289**, 96–104
- Bot, B.; L. Kosir, E. Knez, M. Kukovic, V. Skerlavaj, A. Skvarc. 1999. Microencapsulation and testing of the agricultural animal repellent, Daphne. *J Microencapsulation* **16**(2) 169-180
- Bradley, M., N. Bruno, B. Vincent. 2005. Distribution of CdSe Quantum Dots within swollen polystyrene microgel particles using confocal microscopy. *Langmuir*, **21**, 2750-2753
- Brown, E. N.; M. R. Kessler, N. R. Sottos, S. R. White. 2003. In situ poly(urea-formaldehyde) microencapsulation of dicyclopentadiene. *J Microencapsulation* **20**(6), 719-730
- Bustami, R. T.; H-K Chan, F. Dehghami, N. R. Foster. 2000. Generation of microparticles of proteins for aerosol delivery using high pressure modified carbon dioxide. *Pharm Research* **17** (11), 1360-1366

- Cellesi, F.; W. Weber, M. Fussenegger, J.A. Hubbell, N. Tirelli. 2004. Towards a fully synthetic substitute of alginate: optimization of a thermal gelation/chemical cross-linking scheme ("tandem" gelation) for the production of beads and liquid-core capsules. *Biotech Bioengineering*, **88**(6), 740-749
- Chan, W. C., D.J Maxwell, X. Gao X., R. E. Bailey, M. S. Han, S. Nie. 2002. Luminiscence quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotech* 13, 40-46
- Charcosset, C; Limayem, I.; Fessi, H. 2004. The membrane emulsification process - a review. *J.Chem Techmol. Biotechnol.*, 79, 209-218
- Cho, J-S, A. Kwon, C-G Cho. 2002. Microencapsulation of octadecane as phase-change material by interfacial polymerisation in an emulsion system. *Colloid Polym Sci* 280, 260-266
- Choi, H. J., T. M. Kwon, M. S. Jhon. 2000. Effects of shear rate and particle concentration on rheological properties of magnetic particle suspensions. *J Mat Sci* 35, 889-894
- Cui, W.; G. Barr, K.M. Faucher, X.-L. Sun, S.A. Safley, C.J. Weber, and E.L. Chaikof A 2004. Membrane-Mimetic Barrier for Islet Encapsulation. *Transplantation Proceedings* 36, 1206-08
- Davidson, M. R., D. J. E. Harvie, J. J. Cooper-White. 2005. Flow Focusing in microchannels. *ANZIAM J* 46, 47-58
- de Vicente, J, G. Bossis, S. Lacis, M. Guyot. 2002. Permeability measurements in cobalt ferrite and carbonyl iron powders and suspensions. *J Magnetism Magnetic Mat* 251, 100-108
- Deasy, P. B.. 1984. Microencapsulation and related drug processes, Volume 20. In *Drugs and the Pharmaceutical Science*. Edited by J. Swarbrick, New York, Basel Marcel Dekker,
- Del Gaudio, P., Paolo Colombo, Gaia Colombo, Paola Russo, Fabio Sonvico. 2005. Mechanisms of formation and disintegration of alginate beads obtained by prilling. *Int J Pharm* **302** (1-2), 1-9
- Dubertret, B., P. Skourides, D. J. Norris, V. Noireaux, A. H. Brivanlou, A. Libchaber. 2002. In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipids micelles. *Science* 298, 1749-1762
- Ekman B y Sjöholm I. 1978. Improved stability of proteins immobilized in microparticles prepared by a modified emulsion polymerization technique. *J Pharm Sci.*, **67**(5):693-696
- Evans, M., C. Sewter, E. Hill. 2003. An encoded particle array tool for multiplex bioassays. *ASSAY Drug Dev Tech* **1**(1-2), 1-9

- Falk, R.; Randolph, T. W.; Meyer, J. D.; Kelly, R. M.; Manning, M. C.. 1997. Controlled release of ionic compounds from poly (L-lactide) microspheres produced by precipitation with a compressed antisolvent. *J Control Release* 44, 77-85
- Falk, R.F., Randolph, T.W. 1998. Process variable implications for residual solvent removal and polymer morphology in the formation of gentamycin-loaded poly(lactide) microparticles. *Pharm Res.* 15, 1233-1237
- Freiberg, S. and X.X. Zhu. 2004. *Int J Pharm.* Polymer microspheres for controlled drug release 282, 1-18
- Friess, W., Schlapp, M., 2002a. Release mechanism from gentamicin loaded poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA) microparticles. *J. Pharm. Sci.* 91, 845-855
- Friess, W., Schlapp, M., 2002b. Modifying the release of gentamicin from microparticles using PLGA blend. *Pharm. Dev. Tech.* 7, 235-248
- Fuja, T. S. Hou y P. Bryant. 2004. A multiplex microsphere bead assay for comparative RNA expression analysis using flow cytometry. *J Biotechnol* 108, 193-205
- Gañán Calvo, A. M., A. Barrero Ripoll. 1998. Producing homogeneous size droplets and sprays in the micron/submicron range by micro suction. *Bull American Phys Society Division of Fluid Dynamics.* Vol. 43, 2082-2082,
- Gañán Calvo, A. M., A. Barrero Ripoll. 1999. A novel pneumatic technique to generate steady capillary microjets. *J Aerosol Sci*, 30(1), 117-125
- Gañán-Calvo, A. M., M. A. Herrada, P. Garstecki. 2006a. Bubbling in unbounded coflowing liquids. *Phys Rev Lett* 96(12), 124504
- Gañán-Calvo, A. , L. Martín-Banderas, R. González-Prieto, A. Rodríguez-Gil, T. Berdún-Álvarez a, A. Cebolla , S. Chávez, M. Flores-Mosquera. 2006b. Straightforward production of encoded microbeads by Flow Focusing: potential applications for biomolecule detection. *Int J Pharm* 324 (1), 19-26
- Gañán-Calvo, A. M., J. M. 2001. Gordillo. Perfectly monodisperse microbubbling by capillary flow focusing. *Phys Rev Lett* 8(27), 274501-1-4
- Gañán-Calvo, A. M., J. M. Fernández, A. Márquez Oliver. 2004. Coarsening of monodisperse wet microfoams *Applied Phys Lett* 84(24), 4989-4991
- Gañán-Calvo, A. M.. 1998a Generation of Steady Liquid Microthreads and micron-sized monodisperse sprays in gas streams. *Phys Rev Lett* 80(2), 285-288
- Gañán-Calvo, A. M.. 2004. Perfectly monodisperse microbubbling by capillary flow focusing: An alternate physical description and universal scaling. *Phys Review E* 69, 027301-3
- Gañán-Calvo, M. y P. Riesco-Chueca. 2006. Jetting-dripping transition of a liquid jet in a lower viscosity co-flowing immiscible liquid: the minimum flow rate in flow focusing. *J Fluid Mech*, 553, 75-84

- Gaponik, N. I. L. Radtchenko, M. R. Gerstenbergger, Y. A. Fedutik, G. B. Sukhorukov, A. L. Rogach. 2003. Labeling biocompatible polymer microcapsules with near-infrared emitting nanocrystal. *Nano Lett* 3(3), 369-372
- Gijs M. A.. 2004. Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications. *Microfluid Nanofluid* 1, 22-40
- Goosen, M. F. A., A. S. AL-Ghafri, O. El Mardi, M. I. J. Al-Belushi, H. A. Al-Hajri, E. S. Mahmoud, E. C. 1997. Consolación. Electrostatic droplet generation for encapsulation of somatic tissue: Assessment of high-voltage power supply. *Biotechnol Prog* 13, 497-502
- Gordillo, J. M., Z. Cheng, A. M. Gañán-Calvo, M. Márquez, D. A. Weitz. 2004. A new device for the generation of microbubbles. *Phys Fluids* 16(8), 2828-2834
- Gotoh, T., H. Honda, N. Shiragami, H. Unno. 1991. Forced break-up of a power-law fluid jet discharged from a orificie. *J Chem Eng Jpn* 24, 799-801
- Guillemot, G., G. Vaca-Medina , H. Martin-Yken , A. Vernhet ,P. Schmitz , M. Mercier-Bonin. 2006. Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae* from stainless steel: Influence of yeast and solid surface properties. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 49, 126-135
- Han, M., X. Gao, J. Z. Su y S. Nie. 2001. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexing optical coding of biomolecules. *Nature Biotech* 19, 631-635
- Hergt, R., W. Andrä, C. G. d´Ambly, I. Hilger, W. A. Kaiser, U. Richter, H-G Schmidt. 1998. Physical limits of hyperthermia using magnetite fine particles. *IEEE Transactions Magnetism* 34(3), 3745-54
- Hinds, W. C. 1982. Particle size statistic. En: *Aerosol technology. Properties Behaviour and measurement of airborne particles*. Ed. Jhon Wiley and sons, Inc. EE. UU., p. 69-103
- Horák, D., F. Lednicky, E. Petrovsky, A. Kapiřka. 2004. Magnetic characteristics of ferrimagnetic microspheres prepared by dispersion polymerization. *Macromol. Mater. Eng.*, 289, 341-348
- Huang S-H, W-H Tan, F-G Tseng, S. Takeuchi. 2006. A monolithically three-dimensional flow-focusing device for formation of single/double emulsions in close/open microfluidic systems. *J Micromech Microeng* 16, 2336-2344
- Iglesias, G. Estabilidad de suspensiones magnéticas concentradas. Universidad de Granada. (archivo online) [3 páginas] Disponible en URL: http://www.ugr.es/~mtaf/documentos/trabajos_investigacion/Ramon%20Iglesias,%20Guillermo_trabajo.pdf, junio, 2007
- Ivanova, E. P., M. Papiernik, A. Oliveira, I.g Sbarski, T. Smekal, P. Grodzinski, D. V. Nicolau. 2002. Fesability of using carboxylic-rich polymeric surfaces for the

- covalent binding of oligonucleotides for microPCR applications. *Smart Mater Struct* 11, 783-791
- Jain, R. A.. 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21(23) 2475-90
- Kennedy JP, Niebergall PJ. 1996. Development and optimization of a solid dispersion hot-melt fluid bed coating method. *Pharm Dev Techno*, 1(1):51-62
- Kim, C. A.; M. J. Joung, S. D. Ahn, G. H. Kim, S-Y Kang, I-K You, J Oh, H J Myoung, K. H. Baek, K. S. Suh. 2005. Microcapsules as an electronic ink to fabricate color electrophoretic displays. *Synthetic Metals* 151, 181-185
- Kim, K. y R. J. Tumbull. 1976. Generation of charged drops of insulating liquids by electrstatic spraying. *J Applied Phys* 47 (5), 1964-69
- Kingsmore, S. F.. 2006. Multiplexed protein measurement: technologies and applications of protein and antibody arrays. *Nature Rev Drug Discovery*, 101038, 1-11
- Knezevic Z, Gosak D, Hraste M, Jalsenjak I. 1998. Fluid-bed microencapsulation of ascorbic acid. *J Microencapsul.*, Mar-Apr;15(2):237-52
- Kondo, A.. *Microcapsule processing and technology*. Ed Marcel Dekker, Inc. New York, 1979 (1979)
- Kwok, K. K. y cols. 1991 Production of 5-15 μm diameter alginate-polylysine microcapsules by air-atomization technique. *Pharm Res* 8(3) 341-344
- Lange, J., R. Kötitz, A. Haller, L. Trahms, W. Semmler, W. Weitschies. 2002. Magnetorelaxometry-a new binding specific detection method based on magnetic nanoparticles. *J Magnetism Magnetic Mat*, 252, 381-383
- Larson D. R., W. R. Zipfel, R. M. Williams, S. W. Clark, M. P. Bruchez, F. W. Wise, W. W. Webb. 2003. Water-Soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science* 300, 1434-1436
- Lee, H. Y.; S. J. Lee, I. W. Cheong, J. H. Kim. 2002. Microencapsulation of fragrant oil via *in situ* polymerisation: effects of pH and melamine-formaldehyde molar ratio. *J Microencapsulation* 19(5), 559-569
- Lelu, S., C. Novat, C. Graillat, A. Guyot, E. Bourgeat-Lami. 2003. Encapsulation of an organic phthalocyanine blue pigment into polystyrene latex particles using a miniemulsion polymerization process. *Polym Int* 52, 542-547
- Li, W-I, K. W. Anderson, P. P. DeLuca. 1995a. Kinetic and thermodynamic modeling of the formation of polymeric microspheres using solvent extraction/evaporation method. *J Control Release* 37, 187-198

- Li, W-I, K. W. Anderson, R. C. Mehta, P. P. DeLuca. 1995b. Prediction of solvent removal profile and effect on properties for peptide-loaded PLGA microspheres prepared by solvent extraction/evaporation method. *J Control Release* 37, 199-214
- Liggins, R. T. y H. M. Burt. 2004. Paclitaxel loaded poly(L- lactic acid) (PLLA) microspheres II. Effect of processing parameters on microsphere morphology and drug release. *Int J Pharm* 281, 103-106
- Liu, K., H-J Ding, J. Liu, Y. Chen, X-Z Zhao. 2006. Shape-controlled production of biodegradable calcium alginate gel microparticles using a novel microfluidic device. *Langmuir* 22 9453-57
- López-López, M. T., P. Kuzhir, S. Lacis, G. Bossis, A. V. Delgado, F. González-Caballero, J. D. G. Durán. 2006. Magnethoreology for suspensions of solid particles dispersed in ferrofluidos. *J Phys: Condes Matter* 18, S2803-S2813
- López-López, M. T., J. D. G. Durán, A. V. Delgado, F. González-Caballero. 2005. Stability and magnetic characterization of oleato-covered magnetite ferrofluidos in different non polar carriers. *J Colloid Interface Sci* 291, 144-151
- Lorceau, E., Y. Y. Cheung Sang, R. Höhler, S. Cohen-Addad. 2006. A high rate flow-focusing foam generator. *Phys Fluids*, 18(9), 097103-097103-5
- Lorceau, E., Y. Y. Sang, R. Oler, S. Cohen-Addad. 2006. A high rate flow focusing foam generator. *Phys fluid* 18(9) 097103-11
- Ma, G.; H. Sone, S. Omi. 2004. Preparation of uniform-size polystyrene-polyacrylamide composite microspheres from w/o/w emulsion membrane emulsification technique and subsequent suspension polymerization. *Macromolecules*, 37, 2954-2964
- Maa YF, Hsu C. 1996. Liquid-liquid emulsification by static mixers for use in microencapsulation. *J Microencapsulation* 13 (4): 419-433
- Maguire, T.; E. Novik, R. Schloss, M. Yarmush. 2006. Alginate-PLL microencapsulation: effect on the differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes. *Biotech Bioengineering*, 93(3), 581-591
- Martín, T. M; Bandi, N.; Shulz, R.; Roberts, C. B. y Kompella, U. B.. 2002. Preparation of budesonide and budesonide-PLA microparticles using supercritical fluid precipitation technology. *AAPS Pharm Sci Tech*, 3 (3) 1-11
- Martín-Banderas, L., M. Flores-Mosquera, M. Fernández-Arévalo, A. Iruín, A. Cebolla Ramírez, A. Gañan-Calvo. 2005b. Production of monodisperse gentamicyn Sulphate-PLGA microparticles with internal controlled structure using flow focusing technology.. XVth Intational Symposium on Microencapsulation, International Microencapsulation Society. Parma, Italia. Universita di Parma.. Pag. 251-252
- Martín-Banderas, L., M. Flores-Mosquera, P. Riesco, A. Rodriguez-Gil, A. Cebolla, S. Chávez de Diego, A. Gañan-Calvo. 2005a. Flow Focusing: a Versatile Technology to

- Produce Size-Controlled and Specific-Morphology Microparticles. *Small*. **1** (7), 688-692
- McDonald, C. J. Y Devon, M. J. 2002. Hollow latex particles: synthesis and applications. *Adv Colloid Interfaces Sci* 99, 181-213
- Meyer, J., Falk, R.F., Kelly, R.M., Shively, J.E., Withrow, S.J., Dernel, W.S. Kroll, D.J., Randolph, T.W., Manning, M.C. 1998. Preparation and in vitro characterization of gentamicin-impregnated biodegradable beads suitable for treatment of osteomyelitis. *J. Pharm. Sci.* 87, 1149-1154
- Michalet X., F. F. Pinaud, L. A. Bentolila, J. M. Tsay, S. Doose, J. J. Li, G. Sundaresan, A. M. Wu. S. S. Gambhir, S. Weiss. 2005. Quantum dots for live cells in vivo imaging and diagnostics. *Science* 307, 538-544
- Mulvaney, S. P., H. Mattsoussi, L. J. Whitman. 2004. Incorporating fluorescent dyes and quantum dots into magnetic microbeads for immunoassays. *BioTech* 36, 602-609
- Mulvaney, S.P., H. M. Mattoussi, L. J. 2004. Whitman. Incorporating fluorescent dyes and quantum dots into magnetic microbeads for immunoassays. *Biotech* 36(4), 602-609
- Nagai, K., M. Nakajima, T. Norimatsu, Y. Izawa, T. Yamanaka. 2000. Solvent removal during curing process of highly spheric and monodispersed-sized polystyrene capsules from density-matched emulsions composed of water and benzene/1,2-dichloroethane. *J Pol Sci A*, 38, 3412-3418
- Nedović, V. A., B. Obradović, I. Leskošek-Čukalović, O. Trifunović, R. Pešić, B. Bugarski. 2001. Electrostatic generation of alginate microbeads loaded with brewing yeast. *Procc Biochem* 37, 17-22
- Nelson G.. 2002. Application of microencapsulation in textiles. *Int J Pharm* 242,55-62
- Neut, D., Belt, H., Horn, J.R., Mei, H.C., Busscher, H.J. 2003. Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation. *Biomaterials* 24, 1829-1831
- O'Brien, P., S. S. Cummins, D. Darcy, A. Dearden, O. Masala, N. L. Pickett, S. Ryley, A. J. Sutherland. 2003. Quantum dot-labeled polymer beads by suspension polymerization. *Chem Commun*, 2532-2533
- Omi, S. Preparation of monodisperse microspheres using the Shirasu porous glass emulsification technique. 1996. *Colloids Surfaces A*, 109, 97-107
- Omi, S., A. Kanetaka, Y. Shimamori, A. Supsakulchai, M. Nagai, G.-H. Ma. 2001. Magnetite (Fe₃O₄) microcapsules prepared using a glass membrane and solvent removal. *J. Microencapsulation*, , **18**(6), 749-765
- Orive G., Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Pedraz JL. 2003. Survival of different cell lines in alginate-agarose microcapsules. *Eur J Pharm Sci.* 18: 23-30

- Orive G., Ponce S., Hernández R.M., Gascón A.R., Igartua M., Pedraz JL. 2002. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials* 23, 3825-3831
- Palomo M.E., M.P. Ballesteros, P. Frutos. 1997. *Tecnología Farmacéutica. Procedimientos de microencapsulación (II) Microencapsulación mediante procesos físico-químicos* may/jun pp 59-65
- Pereira, T.; T. J. Millar y J-A Chuck. 2005. Viability analysis of alginate encapsulated micro-organisms using fluorescent stains. *J Microencapsulation*, 22(7): 787-792
- Poncelet, D. Microencapsulation?. (archivo online) [30 pantallas]. Disponible en URL: <http://nanoparticles.org/pdf/Poncelet-Microencapsulation.pdf>, marzo 2007
- Poncelet, D., V. G. Babak, R. J. Neufeld, M. F. A. Goosen, B. Burgarski. 1999. Theory of electrostatic dispersion of polymer solutions in the production of microgel beads containing biocatalyst. *Adv Colloid Interface Sci* 79, 213-228
- Poncelet, D.; V. Babak, D. V. ;Dulieu, C.; Picot, A. 1999. A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. *Colloids and Surface A*, 155:171-76
- Prior, S., Gamazo, C., Irache, J.M., Merkle, H.P., Gander, B. 2000. Gentamicin encapsulation in PLA:PLGA microspheres in view of treating Brucella infections. *Int. J. Pharm.* 196, 115-125
- Prior, S., Gander, B., Blarer, N., Merkle, H.P., Subirá, M.L., Irache, J.M., Gamazo, C. 2002. In vitro phagocytosis and monocyte-macrophage activation with poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Eur. J. Pharm. Sci.* 15, 197-207.
- Quevedo, E., J. Steinbacher y D. T. McQuade. 2005. Interfacial polymerization within a simplified microfluidic device: capturing capsules. *J Am Chem Soc* 127, 10498-99,
- Ramos Picos D; Gómez Carril M; Fernández Mena D. 2001. Métodos de obtención de microesferas biodegradables. *Rev Cubana Farm* 35(2) 126-35
- Rayleigh L. 1879. On the instability of jets. *Proc. London Math Soc* 10, 4-13
- Reverchon, E.. 1999. Supercritical antisolvent precipitation of micro- and nanoparticles. *J Supercritical Fluid* 15, 1-21
- Rogach, A. L., N. A. Kotov, D. S. Koktysh, A. S. Susha, F. Caruso. 2002. II-IV semiconductor nanocrystals in thin films and colloidal crystals. *Coll Surf A*, 135-144,
- Rosca, I. D., F. Watari, M Uo. 2004. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *J Control Release* 99, 271-280
- Rudershausen, S., C. Grüttner, M. Frank, J. Teller, F. Westphal. 2002. Multifunctional superparamagnetic nanoparticles for life science applications. *European Cell Mat* 3(2), 81-83

- Rudge, S. R., T. L. Kurtz, C.R. Vessely, L. G. Catterall, D. L. Williamson. 2000. Preparation, characterization and performance of magnetic iron-carbon composite microparticles for chemotherapy. *Biomaterials* 21, 1411-1420
- Sah, H.. 1997. Microencapsulation techniques using ethyl acetate as dispersed solvent: effects of its extraction rate on the characteristics of PLGA microspheres. *J Cont Release* 47, 233-245
- Sakai, S. I. Hashimoto, K. Kawakami. 2006. Usefulness of flow focusing technology for producing subsieve-size cell enclosing capsules: Application for agarose capsules production. *Biochem Eng J* 30, 218-221
- Scher, H. B.; Rodson, M.; Lee, K-S. 1998. Microencapsulation of pesticides by interfacial polymerisation utilizing isocyanate or aminoplast chemistry. *Pest Sci* 54 394-400
- Senuma, Y., C. Lowe, Y. Zweifel, J. G. Hilborn, I. Marison. 2000. Alginate hydrogel microspheres and microcapsules prepared by spinning disk atomization. *Biotechnol Bioeng* 67(5), 616-622
- Shang, H., W-S Chang, S. Kan, S. A. Majetich, G. U. Lee. 2006. Synthesis and characterization of paramagnetic microparticles through emulsion-templated free radical polymerization. *Langmuir*, 22, 2516-2522
- Sirignano, W.A. y C. Mehring. 2000. Review of theory of distortion and desintegration of liquid streams. *Prog Energy Combustion Sci* 26, 609-655
- Soppimath, K. S. ; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E.. 2001. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 70, 1-20,
- Takeuchi, S., P. Garstecki, D. B. Weibel, G. M. Whitesides. 2005. An asymmetric flow-focusing microfluidic device. *Adv Mater* 17 (8), 1067-1072
- Tartaj, P. M. Del Puerto Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. González-Carreño, C. J. Serna. 2003. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D* 36, R182-R197,
- Taylor, G. I. 1964. *Proc R Soc A*, 280, 383,
- The index Merck edición 20, pp 2199, 3806, 6142, 2002
- Utada, A. S., E. Lorenceau, D. R. Link, P. D. Kaplan, H. A. Stone, D. A. Weitz. 2005. Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device. *Science* 308, 537 - 541
- Vignali , D. A. A.. 2000. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immuno Methods* 243, 243-255
- Vila Jato, Capítulo 4. Sistemas dispersos heterogéneos. Suspensiones, pp 299-316 en *Tecnología Farmacéutica vol. I Formas Farmacéuticas*. Madrid, Síntesis, 1997

- Viota, J. L., J de Vicente, J. D. G. Durán, A. V. Delgado. 2005. Stabilization of magnetorheological suspensions by polyacrylic acid polymers. *J Colloid Interface Sci* 28, 527-541
- Vladislavljevic, G. T. y Williams, R. A.. 2005. Recent developments in manufacturing emulsions and particulate products using membranes. *Adv Colloids Interface Sci* 113, 1-20
- Wang, G., Liu, S-J., Ueng, S., Chan, E-C. 2004. The release of cefazolin and gentamicin from biodegradable PLA/PGA beads. *Int. J. Pharm.* 273, 203-212.
- Wang, J. y S. P. Scwendeman. 1998. Mechanisms of solvent evaporation encapsulation processes: prediction of solvent evaporation rate. *J Pharm Sci* 88 (10), 1090-1099
- Wang, J., G. Liu, G. Rivas. 2003. Encoded beads for electrochemical identification. *Anal Chem*, 75, 4667-4671
- Wang, W.; X. Liu, Y. Xie, H. Zhang, W. Yu, Y. Xiong, W. Xie y X. Ma. 2006. Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. *J Mater Chem*, 16, 3252-3267
- Wang, F-J. y C-H Wang. 2002. Sustained release of etanidazole from spray dried microspheres prepared by non-halogenated solvents. *J Cont Release* 81, 263-280
- Wilson, R., A. R. Cossins, D. G. Spiller. 2006. Encoded microcarriers for high-throughput multiplexed detection. *Ang Chem Int Ed* 45, 6104-6117
- Wischke, C., H.-H. Borchert. 2006. Influence of the primary emulsification procedure on the characteristics of small protein-loaded PLGA microparticles for antigen delivery. *J Microencapsulation*, 23(4): 435-448
- Xu, S., Z. Nie, M. Seo, P. Lewis, E. Kumacheva, H. A. Stone, P. Garstecki, D. B. Weibel, I. Gitlin y G. M. Whitesides. 2005. Generation of monodisperse particles by using microfluidics: control over size, shape and composition. *Ang Chem Int* 44, 724-728
- Yang, W., D. Trau, R. Renneberg, N. T. Yu, F. Caruso. 2001. Layer-by-layer construction of novel biofunctional fluorescent microparticles for immunoassay applications. *J Colloid Interface Sci* 234, 356-362
- Ye, S., C. Wang, X. Liu, Z. Tong. 2005. Deposition temperature effect on release rate of indomethacin microcrystals from microcapsules of layer-by-layer assembled chitosan and alginate multilayer films. *J Control Release* 106, 319-328
- Yeo Y., O. A. Bassaran, K. Park. 2003. A new process for making reservoir-type microcapsules using inkjet technology and interfacial phase separation. *J Control Release* 93, 161-173
- Yobas, L., S. Martens, W-L Ong N. Ranganathan. 2004. High-performance flow - focusing for spontaneous generation of monodisperse droplets. *Lab Chip* 6, 1073-1079

- Yoshizawa, H. 2004. Trends in microencapsulation research. *KONA* 22, 23-31
- Zhang, J., N. Coombs, E. Kumacheva, Y. Lin, E. H. Sargent. 2002. A new approach to hybrid nanocomposite materials with periodic structures. *J Am. Chem. Soc.* **124**, (49), 14512- 14513
- Zhang, SQ; Zhu, YH; Yang, XL; et al. 2005. Fabrication of core-shell latex spheres with CdS/polyelectrolyte composite multilayers. *Surf A: Phys Eng As*, **264** (1-3), 215-218

URLs

<http://pubs.acs.org/subscribe/journals/tcaw/11/i02/html/02regs.html>, enero 2007

<http://www.bdbiosciences.com/spectra/>, enero 2007

<http://www.biomedal.es>, junio 2007

<http://www.sono-tek.com>, enero 2007

<http://www.nisco.ch>, enero 2007

<http://www.pctincusa.com>, enero 2007

<http://www.gate2tech.com>, enero 2007

<http://www.invitrogen.com>, marzo 2007

<http://en.wikipedia.org/wiki/Fluoresce>, junio 2007)

NOMENCLATURA

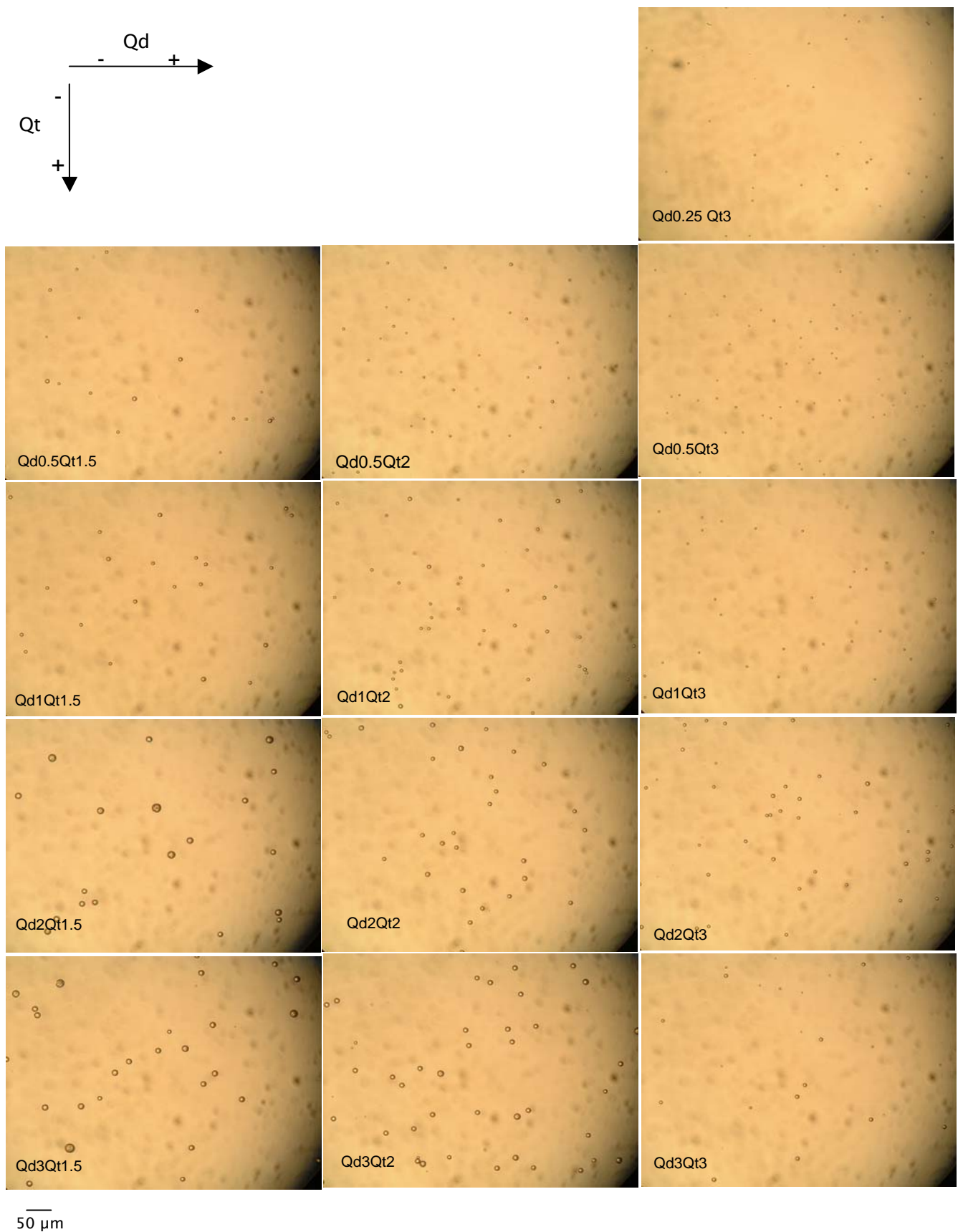
NOMENCLATURA

ρ	densidad (Kg/m ³)
σ	tensión superficial (mN/m)
μ	viscosidad (cP)
λ	longitud de onda (nm)
AC	ángulo de contacto
Bo	número de Bond
BP	<i>band pass filter</i>
CHL	cloroformo
CV(%)	porcentaje coeficiente variación
Δ	coeficiente difusión (m ² /s)
D	diámetro del orificio de salida (μm)
D ₀	diámetro interno del tubo capilar (μm)
DCM	diclorometano
DE	desviación estándar (μm)
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
EA	acetato de etilo
FF	Flow Focusing
Flu	fluoresceinamina isómero I
FSD	<i>forward scatter detector</i>
GSD	<i>geometrical standard deviation</i>
H	distancia entre el tubo capilar y el orificio de salida, altura (μm)
HPMC	hidroxipropilmetil celulosa
ICP	<i>acoplamiento de plasma inductivo</i>
LD ₅₀	dosis letal 50 (g/Kg)
LP	<i>long pass filter</i>
MBA	<i>multiplex bead assays</i>
MPs	micropartículas
NB	azul nilo, Nile blue
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Oh	número de Ohnesorge
p.a.	principio activo
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	polietilenglicol

PLGA	<i>poly-d, l-lactide-co-glycolide acid</i>
PMDS	polidimetilsiloxano
PS	poliestireno
PSM	poliestireno maleico
PVA	alcohol polivinílico
Q_d	caudal fluido enfocado, fase orgánica (mL/h)
QD	<i>quantum dot</i>
Q_t	caudal fluido enfocante, fase acuosa (mL/min)
Re	número de Reynolds
RhB	rodamina B
SEM	<i>scanning electron microscopy</i>
SG	sulfato de gentamicina
SLS	<i>sodium lauryl sulfate</i> , lauril sulfato sódico
SSD	<i>side scatter detector</i>
Tg	temperatura de transición vítrea (°C)
We	número de Weber
r.p.m.	revoluciones por minuto

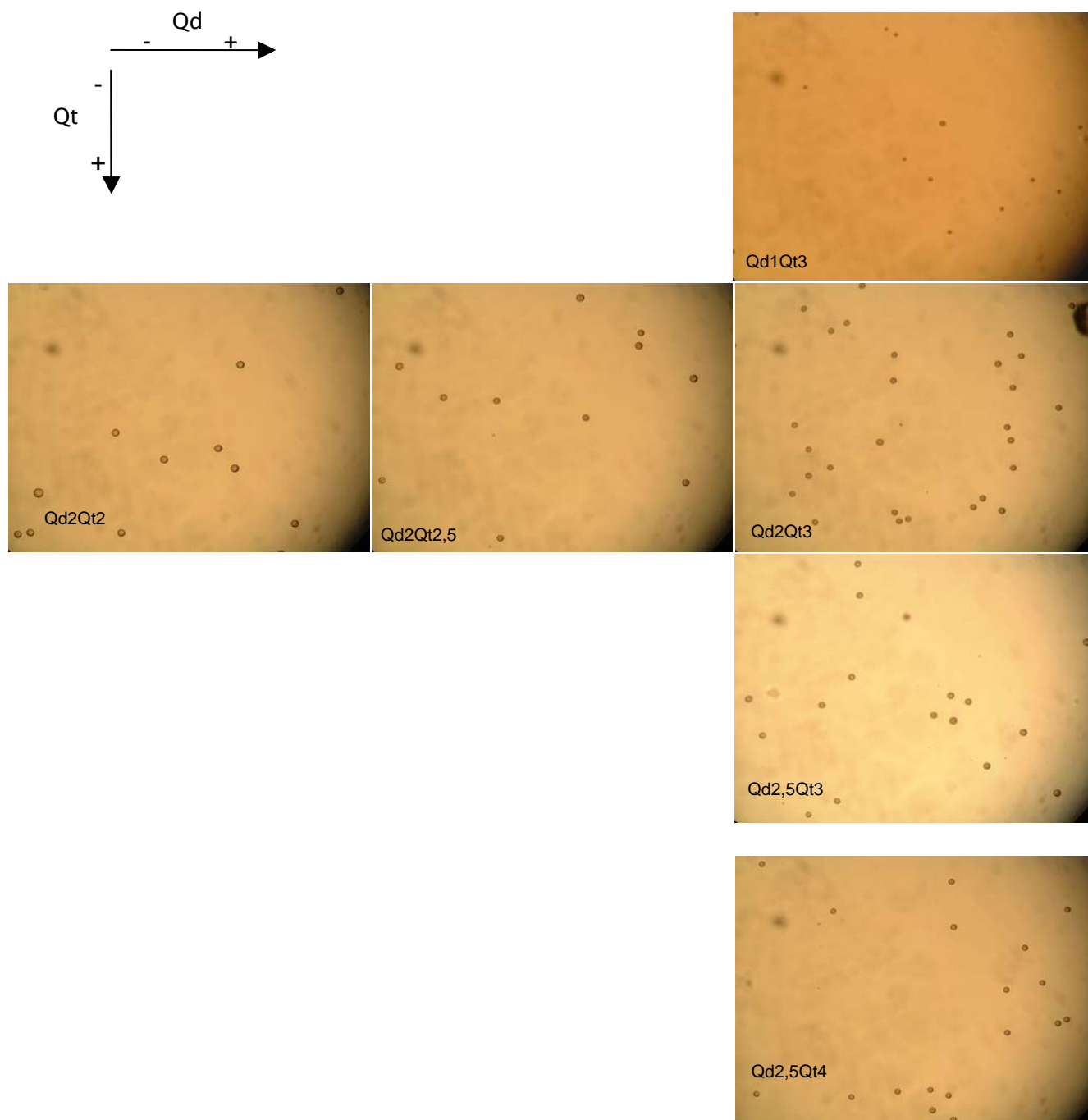
ANEXO I

Imágenes del microscopio óptico de MPs elaboradas a partir de una solución de PS al 4% p/v (D 100 μm) en función del caudal de los fluidos enfocadao (Qd) y enfocante (Qt):



ANEXO II

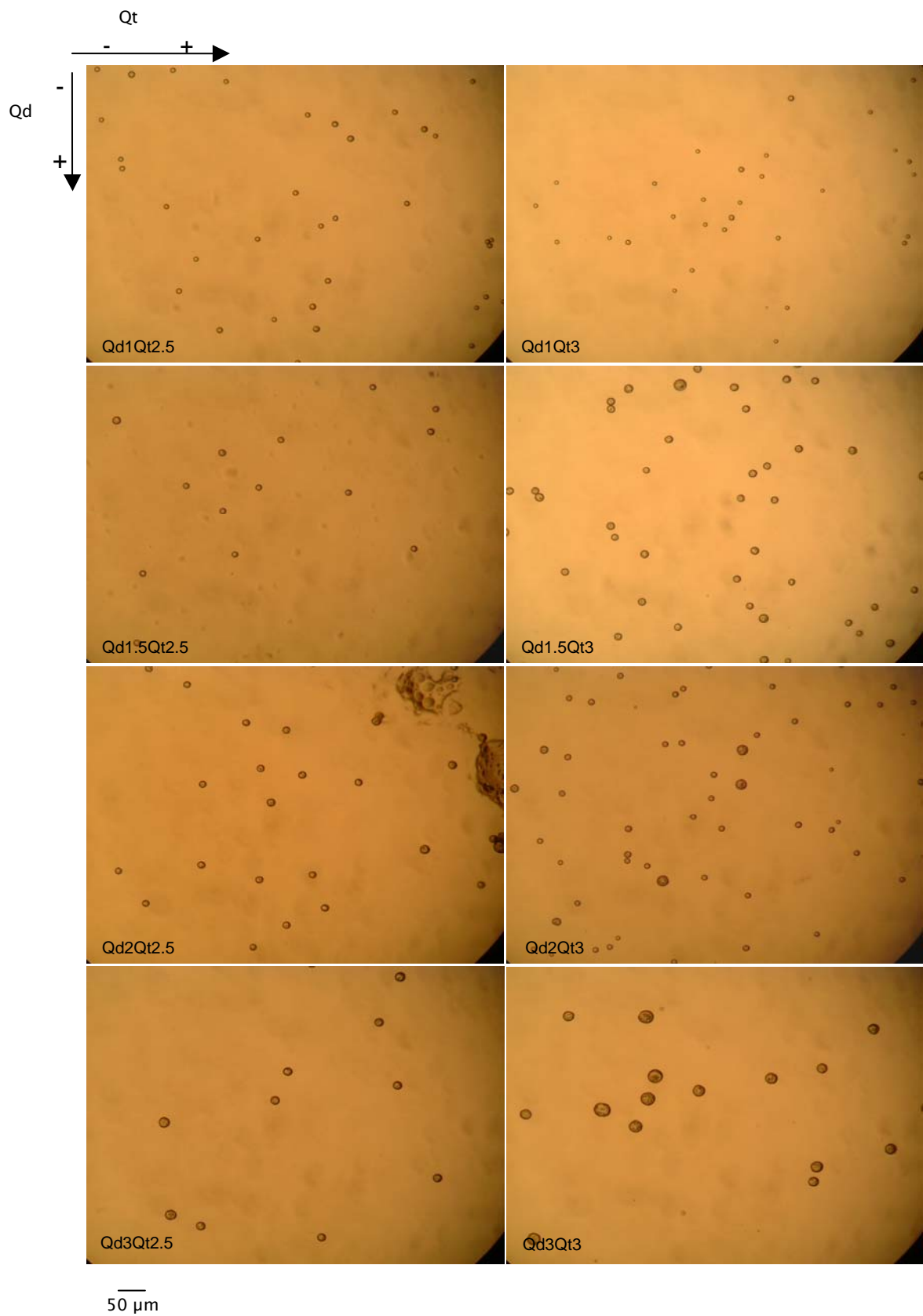
Imágenes del microscopio óptico de MPs elaboradas a partir de una solución de PS al 4% p/v (D 150 μm) en función del caudal de los fluidos enfocadao (Qd) y enfocante (Qt):



50 μm

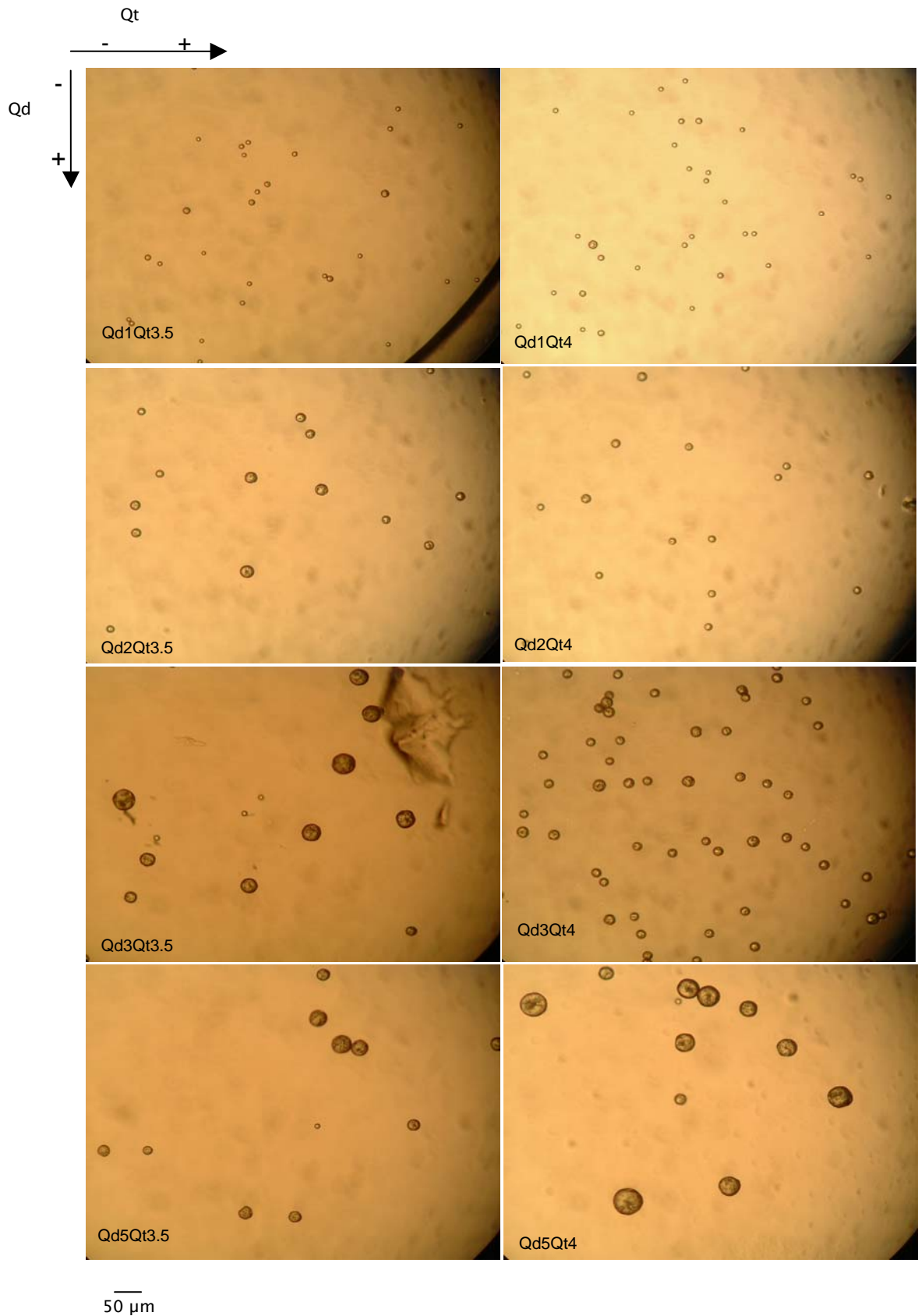
ANEXO III

Imágenes del microscopio óptico de MPs elaboradas a partir de una solución de PS al 4% p/v (D 200 μm) en función del caudal de los fluidos enfocadao (Qd) y enfocante (Qt):



ANEXO IV

Imágenes del microscopio óptico de MPs elaboradas a partir de una solución de PS al 4% p/v (D 200 μm) en función del caudal de los fluidos enfocadao (Qd) y enfocante (Qt):



ANEXO V

Relación de lotes producidos de MPs codificadas con fluoróforos:

		Fluoróforo	Conc. (mM)	Disolvente	Dm (um)	DE (µm)	CV (%)	GSD
SIMPLES	FLUORES-CEINA	1	EA	5,64	0,64	11,38	1,12	
		0,7	EA	5,35	0,57	10,60	1,12	
		0,4	EA	5,58	0,48	8,59	1,10	
		0,1	EA	5,32	0,69	13,04	1,13	
		0,08	EA	5,58	0,65	11,70	1,12	
		0,05	EA	5,22	0,44	8,42	1,09	
		0,01	EA	5,22	0,52	9,99	1,10	
		0,001	EA	5,20	0,56	10,70	1,07	
	NILE BLUE	sat.	EA	5,41	0,45	8,33	1,09	
		0,2	EA	5,21	0,44	8,42	1,09	
		0,09	EA	6,69	0,73	10,85	1,11	
	RODAMINA B	0,6	EA	5,38	0,52	9,65	1,10	
		0,55	EA	5,79	0,76	13,19	1,15	
		0,4	EA	5,82	1,21	20,80	1,24	
		0,4	5EA / 4DCM	5,69	0,72	12,70	1,15	
		0,4	EA / DCM	5,64	0,66	11,67	1,13	
		0,2	EA	5,59	0,52	9,30	1,10	
		0,2	EA / DCM	5,77	0,48	8,30	1,08	
		0,1	EA	5,55	1,05	18,84	1,20	
		0,06	EA	5,46	0,61	11,23	1,11	
		0,05	EA / DCM	5,80	0,61	10,57	1,11	
		0,01	EA / DCM	6,20	0,52	8,39	1,09	
		0,003	EA / DCM	5,39	0,68	12,54	1,14	
		0,006	EA	5,29	0,50	9,45	1,10	
		0,0004	EA	5,04	0,50	9,95	1,01	
	SRQ	0,6	EA	5,98	0,59	9,87	1,10	
	QDs	505nm	1,74182	EA / DCM	5,82	0,56	9,60	1,11
			0,17133	EA / DCM	5,72	0,51	8,90	1,09
		585nm	2,61	EA / DCM	6,41	1,25	19,54	1,23
		590nm	1,74182	EA / DCM	5,57	0,54	9,78	1,11
			0,17133	EA / DCM	5,84	0,56	9,52	1,10
		639nm	1,74182	EA / DCM	5,92	0,44	7,37	1,08
			0,17133	EA / DCM	6,02	0,61	10,10	1,10
MEZCLAS		BINARIAS	NB + R	sat.+0,0004	EA / DCM	5,63	0,37	6,56
	NB + R		sat.+0,004	EA / DCM	5,89	0,36	6,15	1,07
	NB + R		0,177 / 0,177	EA / DCM	5,44	0,49	9,06	1,10
	NB + R		0,2 / 0,01	EA / DCM	5,83	0,61	10,44	1,11
	NB + R		0,2 / 0,003	EA / DCM	5,95	0,55	9,22	1,10
	NB + R		0,177 / 0,177	EA	5,71	0,46	8,06	1,01
	R + F		0,177 / 0,177	EA / DCM	5,70	0,61	10,63	1,11
	R + F		0,20 / 0,20	EA	5,65	0,48	8,50	1,10
	F + NB		0,177 / 0,177	EA	5,38	0,42	7,74	1,08
	F + NB		0,177 / 0,177	EA	4,99	0,46	9,22	1,10
	F + NB		0,2 / 0,01	EA	5,59	0,51	9,12	1,10
	F + NB		0,2 / 0,03	EA	5,93	0,58	9,78	1,10
	F + NB		0,6 / 0,004	EA	5,50	0,38	6,91	1,10
	F + NB		0,6 / 0,0004	EA	4,97	0,34	6,84	1,10
	F + NB	0,177 / 0,177	EA	5,40	0,50	9,26	1,10	
	TERNARIAS	NB + R + F	sat./ 0,0004 / 0,2	EA / DCM / EA	4,77	0,45	9,39	1,10
		NB + R + F	sat./ 0,0004/ 0,4	EA / DCM / EA	5,78	0,33	5,74	1,06
		R + F + NB	0,2 / 0,6 / 0,0004	EA	5,35	0,43	8,04	1,10
R + F + NB		0,4 / 0,6 / 0,0004	EA	5,50	0,38	6,91	1,10	

(R: rodamina B; F: fluoresceína isómero I; NB: nile blue; EA: acetato de etilo; DCM: diclorometano)

INDICIE DE FIGURAS Y TABLAS

INDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Clasificación de las micropartículas en función de su morfología: a) Microcápsula tipo mono-vesicular, b) Microcápsula tipo multi-vesicular, c) Microesfera tipo multi-capas, d) microsfera tipo matriz.....	5
Figura 2. (a) <i>Microarray</i> convencional, posicional o 2D y (b) MBA, virtual o 3D (Wilson y cols., 2006).....	8
Figura 3. Principio de funcionamiento de un MBA (Vignali, 2000)	9
Figura 4. Clasificación de los métodos y técnicas de microencapsulación en función del estado del material a encapsular ((*) <i>spray congealing</i>)	11
Figura 5. Esquema de un equipo de spray drying (www.buchi.com, enero 2007)	15
Figura 6. Esquemas de dos tecnologías de lecho fluido (www.glatt.com, enero 2007): (a) lecho fluido secado, (b) lecho fluido recubrimiento	15
Figura 7. Esquema de la encapsulación de una sustancia hidrosoluble mediante el empleo de liposomas (http://www.cinvestav.mx, 2006)	17
Figura 8. Esquema de funcionamiento de una membrana porosa (Charcosset y cols., 2004)	19
Figura 9. Esquema de un equipo de PCA (Falk y cols. 1997)	20
Figura 10. Equipos empleados para la formación de emulsiones en procesos de microencapsulación: a) equipo de agitación de palas y b) mezclador estático (Poncelet, 2007)	22
Figura 11. Dispositivo de funcionamiento de un equipo de membranas porosas	23
Figura 12. (a) Esquema de la rotura del chorro en pequeñas gotas por imposición de vibración (http://www.gate2tech.com) (b) dispositivo múltiple de Inotech y detalle de la rotura	25
Figura 13. Principio básico de funcionamiento de un "jet cutter"	25
Figura 14. Esquema de funcionamiento de un disco rotatorio (PCT) (http://www.pctincusa.com, 2007)	27
Figura 15. (a) Efecto del aumento de potencial eléctrico en la rotura del chorro y (b) montaje del dispositivo (www.nisco.ch, 2007)	27
Figura 16. Esquema de la configuración básica de un nebulizador FF.....	29
Figura 17. Representación de tres técnicas de inyección de tinta: (a) continua (CIJ), (b) a demanda controlada por temperatura (TIJ) y (c) a demanda controlada por la expansión de una gota de vapor (Basaran, 2002)	30
Figura 18. Esquema de funcionamiento de un sistema de cilindros o "pin tool" para la formación de gotas (Basaran, 2002).....	31

CAPÍTULO 2

Figura 19. Modos de desintegración en función de los números de We y Re (Sirignano y Mehring, 2000)34

Figura 20. Esquema de la configuración básica de un nebulizador FF35

Figura 21. Posibles configuraciones para un nebulizador FF: a) simple gas-líquido, b) simple líquido - líquido y c) concéntrica.....36

Figura 22. Parámetros geométricos para una configuración simple de FF37

Figura 23. (a) Formación del cono y generación del micro-chorro estacionario y (b) Rotura del chorro siguiendo un patrón de rotura axisimétrico (Gañán-Calvo, 1998).....37

Figura 24. Esquema de formación de un chorro de diámetro d_j en un dispositivo FF de diámetro de orificio de salida D38

Figura 25. Patrón de rotura para: (a) $We < 12 - 15$ y (b) $We > We_{cr}$ (Gañán-Calvo, 1998).....43

Figura 26. Dispersión del tamaño de gota para diferentes líquidos en función de Q/Q_0 donde $Q/Q_0 \sim We^2$ (la línea de puntos indica la transición a un régimen turbulento)44

Figura 27. Esquema del dispositivo empleado para la producción de micropartículas de PLGA conteniendo sulfato de gentamicina.....46

Figura 28. Ajuste de tamaños de partícula experimentales de microesferas de PLGA a los tamaños teóricos predichos por FF (barras de error: DE)48

Figura 29. MPs de PLGA conteniendo sulfato de gentamicina obtenidas utilizando un nebulizador simple FF48

Figura 30. Efecto de diferentes controles y microesferas de SG-PLGA en la viabilidad del crecimiento de *E. coli* DH α_5 en placas de LB-agar: (a) 1 mg of PLGA 50:50; (b) disco con 10 μ L tampón fosfato (pH 6.2); (c) disco con 10 μ L de una solución al 6% p/v de SG y (d) 1.4 mg de microesferas de SG-PLGA.....50

Figura 31. (a) Esquema de una plataforma con múltiples nebulizadores FF para la producción masiva de gotas, (b) Imagen de un prototipo compuesto por 55 nebulizadores simples FF en funcionamiento54

Figura 32. Dispositivo FF axisimétrico comercializado por Ingeniatrics Tecnologías S, L, (modelo comercial *Avant*): (a) nebulizador con conectores estándar para la alimentación de los fluidos y (b) detalle de la cámara presurizada y orificio de salida51

Figura 33. Dispositivo FF 2D fabricado en PDMS (Anna y cols., 2003)52

Figura 34. Geometría FF empleada por Sakai y cols. (2006)53

Figura 35. Geometría FF axisimétrica desarrolladas por Lorenceau y cols. (2006) para la generación de burbujas.....54

Figura 36. Dispositivo FF axisimétrico monolítico 3D plano fabricado en resina epoxi (Huang y cols., 2006).....55

Figura 37. Vista planar del dispositivo FF desarrollado por Yobas y cols.(2006).....56

Figura 38. Módulo compuesto por dos dispositivos FF para la generación de partículas con forma controlada.....57

CAPÍTULO 3

Figura 39. Estructura de diferentes tipos de PS empleados: (a) Estireno (monómero); (b) PS-COOH y (c) PSM	59
Figura 40. Imágenes de los dos modelos de nebulizadores FF simples empleados para la producción de MPs: (a) modelo <i>Reid</i> y (b) modelo comercial <i>Avant-2</i>	63
Figura 41. Producción de MPs de poliestireno utilizando un nebulizador FF	65
Figura 42. Esquema de la medición del ángulo de contacto de un líquido sobre una superficie.....	69
Figura 43. Evolución de una gota de la solución de PSM 4% EA con el tiempo sobre una superficie de vidrio a t.a.	69
Figura 44. Resultados de las medidas de los ángulos de contacto (°) obtenidos sobre vidrio para los líquidos señalados (barra error: DE)	70
Figura 45. Esquema del sistema de producción de las MPs	70
Figura 46. Variación del tamaño de partícula en función de D para cada combinación de Q_d/Q_t ensayada	73
Figura 47. Distribución de tamaños de partículas obtenidos para las condiciones señaladas (Q_d mL/h; Q_t mL/min)	74
Figura 48. Influencia de la concentración polimérica en el tamaño de partícula (barra error: DE (μm); Q_d (mL/h); Q_t (mL/min)).....	75
Figura 49. Capilar de sílica afilado empleado para la producción de micropartículas de poliestireno.....	76
Figura 50. Resultados obtenidos en cuanto a tamaño y distribución de tamaño para partículas de PS elaboradas con capilares de sílica o acero inoxidable.....	77
Figura 51. Ajustes entre datos experimentales y valores teóricos para diferentes valores de D y C igual 4% p/v (barras error: DE/d_0)	81
Figura 52. (a) Zonas de desintegración de líquidos en el rango de We frente a Re (Sirignano y Mehring, 2000) y datos experimentales correspondientes a MPs monodispersas en función de D (PS 4% p/v); (b) ampliación de la gráfica marcada en azul	82
Figura 53. Dispersión del tamaño de partícula en función del número de Weber	82
Figura 54. Ajuste de los diámetros teóricos y experimentales obtenidos en función de la concentración del polímero: \blacklozenge 1, \blacklozenge 4, \blacklozenge 6 y \blacklozenge 8% p/v para $D = 100 \mu\text{m}$ (barras de error: DE)	84
Figura 55. Desviación de los valores experimentales respecto a los teóricos en función de la concentración de polímero empleada	84
Figura 56. Esquema del frente de propagación de la perturbación en un chorro.....	86
Figura 57. Distribución tamaños de partícula obtenidos para: (a) $Q_d0.25 Q_t2$ y (b) $Q_d1 Q_t2$ en función de la técnica de medida (DLS (izqda.) y óptico (dcha.)).....	89
Figura 58. Imágenes de SEM de partículas nanométricas obtenidas con un nebulizador con $D = 50 \mu\text{m}$: (a) 770 nm ($Q_d0.05 Q_t3$) y (b) 710 nm ($Q_d0.1 Q_t3$)	90
Figura 59. Efecto del cambio de geometría de la salida del nebulizador para $Q_d0.5 Q_t3$: (a) orificio y (b) tubo capilar.....	91

Figura 60. Imagen de las líneas de flujo del fluido enfocante conteniendo partículas fluorescentes durante la formación del chorro en una configuración líquido-líquido (Anna y Mayer, 2006).....	93
Figura 61. Esquema del proceso de solidificación de las gotas y valores de coeficiente de difusión (D) para las diferentes fases que intervienen ((*) Li y cols., 1995b)	95
Figura 62. Morfología de micropartículas de poliestireno al 4% p/v. Efecto disolvente: DCM (5 μ m: a-c; 15 μ m: g), EA (5 μ m:d-f; 15 μ m: h). Efecto tamaño partícula: 5 μ m (f, i) y 15 μ m (c, j). Efecto hidrofobia: PS-COOH (e) y PSM (f). Efecto peso molecular, PS estándar: PM 200.000 (d) y PM 20.000 (i).....	96
Figura 63. Imagen del estado de MPs elaboradas con PS o mezclas de PS:PSM iso ó sec tras 10 min en medio Denhart a 90°C	98

CAPÍTULO 4

Figura 64 Esquema de codificación basado en la intensidad de la fluorescencia y la longitud de onda (Han y cols., 2001)	101
Figura 65. Fluorescencia emitida por quantum dots de seleniuro de cadmio (CdSe) al exponerlos a la luz ultravioleta (http://en.wikipedia.org/wiki/Fluoresce , 2007).....	103
Figura 66. Estructuras químicas de los fluoróforos orgánicos empleados.....	106
Figura 67. Espectros de excitación y emisión de los fluoróforos orgánicos empleados (excitación a 488 nm)	107
Figura 68. Estructura de los dos tipos de QDs ensayados: (a) CdSe y (b) CdSe/ZnS.....	107
Figura 69. Esquema de un citómetro de flujo (FSD detector de tamaño; SSD detector de forma; BP filtro <i>bandpass</i> ; LP filtro <i>longpass</i>)	110
Figura 70. (a) Distribución tamaños de partículas codificadas con Rodamina comparada con micropartículas blancas para Qd1Qt3. (b) Imagen de SEM de MPs de rodamina 0.06 mM	113
Figura 71. Aspecto de micropartículas codificadas con distintos fluoróforos a diferente concentración de 5 μ m de diámetro comparadas con MPs “blancas” de 5 y 10 μ m de diámetro. (a) Rodamina 0.6 mM; (b) Rodamina 0.06 mM; (c) Fluoresceína 1 mM; (d) Fluoresceína 0.1 mM(e) Nile Blue sat.; (f) Blanca 5 μ m y (g) Blanca 10 μ m.....	114
Figura 72. Diferenciación de MPs fluorescentes en función de: (a) y (b) concentración de fluoróforo; (c) tamaño de partícula y (d) tipo de fluoróforo	115
Figura 73. Imágenes del microscopio confocal para partículas de 5 μ m de diámetro conteniendo: (a); Fluoresceína 1 mM (b) Rodamina 0.6 mM y (c) Nile Blue sat.....	116
Figura 74. Secuencia de imágenes obtenidas mediante microscopía confocal en xyz de micropartículas de Rodamina 0.6 mM de 5 μ m de diámetro	117
Figura 75. Imágenes de microscopía confocal para micropartículas de 5 μ m de diámetro conteniendo QDs de CdSe: (a) 483 nm; (b) 525 nm y (c) 616 nm	118
Figura 76. Imágenes de microscopía confocal para micropartículas de 5 μ m de diámetro conteniendo QDs de CdSe/ZnSe: (a) 505 nm; (b) 587 nm y (c) 634 nm	119
Figura 77. Imagen del microscopio fluorescencia mostrando la presencia de agregados de QDS 558 nm en DCM.....	119

Figura 78. Número de partículas frente a intensidad de fluorescencia en el filtro primario para los distintos fluoróforos en función del tamaño de partícula o la concentración: (a) F 0.2 mM de 2, 5 y 10 μm de diámetro y blanca de 5 μm , (b) R 0.0004 mM para partículas de diámetros 2, 5 y 10 μm , (c) NB 0.2 y 0.6 mM, partículas de 5 μm de diámetro	121
Figura 79. Número de partículas frente a intensidad de fluorescencia en filtros secundarios para MPs conteniendo los distintos fluoróforos empleados (tamaño de partícula : 5 μm de diámetro).....	122
Figura 80. Ejemplo de un diagrama de dispersión generado por el citómetro a partir de un MBA (eje X: intensidad de fluorescencia relativa en FL1; eje Y: intensidad de fluorescencia relativa en FL3)	123
Figura 81. Intensidad de fluorescencia en filtros FL2 y FL3 para MPs conteniendo diferentes cantidades de RhB (<i>settings I</i>)	124
Figura 82. Intensidad de fluorescencia en el filtro FL1 para MPs conteniendo diferentes cantidades de F (<i>settings II</i>).....	125
Figura 83. Intensidad de fluorescencia en el filtro FL3 para MPs conteniendo NB 0.6mM partiendo de disoluciones en: (a) EA y (b) DCM (<i>settings II</i>)	126
Figura 84. Intensidad de fluorescencia en el filtro FL3 para MPs conteniendo NB a diferentes concentraciones partiendo de una disolución de NB en EA:MeOH	127
Figura 85. Intensidad de fluorescencia en el filtro FL3 para MPs conteniendo SRQ 0.6 mM.....	127
Figura 86. Identificación de diferentes poblaciones de MPs codificadas con R, F y NB en función del tamaño de partícula en los filtros FL2/FL1 (<i>settings III</i>)	128
Figura 87. Identificación de diferentes poblaciones de MPs codificadas con R, F y NB en función del tamaño de partícula en los filtros FL3/FL1 (<i>settings III</i>)	129
Figura 88. Identificación de diferentes poblaciones de MPs codificadas con R, F y NB en función del tamaño de partícula en los filtros FL3/FL2 (<i>settings III</i>)	131
Figura 89. Imágenes del microscopio de fluorescencia de MPs de PSM de 5 μm de diámetro con diferentes moléculas fluorescentes unidas covalentemente en superficie: (a) oligonucleótidos, (b) GFP y (c) anticuerpo de ratón IgG	134
Figura 90. Resultados del citómetro de flujo para partículas reactivas conjugadas con un oligo tras ser incubadas con el oligo complementario (en verde) y el oligo no complementario (en rojo).....	132
Figura 91. Resultados del citómetro de flujo para el análisis de especificidad de la unión entre el anticuerpo anti-ratón IgG conjugado con: partículas reactivas conjugadas con un péptido (rojo) y con partículas reactivas conjugadas con el anticuerpo de ratón IgG (en verde) ...	132
 CAPÍTULO 5	
Figura 92. Esquema de aislamiento de una proteína utilizando MPs paramagnéticas (www.invitrogen.com, 2007)	136
Figura 93. Esquema de elaboración de una suspensión de magnetita en medio orgánico.....	143
Figura 94. Modelos de separadores magnéticos empleados.....	144

Figura 95. Variación del aspecto con el tiempo de diferentes suspensiones de magnetita elaboradas en medio acuoso tras sonicar: (a) 0 min y (b) 60 min	146
Figura 96. Aspecto de diferentes suspensiones de magnetita elaboradas en medio orgánico empleando tensioactivos como estabilizantes tras 60 min de sonicar	147
Figura 97. Aspecto de dos suspensiones de magnetita elaboradas con polimetilacrilatos en medio orgánico: (a) tras 30 min de sonicar y (b) Eud. RS PO tras 60 min una vez filtrada	147
Figura 98. Estructura química del ácido oleico.....	148
Figura 99. Aspecto de una suspensión de magnetita tras 40 min en reposo preparada utilizando ácido oleico como estabilizante.....	148
Figura 100. Aspecto de dos suspensiones de magnetita elaboradas con celulosas en medio orgánico tras 60 minutos en reposo: (a) Methocel y (b) Ethocel.....	149
Figura 101. Aspecto de una suspensión de magnetita elaborada con Aerosil en medio orgánico tras 24 horas en reposo	149
Figura 102. Distribución de tamaño de partícula obtenida para MPs paramagnéticas elaboradas con los estabilizantes indicados	150
Figura 103. Imágenes de SEM de MPs paramagnéticas elaboradas con distintos agentes estabilizantes (Qd 1 mL/h Qt 3 mL/min)	151
Figura 104. Imágenes de SEM de MPs paramagnéticas elaboradas utilizando distintas concentraciones de polímero: (a) 1% p/v, (b) 2% p/v y (c) 4 % p/v.....	154
Figura 105. Aspecto de las suspensiones tras 60 min de reposo elaboradas con distintas cantidades de Aerosil y concentración de polímero: (a) 2% p/v y (b) 4% p/v.....	155
Figura 106. Imágenes de SEM de MPs paramagnéticas de 5 µm de diámetro mostrando el efecto de la concentración de Aerosil en la morfología de las partículas: (a) A6 - 12% p/p; (b) A7 - 14.5% p/p y (c) A8 - 29% p/p.....	155
Figura 107. Imágenes de MPs paramagnéticas de 5 µm de diámetro (aumento 100X) elaboradas con las formulaciones A6, A9 y A10 tras ser sometidas en distintos medios de incubación a los tiempos y temperaturas indicadas.....	158
Figura 108. Imagen del microscopio de fluorescencia de MPs paramagnéticas (formulación A10) codificadas con Rodamina B (0.2mM)	159
Figura 109. Imagen del microscopio de fluorescencia de MPs paramagnéticas (formulación A10) codificadas con Nile Blue (0.2mM)	160
Figura 110. Imagen del microscopio óptico de MPs paramagnéticas, formulación A11, conteniendo Nile Blue 0.2 mM.....	160
Figura 111. Estructura química de Ethocel.....	162
Figura 112. Distribución de tamaño de partícula para las formulaciones A10, E3 y E5 obtenidas para una combinación de caudales Qd1Qt3 y tamaño medio de partícula en función del contenido en Ethocel	164
Figura 113. Imágenes de SEM de MPs paramagnéticas elaboradas con las formulaciones: (a) E2, (b) E3 y (c) E5	165

Figura 114. Imágenes de MPs paramagnéticas de 6-7 μm de diámetro (aumento 100X) elaboradas con las formulaciones E3 y E5 tras ser sometidas a distintos medios de incubación a los tiempos y temperaturas indicadas..... 166

INDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1

- Tabla 1.** Tabla resumen de las técnicas y/o métodos de microencapsulación empleados en la actualidad21
- Tabla 2.** Tabla resumen de las técnicas de generación de gotas empleadas en el campo de la microencapsulación con alta productividad y alto control del tamaño de gota29

CAPÍTULO 2

- Tabla 3.** Condiciones experimentales y diámetro medio obtenidos para las microesferas.....47
- Tabla 4.** Condiciones experimentales y diámetro medio obtenidos para las microcápsulas.....47
- Tabla 5.** Resultados de atrapamiento (%) y eficacia de encapsulación (%) obtenidos mediante microanálisis para las muestras indicadas49
- Tabla 6.** Algunos ejemplos de aplicaciones de la tecnología FF en el campo de la microencapsulación.....50

CAPÍTULO 3

- Tabla 7.** Tipos de poliestireno empleados en la producción de MPs (** mezcla 50:50 de dos componentes (PM 4.000 + 200.000)).....59
- Tabla 8.** Propiedades de algunos disolventes empleados (** oral en ratas)) (The Index Merck, 2002)60
- Tabla 9.** Modelos de nebulizadores y dimensiones geométricas empleadas para la producción de MPs64
- Tabla 10.** Condiciones experimentales de ensayos de estabilidad de las MPs66
- Tabla 11.** Valores de viscosidad obtenidos para diferentes concentraciones de PS (μ t viscosidad fluido enfocante; μ d viscosidad fluido enfocado)67
- Tabla 12.** Valores de tensión superficial para las soluciones indicadas.....67
- Tabla 13.** Valores de tensión interfacial para las fases indicadas68
- Tabla 14.** Valores de tensión interfacial y volumen de gota para las fases indicadas.....68
- Tabla 15.** Resultados de tamaños de partículas obtenidos en función de Qt , Qd , y D (en negrita, condiciones donde se han obtenido MPs monodispersas).....72
- Tabla 16.** Tamaños de partícula medio contemplando la variabilidad inter-lote para las condiciones indicadas.....78
- Tabla 17.** Valores números adimensionales We , Oh y Re para las condiciones ensayadas (PS 4% p/v) (en negrita, condiciones donde se han obtenido MPs monodispersas).....83
- Tabla 18.** Posibles valores de Qd mínimo para las condiciones especificadas86
- Tabla 19.** Resultados obtenidos para D 50 μ m para cada técnica de medida y valores de We y Re para cada condición ensayada88
- Tabla 20.** Efecto modificación geometría del nebulizador en el tamaño de partícula y en la distribución de tamaños (diámetro de salida 100 μ m)90

Tabla 21. Factor de contracción teórico y experimental del tamaño de MPs en función de la concentración de polímero empleada	94
---	----

CAPÍTULO 4

Tabla 22. Principales propiedades de los fluoróforos orgánicos empleados	107
Tabla 23. Propiedades de emisión de los QDs ensayados (NN Labs, EE UU)	108
Tabla 24. Descripción de los filtros empleados con el microscopio de fluorescencia (BP: filtro bandpass; +: specially for multi-parameter fluorescence)	109
Tabla 25. Filtros y detectores empleados con el citómetro de flujo (BP: filtro bandpass; LP: filtro longpass).....	110
Tabla 26. Tamaño de partículas obtenidos en función del tipo de fluoróforo y su concentración para Qd1Qt3.....	112
Tabla 27. Tamaño de partículas obtenidos en función del tipo de poliestireno (4% p/v) para Qd1Qt3	113
Tabla 28. Distribución emisión fluorescencia para cada fluoróforo (excitación 488 nm) según el simulador virtual	121
Tabla 29. Lotes de MPs de 5 micras de diámetro codificadas con Rodamina B.....	124
Tabla 30. Lotes de MPs de 5 micras de diámetro codificadas con Fluoresceína isómero I	125

CAPÍTULO 5

Tabla 31. Principales propiedades del material paramagnético ensayado	142
Tabla 32. Agentes estabilizantes ensayados en medio acuoso.....	142
Tabla 33. Agentes estabilizantes ensayados en medio orgánico	142
Tabla 34. Condiciones experimentales de ensayos de estabilidad de las MPs paramagnéticas	144
Tabla 35. Composición de las primeras formulaciones ensayadas para la elaboración de MPs paramagnéticas	150
Tabla 36. Formulaciones elaboradas con Aerosil ® 200 Pharma	152
Tabla 37. Composición detallada de la formulación A8.....	156
Tabla 38. Composición detallada de la formulación optimizada para la producción de MPs paramagnéticas	159
Tabla 39. Formulaciones ensayadas empleando celulosas como agentes estabilizadores de la suspensión de partículas magnéticas.....	163
Tabla 40. Resultados obtenidos del contenido en Fe para MPs elaboradas a partir de las formulaciones indicadas	167