



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROPARTÍCULAS
POROSAS DE POLICAPROLACTONA MEDIANTE EL USO DE
MICROCANALES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ARTURO MURILLO SÁNCHEZ



Ciudad Universitaria, CDMX, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

VOCAL: VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS

SECRETARIO: LUZ ANTONIA BORJA CALDERON

1er. SUPLENTE: GERARDO LEYVA GOMEZ

2° SUPLENTE: PERLA GARCIA GUZMAN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ESTA TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS EN CONJUNTO CON EL LABORATORIO DE BIO-FISICOQUÍMICA Y MICROFLUÍDICA UBICADOS EN EL EDIFICIO F DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. LUIS FERNANDO BRAVO DUQUE

SUSTENTANTE:

ARTURO MURILLO SANCHEZ

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	vi
1 ANTECEDENTES.....	1
1.1 Sistemas de liberación	1
1.1.1 Sistemas de liberación modificada.....	2
1.1.2 Microacarreadores.....	3
1.2 Polímeros biodegradables.....	3
1.2.1 Policaprolactona.....	4
1.3 Micropartículas poliméricas.....	5
1.4 Microfluídica.....	10
1.4.1 Dispositivos de microfluídica: <i>microchips</i>	10
1.4.2 <i>Microchips</i> de polidimetilsiloxano	11
1.5 Fabricación de micropartículas en microfluídica.....	14
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivo general	20
3.2 Objetivos particulares.....	20
4 HIPÓTESIS.....	20
5 METODOLOGÍA	21
5.1 Materiales.....	21
5.2 Elaboración de los <i>microchips</i>	21
5.2.1 Diseño de los <i>microchips</i>	21
5.2.2 Fabricación del molde de <i>microchips</i>	22
5.2.3 Elaboración de los <i>microchips</i> de PDMS	23
5.3 Caracterización de los <i>microchips</i>	24
5.4 Modificación de las características del PDMS	24

5.4.1	Tratamiento con H ₂ SO ₄	24
5.4.2	Incorporación de tensoactivos: Triton X-100.....	24
5.4.3	Recubrimiento con Tetraetilortosilicato	24
5.4.4	Recubrimiento con Alcohol polivinílico	24
5.4.5	Evaluación de los tratamientos.....	25
5.5	Elaboración de micropartículas poliméricas porosas de policaprolactona	25
5.5.1	Prueba de estabilidad de las microgotas. Selección de la concentración de PVA	25
5.5.2	Elaboración de microgotas.....	25
5.5.3	Influencia de las variables de fabricación en la obtención de las microgotas.....	27
5.5.4	Secado de las microgotas	28
5.5.5	Influencia de la concentración de canfeno en la porosidad	28
5.5.6	Relación entre el tamaño de gota y tamaño de partícula.....	29
5.5.7	Caracterización de las micropartículas obtenidas	29
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6.1	Fabricación del molde de los <i>microchips</i>	30
6.2	Caracterización de los <i>microchips</i>	30
6.3	Modificación de las características del PDMS	33
6.4	Elaboración de las micropartículas porosas de policaprolactona	40
7	CONCLUSIONES.....	63
8	PERSPECTIVAS	64
9	BIBLIOGRAFÍA	65
10	ANEXOS	69

RESUMEN

Los avances en el área farmacéutica han traído como resultado el desarrollo de los sistemas de liberación controlada (SLC) los cuales son capaces de brindar un mejor control en la administración del fármaco, maximizar la eficacia, reducir efectos tóxicos o lograr dirigir el fármaco a un tejido específico [1].

Estos sistemas pueden ser elaborados con materiales novedosos que ofrecen ventajas en la liberación del fármaco. Entre ellos destaca la policaprolactona (PCL), un poliéster semicristalino, biocompatible y biodegradable que suele emplearse para lograr una administración por un tiempo prolongado [2].

Entre los acarreadores más empleados para el desarrollo de SLC se encuentran las micropartículas (MP), que comprenden un tamaño en el intervalo de 1 a 1000 μm y en las cuales el fármaco puede estar disperso, encapsulado, disuelto o unido a la matriz. Este tipo de acarreadores tienen como ventaja la capacidad de poder manipular su tamaño y sus características superficiales y estructurales razón por la cual suelen ser empleadas en el desarrollo de diversas formulaciones [3].

Esta investigación buscó la obtención de micropartículas porosas de policaprolactona mediante el empleo de un *microchip* de microfluídica, con posible aplicación en el desarrollo de sistemas de liberación modificada de fármacos. Las micropartículas fueron elaboradas por la técnica de emulsión-evaporación de disolvente; además se evaluaron algunas de las variables de proceso que influyen en parámetros como el tamaño y porosidad de las mismas. La caracterización de las micropartículas obtenidas se realizó empleando las técnicas de microscopía electrónica de barrido (SEM) para tamaño y morfología, así como espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) para composición.

Con los experimentos realizados se logró evaluar la influencia de algunas variables de fabricación durante el proceso de obtención de micropartículas, observando que el ángulo de corte del *microchip*, así como flujos de inyección de las fases controlan el tamaño de la microgota, el aumento la concentración de canfeno trae como resultado un aumento en el tamaño y la cantidad de poros y finalmente la forma de secado genera diferentes tipos de estructura en las micropartículas.

1 ANTECEDENTES

1.1 Sistemas de liberación

Desde épocas antiguas, el hombre ha destinado el uso de diversos remedios para el tratamiento de las enfermedades que lo aquejan, más adelante se demostró que estas propiedades se debían a la presencia de sustancias con actividad farmacológica, denominados fármacos. Con el descubrimiento de estas sustancias, la ciencia se ha dedicado a encontrar la forma de poder administrarlas en el organismo, facilitando su uso y mejorando la efectividad.

Con el surgimiento de las formas farmacéuticas convencionales, que incluyen a las cápsulas, tabletas, ungüentos, soluciones orales, soluciones inyectables y supositorios fue posible dar tratamiento a muchas enfermedades. Antes de 1950 todos los medicamentos se elaboraban en forma de tabletas o cápsulas [4].

Sin embargo, estas formas farmacéuticas proveen una liberación rápida e inmediata, teniendo poco control en los niveles plasmáticos del fármaco en el organismo y la necesidad de administrar varias veces el medicamento en un periodo corto de tiempo. Estas múltiples administraciones traen como consecuencia cambios en los niveles plasmáticos del fármaco y pueden llevar a la pérdida del efecto terapéutico al estar por debajo de la concentración mínima efectiva o la aparición de efectos adversos al alcanzar concentraciones muy elevadas, en la figura 1 se muestran los cursos temporales de las vías de administración más comunes. A pesar de sus desventajas, las formas convencionales siguen siendo las más prescritas y encontradas en el mercado [1].



Figura 1. Concentración plasmática de un fármaco modelo en función de la vía de administración. Se puede observar que la forma de administración impacta de manera directa en la concentración plasmática del fármaco y con ello en la eficacia del tratamiento.

Debido a que la eficacia del principio activo dentro de un producto farmacéutico depende, en gran medida, de la vía por la que se administra y dadas las limitaciones que presentan las formas farmacéuticas convencionales la ciencia se ha enfocado en el desarrollo de nuevos métodos de administración de fármacos, lo cual solo es posible si se trabaja con un enfoque multidisciplinario entre farmacéuticos, ingenieros, químicos, físicos y médicos [5].

1.1.1 Sistemas de liberación modificada

Los avances tecnológicos han traído como resultado sistemas capaces de brindar un mejor control en la velocidad de administración del fármaco, lograr mantener la duración de la actividad terapéutica maximizando la relación dosis-eficacia, reducir los efectos tóxicos e incluso dirigir a las moléculas del fármaco a un tejido blanco específico. A estas formas de administración más completas se les denominan sistemas de liberación controlada y de manera general pueden ser clasificados en cuatro grupos [1], [6]:

a) Sistemas de liberación de velocidad preprogramados.

El principio activo se logra entregar a través del uso de barreras que rodean o conforman al sistema, controlando la difusión de las moléculas del fármaco al medio. Estos sistemas son capaces de preprogramarse en perfiles de velocidad específica.

b) Sistemas de liberación de activación modulada.

La entrega del fármaco se logra mediante algún proceso o estímulo físico, químico o bioquímico y es facilitado por la administración de energía. La velocidad de liberación del fármaco se controla regulando el proceso aplicado.

c) Sistemas de liberación regulados por retroalimentación.

En este tipo de sistemas la liberación de las moléculas del agente terapéutico es mediada por la presencia de agentes activadores. La velocidad de liberación del fármaco se controla mediante la concentración de dichos agentes, que pueden ser compuestos bioquímicos presentes en el organismo.

d) Sistemas de liberación sitio dirigidos.

El fármaco únicamente es liberado en el tejido blanco, evitando efectos adversos en el organismo. Esto es posible gracias al uso de vectores con afinidad a la célula diana.

Con el surgimiento de este tipo de sistemas de liberación más sofisticados ha sido necesario desarrollar nuevos materiales que cumplan con las características necesarias para ser empleados en la elaboración de medicamentos y además puedan interactuar en el organismo

sin causar daños. Actualmente, la ciencia se ha centrado en el desarrollo de nuevos materiales entre los que destacan los de tipo polimérico.

1.1.2 Microacarreadores

Entre los avances en el desarrollo de los SLC se encuentra el uso de diversas estructuras a las que se les ha denominado acarreadores farmacéuticos los cuales son las encargadas de almacenar y transportar el fármaco hasta el sitio blanco. Se clasifican en sistemas moleculares y sistemas coloidales, dentro de estos últimos se encuentran las emulsiones, liposomas, niosomas, nanopartículas y micropartículas [7]. En las últimas décadas, las micropartículas han recibido especial atención dado que presentan muchas ventajas con respecto a otros sistemas y que pueden ser elaboradas fácilmente a partir de gran variedad de materiales [3].

1.2 Polímeros biodegradables

Los polímeros son macromoléculas formadas por una o más subunidades denominadas monómeros. Cuando todos los monómeros que lo conforman son iguales se le denomina homopolímero y cuando son dos o más monómeros distintos se les denomina copolímeros. Este tipo de compuestos se ha vuelto de gran interés a nivel industrial pues poseen propiedades fisicoquímicas que permiten usarlos en la elaboración de un sin fin de productos de uso cotidiano incluyendo el desarrollo y formulación de medicamentos. Basados en su origen son clasificados en tres tipos: naturales, semisintéticos y sintéticos. [8].

Los polímeros de origen natural se obtienen de los recursos naturales, por lo que es necesario extraerlos de seres vivos como plantas, hongos, bacterias o animales; dentro de ellos se pueden encontrar materiales de carácter proteico como la gelatina y la lecitina o de carácter polisacárido como el alginato, agarosa, o quitosano [9]. Por otro lado, los polímeros sintéticos se obtienen a partir de la experimentación en laboratorios y se clasifican en familias dentro de las que destacan los policianoacrilatos, poliimidias, poliamidas y poliésteres; siendo estos últimos los más importantes y dentro de los que se encuentran la policaprolactona, el ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y el ácido poliláctico (PLA) [10].

Un biomaterial o material biocompatible es aquel material diseñado para entrar en contacto con sistemas biológicos y que es capaz de tratar, mejorar o reemplazar tejidos o funciones del organismo [11]. Al tratarse de materiales inocuos cada vez son más empleados en el campo

de la medicina para elaborar implantes, dispositivos médicos o matrices para la liberación controlada de fármacos.

La biodegradación es un proceso natural por el cual los compuestos orgánicos son degradados en compuestos más simples; por ello se les denomina polímeros biodegradables a aquellos que pueden ser degradados *in vivo*, generando subproductos no tóxicos que son metabolizados y eliminados con mayor facilidad a través de las diversas rutas metabólicas [12]. Los polímeros biodegradables de origen natural presentan características como biocompatibilidad, baja toxicidad y alta susceptibilidad a la degradación en el organismo por enzimas o agua en tanto que los de origen sintético poseen mayor resistencia mecánica y flexibilidad así como una menor susceptibilidad a la degradación [13].

Actualmente el uso de polímeros biodegradables para la administración de productos farmacéuticos ha aumentado considerablemente, siendo la principal aplicaciones el desarrollo y elaboración de sistemas de administración controlada de fármacos [14].

1.2.1 Policaprolactona

La policaprolactona es un polímero de tipo poliéster semicristalino, biodegradable y biocompatible que puede ser sintetizado por polimerización aniónica, catiónica o de coordinación a partir de ϵ -caprolactona, la figura 2 muestra de manera general la síntesis de la PCL. Posee una temperatura de transición vítrea de 60°C y un punto de fusión de entre $59\text{-}64^{\circ}\text{C}$, su peso molecular promedio puede variar de 10,000 a 42,500 Da y a temperatura ambiente es soluble en cloroformo, diclorometano (DCM), tetracloruro de carbono, benceno, tolueno, y ciclohexano e insoluble en hidrocarburos alifáticos, éter dietílico y alcoholes [2], [15].

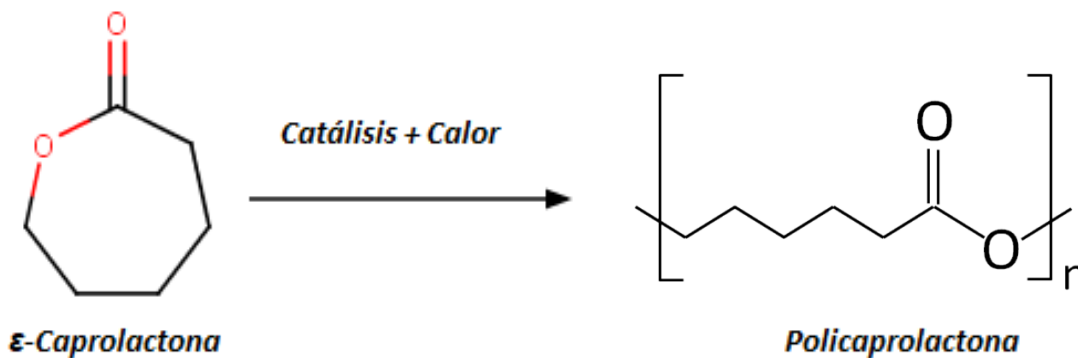


Figura 2. Esquema de la síntesis catalítica de la policaprolactona a partir de su monómero.

La degradación de la PCL es lenta y no genera un ambiente ácido en comparación con otros polímeros biodegradables como el PLGA o PLA e inclusive es posible modificar la velocidad de degradación al ser puede ser empleada en combinación con otros polímeros. Dentro del organismo su biodegradación ocurre en dos pasos fundamentales; primero una escisión aleatoria no enzimática catalizada por los grupos carbonilo terminales, seguida de una fragmentación mediada por enzimas [2].

El primer paso ocurre en la región amorfa del polímero, debido a una hidrólisis del grupo carbonilo generando fragmentos más pequeños los cuales difunden de la matriz polimérica al medio, se ha encontrado que la longitud crítica para la difusión del fragmento de PCL debe ser inferior a 5000 Da. El proceso de escisión está limitado por la permeabilidad del agua en el sistema y ocurre en un lapso de tiempo largo, generalmente mayor a 6 meses dependiendo el peso molecular de la PCL. Finalmente, los fragmentos desprendidos de la matriz son fagocitados y degradados a monómeros por acción enzimática [16]. Con los diversos estudios realizados, se ha descubierto que la lipasa aumenta la tasa de degradación de la PCL y puede degradarla a oligómeros y monómeros en un plazo de 3 a 4 semanas, se estima que la presencia de esta enzima mejora la velocidad de degradación del polímero hasta 1000 veces más en comparación de un medio acuoso que no la posee [17].

Dadas las características fisicoquímicas antes mencionadas, su permeabilidad, estabilidad *in vitro*, nula toxicidad y bajo costo es ampliamente utilizado en la preparación de sistemas de liberación controlada al favorecer una administración por un tiempo prolongado dentro del organismo, razón por la cual durante la última década, el uso de la PCL ha atraído mucho interés en la administración de medicamentos en comparación con los poliésteres biodegradables derivados de los ácidos láctico y glicólico [18].

1.3 Micropartículas poliméricas

Las micropartículas (MP) son definidas como partículas sólidas con un tamaño en el intervalo de 1-1000 μm . En este tipo de sistemas el fármaco puede encontrarse disuelto, encapsulado o unido a la matriz de la partícula [3]. Cuando la matriz está constituida de un material polimérico se le da el término de micropartícula polimérica (MPP). A este tipo de sistemas suele atribuírseles forma esférica por lo que generalmente se habla de microesferas y microcápsulas, aunque se ha reportado en la literatura micropartículas sin forma esférica al modificar la técnica

de elaboración obteniendo [19], en la figura 3 se muestra una de las clasificaciones más comunes para las MPP en función de su estructura y el contenido que presentan.

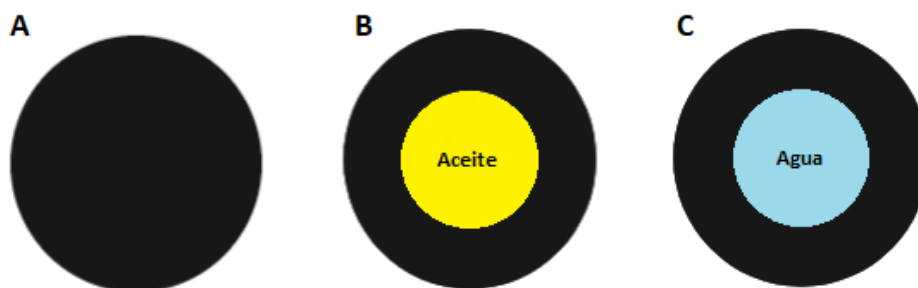


Figura 3. Clasificación de las MPP (A) Microesfera (B) Microcápsula conteniendo aceite (C) Microcápsula conteniendo agua. Las microesferas son totalmente sólidas y son denominados sistemas matriciales en tanto que, las microcápsulas cuentan con un núcleo en el cual es posible almacenar diversos tipos sustancias. Tomado de [19].

El desarrollo y uso de MPP para la administración de fármacos se debe a las ventajas únicas que presentan, incluyendo: (i) la manipulación del tamaño y características de la superficie de las partículas, (ii) el control y la liberación sostenida del fármaco en el sitio blanco logrando un aumento en la eficacia terapéutica y reducción de los efectos secundarios, (iii) la modulación de la liberación del principio activo y la degradación de las partículas mediante la elección de los constituyentes de la matriz (iv) el uso de diversas vías de administración incluyendo orales, nasales, parenterales e intraoculares [3]. Además, el uso de materiales biodegradables ofrece la posibilidad de elaborar sistemas en los cuales la matriz se puede transformar en compuestos no tóxicos y de bajo peso molecular que pueden ser eliminados fácilmente del organismo evitando posibles efectos secundarios debidos a la naturaleza de la matriz [18].

El polímero o polímeros que serán la base de la micropartícula influyen en diversos aspectos del microacarreador incluidos el tipo de moléculas que pueden encapsularse, el tiempo de degradación de la matriz, la vía de eliminación y la forma de liberación del fármaco. Esto debido a que funciona como una barrera que limita la salida del fármaco al medio y depende de la erosión o permeabilidad de la matriz [7]. Por esta razón, este tipo de sistemas han sido elaborados de una gran variedad de polímeros biodegradables entre los que destacan los poliésteres como el PLA, PLGA o PCL, aunque también suelen emplearse poliorioésteres, polianhídros, poliamidas y polifosfacenos [20]. Por esta razón es necesario elegir de manera adecuada el polímero a emplear basándose en sus propiedades fisicoquímicas y el uso que

se le pretende dar a las micropartículas. Además, gracias a las propiedades del polímero empleado, en algunas ocasiones es posible modificar las características superficiales y/o internas de la MPP al recubrirla con algún otro material o compuesto e inclusive formar estructuras o huecos al interior o exterior de la matriz.

En los últimos años, la obtención de micropartículas porosas ha tomado gran importancia debido a sus múltiples aplicaciones entre las que destacan: la cromatografía, catálisis, tecnología de sensores, almacenamiento de energía, microrreactores, adsorbentes, ingeniería de tejidos y la liberación de fármacos. Las micropartículas que presentan poros en su estructura tienen como características un aumento del área superficial, baja densidad, excelente estabilidad y alta permeabilidad [21]. Para tener mayor información acerca de la porosidad de la partícula, se han clasificado como macroporosas, mesoporosas y microporosas en función del tamaño de los poros, respectivamente de >50 nm, $50-2$ nm y <2 nm [22].

Para poder elaborar MPP que posean poros en su estructura es necesario el uso de un material generador de poros también denominado porógeno [23], aunque también se ha buscado el desarrollo de materiales porosos con dimensiones controlables en el tamaño de los poros que van de nanoescala a microescala. A pesar de ello, el uso de porógenos sigue siendo ampliamente aplicado pues permite el uso de compuestos de distintas características como: sólidos (denominados no solventes) como NaCl, Canfeno, NaHCO_3 , CaCO_3 y NH_4HCO_3 ; disolventes, como tolueno y hexadecano; polímeros lineales como Pluronic, poli-propilenglicol, PVA, polimetilmetacrilato e inclusive agua. Además, el agente formador de poro juega un papel importante en el tamaño y distribución de los poros de la micropartícula [21], [22].

Resulta importante mencionar que el tamaño de partícula es un parámetro que influye en el comportamiento de las partículas dentro del organismo incluyendo su degradación, mecanismos de eliminación y liberación del principio activo. Este parámetro puede controlarse con la concentración de polímero empleada, el uso de surfactantes o directamente con el método de fabricación, sin embargo algunas de las metodologías comúnmente usadas para la preparación de micropartículas poliméricas se asocian con problemas respecto al control del tamaño, morfología y distribución de las partículas debido a que durante el proceso suelen emplearse procesos de agitación mecánica, sonicación u homogenización [18].

Entre las técnicas más empleadas para la elaboración de MPP se encuentran [19]:

a) Emulsión-Evaporación de disolvente

En este método, se elabora una emulsión a partir de una disolución del polímero preformado y que fungirá como base para la MPP en un disolvente orgánico volátil y una disolución acuosa que contiene algún agente estabilizante. Para ello es necesario el uso de homogenización de alta velocidad (*high-speed homogenization*) o ultrasonificación, por lo que es posible la elaboración de emulsiones simples de tipo agua en aceite o aceite en agua o emulsiones dobles de tipo agua-aceite-agua y aceite-agua-aceite. Finalmente, a partir de la emulsión, se obtiene una suspensión de micropartículas debido a la evaporación del disolvente orgánico del polímero debido a su difusión a través de la fase continua, la figura 4 ejemplifica de manera general el proceso. Esta técnica permite obtener partículas de escala nano y/o micrométrica y solo utiliza polímeros preformados solubles en disolventes orgánicos volátiles y no miscibles en agua. Los polímeros más empleados son PLGA, PLA, PCL o poli-organofosfaceno (POP). Uno de los principales inconvenientes que presenta es el uso de disolventes orgánicos clorados como diclorometano o cloroformo los cuales son dañinos para el medio ambiente.

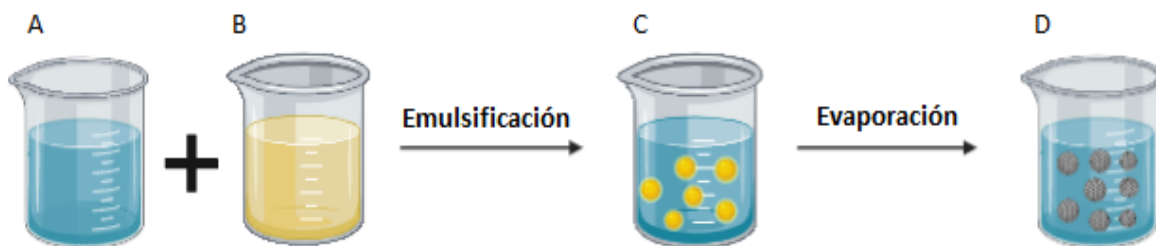


Figura 4. Proceso de elaboración de MPP mediante el método de emulsión-evaporación de disolvente. Se mezclan una (A) Disolución acuosa que contiene un agente estabilizante y una (B) Disolución del polímero que será la base de la MPP para formar una (C) Emulsión aceite en agua y finalmente la (D) Dispersión de MPP en el medio.

b) *Salting-out*

En esta técnica se elabora una emulsión en la cual la disolución polimérica emplea un disolvente miscible en agua. El proceso de emulsificación se logra debido a la presencia de una alta concentración de sales o sacarosa en la fase acuosa, generando una disminución de miscibilidad del agua con el disolvente empleado. Por último, se añade un exceso de agua para disminuir el efecto de *salting-out* favoreciendo la migración del

disolvente polimérico a la fase acuosa y provocando a la precipitación del polímero. Las sales o agentes *salting-out* más empleados son cloruro de calcio (CaCl), cloruro de magnesio (MgCl), acetato de magnesio (Mg(CH₃COO)₂) mientras que el disolvente polimérico más empleado es la acetona. Además, solo se usan polímeros preformados como PLGA, PLA o Polimetilmetacrilato (PMA).

c) Micro-Nanoprecipitación

También conocida como desplazamiento de disolvente, esta técnica se fundamenta en la deposición interfacial del polímero después del desplazamiento del disolvente de la fase orgánica a la fase acuosa. Las partículas son producidas mediante la adición lenta de la fase orgánica a la fase acuosa con agitación moderada. Para poder realizar esta técnica es necesario emplear disolventes orgánicos miscibles en agua y fáciles de eliminar por evaporación, así como el uso de surfactantes en la fase acuosa.

d) Diálisis

En este caso, el polímero es disuelto en un disolvente orgánico y colocado dentro de una membrana diálisis con *cut-off* adecuado. En el medio exterior se coloca una fase acuosa en la cual el polímero no es soluble. El desplazamiento del disolvente dentro de la membrana al exterior provoca la agregación del polímero debido a una pérdida de la solubilidad y la formación de una suspensión homogénea de partículas. Actualmente, el mecanismo de formación de partículas por el método de diálisis no se entiende completamente, pero se cree que puede basarse en un mecanismo similar al de la nano-microprecipitación.

e) Polimerización en emulsión

A diferencia de todas las técnicas anteriores, con la polimerización en emulsión es posible trabajar con monómeros. Para ello se emplea agua como medio de dispersión, monómeros de bajo peso molecular, iniciadores solubles en agua y en algunos casos tensoactivos. La iniciación ocurre cuando el monómero es disuelto en la fase continua y choca con el iniciador y la formación de la partícula puede ocurrir antes o después de la finalización de la reacción de polimerización. En la literatura se ha reportado la formación de partículas de poliestireno, polimetilmetacrilato, polivinilcarbazolo, polietilcianoacrilato y polibutencilcianoacrilato a partir de esta técnica.

La selección del método de fabricación depende de diversos factores entre los que resaltan el tipo de polímero o material del que estará constituida la partícula, el área de aplicación, el tamaño requerido así como la de dispersión que desea que presente dicho parámetro [10]. Finalmente, y dado que la gran mayoría de las metodologías usadas para la elaboración de MPP necesitan la previa formación de una emulsión, es posible emplear técnicas adicionales que permitan tener un control en la formación y tamaño de las gotas que conforman a la fase dispersa. Una de estas técnicas es la microfluídica.

1.4 Microfluídica

Los progresos en ciencia y la tecnología han logrado una expansión considerable en el campo de la miniaturización. Ahora es posible miniaturizar sistemas, de tipo mecánicos, fluidos, electromecánicos o térmicos a tamaños submicrométricos. Estos avances dieron lugar a los sistemas microelectromecánicos que han logrado ser aplicados en diversas áreas de índole química, biológica y biomédica. Estos sistemas permitieron emplear flujos de fluidos que operaban en condiciones inusuales e inexploradas, lo que naturalmente llevó a la necesidad de crear una nueva disciplina, la microfluídica [24].

Se define como microfluídica a la ciencia y tecnología que emplea microsistemas con los cuales es posible manipular volúmenes muy pequeños de fluidos, a partir del desarrollo de dispositivos con canales de dimensiones de decenas a cientos de micrómetros (μm). Los volúmenes con los que se trabaja van de los 10^{-9} a los 10^{-18} litros. La microfluídica es aplicada a una gran cantidad de áreas como biología, farmacia, microbiología o química debido a que cuenta con características muy útiles como: la capacidad de usar cantidades muy pequeñas de muestras y reactivos; realizar separaciones y detecciones con alta resolución y sensibilidad; bajo costo; tiempos cortos para el análisis; y pequeñas huellas para los dispositivos analíticos [25].

1.4.1 Dispositivos de microfluídica: *microchips*

Para realizar ensayos a partir de esta técnica es necesario elaborar un dispositivo de microfluídica, también llamados *microchips*. Su fabricación requiere el uso de alguna técnica de grabado para el diseño de los canales, así como de un material base para el *microchip*. Las técnicas de elaboración de los *microchips* se pueden dividir en dos categorías: tecnologías "duras" (*hard technologies*) y tecnologías "suaves" (*soft technologies*) [24].

Las tecnologías duras emplean técnicas como grabado, litografía o deposición y se pueden aplicar para obtener diseños en el intervalo de escalas entre 0.2 y 500 micrómetros. Se denominan así ya que utilizan materiales duros como el vidrio o el silicio. La combinación de técnicas de grabado, litografía y deposición hace posible obtener dispositivos microfluídicos complejos. Por otro lado, las tecnologías suaves permiten obtener diseños entre 0.5 y 500 micrómetros y emplean materiales de carácter plástico entre los que destacan los elastómeros. Dependiendo del material que se empleará, los *microchips* se pueden fabricar utilizando un método directo como la ablación por láser o mediante métodos de replicación en el cual se hace uso de un molde maestro.

Actualmente las tecnologías suaves son más atractivas desde el punto de vista del costo debido a que los plásticos son aproximadamente 100 veces menos costosos que el silicio [24]. Si bien, se conocen muchos materiales que pueden ser empleados para su fabricación, algunos pueden generar interferencias en los resultados por lo que es necesario tener en cuenta la aplicación que se le quiere dar al *microchip*, así como las propiedades del material, entre las que se pueden destacar la permeabilidad al aire, compatibilidad con disolventes, biocompatibilidad, conductividad eléctrica y transparencia óptica [23].

En cuanto a los materiales empleados para la fabricación de *microchips* pueden dividirse en dos grandes categorías: inorgánicos y poliméricos. Los materiales inorgánicos únicamente comprenden al vidrio, silicatos y cerámicos. Por otro lado, los materiales poliméricos han ganado más importancia en las últimas décadas, por lo que existe un mayor número de compuestos de este tipo, siendo los más empleados el polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato (PC), poliestireno (PS), poliimida (PI), policloruro de vinilo (PVC), los polímeros de olefinas cíclicas y el polidimetilsiloxano (PDMS) [26]. Actualmente, un gran porcentaje de los *microchips* empleados en investigación son elaborados a base de PDMS debido a su bajo costo y rápida fabricación.

1.4.2 *Microchips* de polidimetilsiloxano

El PDMS $(C_2H_6OSi)_n$ es un polímero flexible, con alto nivel de elasticidad de las cadenas, biocompatible, permeable a gases, incoloro, hidrófobo, ópticamente transparente a longitudes de onda (λ) de 240 a 1100nm y resistente a temperaturas de hasta 200°C; la figura 5 muestra la estructura química de este polímero. Sus propiedades lo hacen apto para la elaboración de diseños complejos de *microchips* con diversas aplicaciones [27], [28].

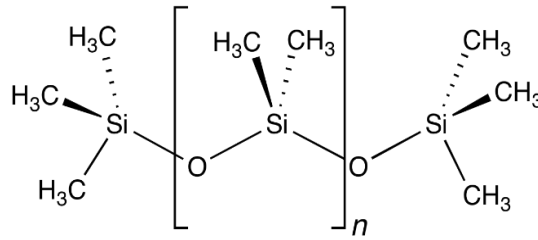


Figura 5. Estructura química del PDMS.

La obtención de *microchips* de PDMS involucra como primer paso la elaboración de un molde maestro que cuenta con el diseño de los microcanales en relieve negativo. Generalmente el molde se elabora mediante fotolitografía, una técnica que consiste en iluminar a través de una máscara, una resina fotosensible que se ha depositado sobre un sustrato como una oblea de silicio y posteriormente obtener los *microchips* por moldeo mediante litografía suave al verter una mezcla de PDMS y un agente curante que favorece la polimerización y con ello la solidificación. Finalmente se separa del molde y se adhiere con el uso de plasma de oxígeno a una superficie de vidrio con el fin de sellar los microcanales. La figura 6A muestra de manera general el proceso de elaboración de *microchips* de PDMS. [24].



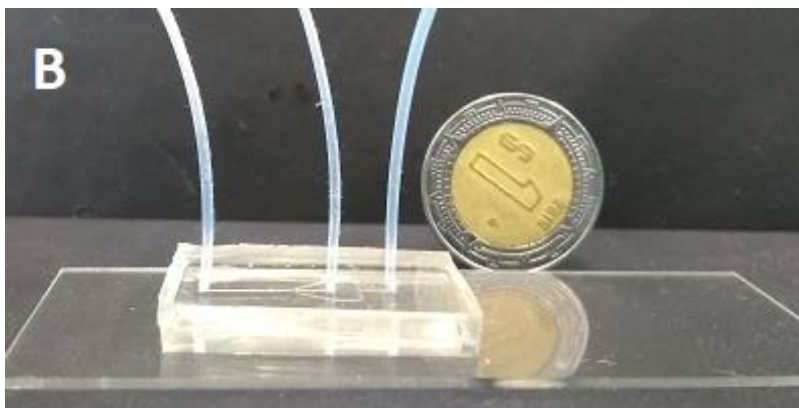


Figura 6. (A) Serie de pasos generales para la obtención de microchips de PDMS. Los pasos 1 a 4 representan la técnica fotolitografía para la obtención del molde mientras que los pasos 5-8 la etapa de litografía suave para la obtención del microchip. (B) Microchip de PDMS elaborado en el laboratorio.

Sin embargo, el uso de PDMS también presenta ciertas limitaciones como la deformación de los canales, ser susceptible al ataque de sustancias ácidas o básicas, la adsorción de compuestos lipofílicos o proteicos así como la incompatibilidad con ciertos disolventes orgánicos [29].

Por lo anterior, se ha tratado de modificar algunas de las propiedades del PDMS, siendo uno de los principales objetivos mejorar la compatibilidad con disolventes orgánicos o compuestos de carácter lipofílico debido a que este tipo de sustancias suelen ser muy empleados en diversas áreas experimentales. Para ello se han diseñado distintos tratamientos o modificaciones superficiales sobre el PDMS los cuales se pueden dividir en: permanentes y recubrimientos dinámicos, en función del tiempo que dura la modificación, o en físicas y químicas dependiendo el cambio que sufren las cadenas de PDMS. Las modificaciones comúnmente empleadas son: el tratamiento con plasma de O_2 [30], el tratamiento con agentes ácidos [31], la incorporación de tensoactivos durante el proceso de la polimerización [32] y la deposición de silicatos [33] o polímeros lineales [34].

Para la evaluación del tratamiento realizado se pueden aplicar diversas técnicas las cuales tienen como objetivo determinar la efectividad del procedimiento al que fue sometido el PDMS en función de la aplicación que se le desea dar al *microchip*. Por ello, cada una evalúa distintos parámetros o propiedades como adsorción de moléculas lipofílicas, adsorción de proteínas, o la resistencia a disolventes orgánicos. La microscopia de fluorescencia es una técnica que

permite evaluar el comportamiento de distintos compuestos dentro del *microchip* y con ello determinar si el tratamiento ha logrado modificar las características iniciales del PDMS [31].

1.5 Fabricación de micropartículas en microfluídica

Con el desarrollo de la microfluídica tomó mayor relevancia el estudio de la dinámica de fluidos a microescala, debido a que el comportamiento del fluido dentro de un microcanal depende de factores como sus propiedades, la velocidad de inyección y las dimensiones del microcanal. Se han desarrollado distintos parámetros para predecir y entender el comportamiento que presenta uno o varios fluidos confinados dentro de un sistema de microcanales. Teniendo en cuenta estos y muchos otros parámetros, es posible usar dos líquidos inmiscibles para elaborar gotas con volúmenes en el rango de femtolitros a nanolitros dentro de un sistema de microcanales [35], [36].

El número de Reynolds (Re) que se representa matemáticamente en la ecuación 1, es un parámetro adimensional que relaciona la densidad del fluido (ρ), su viscosidad (μ) su velocidad dentro del canal (v) y las dimensiones del canal (L). Permite determinar el tipo de flujo de un fluido. Un valor alto de Re (generalmente > 2300) se clasifica como flujo turbulento, presentando un movimiento desordenado de las moléculas del fluido. En contraste, el flujo laminar ocurre a valores más bajos (< 1800) y refleja un movimiento ordenado de las moléculas. Cuando un fluido presenta un flujo laminar, es posible manipular sus moléculas con precisión para generar gotas controlables y monodispersas. En sistemas de microfluídica, los valores de Re suelen ser muy bajos (no exceden 10^{-1}) por lo que es común que las moléculas de los fluidos de trabajo presente este tipo de movimiento ordenado [24], [37]

$$Re = \frac{\rho v L}{\mu} \quad \text{Ecuacion 1}$$

El número capilar (Ca) que se muestra en la ecuación 2, expresa la importancia de la tensión interfacial (γ) entre dos fluidos inmiscibles al relacionarlos con su viscosidad (η) y velocidad con la que recorren el microcanal (U_0). Se trata de un parámetro adimensional que se encuentra cada vez que las tensiones interfaciales compiten con tensiones viscosas. Un valor bajo de Ca indica que las tensiones debidas a la tensión interfacial son fuertes en comparación con las tensiones viscosas. Las gotas que fluyen bajo tal condición casi minimizan su área de superficie al producir extremos esféricos. En contraste, a valores altos dominan los efectos

viscosos y se pueden observar grandes deformaciones de las gotas y formas asimétricas [35], [36].

$$Ca = \frac{\eta U_0}{\gamma} \quad \text{Ecuacion 2}$$

La microfluídica basada la formación de gotas se ha convertido en una herramienta versátil con múltiples aplicaciones atribuida a las ventajas que presenta como: uso de un volumen pequeño de reactivos, producción masiva de gotas monodispersas, alta relación superficie-volumen que facilita una reacción rápida y control independiente de cada gota [38]. Debido a que la gran mayoría de las metodologías para la obtención de micropartículas involucran la elaboración de emulsiones, ha sido posible acoplarlas para permitir el uso de un sistema de microcanales (figura 7).

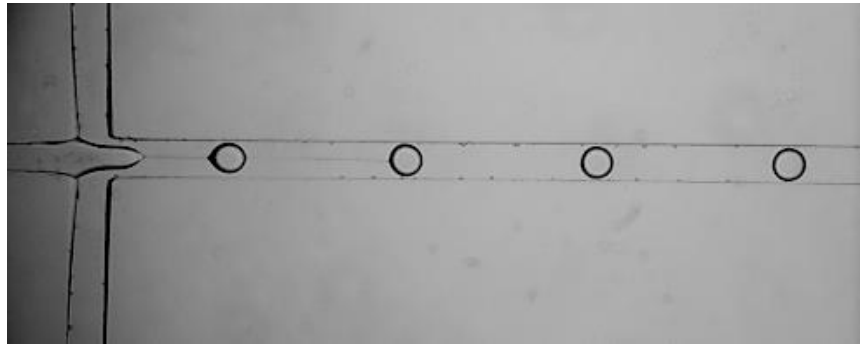


Figura 7 Formación de microgotas dentro de un sistema de microcanales

Generalmente, las gotas elaboradas mediante microfluídica son empleadas de dos maneras: como microrreactores para realizar y monitorear reacciones químicas y bioquímicas o debido a las características y propiedades de los componentes de las microgotas, pueden ser usadas como base para la elaboración de microfibras o micropartículas con aplicaciones en productos farmacéuticos, cosméticos o alimenticios. La generación de gotas se puede realizar de manera pasiva en donde la formación depende únicamente de la interacción entre las fases y del comportamiento de los fluidos, o de forma activa al añadir energía externa al dispositivo (energía eléctrica, mecánica o centrífuga) [36], [38].

La elaboración de microgotas de forma pasiva se basa en la organización del flujo de fluidos multifásicos, por lo que la geometría que presenta el dispositivo tiene relevancia en la forma en que entraran en contacto las fases de trabajo. La formación de gotas ha sido ampliamente

estudiada en diversas geometrías de *microchips*, entre las que destacan: *Flow-focusing*, *Co-flowing* y *T-junction* también llamada *Cross-junction*, la figura 8 muestra un esquema de cada una. Las tres geometrías han sido enfocadas en el desarrollo de emulsiones simples, dobles y múltiples para la posterior producción de micropartículas para la administración de fármacos [37].

La geometría tipo *Co-flowing* está compuesta por un canal principal a través del cual fluye la fase continua, mientras que la fase dispersa se encuentra dentro de un canal interno de menor tamaño fluyendo en la misma dirección que la fase continua. Cuando se emplea la geometría *Flow-focusing* la fase dispersa y la fase continua fluyen a través de dos lados del canal y se encuentran antes del orificio del capilar interno, las gotas se forman en el orificio y su tamaño dependerá de las condiciones de trabajo y de las propiedades de los fluidos.

En los dispositivos con geometría *T-junction* la fase continua fluye a través de un canal principal recto, mientras que la fase dispersa fluye a través de canales laterales, entrando en el canal principal a través del flujo cruzado. La unión en T tiene el beneficio de producir gotas con mejor monodispersión. Además, en este tipo de arreglos es posible modificar el ángulo y tamaño en la zona en que se unen el canal principal con los canales laterales. Se ha demostrado que la variación en el ángulo del diseño puede modificar la formación de la microgota al cambiar las características hidrodinámicas [39].

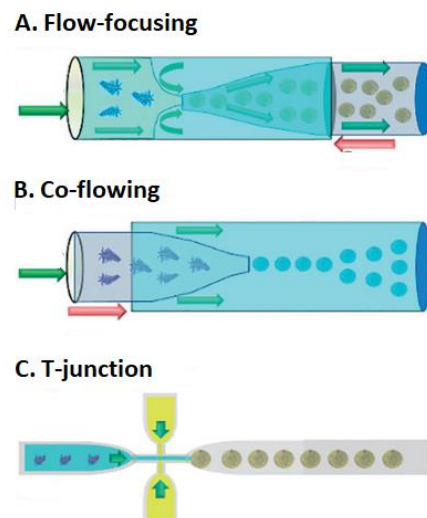


Figura 8. Geometrías (A) *Flow-focusing*, (B) *Co-flowing* y (C) *T-junction* empeladas en dispositivos de microfluídica para la elaboración de microgotas. Tomado de [37].

La forma en que se comportan dos o más fases inmiscibles dentro de un *microchip* ha sido ampliamente estudiada, encontrándose la presencia de comportamientos o regímenes al interaccionar los fluidos dentro de un microcanal y que conlleva a la formación de la microgota. Se han descrito cuatro principales regímenes denominados: *Threading*, *Squeezing*, *Dripping* y *Jetting*; los cuales se muestran en la figura 9. El tipo de régimen que se presenta depende principalmente del Ca , por lo que el uso de tensoactivos que modifiquen la tensión interfacial entre los fluidos, así como la velocidad de flujo con la que se inyectan dentro del *microchip* influyen en el tipo de régimen que se presenta [39].

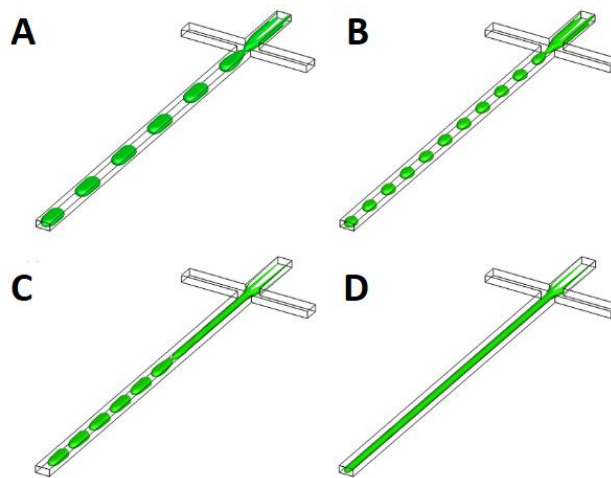


Figura 9. Esquema de los distintos regímenes de formación de gota observados dentro de un microchip con geometría T-junction. (A) Squeezing, (B) Dripping, (C) Jetting y (D) Threading. Tomado de [39].

Los cuatro regímenes tienen características distintas y únicamente el *Squeezing*, *Dripping* y *Jetting* muestran formación de gota. Si las propiedades fisicoquímicas de los fluidos son constantes, la velocidad con la que avanzan dentro del microcanal se vuelve el parámetro de mayor importancia. La velocidad se puede manipular cambiando los flujos con los que se inyectan cada fase dentro del *microchip*. Para poder relacionar los flujos de las fases de trabajo, generalmente se habla de relaciones de flujo (Q_r) que de manera general se representa en la ecuación 3.

$$Q_r = \frac{\text{Flujo de la fase continua}}{\text{Flujo de la fase dispersa}} \quad \text{Ecuacion 3}$$

El *Squeezing* se presenta a relaciones de flujo (Q_r) más pequeñas (≤ 1.75) y a medida que aumenta Q_r , el régimen observado evoluciona a *Dripping* disminuyendo el tamaño de las

microgotas. Si se sigue aumentando Q_r se presenta el fenómeno de *Jetting* caracterizado por la formación de un hilo debido desplazamiento de la fase dispersa más allá de la zona de intersección de los microcanales. Se ha demostrado que el *Jetting* produce más gotas polidispersas que el *Squeezing o Dripping* [39].

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La elaboración de micropartículas poliméricas ha tomado gran relevancia en las últimas décadas debido a las múltiples aplicaciones que pueden recibir. Por esta razón, se han desarrollado una gran cantidad de procedimientos y técnicas con la finalidad de modificar sus características estructurales y superficiales. Características como el tamaño, distribución, estructura superficial o interna son de gran relevancia para el tipo de aplicación que reciben debido a las ventajas que presentan con respecto a micropartículas solidas

El desarrollo y preparación de micropartículas porosas se ha convertido en un campo de interés debido a las ventajas que presentan y a las múltiples aplicaciones que se les puede dar dentro de áreas como la química, catálisis, ingeniería de tejidos y liberación de fármacos.

Aplicadas dentro de los sistemas de liberación de fármacos, además de la estructura, el tamaño y la polidispersidad de las micropartículas juega un papel muy importante en la liberación del fármaco y la eliminación de la matriz, por lo que técnicas que ofrezcan un control en estos parámetros permiten mejorar sus propiedades en el tratamiento de enfermedades. Actualmente, las técnicas empleadas para su elaboración no logran ofrecer un control adecuado en el tamaño y la dispersidad de las micropartículas por lo que el desarrollo o mejora de las técnicas representa un reto para la ciencia trayendo beneficios para el área farmacéutica.

El propósito de esta investigación fue el desarrollo de micropartículas porosas de policaprolactona, teniendo control en el tamaño y la polidispersidad mediante el uso de un sistema de microcanales para su aplicación en la elaboración de sistemas de liberación controlada de fármacos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Elaborar y caracterizar micropartículas porosas de policaprolactona, empleando un *microchip* de microfluídica, como posibles acarreadores para el desarrollo de un sistema de liberación controlada de fármacos.

3.2 Objetivos particulares

- Diseñar un sistema de microcanales, mediante el software Librecad, para la fabricación de la fotomáscara para la elaboración del molde maestro de *microchips*.
- Elaborar un molde maestro para la obtención la elaboración de *microchips* de PDMS
- Determinar el tipo de tratamiento que le conferirle mayor resistencia al PDMS sobre disolventes orgánicos.
- Evaluar la influencia del tamaño de los microcanales en la formación de las microgotas.
- Evaluar la influencia del ángulo de corte en la geometría del microchip durante la formación de las microgotas.
- Elaborar micropartículas de policaprolactona porosas por la técnica de emulsión- evaporación de disolvente a partir de microgotas elaboradas con microfluídica.
- Determinar la influencia de la concentración de porógeno (canfeno) sobre el tamaño y estructura de las micropartículas.
- Determinar la influencia del método de secado sobre la morfología y tamaño de las micropartículas.
- Caracterizar las micropartículas obtenidas, determinando tamaño de partícula, estructura y porosidad mediante microscopia electrónica de barrido (SEM).

4 HIPÓTESIS

Mediante el uso de un sistema de microcanales, será posible obtener una emulsión formada por microgotas monodispersas de una disolución de polímero y un porógeno, a partir de las cuales y mediante la técnica de emulsión- evaporación de disolvente, se obtendrán micropartículas poliméricas porosas y monodispersas las cuales pueden ser empeladas en la elaboración de un sistema de liberación controlada de fármacos.

5 METODOLOGÍA

5.1 Materiales

Policaprolactona (PCL, $(C_6H_{10}O_2)_n$, Mw 45 KDa), alcohol polivinílico (PVA, $(C_2H_4O)_n$, hidrolizado 87-89%, Mw 13-23 KDa), alcohol polivinílico (PVA $(C_2H_4O)_n$, hidrolizado 87-89%, Mw 84-126 KDa), rojo nilo ($C_{20}H_{18}N_2O_2$), Triton X-100, tetraetilortosilicato (TEOS, $SiC_8H_{20}O_4$), hexadecano ($C_{16}H_{34}$, 99%) adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, USA); ácido sulfúrico (H_2SO_4 , $\geq 98\%$) cloruro de metileno (CH_2Cl_2 , pureza 99.9%) obtenidos de J.T. Baker; canfeno ($C_{10}H_{16}$) adquirido de Productos Químicos El Trébol (Ciudad de México, México); agua desionizada se obtuvo con el equipo Nanopure Diamond (Barnstead); sylgard 184 Kit (polidimetilsiloxano $(C_2H_6OSi)_n$ (PDMS) y agente curante) obtenido de Dow Chemical Company (Midland, MI, USA), resina SU-8 obtenida de MicroChem (Westborough, MA, USA).

5.2 Elaboración de los *microchips*

5.2.1 Diseño de los *microchips*

El diseño de los microcanales que conforman al chip se realizó con el uso del software de descarga libre LibreCAD (QCAD). Se optó por usar dos diseños, en las cuales los ángulos de corte fueron de 30° y 90° , respectivamente, con respecto al canal de salida, la figura 10 muestra los dos diseños elaborados. Los dos diseños cuentan con una entrada para la fase acuosa (fase continua) y una entrada para la fase oleosa (fase dispersa), así como una zona de corte de fases. Finalmente cuentan con un canal de salida por donde son retiradas las microgotas del chip para su recolección.

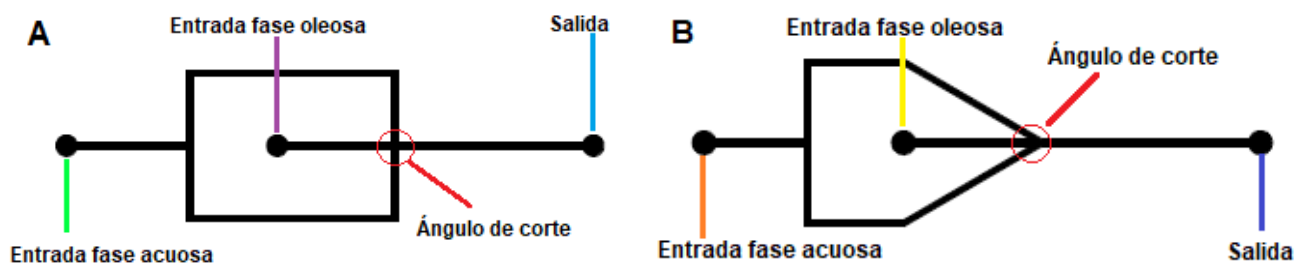


Figura 10. Diseño de las geometrías elaboradas para la fabricación de los *microchips*. (A) Diseño con ángulo de corte a 90° (B) Diseño con ángulo de corte a 30° .

Además, los diseños se elaboraron usando dos anchos de canal diferentes, de 200 y 300 μm por lo que en total se obtuvieron 4 *microchips* distintos, elaborándose varias copias ordenadas

de cada uno para ser impresos en negativo sobre un acetato, la figura 11 muestra el orden de los diseños. Estas impresiones funcionaron como máscara maestra para la fabricación de los moldes maestros. Cada máscara cuenta con 3 copias de cada diseño de los *microchips*, la máscara “1” cuenta únicamente con *microchips* de 200 μm de ancho y la máscara “2” con *microchips* de 300 μm de ancho.

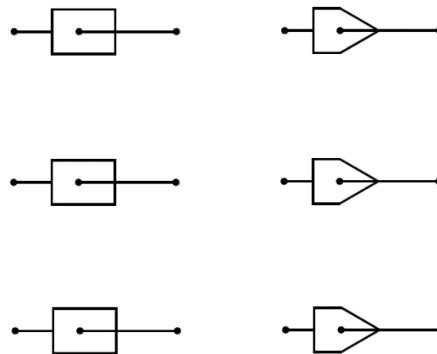


Figura 11. Orden de los diseños de *microchips* elaborados para ser impresos en acetato negativo para la elaboración de la máscara maestra. El orden es el mismo para las máscaras de 200 y 300 μm .

5.2.2 Fabricación del molde de *microchips*

Se empleó la técnica de fotolitografía usando la resina fotosensible SU-8 3035 y obleas de silicio ($r=3.81$ cm, Silicon Valley Microelectronics) como base para el molde. Se elaboraron dos moldes, uno para chips de 300 μm de ancho y otro para chips de 200 μm de ancho usando las dos mascararas maestras previamente impresas en negativo.

Se inició con un lavado de dos obleas en solución piraña ($\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 5:1) por dos días para eliminar posible materia orgánica. Posteriormente se lavaron con jabón neutro. Una vez limpias, cada oblea se trabajó por separado para la elaboración de cada molde siguiendo casi el mismo procedimiento [40].

Se calentó la oblea por 5 minutos a 200°C para deshidratarla, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se colocó dentro del *Spin coater* previamente programado a dos pasos:

- Paso 1: 500 RPM por 12s, con una aceleración de 100RPM/s
- Paso 2: 1000 RPM por 30s, con una aceleración de 300RPM/s

Durante el paso 1 se comprobó que la oblea está bien colocada, mientras que en el paso 2 se añadió la resina SU-8 (3.0 g). En este caso, 1000 RPM por 30 segundos otorgan una altura de aproximadamente 80µm.

Una vez terminado el segundo paso se retiró la oblea del equipo y se calentó a 95°C por 30 minutos, a este paso se le conoce como *Pre-bake*. Además, para la oblea con *microchips* de 300 µm de ancho se realizó una segunda adición de resina SU-8 siguiendo el mismo procedimiento y con la misma programación del *Spin coater* a dos pasos, se retiró la oblea del equipo y se realizó un segundo *Pre-bake* a 95°C por 20 minutos.

Cuando la oblea llegó a temperatura ambiente, se colocó la máscara maestra sobre la oblea y cada diseño de *microchip* se expuso a luz ultravioleta (UV) mediante el uso de una lámpara. Para la oblea con *microchips* de 300 µm de ancho la exposición fue durante 76 segundos, mientras que para el molde con *microchips* de 200 µm de ancho la exposición fue por un lapso de 40 segundos. Ya que todos los *microchips* fueron expuestos a luz UV se retiró la máscara maestra y se realizó un segundo calentamiento o *Post-bake* en dos pasos, primero 2 minutos a 65°C y posteriormente 10 minutos a 95°C.

Finalmente se dejó enfriar la oblea y se colocó dentro de un recipiente vacío, se añadió el agente revelador y se mantuvo con agitación manual, por aproximadamente 12 minutos, transcurrido el tiempo se removieron los restos de la resina no polimerizada con isopropanol y se calentó por última vez a 205°C por 8 minutos.

5.2.3 Elaboración de los *microchips* de PDMS

Cada oblea con los diseños plasmados, se colocó dentro de una caja Petri de plástico, se limpió con aire comprimido y se llenó con una mezcla 10:1 de PDMS y agente curante, se introdujo en el desecador para eliminar las burbujas de aire y posteriormente se incubó a 70°C por dos horas.

Una vez polimerizados los *microchips* fueron cortados uno por uno y se les hicieron las perforaciones en las entradas y salida con un punzón de 0.75 mm (EMS, Rapid Core) para ser fijados a un portaobjetos empleando un tratamiento con plasma de oxígeno (Corona Treater, Electro-technic Products) durante 45 segundos sobre el portaobjetos y el *microchip*. Finalmente se incubaron a 70°C por un lapso de 12 a 24 horas. Este procedimiento se realizó en repetidas ocasiones, para cada uno de los *microchips* utilizados.

5.3 Caracterización de los *microchips*

Se realizó la medición de cada uno de los *microchips* para determinar las dimensiones de altura y anchura que poseen. Para ello, cada uno de los *microchips* fue recortado en varios segmentos de manera perpendicular a los canales. Cada corte fue observado al microscopio a 100x y fotografiado. La altura y anchura fueron determinadas empleando el programa ImageJ (National Institutes of Health).

5.4 Modificación de las características del PDMS

Se realizaron cuatro distintos tratamientos al PDMS, dentro de canales de los *microchips* por los que habría flujo de fase oleosa (Qo) al momento de fabricar los *microchips*.

5.4.1 Tratamiento con H₂SO₄

Se preparó una disolución de H₂SO₄ al 81% v/v en agua desionizada (8.45 mL H₂SO₄ con 1.55 mL agua), esta disolución se introdujo dentro de los canales de un *microchip* sellado y se dejó reposar por 30 minutos. Posteriormente la disolución fue retirada con ayuda de aire y se realizaron 2 lavados con agua desionizada para eliminar residuos de H₂SO₄.

5.4.2 Incorporación de tensoactivos: Triton X-100

Durante el llenado de molde se añadió a la mezcla de PDMS y agente curante, Triton X-100 a concentraciones de 1.2% y 0.75 % m/m. Se colocó el molde en el desecador para eliminar las burbujas de aire y posteriormente se incubó a 70°C por 24 horas. Finalmente se recortaron los *microchips* y se pegaron a un portaobjetos con tratamiento de plasma por 45 segundos.

5.4.3 Recubrimiento con Tetraetilortosilicato

Se preparó una mezcla 1:1 de TEOS (2.0 mL) y acetona (2.0 mL). El tratamiento se realizó después de pegar el *microchip* al portaobjetos, dejándolo reposar por 10 minutos, transcurrido el tiempo se introdujo en el canal la mezcla TEOS-Acetona y se dejó incubar por 60 minutos a 70°C. Finalmente se retiró la solución remanente en los canales con aire y se realizaron 2 lavados con agua desionizada para eliminar residuos.

5.4.4 Recubrimiento con Alcohol polivinílico

Se preparó una disolución 1% m/v de PVA (0.25g) en agua desionizada (25.0mL) a 60°C la se filtró antes de ser empleada. Se le realizó un tratamiento con plasma al *microchip* en la entrada de la fase discontinua y en la salida del sistema de microcanales por 45 segundos en cada

una, enseguida se introdujo en el canal la disolución de PVA y se dejó en reposo por 10 minutos. Transcurrido el tiempo se retiró la disolución y se realizaron dos lavados con agua desionizada. Finalmente se incubo por 10 minutos a 70°C para eliminar todo el rastro de humedad.

5.4.5 Evaluación de los tratamientos

Para la evaluación se introdujo una disolución al 0.5% m/v de Rojo Nilo (0.025 g) en hexadecano (5.0 mL) en los microcanales y se dejó en reposo por 10 minutos, transcurrido el tiempo se retiró la disolución y se observó cada *microchip* al microscopio (Leica Microsystems) a 40x acoplado a una lampara (PhotoFluor II, Chroma, 89 North) con luz verde a longitud de onda $\lambda = 550-570$. Como blanco se utilizó un *microchip* sin tratamiento y se le realizó el mismo procedimiento.

5.5 Elaboración de micropartículas poliméricas porosas de policaprolactona

5.5.1 Prueba de estabilidad de las microgotas. Selección de la concentración de PVA

Se empleó como fase orgánica una disolución de la PCL en DCM al 5% m/v y como fase acuosa disoluciones de PVA en agua desionizada a concentraciones de 0.5%, 1%, 2% 3% y 5% m/v. Se añadió 1mL de la fase orgánica por goteo a flujo de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ en 10 ml de PVA de cada concentración para observar la estabilidad de las gotas formadas. Una vez añadida por completo la disolución se agito magnéticamente a 150 RPM, aumentando la velocidad 50 RPM cada 10 minutos hasta llegar a 600 RPM. Las gotas se analizaban de manera visual y se anotaban los cambios antes de aumentar la velocidad.

5.5.2 Elaboración de microgotas

Las microgotas se elaboraron dentro de un *microchip* previamente recubierto con PVA. Para ello, se hizo pasar una disolución de PVA en agua desionizada al 2% m/v por la entrada de la fase acuosa y una solución de PCL en DCM al 5% m/v por la entrada de la fase oleosa. Las fases fueron inyectadas, con ayuda de bombas para jeringas (New Era Pump Systems, Inc.) a diferentes relaciones de flujos (Q_r) manteniendo constante el flujo de la fase oleosa (Q_o) y variando el flujo de la fase acuosa (Q_a) como se muestra en las tablas 1 y 2. Las gotas fueron recolectadas en 10 mL de una disolución de PVA al 2% m/v.

Con ayuda de un microscopio óptico (Leica Microsystems) y una cámara Phantom de alta velocidad (Ametek, Inc) se observó a 40x la formación de gota en la zona de corte para cada uno de los 4 diseños de *microchips*. Los flujos evaluados se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 1. Flujos evaluados para *microchips* de 300µm de ancho °

Qo (µL/min)	Flujos fase acuosa (Qa) (µL/min)											
	5	10	20	30	40	50	100	200	300	400	500	600
1	5	10	20	30	40	50	100	200	300	400	500	600
5	5	10	20	30	40	50	100	200	300	400	500	600
10	5	10	20	30	40	50	100	200	300	400	500	600
15	5	10	20	30	40	50	100	200	300	400	500	600
20	5	10	20	30	40	50	100	200	300	400	500	600
25	5	10	20	30	40	50	100	200	300	400	500	600
30	5	10	20	30	40	50	100	200	300	400	500	600
40	5	10	20	30	40	50	100	200	300	400	500	600
50	5	10	20	30	40	50	100	200	300	400	500	600

Tabla 2. Flujos evaluados para *microchips* de 200µm de ancho

Qo (µL/min)	Flujos fase acuosa (Qa) (µL/min)											
	0.1	0.5	1	5	10	20	30	40	50	100	150	200
0.1	0.1	0.5	1	5	10	20	30	40	50	100	150	200
0.5	0.1	0.5	1	5	10	20	30	40	50	100	150	200
1	0.1	0.5	1	5	10	20	30	40	50	100	150	200
2	0.1	0.5	1	5	10	20	30	40	50	100	150	200
4	0.1	0.5	1	5	10	20	30	40	50	100	150	200
6	0.1	0.5	1	5	10	20	30	40	50	100	150	200
8	0.1	0.5	1	5	10	20	30	40	50	100	150	200

5.5.3 Influencia de las variables de fabricación en la obtención de las microgotas

Con los intervalos de flujo en los cuales se determinó que hay una formación de gota adecuada, se realizó un mapeo de cada uno de los 4 diseños de *microchips*. Para ello se empleó como fase acuosa PVA en agua desionizada al 2% m/v y como fases oleosas 3 distintas disoluciones que contenían PCL al 5% m/v y canfeno a concentraciones de 5, 10 y 15% m/v en DCM. Con ayuda de un microscopio (Leica Microsystems) se observó a 40x la zona de corte y el canal de salida para evaluar la formación de gota dentro del *microchip* a distintas Q_r observando el régimen que presentan y la forma de la gota obtenida. Cada relación de flujo se mantenía por un lapso de 2 a 5 minutos, hasta estabilizarse. Los flujos evaluados para cada *microchip* se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Flujos evaluados para *microchips* con canales de 300 μ m de ancho.

Relación de flujo	1	2	4	8	10	12	16	20	30	40	80
Flujo fase oleosa (Qo) (μ L/min)	Flujos fase acuosa (Qa) (μ L/min)										
5	5	10	20	40	50	60	80	100	150	200	400
10	10	20	40	80	100	120	160	200	400	-	-
20	20	40	80	160	200	240	320	400	-	-	-
30	30	60	120	240	300	360	-	-	-	-	-
40	40	80	160	320	400	-	-	-	-	-	-

Tabla 4. Flujos evaluados para *microchips* con canales de 200 μ m de ancho.

Relación de flujo	1	2	4	6	8	10	12	16	20	30	40	50	60	80	90
Flujo fase oleosa (Qo) (μ L/min)	Flujos fase acuosa (Qa) (μ L/min)														
0.5	0.5	1	2	3	4	5	6	8	10	15	20	25	30	40	45
1	1	2	4	6	8	10	12	16	20	30	40	50	60	80	-
2	2	4	8	12	16	20	24	32	40	60	-	-	-	-	-
3	3	6	12	18	24	30	36	48	-	-	-	-	-	-	-

Se tomaron distintas fotografías y videos de la formación de gota observada con ayuda de una cámara Phantom de alta velocidad (Ametek, Inc) y con ayuda del programa ImageJ (National Institutes of Health) se midió el diámetro de las gotas formadas dentro del canal de salida. Cuando la gota obtenida poseía forma alargada o elíptica, se midió únicamente el diámetro mayor.

5.5.4 Secado de las microgotas

Se trabajó con un *microchip* con ángulo de corte de 90° y 300µm de ancho. Se empleó como fase oleosa una disolución de PCL al 5% m/v y canfeno al 15% m/v en DCM y PVA en agua desionizada al 2% m/v como fase acuosa. Se trabajó con flujos de 40-40, 40-80 y 30-120µL/min para la fase oleosa y la fase acuosa respectivamente. Se elaboraron 3 lotes de cada relación de flujo recolectando 2ml de fase orgánica en forma de microgotas en 10mL de la fase acuosa. Finalmente, un lote de microgotas de cada relación de flujo se secó mediante alguna de las siguientes metodologías:

- a) Secado por difusión con agitación magnética: Inmediatamente después de elaborar los lotes de microgotas, se colocaron en agitación a 160 RPM por aproximadamente 48 horas a temperatura ambiente hasta observar la formación de partículas sólidas.
- b) Secado a presión reducida: Los lotes se dejaron en reposo a 10°C durante 6 días y posteriormente con ayuda de un evaporador rotativo, rotavapor, las microgotas se secaron por 1 hora a una presión de 500 mm Hg a temperatura ambiente.
- c) Secado por difusión: Las microgotas se secaron a una temperatura de 10°C durante aproximadamente 20 días.

Finalmente, las micropartículas obtenidas se liofilizaron y se observaron mediante SEM.

5.5.5 Influencia de la concentración de canfeno en la porosidad

Se empleó un *microchip* con ángulo de corte de 30° y 300 µm de ancho. Se elaboraron cinco lotes de microgotas trabajando a flujos de 30µL/min y 120µL/min para la fase oleosa y la fase acuosa respectivamente, recolectando 2mL de fase oleosa en forma de microgotas en cada caso. Como fase acuosa nuevamente se empleó una disolución de PVA en agua desionizada al 2% m/v y como fases oleosas cinco disoluciones de PCL al 5% con distintas concentraciones de canfeno al 0, 5, 10, 15 y 20% m/v en DCM. Las microgotas se secaron con Evaporador rotativo por 1 hora a una presión de 500 mmHg.

Las MPP obtenidas se lavaron con agua desionizada para eliminar el PVA y se liofilizaron por 2 días (Temperatura de -50°C a 5°C y presión de 0.021 milibar) para finalmente ser observadas mediante SEM.

5.5.6 Relación entre el tamaño de gota y tamaño de partícula

Se empleó un *microchip* de 300 µm de ancho y ángulo de corte de 30° para elaborar cuatro lotes de microgotas a flujos de 40-40, 40-80, 30-120 y 20-200 µL/min para la fase oleosa y la fase acuosa respectivamente.

La fase oleosa empleada fue PCL y canfeno al 5% y 15% m/v respectivamente en DCM y como fase acuosa PVA en agua desionizada al 2% m/v. Se recolectaron 2 ml de fase oleosa en forma de microgotas. Durante el proceso de fabricación se tomó una muestra de las microgotas las cuales se observaron al microscopio y fotografiaron con ayuda de una cámara para microscopio (Dino-Lite Digital Microscope) a 25x, 40x y 100x. Posteriormente los lotes se dejaron en reposo por 3 días para luego ser secados a presión reducida por una hora (presión de 500 mm Hg a temperatura ambiente) mediante un evaporador rotativo. Las MPP obtenidas se liofilizaron por 48 horas y finalmente se observaron al microscopio y fotografiaron de igual manera a 25x, 40x y 100x. Con las fotografías obtenidas se determinó el diámetro promedio de gota y partícula empleando el programa ImageJ (National Institutes of Health).

5.5.7 Caracterización de las micropartículas obtenidas

A las MPP obtenidas se les realizó un espectro de FT-IR el cual se comparó con el espectro de FT-IR del canfeno y la PCL pura. Además, mediante SEM se evaluó la morfología y tamaño de las MPP.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Fabricación del molde de los *microchips*

La técnica empleada para la elaboración de los dos moldes maestros fue fotolitografía, en la cual se emplea una resina fotosensible que se adhiere a una oblea de silicio al exponerse a luz UV, muchas veces en esta etapa la adherencia no ocurre de manera adecuada debido a un tiempo de exposición inadecuado o por un mal lavado de la oblea. El principal inconveniente es que este tipo de problemas no se observan hasta la etapa final del proceso, cuando se añade el agente revelador.

Al elaborar los dos moldes empleados en esta investigación no todos los diseños se grabaron de manera adecuada sobre la oblea, haciendo inservible dicho diseño (figura 12). Esto puede deberse a que la exposición a la luz UV no se realizó de manera adecuada ya que las zonas en las que se ubican dichos arreglos corresponden a las zonas bajas de la oblea, en las cuales se dificultaba más colocar la máscara protectora a la exposición UV y en donde se llegaban a producir marcas o sombras de los agentes empleados durante los lavados y enjuagados de la oblea como agua o isopropanol.

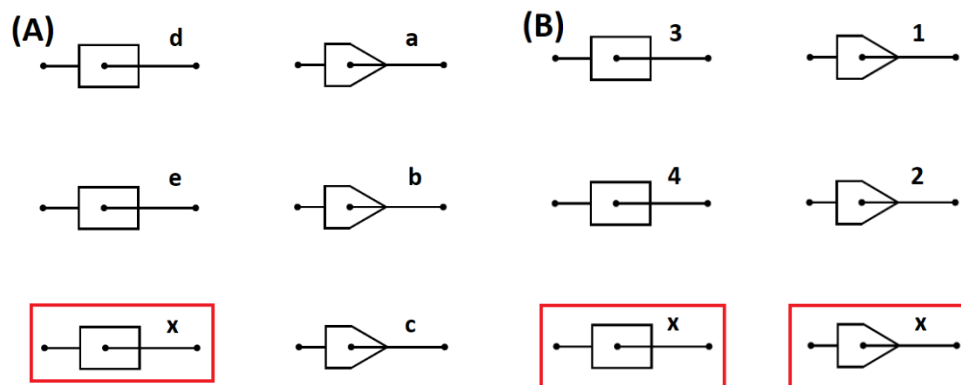


Figura 12. Arreglo de los diseños de microchips para los moldes de (A) 200 μm y (B) 300 μm . Se indica con un recuadro los diseños de microchips que no se grabaron de manera adecuada.

6.2 Caracterización de los *microchips*

Debido a que la fotolitografía consta de una gran cantidad de pasos, las dimensiones que poseerán los diseños grabados dependen de diversos factores como la velocidad de homogenización de la resina, el tiempo de calentamiento y el tiempo de exposición a la luz UV. Por estas razones fue necesario determinar con exactitud las dimensiones que poseen cada

uno de los diseños plasmados en los moldes para los *microchips*. Con las mediciones realizadas a los cortes de los microcanales de cada *microchip* (figura 13C y 13D) se determinaron los valores reales de altura y anchura promedio que poseen. Los valores se muestran en las tablas 5 a 7.

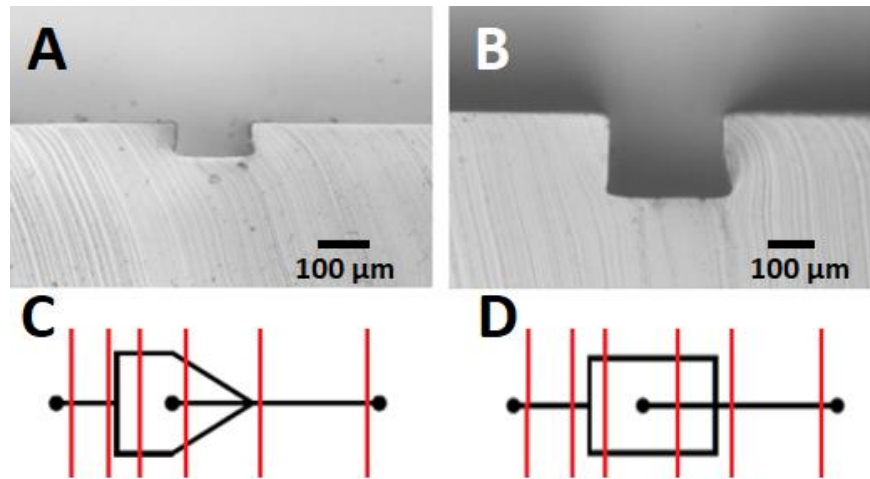


Figura 13. Fotografías de los cortes realizados a (A) un *microchip* de 200 μm y (B) un *microchip* de 300 μm observados al microscopio a 10x. Se muestran los diseños para los *microchips* con ángulo de corte de (C) 30° y (D) 90° con líneas rojas que indican las zonas en las que se realizaron cada uno de los cortes.

Tabla 5. Dimensiones promedio de alto y ancho para los *microchips* del molde B (300 μm de ancho).

Parámetro	Microchip 1 (30°)		Microchip 2 (30°)		Microchip 3 (90°)		Microchip 4 (90°)	
	Altura (μm)	Ancho (μm)	Altura (μm)	Ancho (μm)	Altura (μm)	Ancho (μm)	Altura (μm)	Ancho (μm)
Promedio	198.48	284.24	194.90	312.99	214.23	286.19	196.13	299.30
Desv. Est.	15.75	21.49	16.60	7.75	7.61	13.08	13.07	8.97
CV%	7.9	7.6	8.5	2.5	3.6	4.6	6.7	3.0

Tabla 6. Dimensiones promedio de alto y ancho para los *microchips* del molde A (200 μm de ancho).

Parámetro	Microchip A (30°)		Microchip B (30°)		Microchip C (30°)		Microchip D (90°)		Microchip E (90°)	
	Altura (μm)	Ancho (μm)	Altura (μm)	Ancho (μm)	Altura (μm)	Ancho (μm)	Altura (μm)	Ancho (μm)	Altura (μm)	Ancho (μm)
Promedio	74.89	174.73	75.53	189.25	77.16	187.29	74.64	170.64	76.85	170.16
Desv. Est.	4.45	6.60	5.37	10.83	1.77	10.32	2.94	12.69	2.44	6.87
CV%	5.9	3.8	7.1	5.7	2.3	5.5	3.9	7.4	3.2	4.0

Tabla 7. Dimensiones promedio de alto y ancho por molde

Parámetro	Molde A (200µm)		Molde B (300µm)	
	Altura (µm)	Ancho (µm)	Altura (µm)	Ancho (µm)
Promedio	75.81	178.41	200.93	298.68
Desviación estándar	1.14	9.20	8.99	13.33
CV%	1.5	5.2	4.4	4.5

Los moldes fueron elaborados esperando obtener *microchips* con dos dimensiones distintas, por un lado, un molde “A” con microcanales de 200µm de ancho por 80 µm de alto y por otro un molde “B” con microcanales de 300 µm de ancho por 160 µm de alto. El fabricante de la resina fotosensible SU-8, MicroChem® indica las condiciones que se deben seguir para obtener las dimensiones deseadas de altura para los microcanales (figura 14), siendo la velocidad con la que se dispersa la resina el factor más importante.

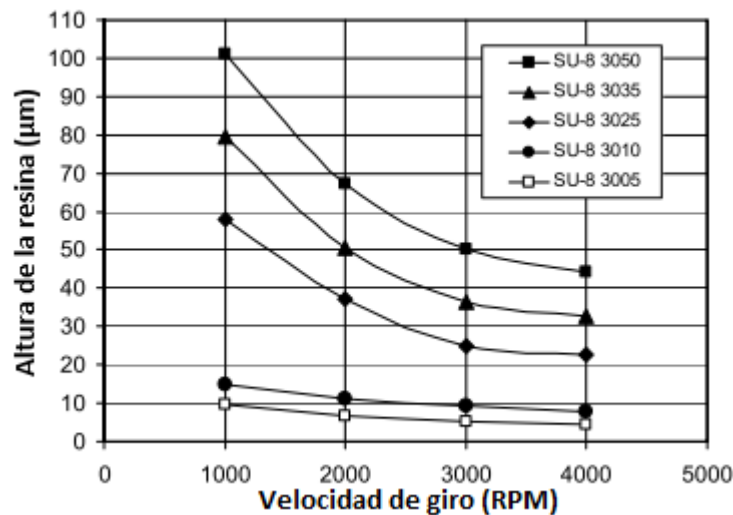


Figura 14. Velocidad de giro vs altura de la capa de resina SU-8 300. En el caso de la resina SU-8 3035 cuando se trabaja a 1000 RPM se obtiene una altura de 80µm. Tomado de [40].

Dentro de las dimensiones promedio obtenidas, estas son muy cercanas a las esperadas pero en el caso de la altura para el molde de B (alto: 200.93 ± 8.99 y ancho: 298.68 ± 13.33) el valor es mucho mayor al esperado (160 µm), esto se puede deber a que se aplicaron dos capas de resina SU-8 a 1000 RPM, por lo que al estar en contacto con una superficie de la misma resina esta pudo tener una mejor adherencia al tratarse del mismo compuesto, fijándose de mejor

manera y generando un aumento en la altura de la capa o bien por el aumento en el tiempo de exposición a la luz UV, ya que al comparar con los resultados del molde A, al cual solo se le aplicó una capa de resina SU-8, no existe una diferencia tan grande entre el valor medido y el reportado por el fabricante de $75.81\mu\text{m}$ y $80\mu\text{m}$ respectivamente.

Finalmente, las fotografías tomadas a los cortes de los *microchips* de PDMS (figura 13A y 13B) muestran una deformación en los microcanales dado que no son rectos completamente llegando a presentar forma de trapecio y no rectangular. Esto se debe principalmente a la exposición a la luz UV, debido a que la fuente se coloca sobre la oblea de forma perpendicular, por lo que la radiación llega con mayor intensidad a la parte superior de la capa de resina y genera un aumento del ancho de canal con respecto a la parte más profunda y cercana a la oblea.

6.3 Modificación de las características del PDMS

La modificación más reportada y estudiada sobre el PDMS es el tratamiento con plasma de O_2 que genera una oxidación de la superficie debido a la destrucción de los grupos metilo (Si-CH_3) y la introducción de grupos terminales de tipo silanol (Si-OH) o la formación de una capa de sílice (SiO_x) la cual cuenta con propiedades hidrofílicas. Sin embargo, este proceso es temporal debido a la flexibilidad del PDMS, permitiendo una reorientación de las cadenas expuesta al interior y la migración de cadenas intactas hacia la superficie; por ello se han buscado otras alternativas más duraderas [30]. Además, el tratamiento con plasma de O_2 también es empleado para el sellado de los *microchips* sobre una superficie de vidrio, esto se logra gracias a que durante el proceso se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) en la zona que estuvo en contacto con el plasma de O_2 por lo que al unir el PDMS con el vidrio se forman enlaces covalentes, de tipo Si-O-Si [28], [30].

Debido a que dentro de la formulación empleada para la obtención de las MPP de PCL fue necesario el uso de DCM, un disolvente orgánico poco compatible con el PDMS, se optó por buscar alternativas que le confirieran mayor resistencia a los microcanales con la finalidad de ampliar la vida útil de cada *microchip*. Se evaluaron las 4 posibles modificaciones mediante microscopía de fluorescencia al colocar dentro de los *microchips* una disolución de Rojo Nilo en hexadecano.

El hexadecano es un compuesto orgánico no polar, capaz de difundir dentro de las cadenas de PDMS debido a sus propiedades hidrofóbicas. El rojo nilo es un sólido, soluble en disolventes orgánicos, con propiedades fluorescentes y que presenta un máximo de absorción a longitud de onda $\lambda = 550$ nm y un máximo de fluorescencia al ser excitado a esa longitud de onda de 570 nm, como se muestra en la figura 15. Las propiedades de ambos compuestos son ideales para evaluar los tratamientos al observar la difusión de la disolución hacia el interior del *microchip*: si logran difundir al interior indica que las paredes de los microcanales aun presentan características hidrofóbicas y, por el contrario, si no logran difundir es debido a un cambio en las propiedades superficiales del PDMS al perder o disminuir su hidrofobicidad y limitar el paso a disolventes orgánicos.

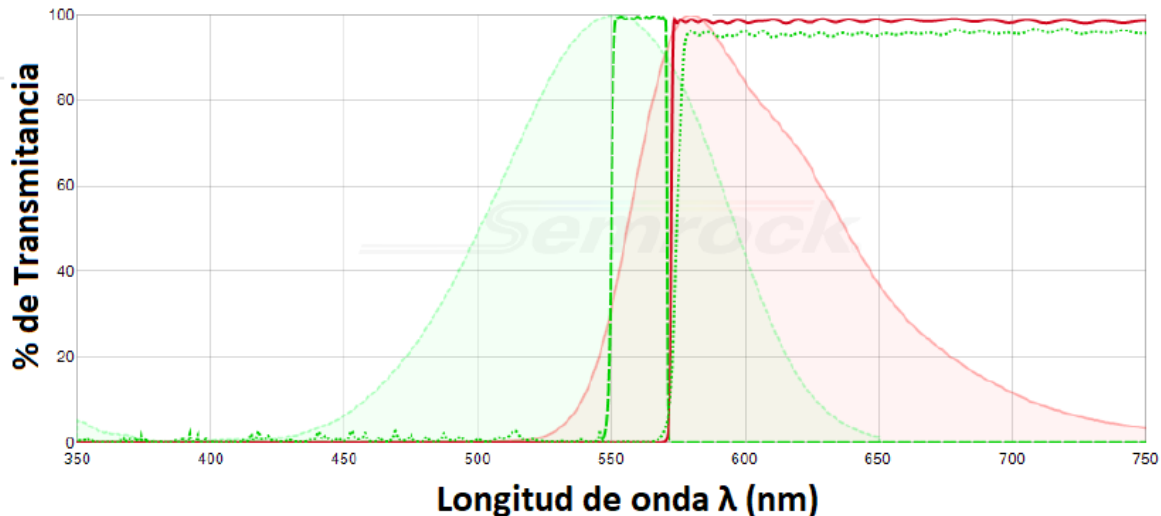


Figura 15. Espectro absorción (verde) y emisión (rojo) del Rojo Nilo, pero lo que vemos es absorbancia no transmitancia. Se muestra con líneas punteadas verdes el intervalo de longitud de onda ($\lambda=550-570$) al que trabaja el filtro usado para observar la fluorescencia del Rojo Nilo. Obtenido de SEMROCK.

Con la comparación entre las pruebas realizada (figura 16) se determinó que: El tratamiento con H_2SO_4 mostro la menor difusión de la disolución del rojo nilo a través de los microcanales, pero también provocó la formación de grietas y rupturas en el PDMS volviendo inservible al *microchip* debido a que podría provocar fugas de las fases empleadas para la formación de microgotas y con ellos variación en los flujos empleados al disminuir la presión dentro del microcanal; por ello este tratamiento quedó descartado. Por otro lado, el tratamiento con Triton X-100 no pudo ser evaluado debido a que no fue posible sellar los microchips al portaobjetos de vidrio mediante el tratamiento de plasma.

El caso de la deposición de PVA y TEOS es muy parecido, ya que en ambos tratamientos disminuye la difusión del hexadecano al interior del *microchip* y ninguno compromete la integridad del PDMS, así como la funcionalidad del dispositivo. El recubrimiento con PVA mostro un menor halo de difusión en la microscopia de fluorescencia, esto debido a que posee una estructura larga con la cual se puede recubrir una mayor área del microcanal al adherirse a su superficie además, no interacciona con el agua por lo que al realizar lavados no se verá afectado el recubrimiento.

Con el tratamiento de PVA, se logró modificar las características superficiales del PDMS, generando una capa hidrofílica que permite el empleo de DCM que se encuentra en de la fase oleosa para la elaboración de micropartículas de PCL, disminuyendo el hinchamiento o deformación de los microcanales y aumentando el tiempo de vida útil de cada *microchip* en comparación con uno que no recibió ningún tratamiento. Los *microchips* tratados con PVA podían ser usados cerca de 50 horas con un flujo continuo de DCM o alguna disolución orgánica, sin cambiar las dimensiones del microcanal o generar daños en el *microchip*.

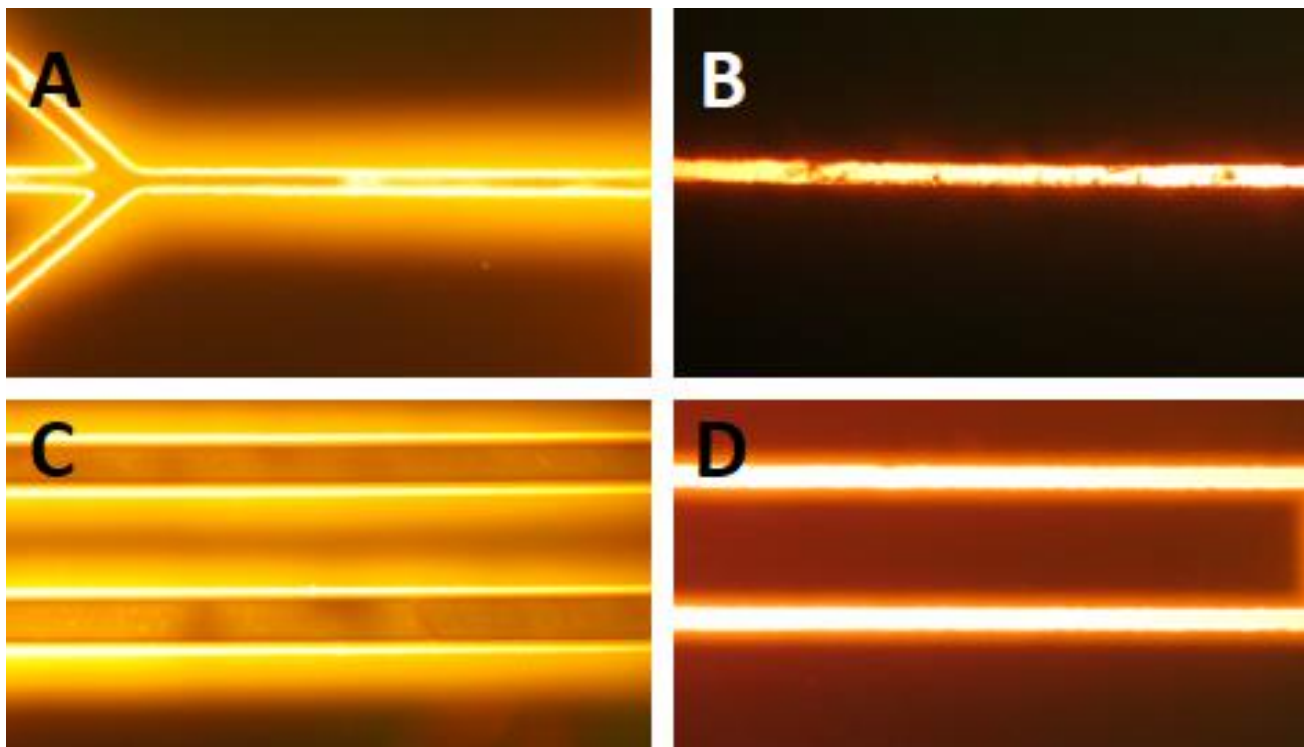


Figura 16. Evaluación mediante microscopia de fluorescencia de los distintos tratamientos aplicados al PDMS. Se muestran (A) Microchip control al cual no se le realizo ningún tratamiento, (B) Microchip tratado con H_2SO_4 , (C) Microchip recubierto con TEOS y (D) Microchip recubierto con PVA.

Las observaciones, resultados y explicaciones de cada tratamiento se muestran a continuación:

6.3.1 Tratamiento con H_2SO_4

Al finalizar el experimento, se notó a simple vista la aparición de una ligera capa color blanco en el interior del *microchip* en la zona en contacto con la disolución ácida. Sin embargo, el ácido fue tan corrosivo que también generó rupturas en los microcanales o en los orificios de entrada de fases del *microchip* por lo que era imposible conectar el sistema de tuberías sin que hubiera fuga de alguna de las fases a emplear para la formación de las microgotas. Estas rupturas se deben a la pérdida de elasticidad del polímero por la modificación química que sufren volviéndolas más frágiles haciendo que en el *microchip* se generen cuarteaduras, la figura 17 muestra algunas de estas zonas en donde el ataque por parte de H_2SO_4 generó daños al microcanal.

Al evaluar el recubrimiento con disolución de rojo nilo, se observó que no difunde al interior del *microchip*, lo que indica que se modificaron las propiedades hidrofóbicas en la superficie del PDMS debido a un cambio en la estructura química. Al estar en contacto el PDMS de los microcanales con la disolución concentrada de H_2SO_4 se genera una fragmentación de la cadena principal debido a la escisión y la desmetilación de los grupos laterales, además el H_2SO_4 estabiliza los grupos terminales de silanol formando organosulfatos [31].



Figura 17. Microscopía de fluorescencia de una disolución de rojo nilo en hexadecano dentro de sistema de microcanales de PDMS tratado con H_2SO_4 . Se pueden observar zonas rugosas (rupturas), marcadas con un recuadro blanco, cercanas a los microcanales debido al tratamiento aplicado.

6.3.2 Incorporación de Triton x-100

Este tipo de tratamientos se basan en la idea de formar una capa con propiedades hidrófilas en la superficie del *microchip* al añadir un tensoactivo, como el Triton x-100, antes de la polimerización. Esto es posible debido a la flexibilidad y movimiento que presentan las cadenas de PDMS una vez polimerizado por lo que, cuando entra en contacto la superficie del polímero con una solución acuosa, es posible la difusión de las moléculas de tensoactivo formando una monocapa en la interfase líquido-polímero, dicha capa orienta su parte hidrofílica al exterior otorgando propiedades hidrófilas [32].

A diferencia del PDMS nativo, los *microchips* elaborados tenían coloración blanca que se intensificaba en función de la concentración de tensoactivo empleado. Este procedimiento fue imposible de evaluar debido a que al tratar de pegar el *microchip* a la superficie de vidrio mediante el uso de plasma de O₂, este se desprendió por completo. Por otra parte, el sellado entre el vidrio y el PDMS se logra al forman enlaces covalentes, de tipo Si-O-Si, al aplicar el tratamiento con plasma. Al tener tensoactivo y generar una superficie con características hidrofílicas en el PDMS tratado con plasma, es muy probable que las moléculas de tensoactivo migren al exterior y eviten que la radiación sea aplicada sobre mas cadenas del polímero disminuyendo el efecto de la exposición al plasma. Además, las presencia del Triton X-100 también puede provocar una mayor movilidad entre las cadenas de PDMS haciendo que el reacomodo ocurra más rápido, e impide la formación de enlaces covalentes con el vidrio y evitando el sellado del *microchip* [28], [30].

6.3.3 Recubrimiento con Tetraetilortosilicato.

Al finalizar el procedimiento se observó la aparición de una ligera capa blanca sobre el microcanal tratado lo que indica la adherencia del TEOS (figura 18) a las cadenas de PDMS. Dicha capa no se removió de la superficie del microcanal al realizar los lavados con agua, razón por la cual se descartó la idea de que fueran residuos de la disolución de TEOS-acetona introducida.

Este recubrimiento se basa en la exposición a plasma de O₂ y la formación de ROS ancladas al silicio de la cadena de PDMS del microcanal que se desea recubrir. Cuando se introduce la disolución de TEOS se forman enlaces covalentes que unen de manera permanente las

moléculas de TEOS a la superficie del PDMS, confiriendo propiedades hidrofílicas a la superficie [33], [41].

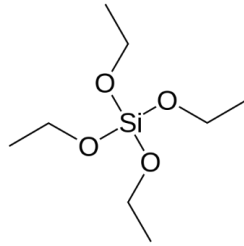


Figura 18. Estructura química del TEOS.

A pesar de ello, la evaluación con rojo nilo mostró una difusión de la disolución a través de los microcanales. Esto puede ser debido a que el TEOS se hidroliza en presencia de agua formando grupos silanol (Si-OH) [41], por lo que los lavados pueden disminuir la capa formada. Además, las moléculas de TEOS son muy pequeñas (figura 18) y pueden no cubrir por completo la superficie de los microcanales, dejando zonas sin recubrir que permiten la difusión del hexadecano. La unión entre las moléculas de TEOS y las cadenas de PDMS depende en gran medida de la cantidad de ROS que se encuentran en las paredes del microcanal y como el tratamiento con plasma se aplica dentro de un *microchip* sellado, este es poco uniforme a lo largo del microcanal provocando que en las zonas más internas exista una menor cantidad de radicales, disminuyendo la cantidad de enlaces formados y el grosor de la capa formada.

6.3.4 Recubrimiento con Alcohol Polivinílico

El PVA (figura 19) es un polímero con propiedades hidrofílicas y que puede ser adsorbido de manera irreversible en películas de polímeros hidrofóbicos, es un sólido y en disolución es incoloro. Al realizar la deposición en las cadenas de PDMS no se observó un cambio a simple vista. Sin embargo, al evaluar la difusión del hexadecano mediante microscopia de fluorescencia se notó una disminución en el halo con respecto a un *microchip* de PDMS al cual no se realizó ninguna modificación.

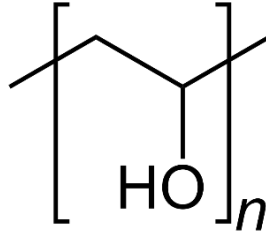


Figura 19. Estructura química del PVA

El recubrimiento es posible ya que al tratar los microcanales de PDMS con plasma de O_2 , se forman especies reactivas de oxígeno que se estabilizan en forma de hidroxilos alcohólicos (C–OH), silanoles (Si–OH) y ácidos carboxílicos (COOH) que logran unir, mediante enlaces covalentes, las moléculas de PVA y la superficie de PDMS. Dicha unión genera una capa con propiedades hidrofílicas a largo plazo en los microcanales tratados [34]. La difusión del rojo nilo observada en la microscopia de fluorescencia puede deberse a que el tratamiento con plasma no es uniforme en todo el microcanal tratado, generando zonas con menor cantidad de cadenas de PVA unidas y permitiendo el paso de moléculas con propiedades hidrofóbicas.

Para corroborar la formación de la capa de recubrimiento en el PDMS se le realizó FT-IR (figura 20) al polimerizado PDMS, a una muestra de PVA y una capa de PDMS tratada y lavada en repetidas ocasiones con agua desionizada. En resumen, la señal del PDMS tratado con PVA está formada por una mezcla entre las señales del PVA y el PDMS, es importante resaltar que presenta una banda muy ancha en la región de $3400-3200\text{ cm}^{-1}$ lo que indica la presencia de grupos -OH poliméricos, que son otorgados por el PVA anclado a la superficie, en tanto que presenta picos en $2970-2950\text{ cm}^{-1}$ indicando la presencia de grupos metilo.

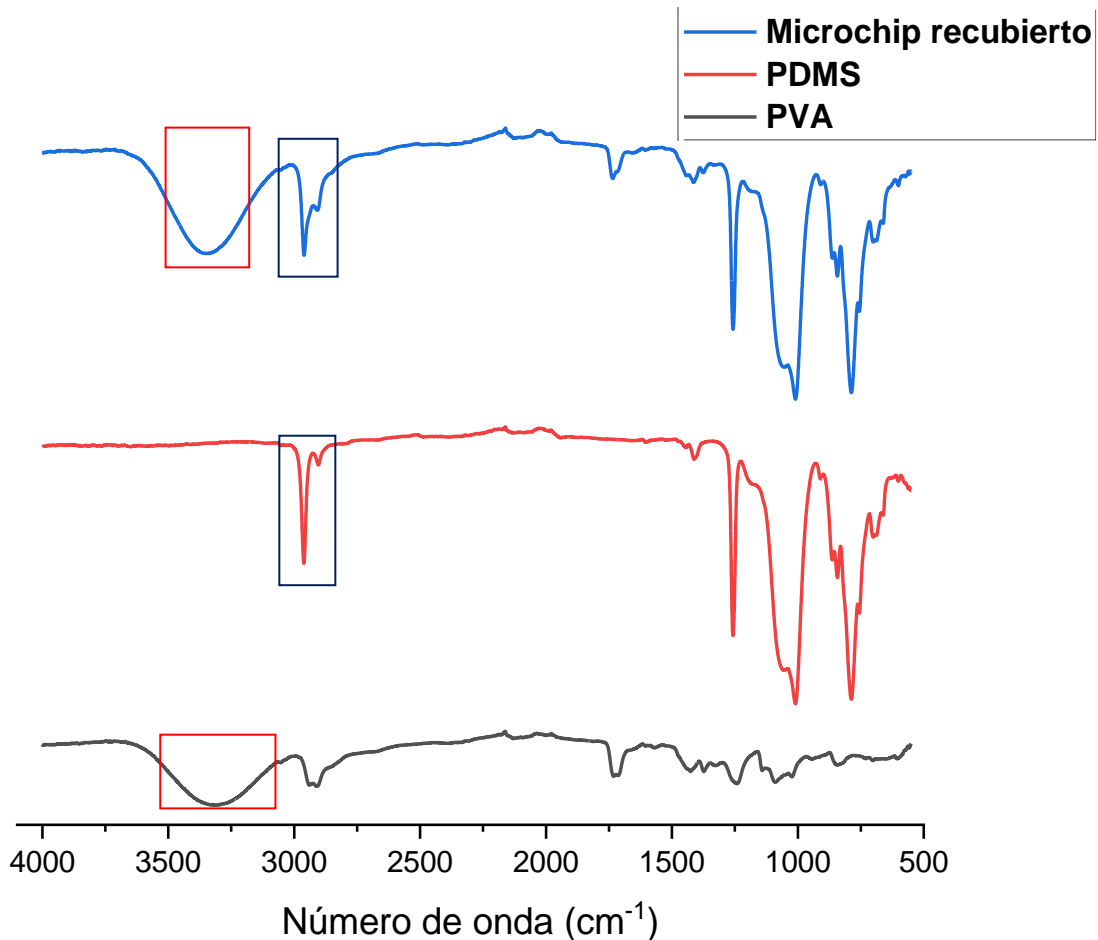


Figura 20. Espectro de FT-IR para PDMS (rojo), PVA (negro) y una sección de un microchip recubierto con PVA (azul). Se observa que la señal del microchip recubierto muestra los picos característicos del PDMS, siendo la señal de 2970-2950 cm^{-1} (recuadro azul) la que indica la presencia de los grupos metilo junto con la señal que presenta el PVA a 3400-330 cm^{-1} debido al -OH de la cadena; esto sugiere la formación de enlaces PDMS-PVA.

6.4 Elaboración de las micropartículas porosas de policaprolactona

6.4.1 Prueba de estabilidad de las microgotas. Selección de la concentración de PVA

Las gotas se sometieron a agitación empleando como fase acuosa disoluciones de PVA a distintas concentraciones para poder observar si estas coalescen, aumentan su tamaño o se disgregan, disminuyendo el tamaño inicial con la finalidad de encontrar la concentración de PVA a la cual se podían formarse microgotas estables. La prueba demostró que en concentraciones mayores o iguales a 2% de PVA las microgotas eran estables y no cambiaban su tamaño ante una agitación lenta (100-300 RPM) pero al llegar a velocidades más altas las microgotas disminuye su tamaño, siendo más pequeñas a concentraciones mayores de PVA.

El PVA es el tensoactivo más comúnmente usado para estabilizar emulsiones en la preparación de MPP por el método de emulsión- evaporación de disolvente. Esto es posible debido a que las cadenas de PVA logran interactuar en la interfase fase acuosa-fase orgánica reduciendo la tensión interfacial y evitando la coalescencia de las microgotas. Además, se ha demostrado que al finalizar el proceso de obtención de micropartículas puede quedar una fracción remanente de PVA asociada a la superficie de las MPP debido a que logra crear en la interfase una red interconectada con el polímero base de la matriz e imposible de eliminar con lavados de agua, en la figura 21 se muestra la presencia de PVA residual sobre la superficie de una MPP de PCL. La cantidad de PVA residual depende en gran medida de la concentración de la disolución empleada en la fase acuosa y su presencia puede tener influencia en parámetros como el tamaño de partícula, índice de polidispersidad, hidrofobicidad superficial e inclusive en la carga del fármaco [42].⁻¹

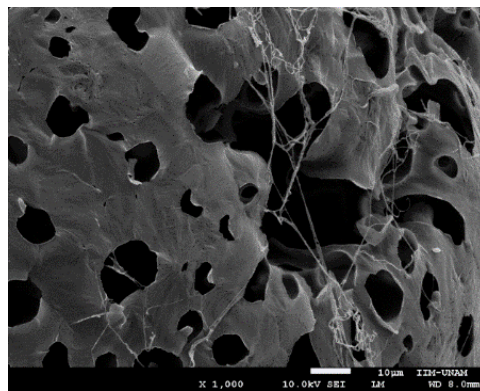


Figura 21. SEM de una MPP porosa de PCL. Se logran distinguir las de redes de PVA residual ancladas a la superficie.

Además, a concentraciones mayores al 3% la viscosidad de la disolución aumentaba considerablemente y dificultaba la introducción de la fase continua dentro del *microchip*, por ello se decidió usar como fase acuosa una disolución de PVA al 2% m/v para evitar la formación de redes de PVA residual ancladas a las micropartículas de PCL y permitir su uso dentro de un *microchip*. Es necesario resaltar que los lavados de las MPP son importantes para eliminar la mayor cantidad de PVA y evitar la formación de redes al liofilizar, las cuales pueden atrapar a las MPP aumentando la merma.

6.4.2 Elaboración de las microgotas

Al observar el paso de ambas fases a través del sistema de microcanales que conforman al *microchip* de PDMS, se logró determinar el tipo de régimen de flujo que presentan y con ello el intervalo de flujos a los cuales es posible obtener microgotas. Los 4 diseños estudiados presentan los 4 distintos regímenes de flujo: *Threading*, *Squeezing*, *Dripping* y *Jetting* tal y como se muestra en la figura 22. El régimen que se presenta durante el corte fases dentro del *microchip* repercute en la polidispersidad que tendrán las gotas formadas, es por eso que se buscó trabajar a flujos a los cuales se presente como fenómeno de corte *Squeezing* y *Dripping* debido a que presentan gotas con menor variación en comparación con el *Jetting*, que al realizar el corte fuera del cruce de los canales puede formar gotas con variación en su tamaño. Por otra parte, el fenómeno de *Threading* no forma microgotas dentro del microcanal por lo que se evitó trabajar a flujos que presenten ese régimen [39].

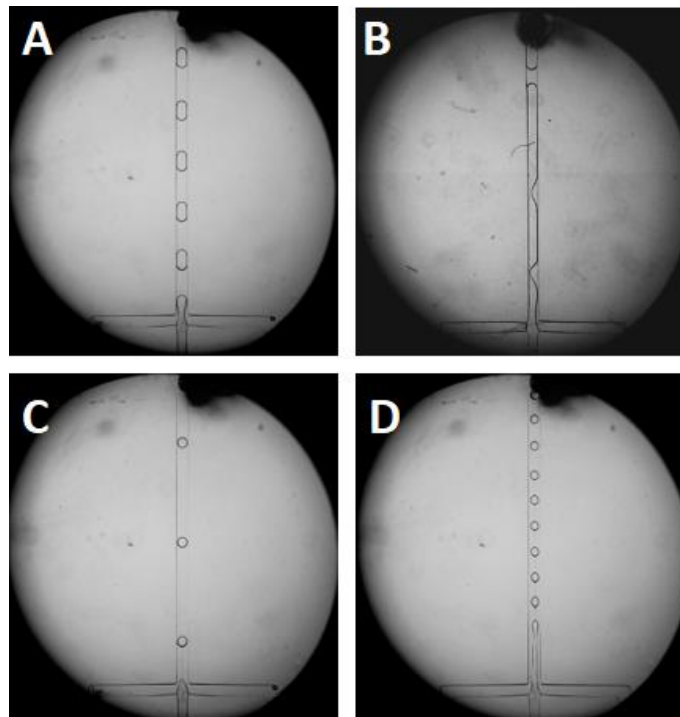


Figura 22. Regímenes de flujo observados dentro de un *microchip* elaborado en el laboratorio. Se muestran: (A) *Squeezing*, (B) *Threading*, (C) *Dripping* y (D) *Jetting*.

Con las observaciones realizadas se logró determinar los intervalos de flujos a los cuales era posible formar microgotas con los *microchips* elaborados en los moldes A ($178.41 \pm 9.20 \mu\text{m}$ de ancho por $75.81 \pm 1.14 \mu\text{m}$ alto) y B ($298.68 \pm 13.33 \mu\text{m}$ ancho por $200.93 \pm 8.99 \mu\text{m}$ alto). Se determinó que en los moldes con microcanales más pequeños era necesario trabajar a flujos en promedio diez veces más lentos en comparación con los de microcanales más

grandes, esto debido a la reducción del tamaño del microcanal, haciendo que a los flujos a los cuales se tiene un movimiento más ordenado y es posible la formación de microgotas de manera adecuada disminuyan. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Con los microchips del molde A, sin importar la geometría de corte se puede trabajar a Q_0 con valores 0.5 y 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ mientras que, para el molde B los Q_0 pueden encontrarse entre 5 y 45 $\mu\text{L}/\text{min}$. Además, los flujos que pueden emplearse en la fase acuosa dependen directamente del flujo que se emplea para la fase oleosa. Se observa que a valores bajos de Q_0 es posible trabajar a valores más altos de Q_a y a medida que aumenta el Q_0 es necesario disminuir el Q_a para poder formar microgotas dentro del *microchip*.

Tabla 8. Intervalos de flujo a los cuales hay formación de microgotas para los *microchips* de cada molde

Molde	Intervalo de flujo para fase oleosa ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Intervalo de flujo para fase acuosa ($\mu\text{L}/\text{min}$)
A	0-4	No hay formación de microgotas
	5-10	20-500
	10-20	10-400
	20-30	20-320
	30-40	30-300
	40-45	40-200
	45 o más	No hay formación de microgotas
	B	0-0.5
0.5-1		2-80
1-2		4-70
2-3		4-60
3-4		6-48
4-5		8-20
5 o mas		No hay formación de microgotas

Se observó que los regímenes de flujo aparecen en el siguiente orden: *Threading*, *Squeezing*, *Dripping*, *Jetting* y nuevamente *Threading* al aumentar las relaciones de flujo, Q_r , por lo que a flujos muy lentos o muy rápidos no hay formación de gota.

En cuanto a la formación de gota, los fenómenos de *Squeezing* y *Dripping* obtienen gotas monodispersas con forma ovalada para el primero y esférica en el segundo. Al entrar en el régimen de *Jetting*, hay una disminución del tamaño de las microgotas, pero también se llega a observar variaciones en los tamaños e inclusive es común la coalescencia de las gotas dentro del microcanal que trae como resultado un aumento en la dispersión (figura 23A y 23B). Esto

se relaciona con el Ca, donde al aumentar el Qr hay un aumento en la velocidad de los fluidos generando variaciones en las gotas obtenidas.

Además, una vez fuera del canal también llegó a presentarse la coalescencia de gotas dentro del tubo acoplado al chip para la recolección. Esto se puede deber al aumento en el diámetro del canal, disminuyendo la presión que experimentan las microgotas y con ellos su velocidad, favoreciendo un acercamiento y la fusión de las microgotas. Este fenómeno es más notorio a Qa altos, cuando el cambio en la presión es más evidente como se muestra en la figura 23-C.

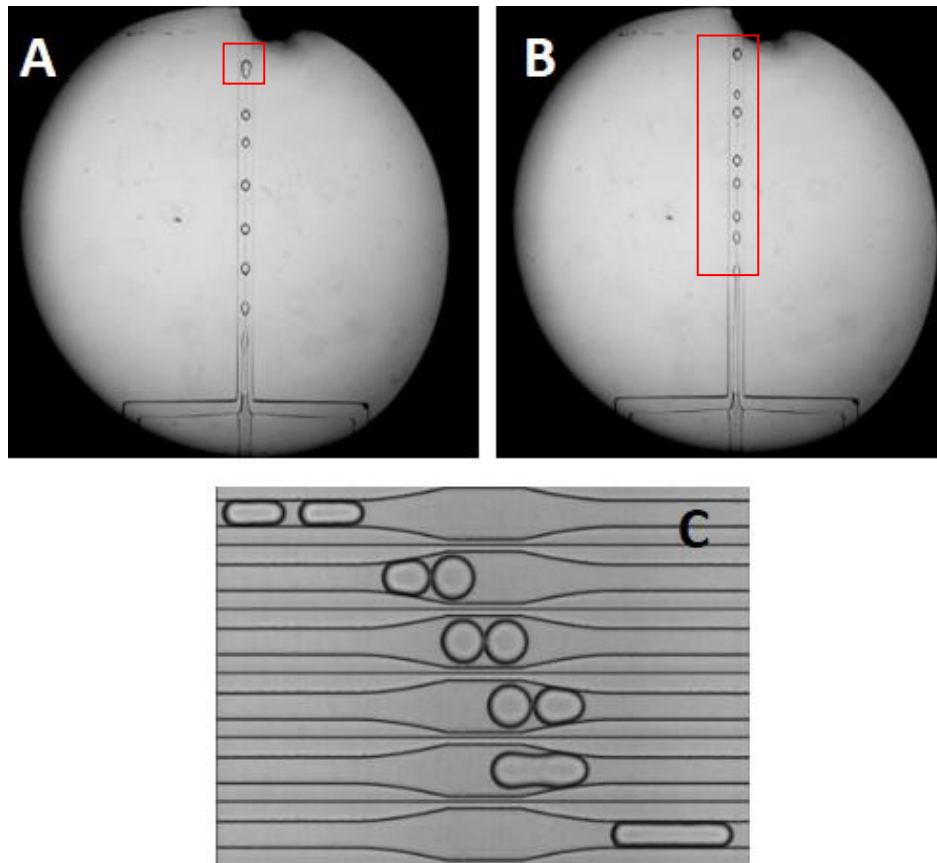


Figura 23. Régimen Jetting en el microchip de trabajo, se puede observar (A) la coalescencia de dos microgotas y (B) la variación en los tamaños de microgota que presenta dicho régimen. (C) Prueba para observar la coalescencia de dos microgotas debido al ensanchamiento de un microcanal (imagen C tomada de [36]).

6.4.3 Influencia de las variables de fabricación en el tamaño de las microgotas

Una vez definidos los intervalos de flujo a las cuales existe una buena formación de gota, se realizó la medición del tamaño de la microgota dentro del canal en función de la relación de flujo (Qr) (definida como: Q_a/Q_o) trabajada. Dentro del microcanal se obtuvieron dos tipos de microgotas: con forma esférica o con forma alargada semejantes a un elipsoide (figura 24).

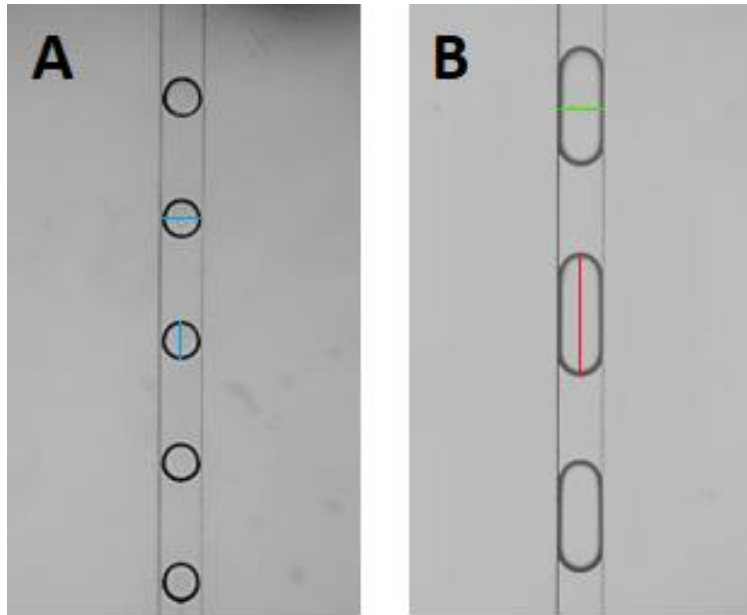


Figura 24. Forma que pueden presentar las gotas dentro de los microchips de trabajo. (A) Forma esférica debido a que el diámetro (en azul) que presenta es menor al ancho del microcanal o (B) Elipsoide que ocurre cuando el volumen de la microgota es muy grande y evita que se forme una esfera, alargándose y generando un diámetro menor que corresponde al ancho del microcanal (en verde) y un diámetro mayor que corresponde al largo de la gota (en rojo).

Cuando poseían forma esférica se midió el diámetro directamente de la fotografía tomada pero cuando tenían forma alargada se midió el diámetro mayor y se le aplicó un tratamiento matemático, partiendo del volumen que contiene, para obtener el diámetro teórico de una esfera con ese mismo volumen. Las ecuaciones empleadas para ello fueron:

Fórmula para el volumen un elipsoide

$$V = \frac{4}{3} \pi abc \quad (\text{ecuación 4})$$

Donde: $a = \frac{1}{2}$ de la altura del microcanal; $b = \frac{1}{2}$ del ancho del microcanal y

$c = \frac{1}{2}$ del diametro de la microgota

Fórmula para obtener el volumen de una esfera

$$V = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (\text{ecuación 5})$$

Donde: $r =$ radio de la esfera

Suponiendo que el volumen de la gota es constante y que al salir del *microchip* toma forma esférica se tiene que:

$$\text{Volumen elipsoide} = \text{Volumen esfera}$$

Despejando el radio r de la ecuación 5 tenemos que:

$$r = \sqrt[3]{\frac{3V}{4\pi}}$$

Finalmente, sabiendo que el diámetro (d) es el doble del radio tenemos que:

$$d = 2 \sqrt[3]{\frac{3V}{4\pi}}$$

Con las mediciones realizadas se obtuvo el diámetro promedio de la microgota, su desviación estándar y el CV%. Finalmente se realizaron distintas tablas y gráficas para evaluar la influencia de las variables en el tamaño y formación de la gota. El trabajo experimental realizado se resume en la tabla 9.

Tabla 9. Experimentos realizados para determinar la influencia de las variables de fabricación en el tamaño de las microgotas		
Características del microchip	Flujo fase oleosa (Qo) (μL/min)	Flujos evaluados para la fase acuosa (Qa) (μL/min)
Microchip 1 Angulo: 30° Ancho: 284.24μm Alto: 194.48μm	5	10, 20, 40, 60, 100, 200, 400
	10	20, 40, 80, 120, 200, 400
	20	40, 80, 160, 240, 320, 400
	30	60, 120, 240, 300, 360
	40	40, 80, 160, 320
Microchip 3 Angulo: 90° Ancho: 286.19μm Alto: 214.23μm	5	10, 20, 40, 60, 100, 200, 400
	10	20, 40, 80, 120, 200, 400
	20	40, 80, 160, 240, 320, 400
	30	60, 120, 240, 300, 360
	40	40, 80, 160, 320
Microchip B Angulo: 30° Ancho: 189.25μm Alto: 75.53μm	0.5	2, 4, 6, 10, 20, 30, 45
	1	4, 8, 12, 20, 40, 60
	2	4, 12, 20, 32, 60
	3	6, 18, 30, 48
Microchip D Angulo: 90° Ancho: 170.64μm Alto: 74.64μm	0.5	2, 4, 6, 10, 20, 30, 45
	1	4, 8, 12, 20, 40, 60
	2	4, 12, 20, 32, 60
	3	6, 18, 30, 48

Con las mediciones recabadas se obtuvieron un total de 54 tablas que muestran los resultados promedio de las mediciones del tamaño de la microgota formada a cada relación de flujo. Para fines didácticos únicamente se mostrarán aquellas que sean de relevancia para el análisis, si se desea consultar los datos crudos o la totalidad de las tablas elaboradas se deberá recurrir a la sección de anexos.

a) Tamaño del microcanal

Al trabajar con los tamaños de *microchip* diseñados se observó que los flujos a los cuales se podía trabajar cambiaban en una unidad de magnitud debido únicamente a la reducción del tamaño en el sistema de microcanales.

Un fluido confinado dentro de un canal puede presentar un flujo turbulento o un flujo ordenado de manera laminar. Cuando se trata de microcanales, el número de Reynolds permite determinar el flujo que presentará. Este parámetro depende de las propiedades del fluido la velocidad con la que se desplaza, y las dimensiones del microcanal.

Gracias a este parámetro se sabe que, en sistemas micrométricos, la velocidad es proporcional a la escala. Al reducirse el tamaño de los microcanales, es necesario que se disminuya la velocidad con la que se desplazan los fluidos dentro del microchip para volver a retomar el comportamiento laminar. Por esta razón, cuando se trabajan *microchips* con tamaño de microcanal más pequeño es necesario reducir los flujos de inyección de las fases, disminuyendo su velocidad y favoreciendo un comportamiento laminar de los fluidos. Al ocurrir esto las moléculas de los fluidos pueden interaccionar de mejor manera y se favorece la formación de microgotas. Por el contrario, al aumentar el tamaño del microcanal es posible trabajar a flujos más altos sin perder el movimiento ordenado de las moléculas del fluido.

Desafortunadamente, el trabajo a velocidades de flujos muy lentas aumenta el tiempo de elaboración de las micropartículas considerablemente. Aunque se obtienen buenos resultados durante la formación de las microgotas, el objetivo principal de este proyecto es el desarrollo de MPP porosas de PCL, por lo que a partir de ahora los resultados que se presentaran únicamente comprenden a los *microchips* del molde B, los cuales presentan dimensiones mayores en el sistema de microcanales.

b) Relaciones de flujo

Cuando se trabaja con dos fluidos inmiscibles dentro de un microcanal, el número capilar permite relacionar las propiedades fisicoquímicas de los fluidos y la velocidad con la que se desplazan dentro del microchip. Si a lo largo del microcanal no se añaden otros compuestos que modifiquen las propiedades fisicoquímicas de las fases de trabajo, este parámetro dependerá principalmente de los flujos con los que se introducen los fluidos al *microchip* debido a que están relacionados con la velocidad del fluido en el sistema. Una forma de relacionar flujos de la fase acuosa (Q_a) y la fase oleosa (Q_o) es mediante las relaciones de flujo (Q_r).

Con las pruebas realizadas, que se muestran en la figura 25, se determinó que el tamaño de la microgota es inversamente proporcional a la relación de flujo con la se está trabajando, es decir a Q_r mayores la microgota presenta un tamaño menor. Además, la polidispersidad de las gotas aumenta cuando se trabaja a un Q_r alto debido a que, por lo general, el régimen que presenta es el *jetting* el cual genera gotas con mayores diferencias de tamaño.

Se observa que en los dos diseños evaluados el comportamiento es semejante, en donde a valores bajos de Q_o la Q_r que se puede alcanzar es mayor pero conforme Q_o va aumentando las Q_r a las que se puede trabajar disminuyen. Esto es debido a que se trata de relaciones proporcionales por lo que al trabajar a valores elevados de Q_o , a menores relaciones se llega a valores altos de Q_a .

También se aprecia que los valores de Q_a bajos logran conseguir microgotas más semejantes en tamaño con respecto a pruebas en las que el Q_a es mayor. Esto debido a la velocidad con la que viajan los fluidos, la cual siendo mayor haciendo que el Ca aumente y favorece la formación del *Jetting* que trae como resultado gotas polidispersas. Desde el punto de vista del Re , al desplazarse a gran velocidad, el movimiento ordenado de las moléculas de los fluidos puede disminuirse, evitando que puedan interaccionar de manera adecuada para formar las microgotas.

Un punto a resaltar, es que cuando se emplea el microchip con ángulo de corte a 90° la variación entre el tamaño de las microgotas es mayor con respecto a un microchip que cuenta con 30° . En el siguiente punto se discutirá más a fondo este cambio.

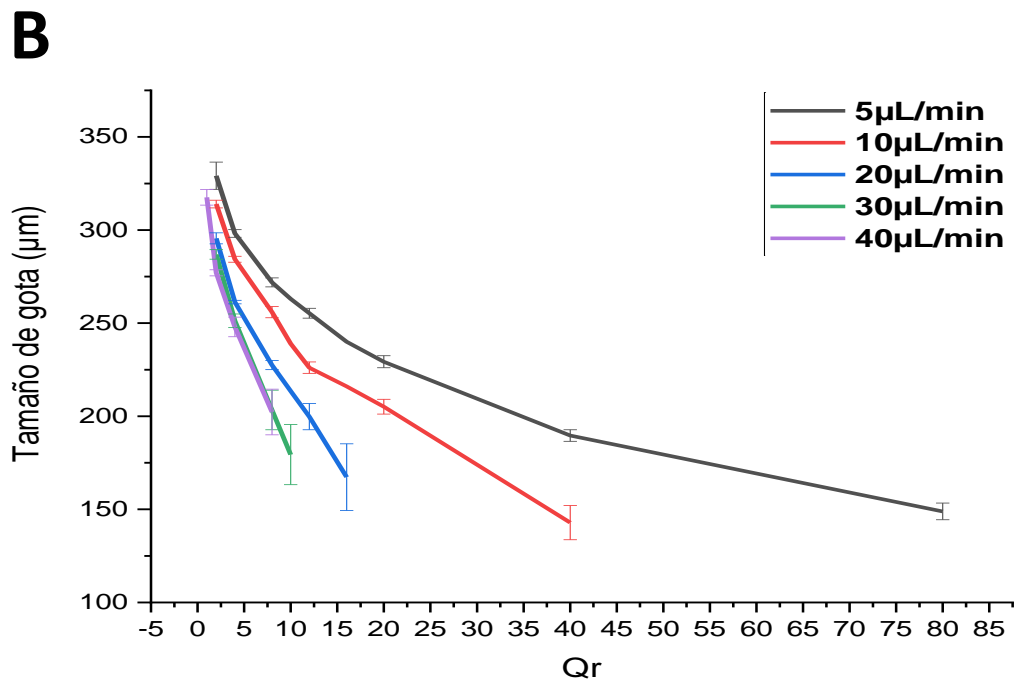
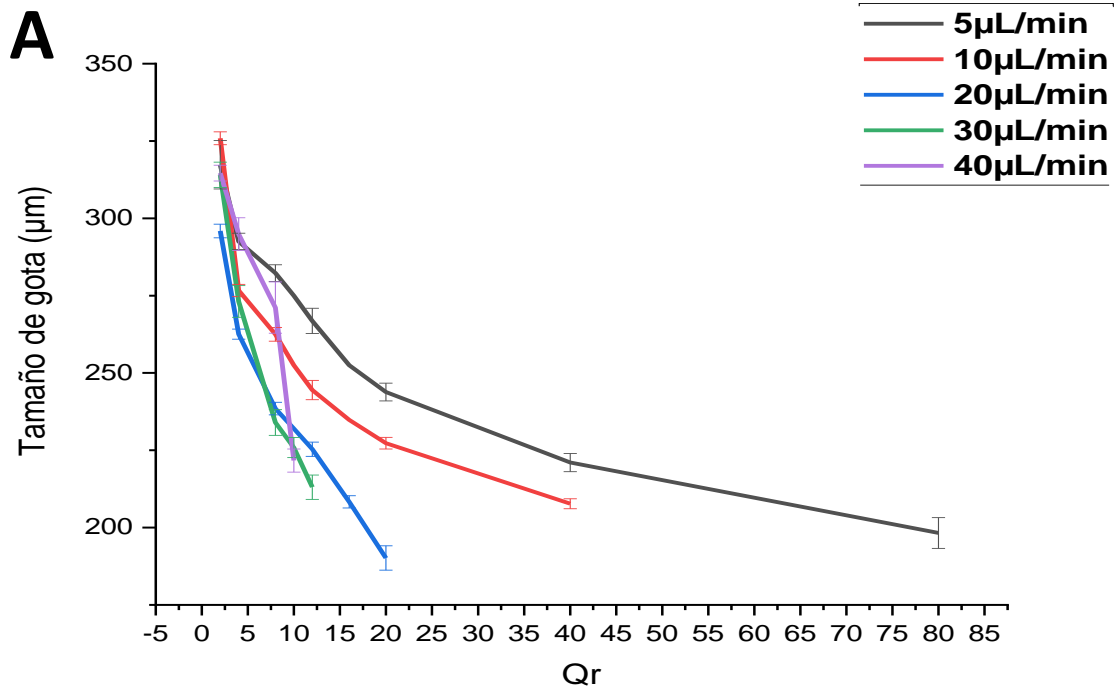


Figura 25. Gráficos de tamaño de microgota en función de la relación de flujo para (A) microchip 1 y (B) microchip 3. Se observa que ambos diseños presentan la misma tendencia, en donde, a Q_r más altos existe una disminución del tamaño de la microgota, pero cuando se trabaja a un Q_0 alto la variación entre el tamaño de las microgotas aumenta considerablemente. En ambos casos el tamaño de las microgotas se encuentra entre los 350 y los 175 μm .

c) Angulo de corte

La formación de microgotas dentro de un microchip depende de la geometría que presenta debido a que esta determinará la forma en que se encontraran las fases, teniendo influencia en la dinámica de los fluidos. En el caso de diseños elaborados por *T-junction* es modificar el ángulo de entrecruzamiento de los canales para determinar el efecto que tienen en la formación de la microgota al cambiar. Cuando se varía el ángulo de corte, la zona de corte se ve modificada por lo que las fases interactúan diferente generando alteraciones en la interfase.

Con los resultados de las pruebas realizadas (figura 26), se determinó que al disminuir el ángulo de corte hay un aumento en el tamaño de la microgota. Si nos centramos en Q_a de 20 y 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ se observa que al trabajar con el ángulo de corte de 30° , a mayores Q_r se produce un aumento en el tamaño de la microgota. También se observa que se puede trabajar a Q_r mayores con respecto al diseño que tiene 90° siendo más notorio el cambio a Q_a más elevados. Un aspecto importante a resaltar es que el ángulo de 30° mostró una menor polidispersidad en el tamaño de las microgotas por lo que si se desea trabajar a flujos rápidos es conveniente usar este tipo de arreglo.

Sin embargo, la modificación no produce cambios en los regímenes de flujo que se presentan en función de Q_r , pues a Q_r iguales se observa el mismo fenómeno en ambos *microchips*.

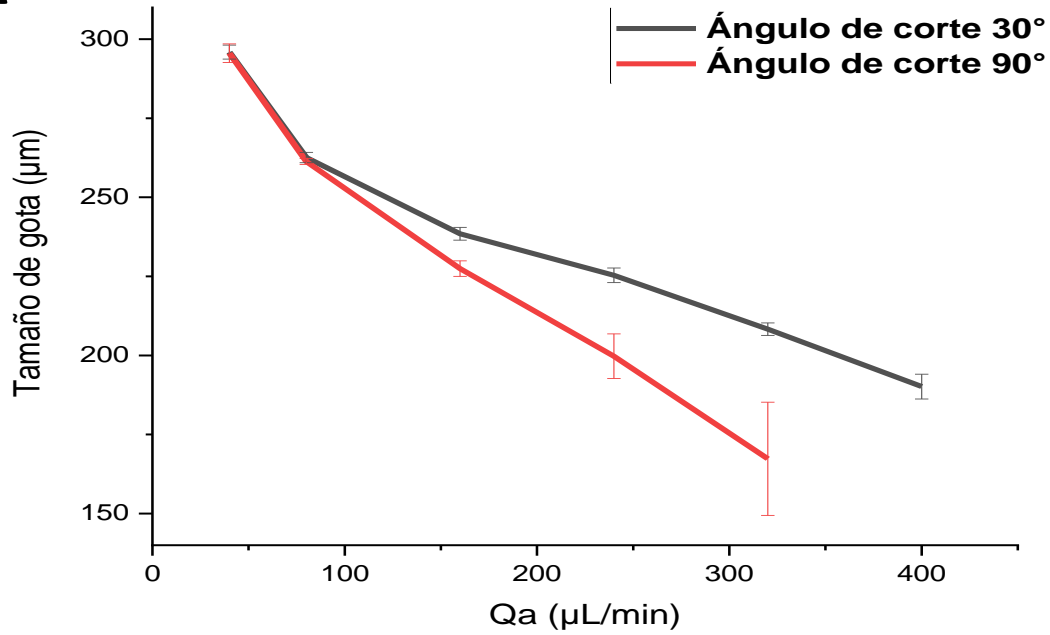
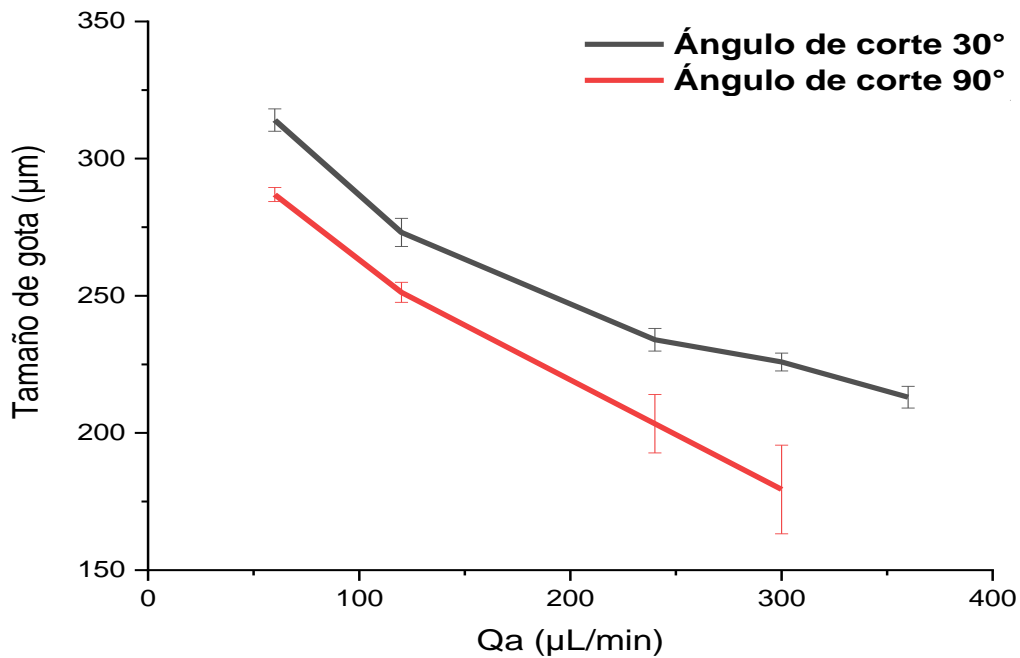
A**B**

Figura 26. Gráficos de tamaño de microgota en función del ángulo de corte del diseño del microchip. Se evaluaron dos flujos de fase oleosa (A) 20 µL/min y (B) 30 µL/min. El ángulo de 30° dentro de la geometría del microchip permite trabajar a mayores Qr y disminuye la variación en el tamaño de las microgotas producidas con respecto a un microchip con ángulo de 90°.

d) Concentración de canfeno

La concentración de canfeno parece no mostrar efecto sobre el tamaño de la microgota. Al comparar tres concentraciones de 5, 10 y 15% m/v a Q_0 de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$, como se observa en la figura 27, siguen la misma tendencia. Esto se debe a que el aumento en la concentración no afecta de manera significativa la densidad y la viscosidad de la fase orgánica y que estas propiedades son modificadas principalmente por la concentración de PCL a la que se trabaja, que fue constante en las tres fases evaluadas. Sin embargo, la concentración de canfeno tiene influencia en la estructura y porosidad de las micropartículas, punto que se discutirá más adelante.

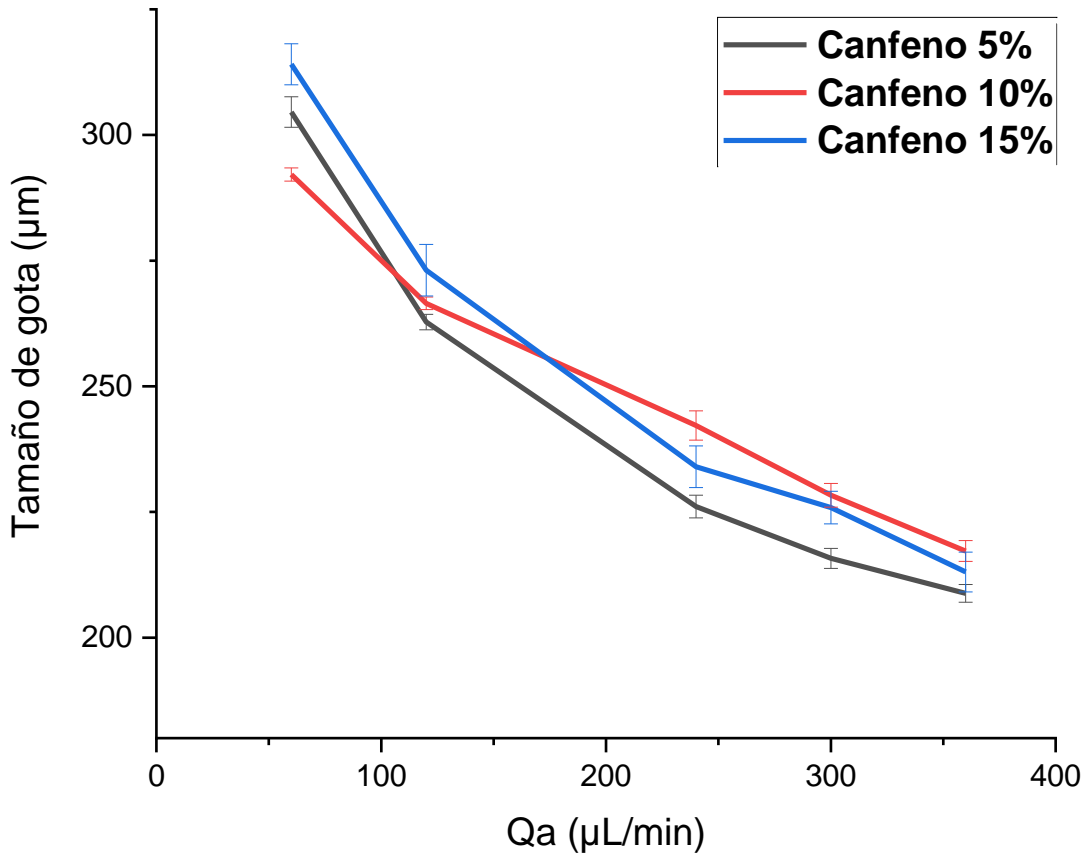


Figura 27. Gráfico de tamaño de microgota en función la concentración de canfeno (% m/v). Se evaluaron tres concentraciones de canfeno (5, 10 y 15% m/v) a un Q_0 de 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ y diferentes Q_r empleando el microchip 3. Las tres concentraciones muestran la misma tendencia e inclusive tamaños muy similares por lo que la concentración de canfeno no influye de manera importante sobre el tamaño de la microgota.

6.4.4 Secado de las microgotas

El secado de las microgotas es uno de los pasos más importantes al elaborar micropartículas debido a que influye directamente sobre la morfología y tamaño de las MPP. Las tres técnicas evaluadas mostraron diferentes resultados.

a) Secado con agitación magnética

Durante la prueba de secado con agitación magnética, se obtuvo un polvo fino de color blanco al fondo del vaso de precipitado y algunas esferas de mayor tamaño en la superficie de la fase continua. Mediante SEM se observaron partículas porosas con variaciones en el tamaño y forma ya que no todas eran esféricas. La figura 28 muestra los resultados obtenidos.

El uso de agitación, así como el tiempo e intensidad de la misma, juegan un papel muy importante en la formación de MPP debido a que puede provocar un cambio en el tamaño inicial de las microgotas y generar un aumento en la polidispersidad. Si bien, la prueba de estabilidad realizada demostró que no había cambio aparente en el tamaño de la microgota a esa velocidad, después de 48 horas las gotas llegan a disgregarse en gotas más pequeñas, aumentando la polidispersidad de la muestra. Esto es debido a la presencia del PVA que no solo estabiliza las gotas formadas, también permite que por el estrés mecánico aplicado las gotas se disgreguen por la disminución de la tensión interfacial, por ello a mayor concentración de dicho agente se pueden obtener gotas más pequeñas.

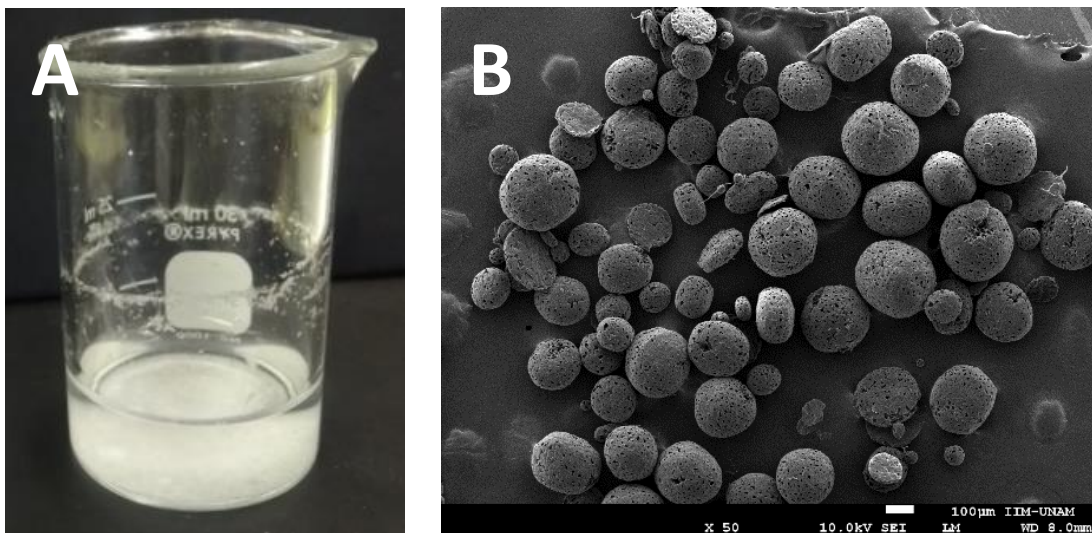


Figura 28. (A) MPP obtenidas por secado con agitación magnética, en el fondo se ubica un precipitado muy fino, en tanto que en las paredes del vaso se encuentran MPP de mayor tamaño. (B) SEM de MPP secadas con agitación, se aprecian MPP de distintos tamaños algunas con forma no esférica y pocos poros.

b) Secado por difusión

El método de secado por difusión es posible ya que el DCM es un compuesto muy volátil por lo que puede evaporarse y difundir a través de la fase acuosa. Con esta prueba se obtuvieron esferas en la superficie de la disolución de PVA a simple vista uniformes en tamaño en tanto que en SEM se observaron esferas huecas, incompletas y con poros sobre la superficie; tal y como se muestra en la figura 29.

En este experimento la formación de la MPP dependió totalmente de la velocidad de evaporación de DCM. La obtención de microesferas huecas es debido a que el secado de la microgota ocurre del exterior al interior por lo que al comenzar a evaporarse el DCM se forma una cobertura de PCL que, aunque no es soluble en agua los grupos funcionales que posee le permiten interactuar con ella, por otro lado, el canfeno se desplaza al interior de la gota debido a sus propiedades hidrofóbicas. La evaporación tan lenta del DCM permitió que la mayor parte del canfeno se concentrara en el núcleo de la microgota por lo que al liofilizar las muestras y al eliminarlo de la micropartícula se formó un hueco en su interior (figura 29).

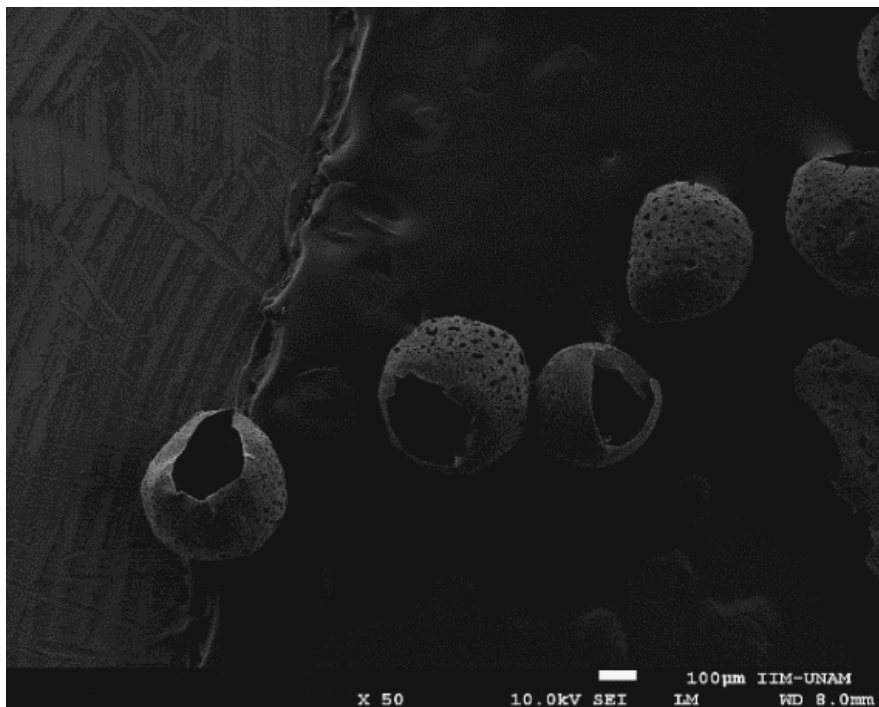


Figura 29. SEM de las MPP de PCL obtenidas mediante secado por difusión, las MPP son huecas por lo que presentan estructura capsular, además la superficie se encuentra incompleta. La morfología obtenida es debido a la difusión del canfeno al interior de la microgota generando la formación de una capa de PCL que recubre a la microgota que contiene la mayor cantidad de canfeno en el interior por lo que al solidificar y ser eliminado forma el núcleo de la MP.

Mediante esta técnica de secado resulta factible obtener microesferas huecas, donde una de las variables más importantes es la concentración del polímero que formará la matriz, por lo que si se aumenta la concentración es probable que estas se logren cerrar por completo al formarse la cobertura polimérica durante la evaporación del disolvente

c) Secado a presión reducida

El secado a presión reducida permite eliminar rápidamente el DCM dado que se disminuye la presión en el sistema y por ende también se disminuye su punto de ebullición. El DCM posee un punto de ebullición de 39.9°C, pero el uso del evaporador rotativo fue posible eliminarlo de las microgotas a temperatura ambiente (18-25°C) para favorecer la obtención de MPP. Al finalizar el proceso, se obtuvo una capa de esferas sobre la superficie de la disolución empleada como fase continua y mediante SEM se observaron micropartículas con poros sobre la cómo se puede observar en la figura 30.

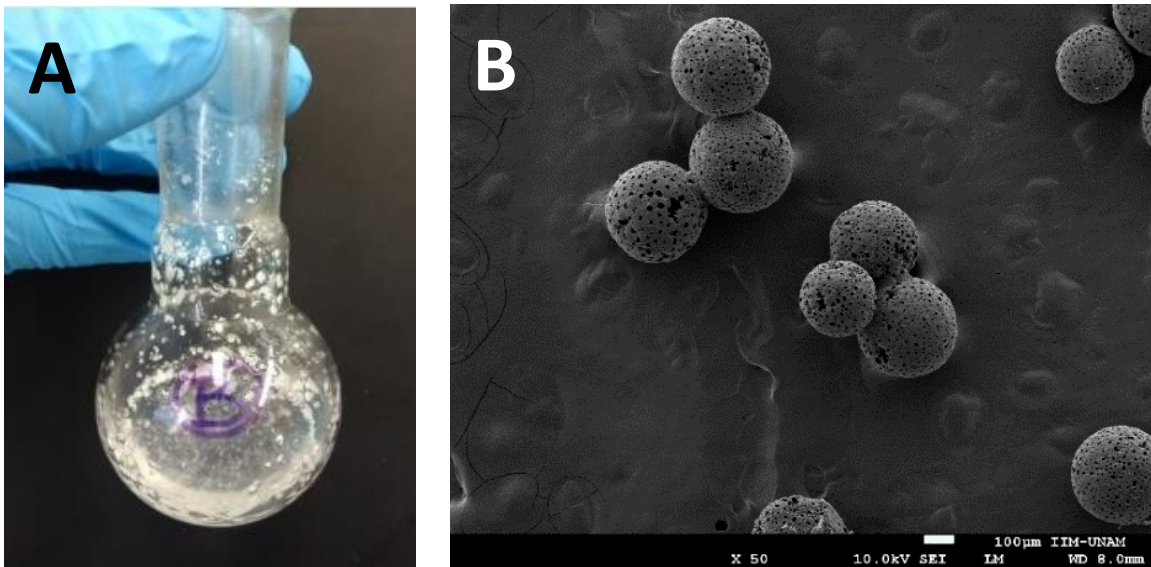


Figura 30. (A) MPP de PCL obtenidas por secado a presión reducida, las MPP se encuentran en la superficie del líquido y (B) SEM de las MPP obtenidas, hay una menor diferencia en los tamaños de las MP, aunque en algunos casos se llega a presentar fusión entre las superficies.

El principal inconveniente de este proceso fue que se observó una ligera variación en el tamaño de las MP, así como la fusión de algunas MP. La variación se puede deber al proceso, el en cual el equipo agita la muestra provocando que algunas de las gotas disminuyan su tamaño, mientras que, la fusión entre las MPP puede ser ocasionada por la velocidad de secado, que permite que tengan contacto dos o más microgotas; favoreciendo que el polímero de una

microgota se una con el de otra. Con los resultados obtenidos, se determinó que la técnica de secado a presión reducida era la que mejores resultados podía traer para el desarrollo de este proyecto debido a la reducción en el tiempo de secado que presenta, así como el tipo de MPP que se producen por lo que las siguientes pruebas se realizaron empleando este procedimiento. Mas adelante se abordará la forma en que actúa el canfeno para la formación de los poros.

6.4.5 Influencia de la concentración de canfeno en la porosidad

El empleo de porógenos durante el proceso de fabricación permite modificar las características superficiales y estructurales de las MP. Se pueden ocupar muchos compuestos sólidos como NaCl o CaCO₃, aunque estos deben dispersarse en la fase oleosa y tienden a sedimentar en las jeringas usadas para inyectar las fases dentro del *microchip*. Otra alternativa es emplear compuestos que pueden sublimar fácilmente y que son solubles en disolventes orgánicos.

El canfeno (figura 31) es un compuesto orgánico perteneciente a los monoterpenos bicíclicos, no toxico, fácil de sublimar en vacío, insoluble en agua, soluble en disolventes orgánicos y que muestra un crecimiento dendrítico durante la solidificación a temperaturas menores a 40°C propiedades que lo hacen candidato para ser empleado como porógeno [23].

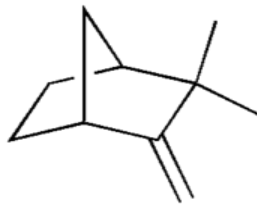


Figura 31. Estructura química del canfeno.

Se evaluaron cuatro distintas concentraciones de canfeno para observar el efecto que producía sobre la estructura de la micropartícula. Como control se empleó un lote de micropartículas que no contenía canfeno en su elaboración, los resultados obtenidos se muestran en la figura 33.

Cuando las microgotas son secadas se obtienen MPP sólidas formadas por los compuestos presentes en la disolución: PCL y canfeno. La formación de los poros ocurre en las zonas donde logró solidificar el canfeno y que posteriormente se elimina de la MPP debido a la fácil sublimación del compuesto (figura 32). La formación de canales de poros interconectados

dentro de la matriz es debido al crecimiento dendrítico que del canfeno por lo que: la estructura, el tamaño, la forma y la orientación de los poros, depende en gran medida del comportamiento de solidificación del canfeno [23].



Figura 32. Ilustración de la formación de canales de poros interconectados en una MPP mediante el uso de canfeno. En la etapa de nucleación se distribuye el canfeno en la microgota, al comenzar a solidificar se forman dendrímeros o redes del compuesto que al sublimarse genera los poros interconectados.

El incremento en la concentración de canfeno genera un aumento en la cantidad y tamaño de los poros de la matriz esto debido a que al existir una mayor cantidad de porógeno. Una mayor parte de la estructura está formada por este compuesto que al final del proceso será eliminado. Si bien, el tamaño no es uniforme entre los poros, es notorio que si existe un aumento en sus dimensiones y en la cantidad de poros de mayor tamaño con respecto a MPP que no se elaboraron con usando canfeno como poroformador.

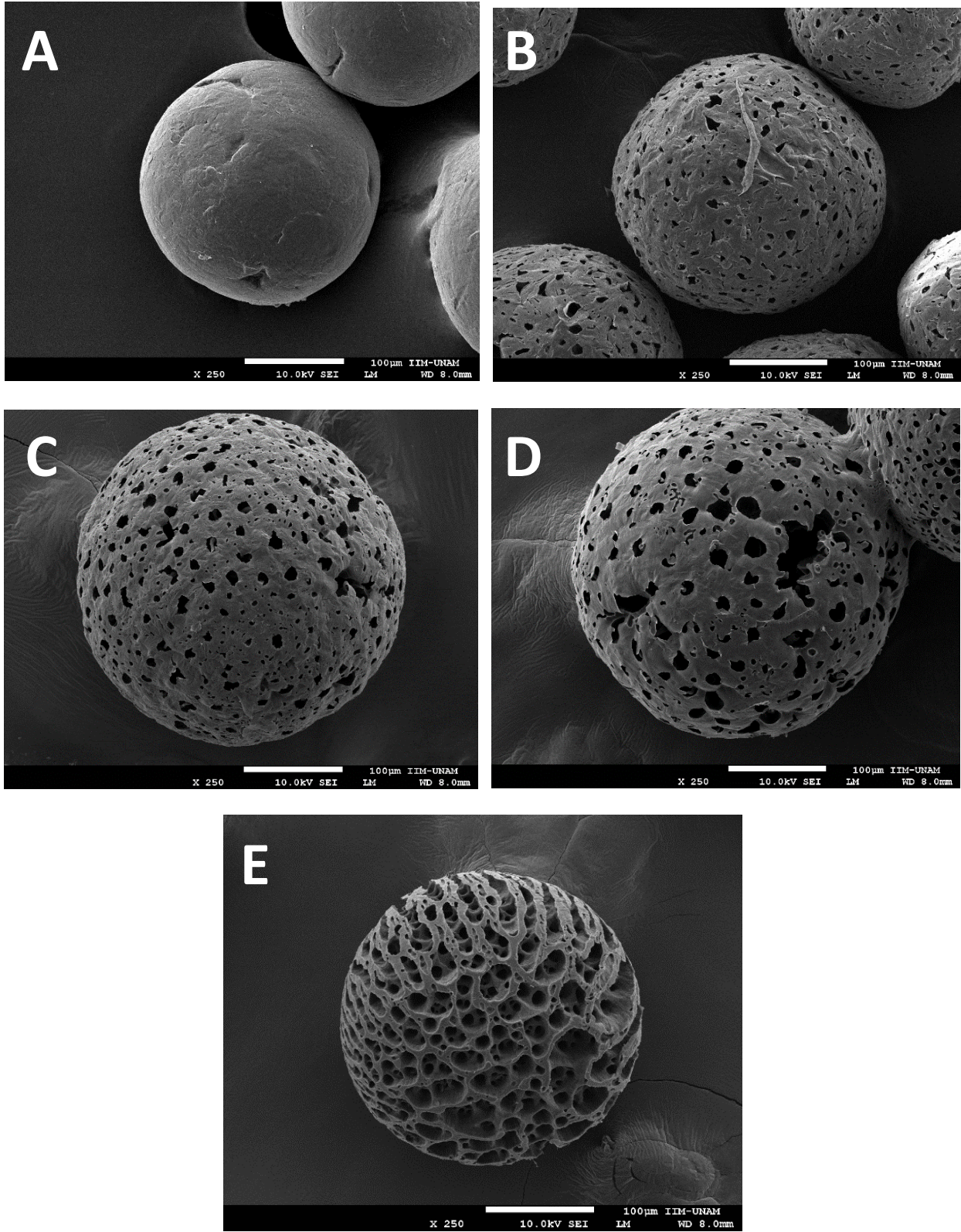


Figura 33. Microscopia SEM de las MPP porosas de PLC obtenidas mediante secado al vacío. Se observa un cambio en la morfología con respecto a la (A) muestra control al incrementar la concentración de cafeína al (B) 5% (C) 10% (D) 15% y (E) 20% m/v.

Al aumentar la concentración de canfeno también se observó un cambio en la estructura de la micropartícula. A la concentración más alta evaluada (20% m/v) los poros podían tener forma esférica o ser muy alargados y recorrer toda la estructura de la micropartícula (figura 34). Nuevamente esto es debido al crecimiento dendrítico que presenta el canfeno [23], que al encontrarse en una gran cantidad se le facilita formar estructuras alargadas y ramificadas. Esta forma también puede ser influenciada por la repulsión que siente con el medio acuoso externo, favoreciendo que se agrupen las moléculas del compuesto en mayor medida.

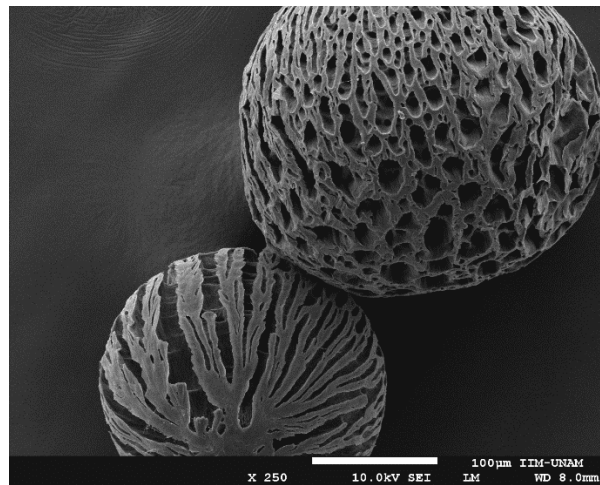


Figura 34. SEM de MPP de PCL. Se puede observar la formación de estructuras alargadas a lo largo de la matriz debido a la alta concentración de canfeno empleada en la fabricación que favorece la formación de estructuras alargadas del porógeno.

6.4.6 Relación entre el tamaño de gota y el tamaño de partícula

Con la evaluación de las microgotas y las MPP obtenidas (figura 35), se determinó que existe una disminución de cerca de la mitad entre el tamaño de la MPP con respecto al tamaño de las microgotas base, los resultados se muestran en las tablas 10 y 11.

Tabla 10. Tamaño promedio para microgotas y micropartículas a diferentes relaciones de flujo

Qo-Qa (μL/min)	40-40		40-80		30-120		20-200	
	Tamaño partícula (μm)	Tamaño gota (μm)	Tamaño partícula (μm)	Tamaño gota (μm)	Tamaño partícula (μm)	Tamaño gota (μm)	Tamaño partícula (μm)	Tamaño gota (μm)
Promedio	364.35	642.21	261.37	622.66	246.10	532.51	205.56	389.41
Desv. Est.	33.92	39.77	75.84	41.99	69.81	53.62	77.44	61.68
CV%	9.31	6.19	29.01	6.75	28.37	10.07	37.67	15.84

	40-40	40-80	30-120	20-200
Flujos (Qo-Qa) ($\mu\text{L}/\text{minuto}$)				
Tamaño gota (Tg) (μm)	642.21	622.66	532.51	389.41
Tamaño partícula (Tp) (μm)	364.35	261.37	246.10	205.56
Relación Tg/Tp	1.76	2.38	2.16	1.89

La elaboración de MPP mediante la técnica de emulsión- evaporación de disolvente involucra un paso final en el cual busca solidificar el polímero al eliminar el disolvente orgánico empleado. Al combinar esta técnica de elaboración con la microfluídica, se busca obtener MPP con un índice de polidispersidad bajo al usar como base microgotas monodispersas. Si el disolvente se logra eliminar de manera adecuada, la micropartícula obtendrá el tamaño de la microgota a partir de la cual fue formada.

Cuando el disolvente se comienza a evaporar el polímero empieza a solidificar debido a que es insoluble en la fase acuosa o continua, por lo que interacción con el medio externo puede generar una disminución en el tamaño de la microgota debido a la migración del polímero al núcleo de la microgota por simples interacciones hidrofóbicas. Además, de manera idónea se esperaría no obtener MPP que superen el tamaño de las microgotas usadas como base para su elaboración.

La disminución de tamaño en las MPP debe estar relacionada con la técnica de secado, pues dentro de la microgota existen dos compuestos que son insolubles en agua: PCL y canfeno. Es probable que antes de comenzar a formarse la MPP exista una ligera migración de los compuestos al interior de la microgota y posteriormente empiece a formarse la superficie externa de lo que será la micropartícula. Los experimentos previos indican que el secado de la microgota ocurre de afuera hacia adentro. Otro factor que puede influir es la concentración del polímero, que al ser bajo permite que se evapore una gran parte del DCM antes de iniciarse la formación de la estructura más externa de la MPP.

También hubo un aumento en la dispersidad de tamaño que presentan las micropartículas con respecto a las microgotas, esto puede deberse a la técnica de secado pues se puede apreciar en algunos casos la fusión entre las superficies de una o varias MP, probablemente el estrés

mecánico al que están expuestas las microgotas dentro del rotavapor genera que algunas se disgreguen en gotas más pequeñas y al formarse la MPP esta tiene un tamaño menor al resto.

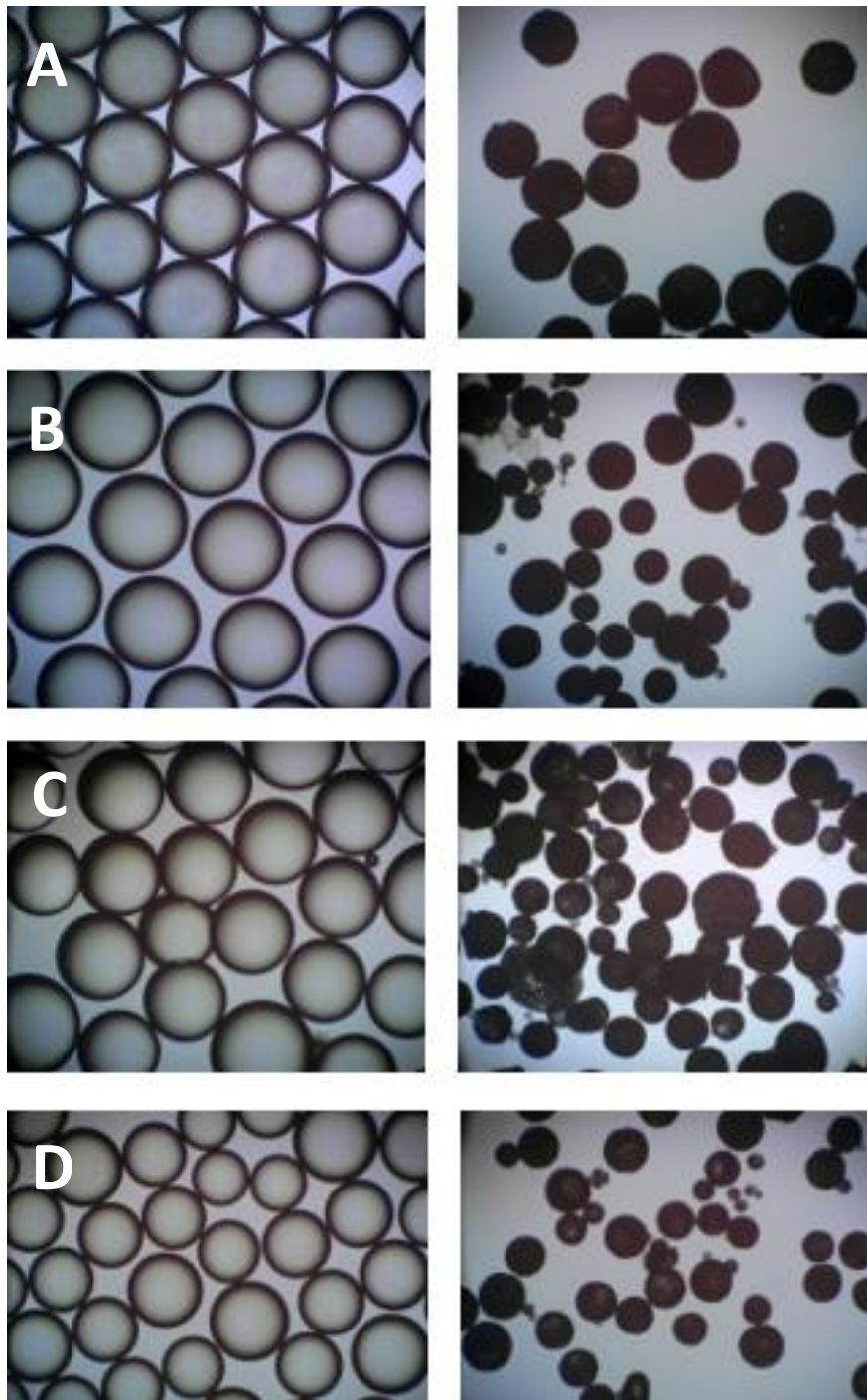


Figura 35. Comparación entre las microgotas base para la obtención de MP. Del lado izquierdo se muestran las microgotas obtenidas a flujos de (A) 40-40, (B) 40-80, (C) 30-120 y (D) 20-220 µL/min para la fase acuosa y oleosa respectivamente; y del lado derecho se encuentran las MPP obtenidas después del proceso de secado. Se observa una disminución en el tamaño de las MPP con respecto a las microgotas, así como una variación mayor en el tamaño debido al proceso de secado.

6.4.7 Caracterización de las micropartículas obtenidas

Finalmente, a las MPP elaboradas se les realizó un espectro de FT-IR el cual se muestra en la figura 36. Las señales que presentan las MPP concuerdan con el espectro de FT-IR de PCL pura, siendo la señal a 1750 cm^{-1} la que indica la presencia del grupo funcional éster en la molécula y la cual es muy notoria en ambos casos. Además, se comparó la señal con el espectro de FT-IR del canfeno para determinar si quedaban restos del porógeno en la matriz, observándose un pico a $2970\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ que corresponde a la presencia de grupos metilo ($-\text{CH}_3$) de la estructura del canfeno por lo que, la presencia de esta señal indica restos de canfeno. A pesar de ello, el canfeno es no es toxico para los seres humanos por lo que no trae riesgos a la salud si estas MPP se llegan a utilizar para el desarrollo de algún medicamento. Una alternativa seria mejorar las condiciones de sublimación del canfeno para eliminarlo por completo del sistema.

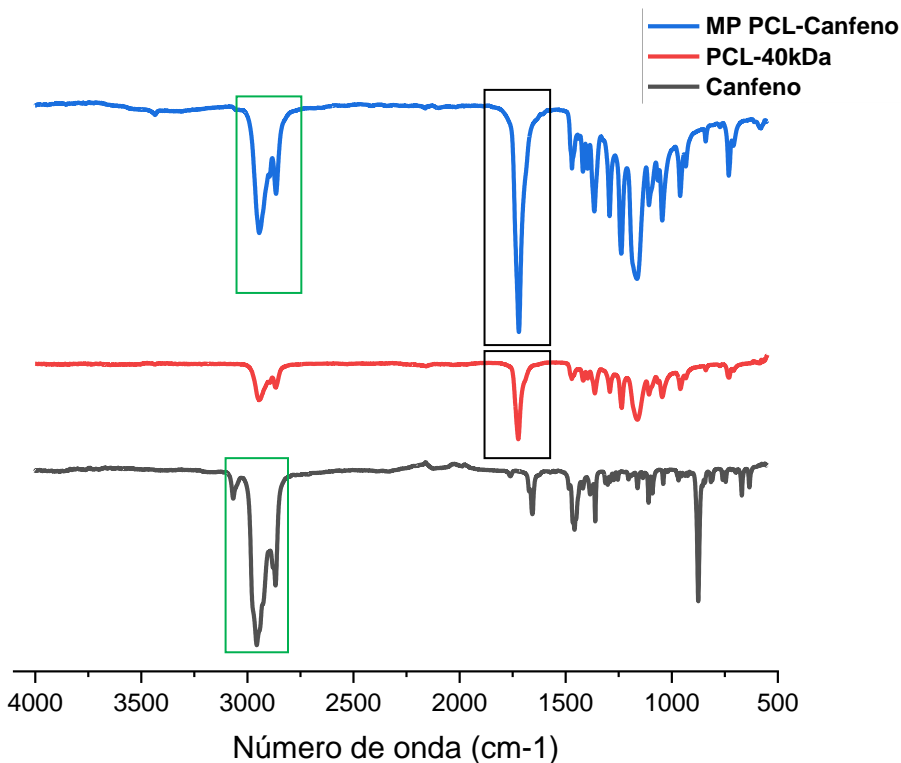


Figura 36. FT-IR de las MPP porosas de PCL (azul), canfeno (negro) y PCL pura (rojo). Al comparar el FT-IR de las MPP obtenidas se observa que presentan los mismos picos que la PCL pura, siendo la señal a 1750 cm^{-1} (marcados con negro) la más importante debido a que indica la presencia del grupo funcional éster. Por otro lado, el aumento de la señal en la región de $2970\text{-}2950$ (marcada con verde), que es muy notoria en el canfeno, es debido a la presencia de restos del porógeno dentro de la matriz.

7 CONCLUSIONES

Se obtuvieron micropartículas porosas de policaprolactona a partir del uso de un sistema de microchip de microfluídica, con posibles aplicaciones para el desarrollo de un sistema de liberación controlada de fármacos.

Se logró diseñar un sistema de microcanales, basado en la geometría *T-junction* con el cual es posible generar microgotas de una fase de orgánica dentro de una fase acuosa las cuales pueden ser usadas como base para la elaboración de micropartículas.

A partir del diseño del sistema de microcanales fue posible elaborar un molde maestro para la obtención de microchips de PDMS empleando la técnica de litografía suave. Con dicho molde es posible obtener cientos de réplicas de los *microchips*.

Se modificaron las características superficiales del PDMS al depositar en las cadenas más externas PVA. Con este tratamiento fue posible conferir mayor resistencia al *microchip* ante disolventes orgánicos como DCM sin comprometer su integridad, permitiendo emplear la técnica de emulsión-evaporación de disolvente dentro del *microchip*. Además, el uso de este tratamiento puede permitir emplear los microchips en otras áreas donde la limitante era la susceptibilidad del PDMS ante compuestos de naturaleza orgánica que pueden difundir a través de sus cadenas.

Se evaluó la influencia de algunas variables en la obtención de microgotas, determinando que la relación de flujos, el diseño (ángulo de corte) y el tamaño del microcanal tienen mayor impacto en el tamaño y dispersión de las microgotas pues son parámetros que determinan la manera en que se comportan los fluidos dentro del microchip.

Se evaluó la influencia de las variables en la obtención de micropartículas, determinando que la concentración de canfeno y el método de secado de la microgota afectan en la estructura interna y superficial, así como en la dispersidad de las partículas. La agitación usada durante la etapa de secado disminuye el tamaño de las micropartículas debido a que disgrega las microgotas. Al aumentar la concentración de canfeno se forman una mayor cantidad de poros en la estructura interna y externa de la micropartícula. Por otra parte, es necesario tener en cuenta el comportamiento del canfeno en un medio acuoso pues, al secar las microgotas, este determinara la forma y ubicación de los poros, permitiendo formar microesferas con poros en la superficie, poros interconectados o inclusive microcápsulas.

8 PERSPECTIVAS

Con las pruebas realizadas es necesario determinar un tamaño de micropartícula en función de la vía de administración y el fármaco que se quiera acarrear para iniciar las pruebas de liberación. Dadas las características del sistema elaborado, es posible emplear una gran variedad de fármacos, pero dentro de esta etapa de evaluación también se podrá observar la afinidad que presenta la matriz con el fármaco y determinar si es necesario modificar o añadir alguna otra barrera o componente al sistema con la finalidad de controlar de mejor manera la liberación.

Además, se logró obtener microgotas con un baja polidispersidad en comparación con las técnicas que usan homogenización de alta velocidad en su elaboración. Sin embargo, podrían realizarse mas pruebas empleando otro tipo de agentes estabilizantes para tener un mayor control en el tamaño y disminuir la polidispersidad de la muestra.

Finalmente, se podrían evaluar otras condiciones de secado debido a que este paso es fundamental al tener impacto directo sobre el tamaño y morfología que presentan las micropartículas.

9 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Y. W. Chien, *Novel Drug Delivery Systems*, 2a ed. 1993.
- [2] V. R. Sinha, K. Bansal, R. Kaushik, R. Kumria, and A. Trehan, "Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview," *Int. J. Pharm.*, vol. 278, no. 1, pp. 1–23, 2004.
- [3] A. Imbrogno, E. Piacentini, E. Drioli, and L. Giorno, "Micro and nano polycaprolactone particles preparation by pulsed back-and-forward cross-flow batch membrane emulsification for parenteral administration," *Int. J. Pharm.*, vol. 477, no. 1–2, pp. 344–350, 2014.
- [4] Y. H. Yun, B. K. Lee, and K. Park, "Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation," *J. Control. Release*, vol. 219, pp. 2–7, 2015.
- [5] N. A. Peppas, "Historical perspective on advanced drug delivery: How engineering design and mathematical modeling helped the field mature," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 1, pp. 5–9, 2013.
- [6] J. R. Robinson and V. H. L. Lee, *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and applications*, 2nd editio., vol. 29, no. 3. 1993.
- [7] S. R. Mudshinge, A. B. Deore, S. Patil, and C. M. Bhalgat, "Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery," *Saudi Pharm. J.*, vol. 19, no. 3, pp. 129–141, 2011.
- [8] C. E. Carraher, "Polymer Chemistry, Sixth Edition," *Sixth Ed.*, pp. 1–902, 2003.
- [9] N. Jawahar and S. Meyyanathan, "Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review," *Int. J. Heal. Allied Sci.*, vol. 1, no. 4, p. 217, 2014.
- [10] S. Bhatia, *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. 2016.
- [11] D. F. Williams, *The Williams Dictionary of Biomaterials*, 1st Editio. Liverpool: Liverpool University Press, 1999.
- [12] J. A. Y. R. Joshi and R. P. Patel, "Role of Biodegradable Polymers in Drug Delivery," vol. 4, no. 4, 2012.
- [13] L. F. Santos, I. J. Correia, A. S. Silva, and J. F. Mano, "Biomaterials for drug delivery patches," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 118, no. January, pp. 49–66, 2018.

- [14] S. Dumitru, *POLYMERIC BIOMATERIALS*. .
- [15] M. Bartnikowski, T. R. Dargaville, and D. W. Hutmacher, "Progress in Polymer Science Degradation mechanisms of polycaprolactone in the context of chemistry , geometry and environment," vol. 96, pp. 1–20, 2019.
- [16] T. K. Dash and V. B. Konkimalla, "Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review," *J. Control. Release*, vol. 158, no. 1, pp. 15–33, 2012.
- [17] J. S. Chawla and M. M. Amiji, "Biodegradable poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen," *Int. J. Pharm.*, vol. 249, no. 1–2, pp. 127–138, 2002.
- [18] A. Imbrogno, E. Piacentini, E. Drioli, and L. Giorno, "Preparation of uniform polycaprolactone Microparticles by membrane emulsification/solvent diffusion process," *J. Memb. Sci.*, vol. 467, pp. 262–268, 2014.
- [19] J. P. Rao and K. E. Geckeler, "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 7, pp. 887–913, 2011.
- [20] J. A. Champion, Y. K. Katare, and S. Mitragotri, "Particle shape : A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers," vol. 121, pp. 3–9, 2007.
- [21] J. B. Fan, C. Huang, L. Jiang, and S. Wang, "Nanoporous microspheres: From controllable synthesis to healthcare applications," *J. Mater. Chem. B*, vol. 1, no. 17, pp. 2222–2235, 2013.
- [22] M. T. Gokmen and F. E. Du Prez, "Porous polymer particles - A comprehensive guide to synthesis, characterization, functionalization and applications," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, no. 3, pp. 365–405, 2012.
- [23] J. H. Park, C. M. Han, E. J. Lee, and H. W. Kim, "Preparation of highly monodispersed porous-channeled poly(caprolactone) microspheres by a microfluidic system," *Mater. Lett.*, vol. 181, pp. 92–98, 2016.
- [24] P. Tabeling, *Introduction to Microfluidics*. Paris, 2003.
- [25] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics," *Nature*, vol. 442, no.

7101, pp. 368–373, 2006.

- [26] P. N. Nge, C. I. Rogers, and A. T. Woolley, “Advances in Microfluidic Materials, Functions, Integration, and Applications,” *Chem. Rev.*, vol. 113, no. 4, pp. 2550–2583, 2013.
- [27] S. R. Yadhuraj, S. Babu Gandla, B. G. Sudarshan, and S. C. Prasanna Kumar, “Preparation and Study of PDMS Material,” *Mater. Today Proc.*, vol. 5, no. 10, pp. 21406–21412, 2018.
- [28] M. P. Wolf, G. B. Salieb-Beugelaar, and P. Hunziker, “PDMS with designer functionalities—Properties, modifications strategies, and applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 83, pp. 97–134, 2018.
- [29] C. W. Tsao, “Polymer microfluidics: Simple, low-cost fabrication process bridging academic lab research to commercialized production,” *Micromachines*, vol. 7, no. 12, 2016.
- [30] D. Bodas and C. Khan-malek, “Formation of more stable hydrophilic surfaces of PDMS by plasma and chemical treatments,” vol. 83, pp. 1277–1279, 2006.
- [31] L. Gitlin, P. Schulze, S. Ohla, H. J. Bongard, and D. Belder, “Surface modification of PDMS microfluidic devices by controlled sulfuric acid treatment and the application in chip electrophoresis,” *Electrophoresis*, vol. 36, no. 3, pp. 449–456, 2015.
- [32] E. Holczer, Z. Fekete, and P. Fürjes, “Surface Modification of PDMS Based Microfluidic Systems by Tensides,” *Mater. Sci. Forum*, vol. 729, pp. 361–366, 2012.
- [33] B. Y. Kim, L. Y. Hong, Y. M. Chung, D. P. Kim, and C. S. Lee, “Solvent-resistant PDMS microfluidic devices with hybrid inorganic/organic polymer coatings,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 19, no. 23, pp. 3796–3803, 2009.
- [34] T. Trantidou, Y. Elani, E. Parsons, and O. Ces, “Hydrophilic surface modification of pdms for droplet microfluidics using a simple, quick, and robust method via pva deposition,” *Microsystems Nanoeng.*, vol. 3, no. November 2016, 2017.
- [35] T. M. Squires and S. R. Quake, “Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale,” *Rev. Mod. Phys.*, vol. 77, no. 3, pp. 977–1026, 2005.

- [36] Baroud Charles N., F. Gallaire, and R. Dangla, "Dynamics of microfluidic droplets," *Lab Chip*, vol. 10, no. 16, pp. 2032–2045, 2010.
- [37] D. Liu, H. Zhang, F. Fontana, J. T. Hirvonen, and H. A. Santos, "Microfluidic-assisted fabrication of carriers for controlled drug delivery," *Lab Chip*, vol. 17, no. 11, pp. 1856–1883, 2017.
- [38] P. Zhu and L. Wang, "Passive and active droplet generation with microfluidics: a review," *Lab Chip*, vol. 17, no. 1, pp. 34–75, 2017.
- [39] W. Yu, X. Liu, Y. Zhao, and Y. Chen, "Droplet generation hydrodynamics in the microfluidic cross-junction with different junction angles," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 203, pp. 259–284, 2019.
- [40] Microchem, "SU-8 2000 Permanent Epoxy Negative Photoresist," *Process. Guidel.*, vol. 20, 2015.
- [41] A. M. Barberena-Fernández, M. T. Blanco-Varela, and P. M. Carmona-Quiroga, "Use of nanosilica- or nanolime-added TEOS to consolidate cementitious materials in heritage structures: Physical and mechanical properties of mortars," *Cem. Concr. Compos.*, vol. 95, no. November 2017, pp. 271–276, 2019.
- [42] S. K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha, and V. Labhasetwar, "Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake," *J. Control. Release*, vol. 82, no. 1, pp. 105–114, 2002.

10 ANEXOS

El total de mediciones, gráficos y tablas elaboradas para las secciones:

6.2 Caracterización de los microchips

6.4.3 Influencia de las variables de fabricación en el tamaño de las microgotas

6.4.6 Relación entre el tamaño de gota y el tamaño de partícula

Se pueden revisar en el siguiente link:

<http://tiny.cc/ro6ycz>