



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**MICROPARTÍCULAS POROSAS DE POLI- $\epsilon$ -CAPROLACTONA CON PROPIEDADES  
MAGNÉTICAS SENSIBLES A TEMPERATURA FABRICADAS MEDIANTE  
MICROFLUIDÍDICA**

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. LUIS FERNANDO BRAVO DUQUE

TUTORA: DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD  
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE 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	Dr. Emilio Bucio Carrillo	Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM
Vocal	Dr. José Juan Escobar Chávez	FES-Cuautitlán, UNAM
Vocal	Dr. Luis Fernando Olguín Contreras	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Mariana Ortiz Reynoso	Facultad de Farmacia, UAEMex
Secretario	Dr. Gerardo Leyva Gómez	Facultad de Química, UNAM

## **Asesora**

Dra. María Josefa Bernad Bernad

## **Sitios donde se realizó el proyecto**

Laboratorios de Sistemas de liberación de fármacos del departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM.

Laboratorios de Bio-fisicoquímica y microfluídica del departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Química, UNAM.

Laboratorio 100 del departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química, UNAM.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por otorgarme el privilegio de recibir una formación académica de gran calidad, desde la preparatoria; y en especial a la Facultad de Química por mi formación científica.

A mi asesora, la Dra. María Josefa Bernad Bernad, por las oportunidades de crecimiento, la confianza en mí y sobre todo por compartir conmigo su gran pasión por la investigación, eso siempre fue una gran motivación.

Al Dr. Jesús Gracia Mora por sus invaluable aportaciones y consejos, sin duda alguna fueron una gran diferencia.

Al Dr. Luis F. Olguín Contreras y al Mtro. Erick Nieves por mostrarme el fascinante, campo de la microfluídica. Muchas gracias por sus aportaciones e interés por el proyecto.

A la Dra. Guillermina Gonzales Mancera y al Fis. Josué Romero Ibarra, por su gran ayuda en los estudios de microscopía electrónica de barrido.

A los miembros de mi jurado, por el tiempo y la dedicación a la revisión de mi trabajo, por las valiosas contribuciones y los consejos para la mejora el mismo.

A la M.C. Renata Salcedo por su gran apoyo. La pasión y dedicación que imprimes en tu trabajo siempre resulta en una gran inspiración para mí.

Al QFB Arturo Sánchez, por sus grandes aportaciones en la realización de este proyecto.

A los integrantes de los laboratorios: de Sistemas de liberación, de Bio-Fisicoquímica y microfluídica, del 100 de Química Inorgánica, de la Facultad de Química, por todo el apoyo prestado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico que me otorgó, durante parte de mis estudios de maestría; con la beca No. 723157.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado, por el financiamiento para poder asistir al 22nd International Conference and Exhibition on Pharmaceutical Formulations, realizado del 4 al 6 de julio de 2019, en Valencia, España.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM), por los fondos otorgados a través del proyecto PAPIIT IT201518 “Síntesis y caracterización de sistemas nano-híbridos superparamagnéticos con posible aplicación en el tratamiento del cáncer.”

## Índice general

Índice de Figuras	V
Índice de Tablas	VIII
Abreviaciones	IX
Resumen	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1. Sistemas de liberación farmacéuticos	5
2.1.1. Sistemas de liberación modificada	6
2.2. Sistemas de liberación modificada multiparticulados	7
2.2.1. Sistemas de liberación modificada multiparticulados de liberación por activación modulada para Cáncer	10
2.3. Polímeros termosensibles	13
2.3.1. Poli-(N-isopropilacrilamida)	14
2.4. Magnetismo	15
2.4.1. Nanopartículas magnéticas	17
2.4.2. Nanopartículas magnéticas en tratamiento de Cáncer	18
2.5. Microfluídica	20
2.5.1. Fabricación de materiales asistidos por microfluídica	21
2.5.2. Formación de gotas basados en microfluídica	22
2.5.3. Fabricación de dispositivos microfluídicos	24
2.5.3.1. Litografía suave	24
2.5.3.2. Polidimetilsiloxano	26
3. Planteamiento del problema.	27
4. Objetivo general.	28
4.1. Objetivos particulares.	28
5. Hipótesis de trabajo	29
6. Metodología experimental	29
6.1. Materiales	29
6.2. Fabricación del dispositivo microfluídico	29
6.2.1. Diseño de fotomáscara con arreglos de microcanales	29
6.2.2. Fabricación del molde maestro por fotolitografía	30

6.2.3.	Fabricación de microchips mediante litografía suave	31
6.2.4.	Modificación superficial de microcanales	32
6.3.	Síntesis de nanopartículas magnéticas hidrofóbicas	33
6.4.	Fabricación de micropartículas porosas	33
6.4.1.	Efecto de la cantidad de PCL	33
6.4.2.	Efecto de cantidad de canfeno en porosidad	34
6.4.3.	Caracterización de los regímenes de flujo en función del ángulo de corte y caudales de las fases	34
6.5.	Recubrimiento termosensible	36
6.5.1.	Evaluación del efecto de ácido metacrilato sobre LCST en nanogeles	36
6.5.2.	Recubrimiento de micropartículas porosas	37
6.6.	Carga de 6-mercaptopurina	37
6.6.1.	Curva de calibración	37
6.6.2.	Inclusión de 6-mercaptopurina en sistema completo	37
6.6.3.	Estudios de liberación <i>in vitro</i> de 6-mercaptopurina	38
7.	Resultados y discusión	39
7.1.	Fabricación del dispositivo microfluídico	39
7.2.	Síntesis de nanopartículas magnéticas hidrofóbicas	44
7.3.	Fabricación de micropartículas porosas	48
7.4.	Recubrimiento termosensible	57
7.5.	Carga de 6-mercaptopurina	64
8.	Conclusiones	67
9.	Perspectivas	68
10.	Referencias	69
11.	Anexos	79

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b>	Representación gráfica del sistema fabricado	1
<b>Figura 2</b>	Representación del sistema multifuncional fabricado en funcionamiento	2
<b>Figura 3</b>	Representación gráfica de las concentraciones plasmáticas del fármaco de diferentes sistemas de liberación	7
<b>Figura 4</b>	Ecuación química de la síntesis de poli- $\epsilon$ -caprolactona	9
<b>Figura 5</b>	Representación de los diferentes estímulos, endógenos y exógenos, para los DDS estímulo sensibles dirigidos a cáncer	10
<b>Figura 6</b>	Esquematzación de las diferentes acciones de DDS sensibles a uno, dos, y a múltiples estímulos	13
<b>Figura 7</b>	Representación gráfica de la transición de fase de nanogeles de pNIPAM.	15
<b>Figura 8</b>	Representación de las aplicaciones de las NPM en la terapéutica del cáncer	19
<b>Figura 9</b>	Ejemplificación de las diferentes aplicaciones que se le puede dar la microfluídica	21
<b>Figura 10</b>	Regimenes de flujo para la formación de gotas y geometrias de dispositivos microfluídicos	23
<b>Figura 11</b>	Etapas de los procesos de fotolitografía y litografía suave	25
<b>Figura 12</b>	Estructura química del polidimetilsiloxano	26
<b>Figura 13</b>	Dimensiones de los arreglos de microcanales diseñados para la fabricación de la fotomáscara	30
<b>Figura 14</b>	Zonas de corte para la determinación de las dimensiones de los microcanales de los microchips	31
<b>Figura 15</b>	Diseños e imagen de un microchip unido a un portaobjetos en funcionamiento	35
<b>Figura 16</b>	Ecuación química de la reacción de polimerización-precipitación mediada por radicales libre de nanogeles de NIPAM	36
<b>Figura 17</b>	Fotografías de molde maestro en la caja Petri cubierto de PDMS	39
<b>Figura 18</b>	Micrografías de cortes transversales de microchips	41

<b>Figura 19</b>	Gráfica de contornos de los ángulos de contacto obtenidos en función del peso molecular de PVA y [PVA]	42
<b>Figura 20</b>	Espectro de FT-IR para confirmar el recubrimiento del PDMS con PVA	43
<b>Figura 21</b>	Dispersiones de NPM recubiertas con ácido oleico y sin recubrir; y representación del recubrimiento de NPM con ácido oleico	44
<b>Figura 22</b>	Espectro FT-IR de NPM recubiertas con ácido oleico y sin recubrir	45
<b>Figura 23</b>	Imágenes de TEM de la muestra NPM-AO	46
<b>Figura 24</b>	Histograma y grafica de probabilidades acumuladas del tamaño de partícula de NPM-AO	47
<b>Figura 25</b>	Gráfica de $\Delta T$ vs. Tiempo (s) obtenida de la una muestra en dispersión de NPM-AO a 1mg/ml	48
<b>Figura 26</b>	Imágenes de SEM de micropartículas a diferentes concentraciones de PCL	49
<b>Figura 27</b>	Imágenes de SEM de lotes fabricadas a diferentes concentraciones canfeno	51
<b>Figura 28</b>	Graficas de caja de la dispersión de tamaños de lotes a diferentes concentraciones de canfeno	52
<b>Figura 29</b>	Gráfica de tamaño de gota contra relación de caudales para microchip de ángulo de corte a 30°	54
<b>Figura 30</b>	Gráfica de tamaño de gota contra relación de caudales para microchip de ángulo de corte a 90°	55
<b>Figura 31</b>	Gráfica de cajas para el tamaño de microgotas y micropartículas	56
<b>Figura 32</b>	Imágenes SEM de las particulas, todas fabricadas a $Q_d=30 \mu\text{l}/\text{min}$ y $Q_c=120 \mu\text{l}/\text{min}$ en un microchip de 90°	57
<b>Figura 33</b>	Grafica de transmitancia contra temperatura a pH=5 para evaluación de las LCST	58
<b>Figura 34</b>	Gráfica de transmitancia contra temperatura a pH=7 para evaluación de las LCST	59
<b>Figura 35</b>	Espectro Raman de la muestra NG-3	61
<b>Figura 36</b>	Comparación de espectro Raman de MP-NG, NG-3, y PLC 45kDa	62



<b>Figura 37</b>	Espectros de EDS e imágenes SEM de micropartículas sin recubrir y recubiertas con co-polímero termosensible	63
<b>Figura 38</b>	Gráfica de 6-mercaptopurina ( $\mu\text{g}$ ) / MP-NG (mg) contra concentración (mg/ml)	64
<b>Figura 39</b>	Cinética de liberación de 6-mercaptopurina a 40°C en sin la aplicación de un campo magnético alterno y con la aplicación de un campo magnético	65
<b>Figura 40</b>	Gráficas de ajuste al modelo Peppas-Sahlin de cantidad liberada (%) contra tiempo (h) para ambas condiciones de liberación	67
<b>Figura 41</b>	Espectro UV-Vis de 6-mercaptopurina en HCl 0.2N	79
<b>Figura 42</b>	Análisis de regresión y grafica de línea ajustada de curva de calibración de 6-mercaptopurina en HCl 0.2N	79
<b>Figura 43</b>	Espectro UV-VIS de 6-mercaptopurina en buffer de acetatos 0.1M a pH=5	80
<b>Figura 44</b>	Análisis de regresión y grafica de línea ajustada de curva de calibración de 6-mercaptopurina en buffer de acetatos 0.1M pH=5	80
<b>Figura 45</b>	Gráfica normal estandarizada de los efectos	82
<b>Figura 46</b>	Micropartículas de PCL fabricadas utilizando polivinilpirrolidona como poroformador	83

## Índice de Tablas

<b>Tabla I</b>	Características fisiológicas del microambiente tumoral	4
<b>Tabla II</b>	Clasificación de los estímulos para la modulación de liberación en cáncer	11
<b>Tabla III</b>	Condiciones de experimentación, para la evaluación del recubrimiento de PDMS con PVA	32
<b>Tabla IV</b>	Caudales de ambas fases trabajadas para la caracterización de los regímenes de flujos para cada una de las dos geometrías de dispositivos microfluídicos	35
<b>Tabla V</b>	Ángulos de contacto obtenidos de los diferentes tratamientos de recubrimiento	42
<b>Tabla VI</b>	Composición de los nano geles de pNIPAM sintetizados	58
<b>Tabla VII</b>	Valores de LCST determinadas a partir del ajuste de Boltzmann (Anexo VI) para una sigmoide	59
<b>Tabla VIII</b>	Porcentajes atómicos obtenidos de estudios de EDS	63
<b>Tabla IX</b>	Parámetros de ajuste de diferentes modelos cinéticos para la liberación en ausencia del campo magnético	66
<b>Tabla X</b>	Parámetros de ajuste de diferentes modelos cinéticos para la liberación en presencia del campo magnético	66

## Abreviaciones

<b>AM</b>	ácido metacrílico
<b>AMF</b>	campo magnético alterno (del inglés <i>alternative magnetic field</i> )
<b>AO</b>	ácido oleico
<b>CV</b>	coeficiente de variación
<b>DCM</b>	diclorometano
<b>DDS</b>	sistema de liberación modificada (del inglés <i>drug delivery system</i> )
<b>DLS</b>	dispersión dinámica de luz (del inglés <i>dynamic light scattering</i> )
<b>DS</b>	desviación estándar
<b>EDS</b>	espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (del inglés <i>energy dispersive spectroscopy</i> )
<b>EPR</b>	efecto de permeación y retención potenciado (del inglés <i>enhanced permeation and retention</i> )
<b>FTIR</b>	espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier
<b>h<sub>c</sub></b>	altura del canal
<b>ICDD</b>	Centro internacional para datos de difracción ( <i>International Centre for Diffraction Data</i> )
<b>LCST</b>	temperatura crítica inferior de solubilidad (del inglés <i>low critical solution temperature</i> )
<b>MBA</b>	N-N'-metilenbisacrilamida
<b>MDR</b>	resistencia múltiple a fármacos (del inglés <i>multidrug resistance</i> )
<b>NIPAM</b>	N-isopropilacrilamida
<b>NPM</b>	nanopartícula magnética
<b>O/W</b>	emulsión aceite en agua
<b>PDMS</b>	polidimetilsiloxano
<b>pH</b>	potencial de hidrógeno
<b>PLC</b>	poli-ε-caprolactona
<b>PLGA</b>	ácido polilactoco-co-glicólico
<b>pNIPAM</b>	poli-(N-isopropilacrilamida)
<b>PSA</b>	persulfato de amonio
<b>PVA</b>	alcohol polivinílico

<b>q</b>	relación de flujos ( $q=Q_d/Q_c$ )
<b>Qc</b>	caudal de la fase continua
<b>Qd</b>	caudal de la fase discontinua
<b>r</b>	radio
<b>RMI</b>	resonancia magnética de imagen
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sodio
<b>SEM</b>	microscopia electrónica de barrido (del inglés <i>scattering electronic microscopy</i> )
<b>T</b>	temperatura
<b>TEM</b>	microscopia electrónica de transmisión (del inglés <i>transmission electron microscopy</i> )
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
<b>UV-Vis</b>	ultravioleta-visible
<b>w<sub>c</sub></b>	ancho del canal
<b>ΔG</b>	diferencia de energía de Gibbs
<b>ΔH</b>	diferencia de entalpía
<b>ΔS</b>	diferencia de entropía

## Resumen

El principal reto para el tratamiento del cáncer mediante quimioterapia es la resistencia múltiple a fármacos (MDR por sus siglas en inglés) que presentan los tumores cancerosos con la terapéutica actual. El desarrollo de sistemas multifuncionales de liberación de fármacos se ha convertido en una estrategia potencial para solucionar el problema de la MDR en el tratamiento contra el cáncer. Las técnicas de fabricación de estos sistemas generalmente se basan en la formación de emulsiones simples o múltiples para usar las gotas como molde. El uso de la microfluídica para la miniaturización del proceso de emulsificación ha ganado gran relevancia para fabricar sistemas multiparticulados de manera más controlada.

Con este proyecto se sintetizaron nanopartículas magnéticas hidrofóbicas de magnetita, las cuales se lograron incluir en micropartículas porosas de policaprolactona, fabricadas a partir de una emulsión O/W utilizando un dispositivo microfluídico. Para el uso adecuado de los dispositivos microfluídicos o microchips se caracterizaron el tamaño de gota formada y el tipo de flujo en la formación de gotas, en función de los caudales de alimentación de ambas fases de la emulsión. Una vez obtenidas las micropartículas porosas de policaprolactona, fueron recubiertas con un copolímero termosensible de pNIPAM (poli-N-isopropilacrilamida) (Figura 1). El polímero sintetizado presentó una temperatura crítica inferior de solubilidad (LCST por sus siglas en inglés) de 42.6°C a pH=5 y 48.9°C a pH=7, este cambio de la LCST en función del pH es debido al uso de ácido metacrílico como comonómero.

Posterior al recubrimiento de las micropartículas con el copolímero termosensible de pNIPAM, se logró cargar 6-mercaptopurina, fármaco antineoplásico de tipo antimetabolito, con un porcentaje en peso de  $6.0 \pm 0.21$  %. Posteriormente se realizaron los estudios de liberación *in vitro* simulando condiciones intratumorales

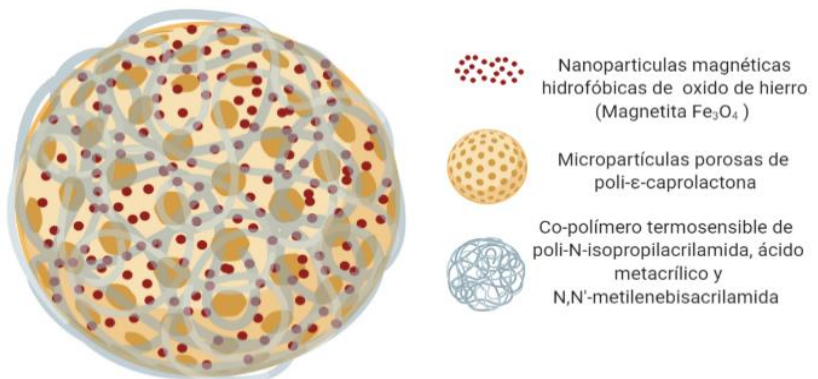


Figura 1 Representación gráfica del sistema fabricado.

(40°C y pH=5), con las cuales se determinó que la cinética de liberación se ajusta a un modelo de Peppas-Sahlin, predominada por la difusión del fármaco. La liberación de la 6-mercaptopurina es más rápida al aplicar un campo magnético alterno (AMF por sus siglas en inglés), debido al efecto de hipertermia localizada por la presencia de las nanopartículas magnéticas dentro de la matriz polimérica (Figura 2). Estos resultados de liberación controlada son muy prometedores para promover este sistema como una alternativa en el tratamiento del cáncer; además de que aún falta evaluar el uso potencial de este sistema en: la embolización de tumores, ablación térmica y en resonancia de imagen para ser considerado como sistema multifuncional.

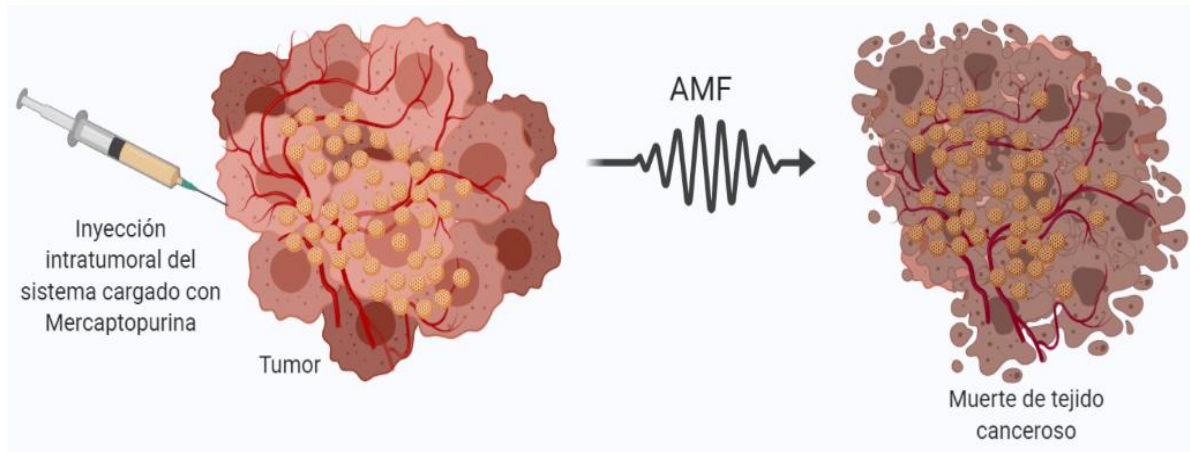


Figura 2 Representación del sistema multifuncional fabricado en funcionamiento.

## 1. Introducción

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. En 2015 ocasionó 8,8 millones de defunciones; casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad [1]. A nivel mundial esto representa un gran desafío para las economías y sistemas de salud. México no ha sido la excepción, desde la década de 1960 el cáncer se ubicó entre las diez principales causas de muerte. Los tumores de próstata, sistema respiratorio y estómago son los que más afectan al género masculino, representando un 36.1% de los fallecimientos; mama y cérvico-uterino constituyen el 25.7% de las defunciones en lo que se refiere a población femenina [2].

El cáncer es una enfermedad compleja que de manera general puede definirse como una proliferación celular descontrolada que resulta en la formación de tumores malignos. La terapéutica común para tumores cancerosos se base en tres estrategias principales: cirugía, radioterapia y quimioterapia, esta última puede ser aplicada por separado o en combinación con las anteriores [3]. A pesar de los severos efectos secundarios, la quimioterapia sigue siendo el tratamiento más efectivo contra tumores; esta estrategia consiste en la administración intravenosa del fármaco antineoplásico en disolución. Sin embargo, el principal reto de la quimioterapia es la resistencia múltiple a fármacos o MDR el cual es un estado de resistencia a fármacos antineoplásicos con estructura y mecanismos de acción no relacionados entre sí; se estima que este efecto es el responsable del 90% de los fracasos en el tratamiento en pacientes [4], [5].

La MDR es explicada por la exposición del fármaco a concentraciones sub-terapéuticas, este ineficiente acarreo del fármaco se atribuye principalmente a la complicada biología del microambiente intratumoral [6]. A diferencia de un tejido sano, los tumores cancerosos poseen características particulares las cuales representan un gran reto para el acarreamiento de fármacos. Sin embargo, otras de estas características pueden ser aprovechadas para una mejor terapéutica, como el fenómeno de permeación y retención potenciado (EPR por sus siglas en inglés). Este fenómeno se debe a que los capilares sanguíneos intratumorales están altamente perforados, debido a que los espacios endoteliales son más anchos, esto permite la permeación y acumulación de cualquier macromolécula [6]. En la Tabla I se muestran las características fisiológicas más representativas del microambiente tumoral [4], [6], [7].

**Tabla I Características fisiológicas del microambiente tumoral [4], [6], [7].**

<p><b>Tejido parenquimático apiñado</b></p>	<p>La enorme proliferación celular incontrolada, da como resultado una masa indiferenciada de células malignas; el aumento de la densidad de empaquetamiento del tumor da como resultado espacios intercelulares más estrechos que disminuye la penetración de fármacos en el tejido tumoral a través de la difusión para-celular.</p>
<p><b>Densidad vascular alta</b></p>	<p>Debido al incremento de la demanda de nutrientes y oxígenos, varios factores de crecimiento son secretados, lo que resulta en una excesiva neo-angiogénesis. Estos nuevos vasos sanguíneos son prematuros, tortuosos, caóticos, de pobre anastomosis, es decir no funcionales.</p>
<p><b>Temperatura</b></p>	<p>Debido a su alta velocidad de proliferación, las células cancerosas poseen una velocidad metabólica mayor, comparada con células normales. Como resultado en ambiente intratumoral posee una temperatura mayor 40-44°C</p>
<p><b>Bloqueo de conductos linfáticos</b></p>	<p>El bloque parcial o total de conductos linfático, el cual se debe al desbalance pro-angiogénico. Este bloqueo provoca la retención de fluidos y macromoléculas y el subsecuente aumento de la presión osmótica del fluido intersticial. La presión del fluido intersticial podría ser tan alta como 50-100 mmHg, este valor es 5 veces mayor la presión arterial capilar más alta, por lo que la dirección de difusión sea al exterior del tumor; este es el mayor desafío para la administración de fármacos a tumores sólidos, por simple difusión.</p>
<p><b>Hipoxia intratumoral</b></p>	<p>La hipoxia se agrava al aumentar la distancia del vaso sanguíneo funcional más cercano. La alta proliferación celular contribuye a la hipoxia intratumoral al aumentar la demanda celular de oxígeno y disminuir la difusión; a pesar de esto las células tumorales sobreviven en condiciones de hipoxia.</p>



<b>Aumento de proteínas en matriz extracelular</b>	Las células tumorales son altamente activas en la síntesis de matriz extracelular y en su remodelamiento enzimático. Se ha demostrado la relación directa entre la cantidad de matriz extracelular y la permeación y distribución de fármacos cancerígenos. Mientras que el remodelamiento enzimático es crucial para la invasión celular, extravasación y metástasis.
--	--

Para revertir la MDR, se han desarrollado inhibidores de la resistencia, desafortunadamente, sus aplicaciones clínicas se vieron obstaculizadas por la baja eficacia, la alta toxicidad inherente o la farmacocinética alterada y la biodistribución de los fármacos antineoplásicos cuando se administraron junto con los inhibidores de la MDR [5]. Sin embargo, los nuevos sistemas de liberación modificada o DDS (por sus siglas en inglés), proporcionan estrategias alternativas para evitar la MDR, al ofrecer los medios para encapsular o adjuntar simultáneamente múltiples funciones; por ejemplo, ligandos o anticuerpos dirigidos a las células tumorales, fármacos quimioterapéuticos, ácidos nucleicos e inhibidores de ciertas enzimas para inhibir diferentes contribuyentes a la MDR [4]–[6].

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Sistemas de liberación farmacéuticos**

El mecanismo por el cual un fármaco es liberado puede tener un efecto significativo en su eficacia. Algunos fármacos poseen un intervalo de concentración óptima, en la cual se alcanzan un máximo de beneficios (ventana terapéutica) y concentraciones por arriba o por debajo de este intervalo pueden ser tóxicas o no tener un efecto terapéutico, respectivamente [8]. Por muchas décadas se han utilizado formas farmacéuticas convencionales (cápsulas, tabletas, ungüentos, supositorios, soluciones orales, aerosoles e inyectables) para el tratamiento de diversas enfermedades; es bien sabido que estas formas farmacéuticas liberan el fármaco contenido de manera inmediata, sin embargo, para mantener una concentración del fármaco dentro de la ventana terapéutica, es necesario administrar el medicamento varias veces al día, dando como resultado una fluctuación en los niveles sistémicos [9]. Estas limitaciones que presentan las formas farmacéuticas convencionales han provocado el desarrollo de nuevos sistemas bajo un enfoque multidisciplinario, para la liberación de fármacos a sitios de acción específicos,

a una velocidad determinada y bajo la presencia de estímulos; estos sistemas son conocidos como sistemas de liberación modificada de fármacos [10]. El desarrollo de estos sistemas, se basan en una estrategia que combina la ciencia de polímeros, la farmacia, la química de bio-conjugación y la biología molecular, entre otras; para minimizar la degradación y la pérdida del fármaco, y así disminuir los efectos secundarios e incrementar la biodisponibilidad y la fracción del fármaco acumulado en la zona requerida [11].

#### 2.1.1. Sistemas de liberación modificada

El término sistema de liberación modificada (Figura 3) es usado para describir sistemas farmacéuticos que tienen la característica de liberar fármacos basados en el tiempo, trayecto y ubicación; los cuales son diseñados para alcanzar un objetivo terapéutico no ofrecido por los sistemas de liberación inmediata [12]. Los sistemas de liberación controlada de fármacos pueden ser clasificados en [9]:

- Liberación de velocidad preprogramado.

La liberación del fármaco ha sido establecida a un perfil específico de velocidad. Esto puede lograrse utilizando un diseño del sistema capaz de controlar la difusión molecular del fármaco contenido dentro del mismo a través de una barrera.

- Liberación de activación modulada y sistemas regulados por retroalimentación.

La liberación del fármaco es activada por algún proceso físico (temperatura, presión osmótica, presión hidrodinámica, presión de vapor, magnéticamente, fonoforesis, entre otras), químico (pH, hidrólisis intercambio iónico) o bioquímico (enzimático). La liberación regulada por retroalimentación es activada por un agente desencadenante, como lo es una sustancia bioquímica presente en el cuerpo.

- Sistemas de liberación vectorizados.

Este tipo de sistemas permite la liberación del fármaco en un sitio o tejido específico del cuerpo, en donde el efecto farmacológico es llevado a cabo sin exponer el fármaco en otros sitios y así evitar posibles efectos tóxicos. Las estrategias para obtener sistemas de liberación dirigidos son: administración en la zona de interés, direccionamiento físico hacia condiciones fisiológicas anormales del sitio de interés y el uso de vectores, los cuales tienen una gran afinidad específica a la zona afectada [13].

## 2.2. Sistemas de liberación modificada multiparticulados

En los sistemas de liberación modificada, las estructuras que transportan el fármaco al sitio de acción son conocidas como acarreadores farmacéuticos. De acuerdo con su composición, los acarreadores se clasifican en sistemas moleculares (ciclodextrinas, dendrímeros y nanoestructuras de carbono) y sistemas coloidales (micro/nano partículas, liposomas, niosomas, cristales líquidos, etc.). Dentro de los acarreadores farmacéuticos coloidales, las micro/nano partículas se han convertido en sistemas de liberación controlada más prometedores, este tipo de acarreadores se clasifica con base en la naturaleza del material que lo constituye, ya sea de tipo polimérico, lipídico, cerámico, metálico (puede ser magnético), o compuestos (también llamados “compositos”) [14]; de entre los cuales los polímeros han sido mayormente utilizados como en DDS por sus propiedades favorables, como una buena biocompatibilidad, fácil diseño y preparación, gran variedad de estructuras, algunos biodegradables, y un interesante carácter biomimético [15].

Otra forma de clasificación es el tamaño de partícula, pero existe una controversia para definir el intervalo de medida que debe de tener una partícula para ser considerada micrométrica o nanométrica [16], [17]. Sin embargo, en el área médica el prefijo nano abarca desde 1-1000 nm, mientras que el prefijo micro abarca desde 1-1000  $\mu\text{m}$ . La

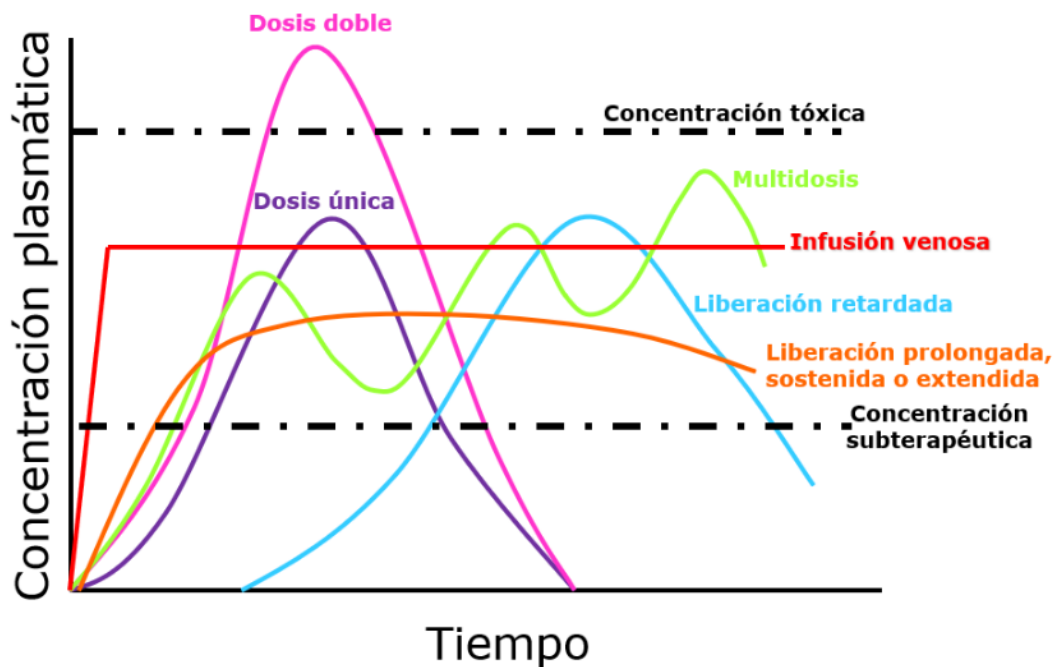


Figura 3. Representación gráfica de las concentraciones plasmáticas del fármaco, de diferentes sistemas de liberación y de diferentes dosis de formas farmacéuticas convencionales.

elección de partículas de tamaño micrométrico o nanométrico, realmente depende del sitio de acción al cual se desea que lleguen las partículas y por cuánto tiempo se desea la liberación controlada del fármaco [17]. En las últimas décadas, las micropartículas poliméricas han demostrado que son vehículos eficientes de ser utilizados como acarreadores farmacéuticos en DDS para combatir diversas enfermedades, como tumores cancerosos. El tamaño y la estructura de las micropartículas permiten la carga de grandes cantidades de fármacos, proteínas y genes [18]. En contraste con las nanopartículas, las micropartículas permiten una mayor cantidad de fármaco cargado y una liberación más prolongada; las nanopartículas en promedio, presentan un perfil de liberación de orden de horas a días; mientras que las micropartículas lo pueden presentar en orden de semanas [19]. Micropartículas administradas vía intratumoral puede proporcionar altos niveles locales de fármaco antineoplásico, adecuados para eliminar células cancerosas que hayan sobrevivido a una cirugía y a quimioterapia convencional [20].

Los polímeros usados para la preparación de micro/nano partículas se pueden dividir en dos grupos: polímeros naturales y polímeros sintéticos. Los polímeros naturales se obtienen directamente de recursos naturales, tales como plantas verdes, animales, algas, bacterias y hongos; entre éstos se encuentran las proteínas como la gelatina, la lecitina, la legumina y la vicilina; y también los polisacáridos como el alginato, el dextrano, la agarosa, el pululano y el quitosano, entre otros [21]. Los polímeros sintéticos son aquellos polímeros que son sintetizados en el laboratorio partiendo de los monómeros que los constituyen, entre ellos se encuentran los poliésteres tales como poli- $\epsilon$ -caprolactona, ácido poliláctico, ácido poliláctico-co-glicólico u otras familias tales como policianoacrilatos, poliamidas, polianhídridos, poli-orto-ésteres [22].

La PCL es un polímero alifático semicristalino con unidades repetidas de hexanoato, cuya temperatura de transición vítrea es de  $-60^{\circ}\text{C}$  y el punto de fusión varía de  $58$  a  $65^{\circ}\text{C}$  [23]. La PCL es altamente hidrofóbica, debido al segmento de cinco  $-\text{CH}_2$  en sus unidades repetidas (Figura 4), lo que resulta en un tiempo de degradación largo (2-3 años); esta degradación puede ser llevada a cabo por microorganismos o por hidrólisis del grupo éster alifático, bajo condiciones fisiológicas. El tiempo de degradación de la PCL es el mayor de todos los poliésteres de uso médico, además de poseer ciertas ventajas sobre

otros poliésteres de uso farmacéutico, como el ácido poliláctico-co-glicólico: no genera un ambiente ácido durante su hidrólisis [24] y ser mucho más económico.

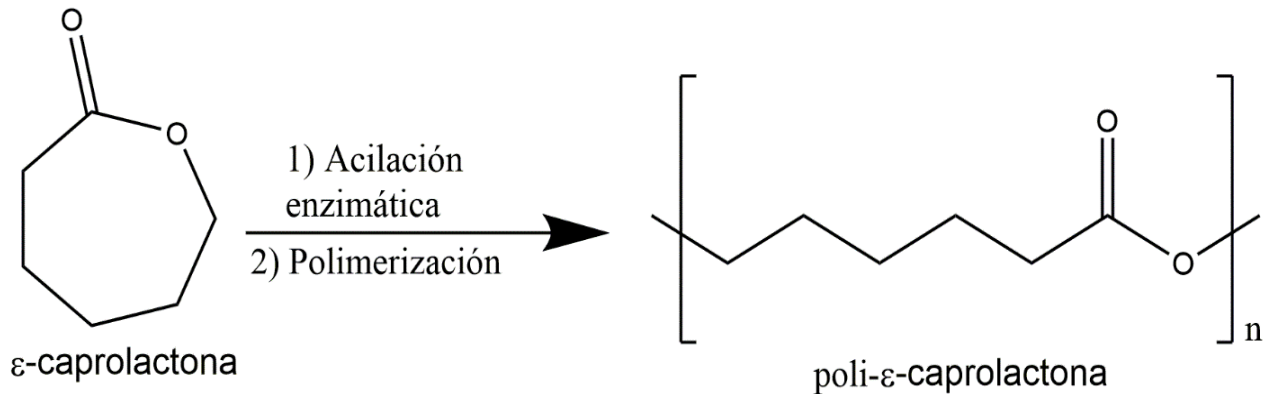


Figura 4. Ecuación química de la síntesis de poli-ε-caprolactona [23].

Debido a estas propiedades que posee la PCL ha sido ampliamente utilizado para la fabricación de DDS y también en el área de ingeniería de tejidos. Diferentes métodos de preparación de micropartículas de PCL, pueden ser empleados para incluir diferentes tipos de fármacos dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas [25].

El uso de micropartículas de PCL como DDS puede ser utilizada para la administración pulmonar o como sistemas de quimio-embolización en tumores cancerosos, mediante la administración intratumoral; debido al tamaño que presentan, lo que también hace posible ser utilizadas en terapia génica y no solo con como moléculas pequeñas, como los fármacos [26]. Las micropartículas poliméricas porosas se han considerado un sistema eficaz para la administración pulmonar debido a sus propiedades únicas, como: baja densidad, diámetro aerodinámico adaptativo y depósito pulmonar favorable [26]–[28]. En cuanto a los DDS de quimio-embolización no es necesario que las micropartículas posean poros, sin embargo, la porosidad aumenta el área superficial haciendo que exista una mayor carga de fármaco [29]. La técnica más utilizada para obtener partículas porosas de PCL, a partir del polímero ya sintetizado, es mediante una generación de una emulsión doble  $W_1/O/W_2$ ; en donde la fase acuosa  $W_1$  es adicionado un agente, que bajo condiciones específicas genera un gas para generar poros, como lo es el bicarbonato de amonio [26]–[28], [30], [31]. Sin embargo, los poros obtenidos con esta técnica suelen no estar interconectados entre sí, y mucho menos estar expuestos en la superficie.

### 2.2.1. Sistemas de liberación modificada multiparticulados de liberación por activación modulada para cáncer.

Para lograr el direccionamiento de los DDS hacia los tumores cancerosos, puede optarse por dos estrategias: el direccionamiento pasivo y el direccionamiento activo. En el direccionamiento pasivo, la acumulación dentro del tumor canceroso se lleva a cabo de manera inespecífica independiente de las propiedades fisicoquímicas y biológicas del tumor y/o del DDS; favorecida por el efecto de permeación y retención potenciado (EPR por sus siglas en inglés). Por otra parte, en el direccionamiento activo, se suele aprovechar las propiedades biológicas de tejidos cancerosos para potenciar la concentración intratumoral del DDS, y por ende la del fármaco antineoplásico [6]. Como se mencionó anteriormente existen un gran número de estímulos (Figura 5) que pueden modular la liberación de los fármacos, sin embargo, no todos pueden ser utilizados para el tratamiento contra cáncer. Las propiedades fisiológicas únicas de los tejidos cancerosos pueden ser aprovechadas para el desarrollo de sistemas de liberación de activación modulada; los estímulos, para modular la liberación, utilizados con mayor frecuencia pueden dividirse en: endógenos y exógenos [4], [6], [7], [36].

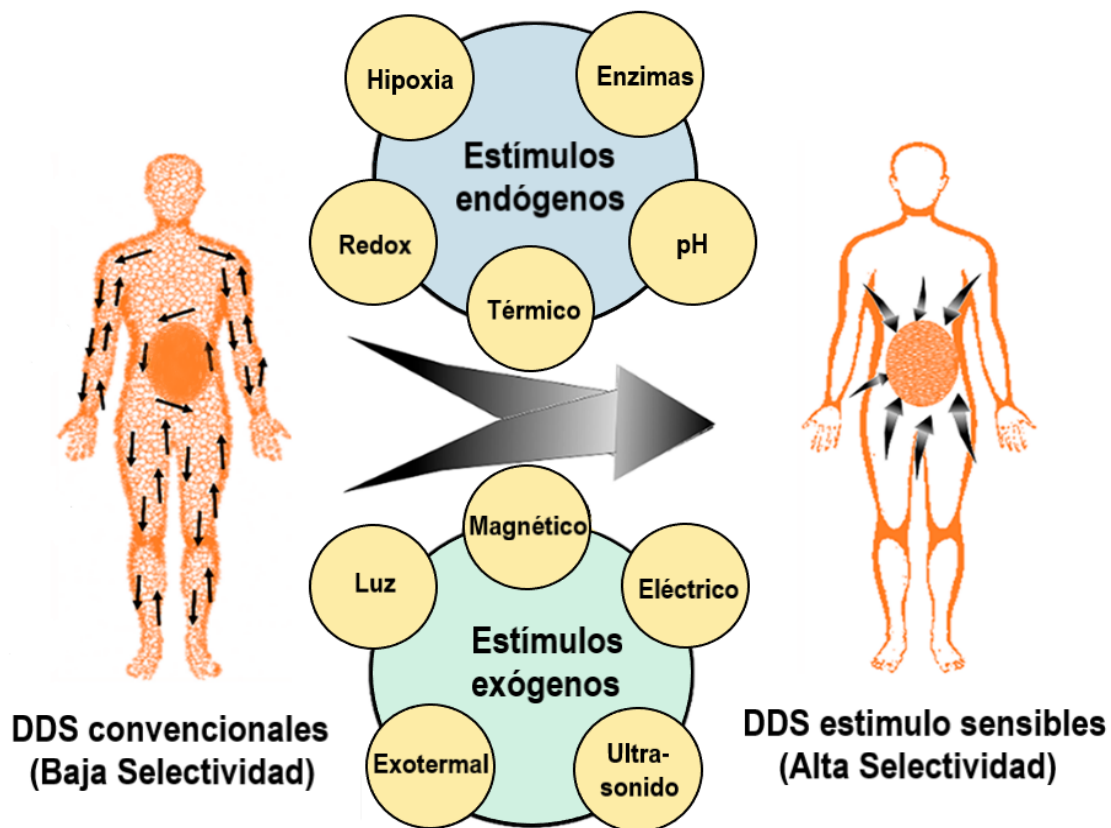


Figura 5. Representación de los diferentes estímulos, endógenos y exógenos, para los DDS estímulo sensibles dirigidos a cáncer [6].

**Tabla II Clasificación de los estímulos para la modulación de liberación en cáncer [3], [4], [6], [7].**

<b>Endógenos</b>	<b>pH</b>	La parte esencial de un DDS sensible al pH es un grupo susceptible al pH (un segmento ionizable, un ácido o base débil) que está unido a la estructura principal.
	<b>Oxido/Reducción</b>	La concentración de glutatión en células tumorales es muy alta. Este actúa como donador electrónico (agente reductor) provocando una tiolisis. Grupos disulfuro, tioeter y diselenuros son susceptibles.
	<b>Enzimático</b>	Se da la sobreexpresión de enzimas en células tumorales, algunas específicas como metaloproteinasas de matriz extracelular. Así, pueden ser acoplados sustratos de estas enzimas en el sistema para modular la liberación de fármacos.
<b>Exógenos</b>	<b>Luz (infrarrojo cercano)</b>	La terapia fototérmica, aumento localizado de temperatura a partir de luz, ha ganado relevancia debido a que el estímulo puede atravesar las barreras del tumor para provocar un daño mediante hipertemia. Esto es conseguido mediante el uso de materiales que absorben en el espectro de infrarrojo cercano y lo transforman en calor.
	<b>Campo magnético</b>	Materiales super paramagnético, como nanopartículas de magnetita ( $Fe_3O_4$ ), las cuales generan un aumento de temperatura localizado al aplicarse un campo magnético alterno, para conseguir un efecto hipertérmico
	<b>Ultrasonido</b>	Las ondas sonoras de alta frecuencia pueden ser utilizadas para crear un fenómeno de cavitación, el cual provoca la liberación de algunos sistemas debido a un colapso violento. además, presenta la ventaja de que este estímulo puede alcanzar zonas anatómicas que los otros estímulos externos no.

Como se puede apreciar en la Tabla II los estímulos externos generan un aumento localizado de la temperatura, lo que provoca diferentes eventos favorables en el tratamiento de tumores cancerosos. Entre estos efectos se encuentra la hipertermia la cual causa la ablación de las células cancerosas, aumento de la permeación de fármacos y/o agentes de contraste al disgregar el empaquetamiento celular del tumor, y también

este aumento de la temperatura puede ser utilizado como un estímulo para modular la liberación de fármacos, mediante el acoplamiento de un material sensible a este estímulo [7]. La investigación en DDS modulados por temperatura dirigido a oncología ha aumentado, debido a que además del efecto hipertérmico creado a partir de estímulos externos los tumores cancerosos poseen una temperatura mayor a los tejidos sanos, por qué sirve también como un estímulo interno. Los materiales termosensibles mayormente utilizados en este tipo de sistemas son los lipídicos que presentan un fenómeno de transición de fase gel-a-cristal líquido, como lo es la dipalmitoilfosfatidilcolina; y los polímeros que poseen una temperatura crítica de disolución, como la poli(N-isopropilacrilamida), la N-(2-hidroxipropil)metacrilamida o la poli(2-isopropil-2-oxazolona) [7], [37].

En un esfuerzo por controlar aún más la liberación del fármaco y aumentar la eficacia terapéutica de los mismos, los DDS pueden liberar en respuesta a estímulos duales o múltiples como: pH/temperatura, pH/redox, pH/campo magnético, pH doble, temperatura/campo magnético, temperatura/enzimas, temperatura/pH/redox, temperatura/pH/magnético, pH/redox/magnético, temperatura/redox/moléculas huésped y temperatura / pH / enzimático [38]; cabe señalar que las respuestas pueden tener lugar simultáneamente en la misma ubicación o de forma secuencial en diferentes entornos y/o compartimentos. Estos DDS sensibles de activación doble o múltiple revelaron una regulación extraordinaria sobre la liberación y administración del fármaco, lo que resultó en una mayor eficacia anticancerígena en los niveles *in vitro* e *in vivo* [6]. En la Figura 6 se muestra una representación del funcionamiento de DDS sensibles a múltiples estímulos, en ella se puede apreciar que este tipo de sistemas poseen una mayor penetración en el microambiente canceroso.

Para obtener DDS sensibles a múltiples estímulos es necesario emplear diferentes tipos de materiales para aprovechar las ventajas de cada uno y tratar de minimizar las limitantes de cada uno. Por ejemplo, se han reportado DDS tipo *core-shell*, en donde nanopartículas de óxido de silicio, las cuales poseen una gran porosidad, son recubiertas de un polímero sensibles a pH y temperatura para la liberación de doxorubicina (fármaco antineoplásico); un láser de infrarrojo cercano es utilizado para controlar la liberación, mediante el aumento de la temperatura y la generación de especies reactivas de oxígeno (terapia fototérmica) [39]. Como variante también ha sido reportado la inclusión de



nanopartículas magnética en las nanopartículas de óxido de silicio, para generar el aumento de temperatura mediante un campo magnético alterno [40].

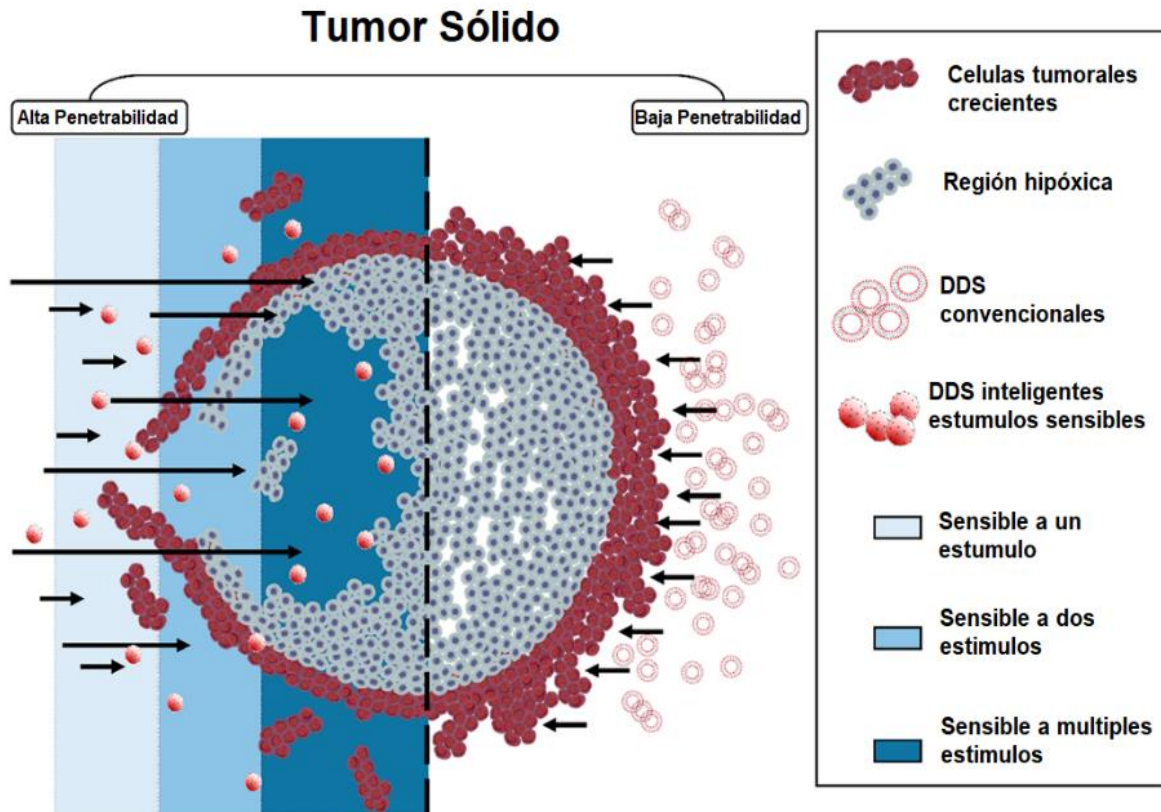


Figura 6. Esquematización de las diferentes acciones de DDS sensibles a uno, dos, y a múltiples estímulos [6].

### 2.3. Polímeros termosensibles

Los polímeros que son termosensibles generalmente presentan un cambio en el estado de hidratación el cual provoca una transición de fase volumétrica cuando la temperatura alcanza cierto valor. Estos polímeros pueden ser clasificados en dos grandes grupos: los polímeros que se vuelven insolubles en agua cuando la temperatura es aumentada a un valor crítico, llamada temperatura crítica inferior de solubilidad (LCST por sus siglas en inglés), y en polímeros los cuales se vuelven solubles en agua a temperaturas por encima de cierto valor, llamada temperatura crítica superior de solubilidad (UCST por sus siglas en inglés) [41]. Idealmente un DDS termosensible debe retener su contenido a la temperatura corporal ( $\sim 37^\circ\text{C}$ ), y liberarlo a la temperatura de un tumor canceroso ( $\sim 40\text{-}42^\circ\text{C}$ ) para sólo liberar de manera específica [42].

### 2.3.1. Poli-(*N*-isopropilacrilamida)

Las poliacrilamidas *N*-alquil-sustituidas son los ejemplos típicos de polímeros que presentan LCST en disoluciones acuosas, dentro de las cuales la pNIPAM ha sido ampliamente estudiada debido a que presenta un LCST cercano a la temperatura corporal (32-33°C), la cual es relativamente independiente del peso molecular y de la concentración. La LCST del pNIPAM puede ser incrementada mediante la copolimerización del pNIPAM con monómeros hidrofílicos, dando como resultado un aumento en el balance hidrofílico lo que a su vez causa un incremento en la cantidad de enlaces de hidrógeno formados entre el polímero y el agua [43], [44].

El efecto de contracción / hinchazón en soluciones acuosas se basa en la competencia entre las fuerzas hidrofobas e hidrofílicas; el pNIPAM presenta grupos hidrofobos como metilo, etilo o isopropilo dentro de su estructura. Por lo tanto, existen tres tipos de interacciones en la fase acuosa: polímero-polímero, polímero-agua y agua-agua. Cuando el polímero es soluble en medios acuosos (estado hinchado), las interacciones polímero-agua son predominantes sobre las interacciones polímero-polímero; cuando la temperatura alcanza la temperatura de transición, las interacciones polímero-polímero superan las fuerzas de solvatación, haciendo que el polímero sea insoluble en la fase acuosa [41]. Desde un punto de vista termodinámico, la solubilidad de un polímero en agua es gobernado por la energía de Gibbs, siendo soluble cuando la energía de Gibbs ( $\Delta G$ ) es negativa.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde H es la entalpia, T es la temperatura, y S es la entropía del sistema. Cuando las moléculas de agua están solvatando al polímero, la formación de enlaces de hidrógeno entre ambos vuelve la entalpia negativa, además de que la entropía es negativa debido a que las moléculas están más ordenadas en este caso; de acuerdo con la Ecuación 1 la entropía es multiplicada por -1 y por T. Por consiguiente, cuando la temperatura alcanza el valor de la LCST la contribución de la entropía se vuelve positiva y supera la entalpia; por lo que  $\Delta G$  se vuelve positiva haciendo que la solubilidad (dispersión molecular) no sea favorable (Figura 7). Así bien cuando existen más enlaces de hidrógeno, entre el polímero y el agua, la temperatura debe ser mayor para poder superar la contribución de la entalpia [41].

Alguno de los monómeros utilizados para aumentar la LCST del pNIPAM en DDS son: acrilamida, *N*-vinil-2-pirrolidona, *N*-vinilacetamida, *N,N*-dimetilacrilamida, ácido acrílico, ácido vinil acético y el ácido meta acrílico. Además, la copolimerización de NIPAM con monómero iónico que contiene grupos de ácido carboxílico forma un nanogel no sólo sensible a la temperatura, sino también sensible al pH [45]:[46].

Para la síntesis de nanogeles, el método de polimerización-precipitación mediada por radicales libres es el más utilizado debido a que presenta algunas ventajas sobre otros métodos, como obtener una estrecha distribución en el tamaño de los nanogeles. De manera general para esta síntesis es necesario, además de *N*-isopropilacrilamida (monómero principal) y del comonómero, el entrecruzador, en algunas ocasiones tensoactivo, iniciador y un catalizador [44]; aunado a esto es importante mantener una atmósfera libre de oxígeno que pueda reaccionar con los radicales libres e interferir con la reacción de polimerización.

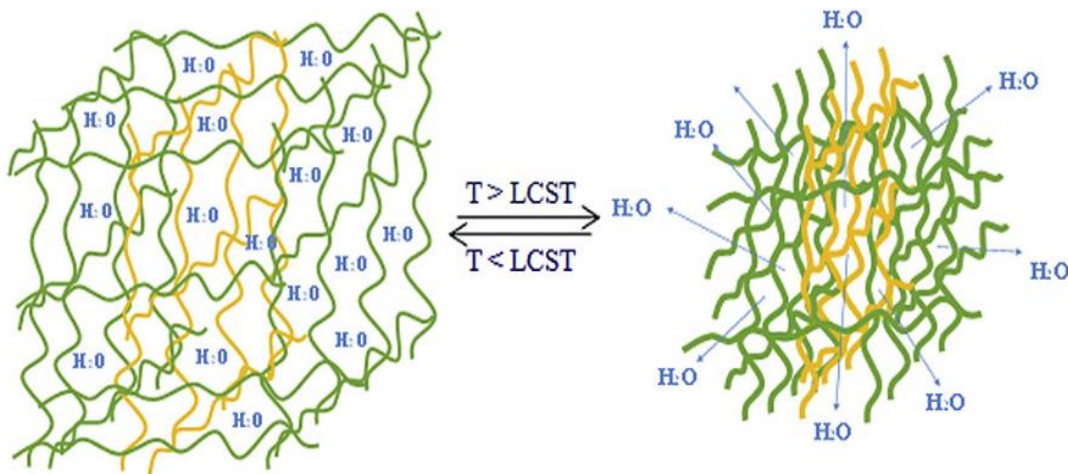


Figura 7. Representación gráfica de la transición de fase de nanogeles de pNIPAM. A temperaturas por encima de la LCST ocurre una desolvatación del polímero [45].

#### 2.4. Magnetismo

Magnetismo es el fenómeno físico producido por el movimiento de cargas eléctricas, el cual resulta en fuerzas de atracción y repulsión entre objetos [47]. El fenómeno del magnetismo radica en los movimientos orbitales y de *spin* de los electrones, y en cómo los electrones interactúan entre sí. Estrictamente toda la materia es magnética, es solo que algunos materiales son mucho más magnéticos que otros; la principal distinción es que en algunos materiales no hay interacción colectiva de los momentos magnéticos atómicos, mientras que en otros materiales existe una interacción muy fuerte entre los

momentos atómicos [48]. El comportamiento magnético de los materiales se puede clasificar según responden los materiales a los campos magnéticos, de acuerdo con los siguientes cinco grupos principales:

- **Diamagnetismo:** es una forma muy débil del magnetismo el cual no es permanente, y solo persiste cuando un campo externo está siendo aplicado. Esto es inducido por un cambio en el movimiento orbital de los electrones debido al campo magnético aplicado; la magnitud del momento magnético inducido es extremadamente pequeña y en una dirección opuesta a la del campo aplicado [47].
- **Paramagnetismo:** en esta clase de materiales, algunos de los átomos o iones en el material tienen un momento magnético neto debido a electrones no apareados en orbitales parcialmente llenos. Sin embargo, los momentos magnéticos individuales no interactúan magnéticamente y, al igual que el diamagnetismo, la magnetización es cero cuando se elimina el campo [48].
- **Ferromagnetismo:** esta propiedad la poseen ciertos materiales metálicos que poseen un momento magnético permanente en ausencia de un campo externo y manifiestan magnetizaciones muy grandes y permanentes. En este tipo de materiales, las interacciones de acoplamiento provocan que los momentos magnéticos de rotación neta de los átomos adyacentes se alineen entre sí, incluso en ausencia de un campo externo; esta alineación de rotación mutua existe sobre regiones de volumen relativamente grandes del cristal llamadas dominios [47].
- **Antiferromagnético:** en este el acoplamiento de momento magnético entre átomos o iones adyacentes ocurre de manera distinta que en los materiales ferromagnéticos; en uno de estos grupos, este acoplamiento da como resultado una alineación antiparalela. Como resultado los momentos magnéticos opuestos se cancelan entre sí y, como consecuencia, el sólido en su conjunto no posee un momento magnético neto [47].
- **Ferrimagnetismo:** las características magnéticas macroscópicas de los ferromagnetos y ferrimagnetos son similares; la distinción radica en la fuente de los momentos magnéticos netos; en los compuestos iónicos, como los óxidos, pueden producirse formas más complejas de ordenamiento magnético como resultado de la estructura cristalina; en estos compuestos la estructura está

compuesta por distintos iones, de distinto tamaño y/o carga lo que resulta en momentos magnéticos desiguales, como resultado el momento magnético del material resulta casi nulo [48].

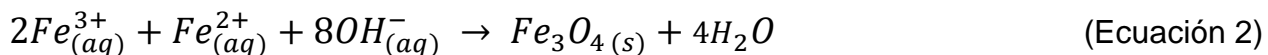
Los anteriores grupos solo comprenden materiales a nivel macroscópico, sin embargo, existe un sexto grupo en el cual se consigue una susceptibilidad magnética mayor cuando el tamaño del material es disminuido, este grupo se denomina superparamagnético. Cualquier material ferro o ferrimagnético está compuesto de pequeñas regiones, ya antes mencionadas, llamadas dominios; los cuales están separados por fronteras o paredes, en las cuales la dirección de la magnetización cambia gradualmente a lo largo de ellas. Normalmente los dominios poseen un tamaño microscópico, por lo que generalmente un espécimen de un material está constituido de varios dominios [47]. Conforme se disminuye el tamaño del material se obtienen partículas las cuales poseen un solo dominio también llamado monodominio, en el cual se encuentra una magnetización uniforme en su estado de saturación [48], por tal motivo son más susceptibles a un campo magnético externo.

#### 2.4.1. Nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas (NPM) son partículas metálicas de tamaño nanométrico, las cuales posee propiedades específicas y comportamiento en respuesta a un campo magnético; el tamaño de las NPM depende del método de síntesis, pero usualmente ronda entre 1-100 nm; sin embargo, en tamaños menores a 20 nm presentan un efecto superparamagnético [49]. Las nanopartículas de óxidos de hierro como la maghemita ( $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) y la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) son las NPM mayormente utilizadas en aplicaciones biomédicas en las últimas décadas, debido a que pueden ser direccionalizadas mediante un campo magnético, son biocompatibles, de baja toxicidad, no inmunogénicas, generan un incremento de la temperatura en presencia de un campo magnético alterno, modificación superficial sencilla y gran estabilidad coloidal aparente [49], [50].

Las diferentes propiedades de las NPM, como la composición, el tamaño, la morfología y la química de la superficie se pueden modular utilizando técnicas de síntesis apropiadas. Diferentes métodos de preparación han sido desarrollados para la obtención de NPM, de entre los cuales se encuentra el método de coprecipitación, el cual es ampliamente utilizado debido a su sencillez, eficiencia y la capacidad de obtener una gran

cantidad de NPM en cada lote de reacción [51]. Este método consiste en la coprecipitación de sales de Fe(II) y Fe(III) (nitratos, percloratos, sulfatos y cloruros) mediante el calentamiento y condiciones alcalinas; siguiendo la siguiente reacción química (Ecuación 2):



El tamaño de las partículas formadas por el método precursor está sujeto a muchas variables como la concentración de sales de hierro, la concentración de surfactante utilizado, basicidad media, velocidad de mezcla y temperatura, además es necesario una atmósfera de reacción libre de oxígeno para evitar la oxidación de magnetita en maghemita [49], [52]. Es posible realizar modificaciones de superficie en las NPM, para ello se introducen tensoactivos o polímeros en la reacción; como ejemplo la adición de ácido oleico, durante la síntesis, genera NPM hidrofóbicas que puede dispersarse bien en el solvente orgánico [52].

#### 2.4.2. Nanopartículas magnéticas en tratamiento de cáncer

Debido a los grandes retos que presenta la terapéutica del cáncer, el desarrollo de nuevas estrategias se ha convertido en un área de investigación necesaria; una estrategia es el desarrollo de materiales de características adecuadas para resolver estos retos, como lo son las NPM. Las características específicas de las NPM pueden contribuir, desde tres perspectivas diferentes, al tratamiento de tumores cancerosos, las cuales pueden ser utilizadas en conjunto para aumentar la eficacia del tratamiento. Dichas estrategias son el uso de NPM como: acarreadores farmacéuticos, generadores de hipertermia y agente de contraste en la resonancia magnética de imagen (RMI) [49], [52].

Las limitantes de los fármacos quimioterapéuticos tradicionales (alta citotoxicidad, baja solubilidad en agua y poca especificidad) dificultan la entrega de cantidades adecuadas de fármaco a los sitios del tumor, a concentraciones bajas para evitar toxicidad sistémica [53]. Las NPM como acarreadores farmacéuticos pueden resolver este problema mediante la entrega del fármaco en el área de interés (tumor) manteniendo las partículas en el sitio específico durante la liberación del fármaco, cuando se combina con un campo magnético externo [53] (Figura 8). El fármaco puede encontrarse en la superficie de las

NPM o se encapsula dentro de un sistema compuesto (“composito”), con algún otro tipo de material, como polímeros o lípidos; de esta manera el fármaco puede protegerse hasta llegar a las células cancerosas. Una vez que el sistema se concentra en el tumor, el fármaco se puede liberar mediante actividad enzimática o cambios en condiciones fisiológicas como el pH, la osmolalidad o la temperatura; de manera específica el aumento de temperatura puede ser mediado al aplicar un campo magnético alterno (AMF por sus siglas en inglés) a sistemas con NPM superparamagnéticas [53], [54].

En oncología, el término "hipertermia" describe diversas técnicas que son utilizadas para aumentar la temperatura, entre 39-43 °C, de una región corporal donde se encuentra un tumor canceroso utilizando una fuente de energía externa [55]. Se ha observado que las células cancerosas presentan una mayor sensibilidad a la hipertermia (presentan apoptosis a temperaturas de 41-46 °C), comparados con células normales [51]. La aplicación de materiales magnéticos para la generación de hipertermia se remonta desde 1957 cuando Gilchrist *et al* [56] calentaron varias muestras de tejido con nanopartículas de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  con tamaño de 20–100 nm expuestas a un campo magnético de 1.2 MHz; desde entonces se han reportado numerosas publicaciones utilizando esta hipertermia

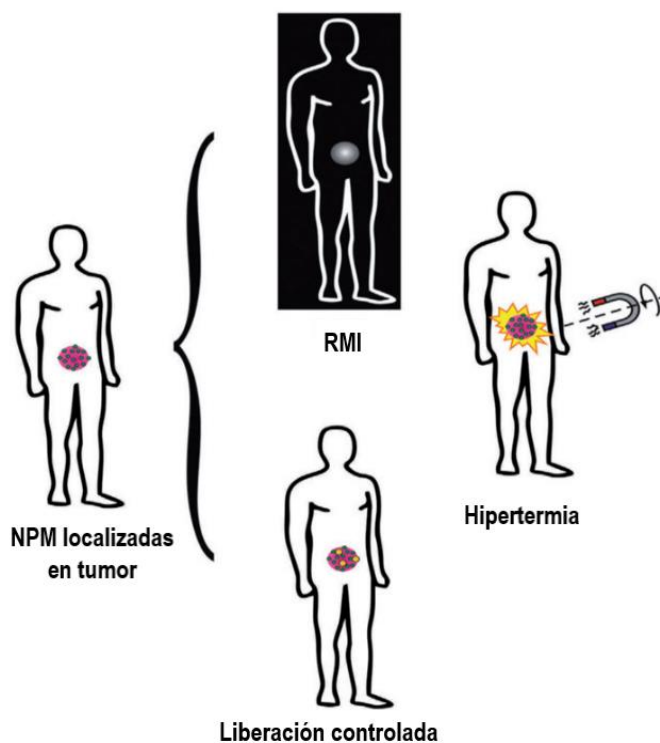


Figura 8. Representación de las aplicaciones de las NPM en la terapéutica del cáncer, dentro de las cuales se encuentran la Resonancia Magnética de Imagen (RMI), la hipertermia y la liberación controlada de fármacos [32].

magnética. En términos generales, las NPM son dispersadas en el tejido objetivo y luego de aplicar un AMF de suficiente fuerza y frecuencia para hacer que las partículas se calienten; si la temperatura puede mantenerse por encima del umbral terapéutico (42 °C) durante 30 minutos o más, las células cancerosas son destruidas [57]. Las ventajas de la hipertermia magnética, para el tratamiento de tumores cancerosos, son que las nanopartículas magnéticas pueden producir calor localizado cuando se exponen a un AMF; y que el AMF puede penetrar en tejidos más profundos que otras fuentes generadoras de calor (luz u ondas acústicas) [53].

Los teragnósticos generalmente se entienden como la combinación de funciones terapéuticas y de diagnóstico dentro de un solo sistema farmacéutico, que utiliza el diagnóstico para guiar los procedimientos terapéuticos, para resolver problemas clínicos y mejorar los resultados del tratamiento [53]. Las NPM han mostrado grandes ventajas como teragnóstico, ya que además pueden desempeñar múltiples funciones como sonda de imagen de RMI. La RMI se basa en el contrapeso entre el extremadamente pequeño momento magnético en un protón y la gran cantidad de protones presentes en el tejido biológico, lo que conduce a un efecto medible en presencia de grandes campos magnéticos [57]. El uso de ondas de radio tiende a perturbar los protones alineados, que vuelven a su estado original por un fenómeno de relajación; a través de este fenómeno de relajación, se puede observar una disparidad local en la densidad de protones de un tejido, del que se obtiene una imagen de RMI observable [51].

## 2.5. Microfluídica

La microfluídica puede ser definida como el estudio de fluidos (líquido o gas), los cuales pueden ser simples o complejos, mono o multifásicos, que circulan en dispositivos fabricados a base de una red de microcanales llamados dispositivos microfluídicos o también conocidos como microchips. Con estos microchips es posible manipular pequeños volúmenes (micro o nanolitros) de un fluido con precisión, lo que permiten que se ejecuten un gran número de pruebas en paralelo, generando grandes cantidades de datos con un gasto mínimo de reactivos [58], [59]. El primer producto basado en la microfluídica comercializado a gran escala fue, la cabeza de las impresoras de inyección de tinta *Inkjet*, en la década de los noventa; a partir de este momento la utilización de microchips se intensificó en aplicaciones que requieren manejo de fluidos, como en análisis biomédicos y químicos, áreas en donde la microfluídica se presenta como la



alternativa para miniaturizar los procesos analíticos. Dicha miniaturización trae consigo ciertas ventajas como lo son menos consumo de muestra/reactivo, reducción del riesgo de contaminación, menos costo por análisis, reducción de operaciones tediosas, aumento de la sensibilidad y especificidad, así como el aumento de la confiabilidad [60]. La microfluídica se está extendiendo rápidamente, en diversas áreas (Figura 9), desde la aplicación analítica original para microanálisis y microdetección, hasta la detección química de alto rendimiento, micromezclado, microreacción, microseparación, y en la fabricación de nuevos materiales funcionales; esto último debido a su excelente capacidad para controlar las interfaces de fluidos, así como a los excelentes rendimientos de transferencia de calor y masa [61].

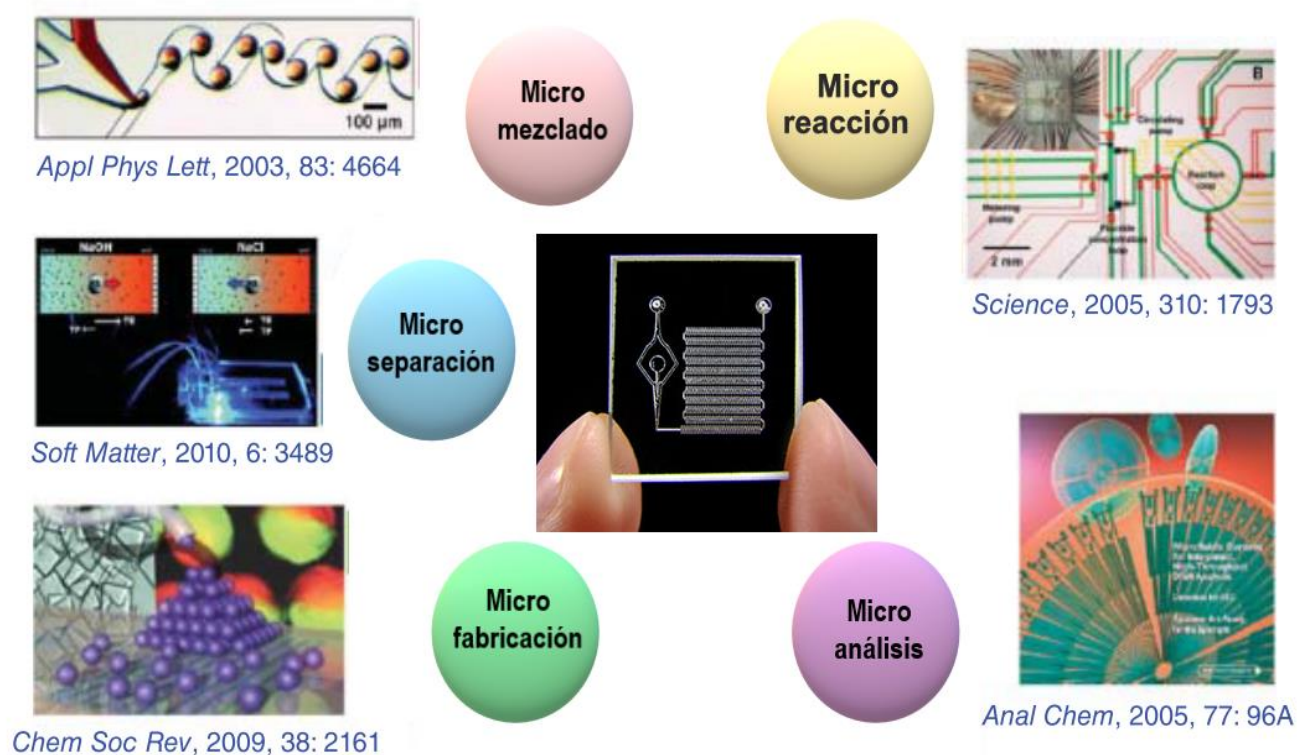


Figura 9. Ejemplificación de las diferentes aplicaciones que se le puede dar la microfluídica; en todas ellas se trata de la miniaturización de diversos procesos experimentales, por tal motivo los dispositivos microfluídicos son conocidos como lab-on-a-chip [45].

### 2.5.1. Fabricación de materiales asistidos por microfluídica

La fabricación de materiales asistidos mediante microfluídica, de manera precisa y controlada, puede ser dividida en tres categorías: (i) fabricación de microesferas y microcápsulas mediante una emulsión, como molde [62]–[65]; (ii) fabricación de membranas dentro de microcanales mediante la generación de un sistema de flujo laminar con interfaces en capas no cerradas [66]; y (iii) fabricación de microfibras

mediante el uso de sistemas de flujo laminar con interfaces anulares no cerradas [67], [68]. Las categorías antes mencionadas solo se restringen para sistemas de al menos dos fases, sin embargo existe otra categoría para la fabricación de nuevos materiales, la cual no está basada en un sistema multifásico; este se trata de la nanoprecipitación, la cual se basa en el cambio de solubilidad de algún material de manera controlada, dentro de los microcanales para formar nanopartículas [63], [69].

Las micropartículas poliméricas, de manera convencional, son fabricadas a partir de una emulsión, la cual es generada a partir de un agitador mecánico el cual genera un estrés mecánico entre dos líquidos inmiscibles; sin embargo, el tamaño y las propiedades de las partículas suelen no ser uniformes [60]. Como ya se mencionó las propiedades físicas y químicas de las micropartículas son de gran importancia para obtener ciertas características, las cuales se vuelven cruciales en DDS, por lo que la utilización de la microfluídica para la formación de una emulsión con gotas de tamaño homogéneo resulta en una alternativa atractiva.

#### 2.5.2. Formación de gotas basada en microfluídica

En un sistema microfluídico las gotas son formadas debido a la inestabilidad del líquido interno (fase discontinua) el cual es seccionado en gotas dentro de un fluido externo (fase continua); existen diferentes parámetros importantes en la formación de gota, de entre los cuales los más importantes son; geometría del canal, caudal de flujo, viscosidad del fluido y surfactante adicionado [70]. De manera general una relación de flujos relativamente alta, gran viscosidad de la fase continua, una tensión interfacial baja y dimensiones de canal pequeñas resultará en un decrecimiento del tamaño de gota obtenido [71]. Otra de las ventajas de la fabricación de emulsiones mediante un sistema microfluídico es la posibilidad de obtener emulsiones múltiples con estructuras internas complejas de manera controlada [61], [71].

Las gotas pueden formarse en tres principales regímenes de flujo (Figura 10 a, b, c); *dripping*, *jetting* y *squeezing* [70]. El modo *dripping* o de goteo es observado en relaciones de caudales bajos y, al aumentar esta relación cambia a modo *jetting*; el régimen tipo *dripping* produce gotas con una estrecha distribución de tamaño, mientras que el régimen tipo *jetting* produce gotas con una mayor dispersión en tamaño, aunque el tamaño de las gotas generadas es menor. Por otra parte, en el régimen tipo *squeezing* las gotas comienzan a crecer hasta obstruir la fase continua y consecuentemente, por el aumento

de la presión de la fase continua, la gota se desprende. Se han evaluado diferentes geometrías de los microchips para promover la generación de gotas con núcleos simples o múltiples. Basado en el contacto de flujo, las geometrías se clasifican en tres categorías principales: *co-flow*, *flow-focusing*, y *cross-flow* [72]; tal como se muestran en la Figura 10(d-h). En la geometría tipo *co-flow*, la fase dispersa fluye desde un canal interno situado de manera coaxial y en la misma dirección, a la fase continua la cual fluye por un canal externo con un caudal mayor [70]. En cuanto a la geometría tipo *flow-focusing*, la fase dispersa y la fase continua fluyen de manera coaxial, ya sea en la misma dirección o en dirección opuesta; al entrar en contacto ambas fases son direccionadas (flujo focalizado) hacia un canal de menor calibre, las gotas se forman en la entrada del orificio [60]:[70]. En la geometría tipo *cross-flow*, la fase discontinua fluye por un canal principal recto, mientras que la fase continua fluye por dos canales laterales los cuales se conectan al canal principal de forma perpendicular, es decir en un flujo cruzado [72]. La unión de los

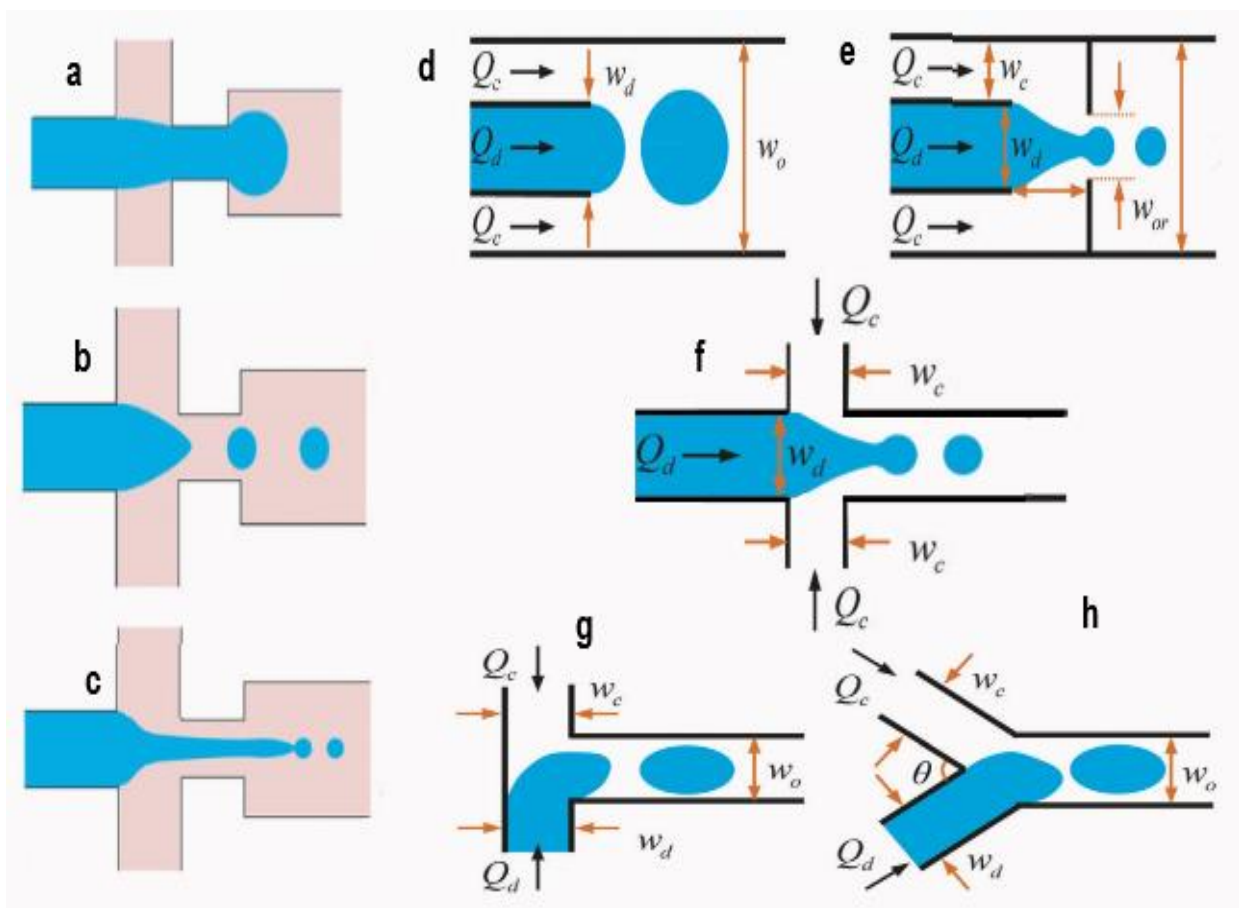


Figura 10. Regímenes de flujo para la formación de gotas; (a) squeezing, (b) dripping, y (c) jetting. Geometrías de dispositivos microfluídicos para la formación de gotas en emulsión simple; (d) co-flow, (e) flow-focusing, (f) cross-flow, (g) forma "T", y (h) forma "Y" [72].

dos canales de la fase continua dentro del canal de la fase discontinua se puede generar

a diferentes ángulos ( $0^\circ < \theta < 180^\circ$ ), siendo el más común el arreglo ortogonal por obtener gotas con una distribución de tamaño más baja [72]. Microchips constituidos por tres canales (uno para cada fase y otro más para la emulsión ya formada) también entran dentro de la clasificación de geometría tipo *cross-flow*, los cuales dependiendo de los ángulos en los que están dispuestos los canales se nombran como microchips de unión tipo “T” o “Y” [70].

### 2.5.3. Fabricación de dispositivos microfluídicos

Los primeros dispositivos microfluídicos fueron fabricados de silicios y vidrio, esto debido a su excelente resistencia a disolventes, preciso control de las dimensiones durante su fabricación, y superficie adecuada para aplicaciones electroforéticas [73]. Sin embargo, la fabricación de estos es compleja y tardada; por lo que para laboratorios de investigación donde se necesitan métodos rápidos de creación de prototipos era necesaria una alternativa que tuviera: (i) un tiempo de fabricación corto y (ii) un bajo costo para un ciclo completo (desde el diseño de la geometría hasta su fabricación, empaque y prueba) [74]. Los microchips fabricados de polímeros, que se desarrollaron mucho tiempo después, lograron una aceptación exponencial debido a que cubrieron esta necesidad de costo tiempo; además de poseer una gran versatilidad en sus aplicaciones. El polidimetilsiloxano (PDMS) es uno de los polímeros más utilizados gracias a la simple, pero alta calidad en la replicación de microchips. Además de este, también son utilizados otros polímeros termoestables en la fabricación de dispositivos microfluídicos mediante la tecnología de impresión tridimensional; mientras que los microchips fabricados de papel han demostrado su potencial microanálisis clínico con una producción de muy bajo costo; y dispositivos de hidrogel se ha utilizado en aplicaciones de cultivo celular [60].

#### 2.5.3.1. Litografía suave

La técnica para obtener los dispositivos microfluídicos de PDMS se le conoce como litografía suave (Figura 11). Esta técnica consiste en la utilización de un molde maestro, en el cual se encuentra grabado en altorrelieve el arreglo de los microcanales; sobre el molde maestro es colocado una mezcla de oligómeros de PDMS y agente entrecruzante (en relación 10:1). Posteriormente es calentado (cerca de  $70^\circ\text{C}$ ), en esta etapa la mezcla se polimeriza y se solidifica; se retira el molde y sobre el PDMS queda una representación negativa del molde maestro [58]. Para ser utilizado el microchip es perforado en los

extremos de los canales, posteriormente es fijado sobre una base de vidrio mediante el tratamiento con plasma debido a la formación de grupos silanoles que reaccionan con grupo alcoxi para formar enlaces covalentes [60].

La fabricación del molde maestro se lleva a cabo mediante fotolitografía. Esta técnica consiste en colocar una capa de un polímero fotosensible (fotoresina), de un grosor determinado, sobre una superficie de un sustrato (vidrio o silicio); posteriormente esta capa es irradiada a una intensa luz ultravioleta (UV) de manera selectiva en ciertas áreas mediante el uso de una fotomáscara [60]. La exposición hace que la fotoresina se modifique químicamente, de modo que las áreas expuestas se vuelvan solubles en el siguiente paso de desarrollo (fotoprotección positivo) o se vuelvan insolubles (resistencia negativa) [73] a la disolución reveladora, dejando el arreglo de los microcanales sobre el sustrato. Para la fabricación de la fotomáscara, es necesario utilizar un software de diseño asistido por computadora, como AutoCAD, en el que se diseña el arreglo de los microcanales en dos dimensiones, de acuerdo a la geometría y dimensiones seleccionadas; una vez obtenido el diseño este es impreso en acetato de forma negativa (microcanales no marcados) o positiva (microcanales marcados), según sea el caso [75].

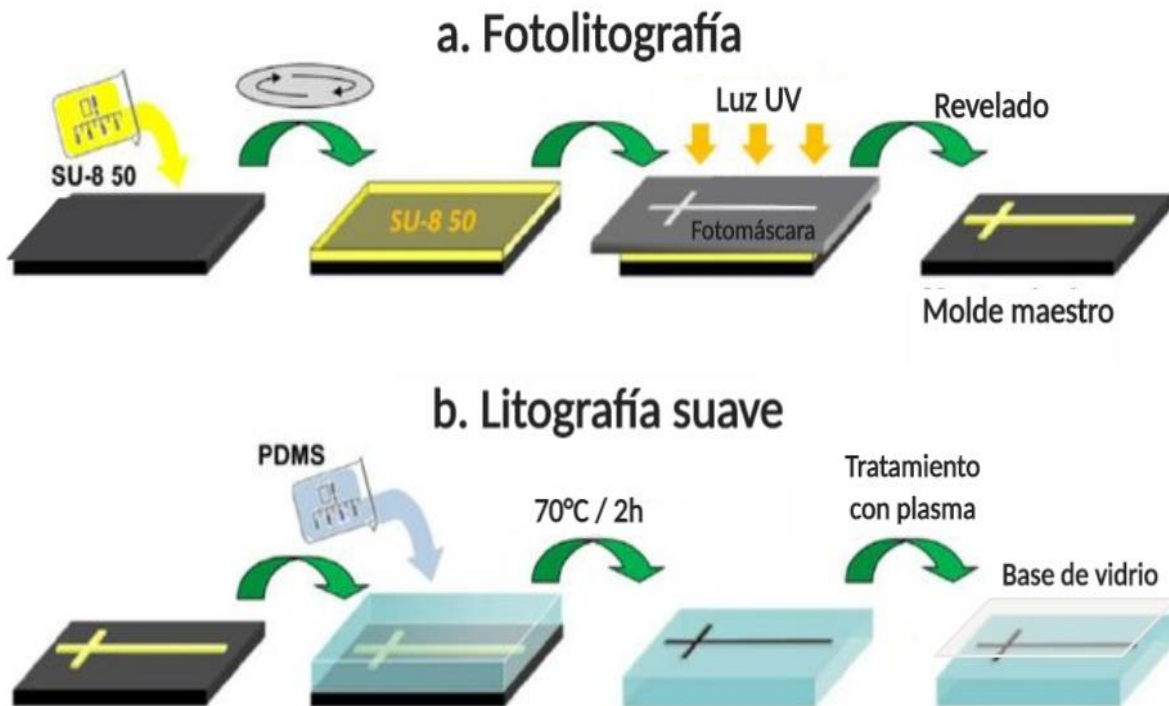


Figura 11. Etapas de los procesos de (a) fotolitografía para la fabricación del molde maestro, y (b) litografía suave para fabricación de microchips de PDMS.

### 2.5.3.2. Polidimetilsiloxano

El PDMS posee una combinación única de propiedades resultantes de la presencia de una cadena principal de siloxano inorgánico y grupos metilo orgánicos unidos al silicio (Figura 12); por lo tanto, pertenece a un grupo de compuestos organosilícicos poliméricos que comúnmente se denominan siliconas [76], cuya fórmula química es  $\text{CH}_3[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ . El PDMS proporciona una buena estabilidad química y no es higroscópico; además, es inerte, no tóxico, biocompatible, no inflamable, tiene buena estabilidad térmica (hasta 186 °C en aire), ópticamente transparente y permeable a gases no polares como el oxígeno. Sin embargo, hay algunas desventajas que acompañan a estos beneficios, como: el PDMS entrecruzado (como se encuentra en microchips) puede hincharse fácilmente mediante una serie de solventes orgánicos no polares como el tolueno y el hexano; la elasticidad y la expansión térmica del PDMS pueden limitar su utilidad en la fabricación de múltiples capas; su suavidad limita la relación de dimensiones de las microestructuras; y puede absorber fármacos, proteínas y pequeñas moléculas hidrófobas [73]. Debido a estas propiedades hidrofóbicas, se han realizados varios esfuerzos para modificar la superficie de los microcanales de PDMS para disminuir su hidrofobicidad y así resolver las limitaciones del PDMS nativo; particularmente el tratamiento con plasma de oxígeno ha sido ampliamente utilizado, y aunque es un tratamiento efectivo, la superficie recupera su hidrofobicidad gradualmente después de un corto lapso de tiempo [77]. Se han reportado diferentes formas de aumentar la resistencia del PDMS frente disolventes orgánicos de manera permanente, mediante tratamientos químicos [78], la adición de tensoactivos durante la polimerización del PDMS [79], y mediante la deposición de moléculas hidrofílicas [80], [81].

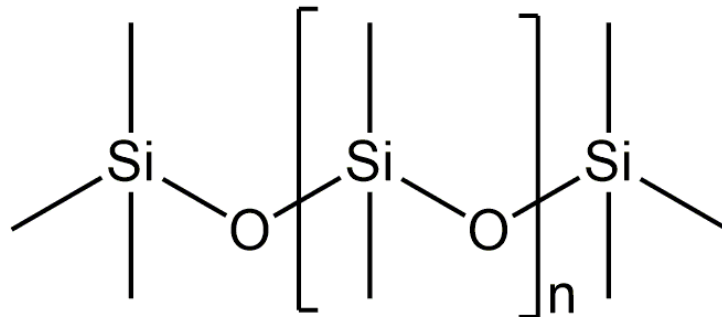


Figura 12. Estructura química del polidimetilsiloxano (PDMS).

### 3. Planteamiento del problema

Debido a que se estima que la resistencia múltiple a fármacos es el responsable del 90% de los fracasos en el tratamiento contra el cáncer, la necesidad de atacar la MDR se ha convertido en un área importante de investigación para garantizar la eficacia de la terapéutica actual. La exposición a concentraciones subterapéuticas de los fármacos antineoplásicos, debida a la complicada biología del microambiente intratumoral, es la principal causa de origen de la MDR [5].

Una de las estrategias más prometedoras es el desarrollo de DDS. Estos han demostrado una optimización de la acción farmacológica con la consecuente reducción de efectos secundarios por la utilización de estos, características de gran valía en tratamientos contra cáncer. Dentro de los DDS existen sistemas capaces de regular la liberación de los fármacos en función a ciertos estímulos, endógenos o exógenos, por lo que se puede tomar ventaja de ciertas características específicas de tejidos cancerosos; como los son: pH, temperatura, cantidad de oxígeno, alta vascularización, entre otras [6]. Además, los DDS que responden a más de un estímulo o que cumplen otra función como los teragnósticos (DDS multifuncionales) representan la mejor opción para un tratamiento muy prometedor contra cáncer; sin embargo, la complejidad en estos DDS novedosos; requiere alternativas de manufactura que con los que se logren las características necesarias para un buen desempeño terapéutico, y al mismo tiempo sean factibles para su producción a gran escala, una de las casusas de que algunos DDS fabricados muy prometedores en etapas tempranas de desarrollo, no logren llegar a la etapa final de comercialización o si es que lo logran, los costos de producción encarecen el precio final de los medicamentos.

Con el presente trabajo se busca crear un DDS multifuncional basado en micropartículas poliméricas porosas de PLC con propiedades magnéticas, para la liberación controlada de un fármaco antineoplásico que recientemente ha demostrado eficacia en el tratamiento de tumores cancerosos [82]. Estas micropartículas podrán representar una alternativa a partículas porosas inorgánicas reportadas[39], [40]; fabricadas mediante microfluídica, un proceso robusto y factible para su producción a gran escala, mediante la paralelización del mismo [83], [84].

#### 4. Objetivo general.

Controlar la liberación en condiciones intratumorales de 6-mercaptopurina cargada en micropartículas poliméricas porosas de policaprolactona, fabricadas mediante un dispositivo de microfluídica; las cuales contienen nanopartículas magnéticas de magnetita dispersas y están recubiertas de un copolímero termosensible de pNIPAM y ácido metacrílico.

##### 4.1. Objetivos particulares.

- Diseñar y fabricar un molde maestro de microfluídica, con arreglos tipo *cross-flow* con ángulos de corte a 30 y 90°, mediante fotolitografía.
- Fabricar y caracterizar dispositivos microfluídicos de PDMS, mediante litografía suave.
- Modificar y evaluar superficie de microcanales de los dispositivos microfluídicos de PDMS, mediante la unión de PVA, para incrementar la resistencia a disolventes orgánicos.
- Sintetizar y caracterizar nanopartículas magnéticas de magnetita recubiertas con ácido oleico por el método de coprecipitación.
- Sintetizar copolímeros de pNIPAM y ácido metacrílico mediante polimerización-precipitación, y evaluar el efecto de la composición sobre la LCST.
- Fabricar micropartículas porosas de PLC con nanopartículas magnéticas dispersas dentro, mediante microfluídica.
- Evaluar el efecto de la cantidad de canfeno como poroformador, sobre la porosidad obtenida en las micropartículas de PCL.
- Evaluar la influencia del ángulo de corte de los microchips fabricados y velocidades de flujo de ambas fases, sobre los regímenes de flujo en la formación de gotas de la emulsión o/w.
- Recubrir micropartículas porosas de PCL con el copolímero pNIPAM-Am mediante polimerización-precipitación.
- Realizar adsorción de 6-mercaptopurina en micropartículas porosas de PLC recubiertas de pNIPAM-AM.
- Realizar estudios de liberación de 6-mercaptopurina sin la aplicación de un campo magnético alterno y con la aplicación de este.



## 5. Hipótesis de trabajo

La fabricación de micropartículas porosas de PLC con propiedades magnéticas y sensibles a temperatura, fabricadas mediante un dispositivo microfluídico, para la liberación de 6-mercaptopurina, permitirá la liberación controlada bajo la aplicación de un campo magnético alterno, además de controlar tamaño y dispersión de las micropartículas.

## 6. Metodología experimental

### 6.1. Materiales

Cloruro ferroso tetrahidratado ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , >99%), cloruro férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99\%$ ), ácido oleico (90%), N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED,  $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ , 99 %); N-N'-metilenbisacrilamida (MBA,  $(\text{CH}_2\text{CHCONH})_2\text{CH}_2$ , 99 %), (N-isopropilacrilamida) (NIPAM,  $\text{H}_2\text{CCHCONHCH}(\text{CH}_3)_2$ , 99 %), ácido metacrílico (Am, 99%, 100-250 ppm hidroquinona) Persulfato de amonio (PSA,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ,  $\geq 98\%$ ) Policaprolactona (PCL,  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2)_n$ , Mw 45 kDa), Alcohol polivinílico (PVA,  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ , hidrolizado 87-89%, Mw 13-23 kDa), Alcohol polivinílico (PVA  $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ , hidrolizado 87-89%, Mw 84-126 kDa), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Cloruro de metileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , pureza 99.9%), Dodecil sulfato de sodio (SDS,  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$ ), hidróxido de sodio (NaOH, 98%) se obtuvieron de J.T. Baker; canfeno ( $\text{C}_{10}\text{H}_{16}$ ) fue obtenido de Productos Químicos El Trébol (Ciudad de México, México); el agua desionizada se obtuvo con un equipo Nanopure Diamond (Barnstead); Sylgard 184 Kit (Polidimetilsiloxano  $(\text{C}_2\text{H}_6\text{OSi})_n$  (PDMS) y Agente curante) se obtuvieron de Dow Chemical Company (Midland, MI, USA), Resina SU-8 se compró de MicroChem (Westborough, MA, USA).

Todos los reactivos fueron utilizados directamente sin algún tratamiento previo, excepto para el caso del ácido metacrílico al que le fue retirada la hidroquinona, mediante una columna de vidrio la cual contenía una resina de estireno-divinilbenceno (Alfa Aesar® 42489).

### 6.2. Fabricación del dispositivo microfluídico

#### 6.2.1. Diseño de foto-máscara con arreglos de microcanales

Los arreglos de microcanales de los microchips utilizados se diseñaron mediante el software LibreCAD (QCAD). Se realizaron dos diseños tipo *cross-flow*, en los cuales los

ángulos de corte de la fase discontinua fueron de 30° y 90° (con respecto al canal principal); el ancho de todos los canales, para ambos diseños, fue de 300 μm, y las dimensiones totales de cada diseño fueron de 20X5mm.

Ocho diseños (cuatro réplicas de cada uno) fueron dispuestos en un área circular de 7.5 cm de diámetro, correspondiente a las dimensiones de la fotomáscara. Finalmente, el diseño fue impreso en acetato en forma negativa (los canales transparentes). En la Figura 13 se muestra las dimensiones de cada diseño

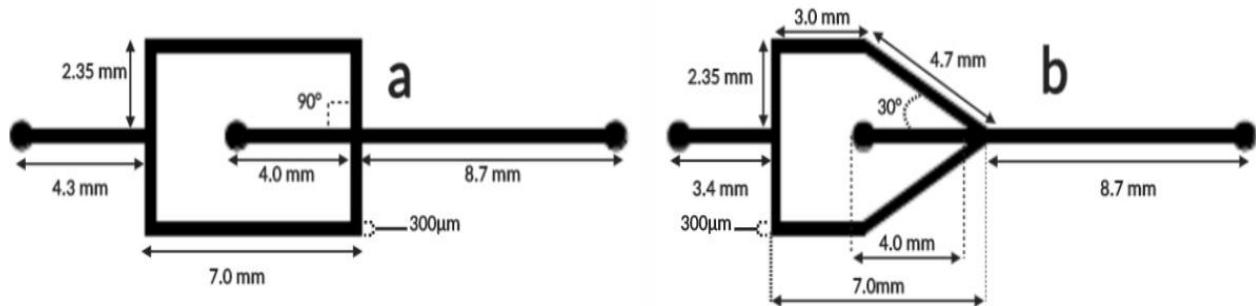


Figura 13. Dimensiones de los arreglos de microcanales diseñados para la fabricación de la fotomáscara.

### 6.2.2. Fabricación del molde maestro por fotolitografía

Empleando la resina fotosensible SU-8 3035 y obleas de silicio ( $r=3.81$  cm, Silicon Valley Microelectronics) como sustrato, se elaboró el molde maestro de la siguiente manera:

- Se realizó un lavado, por inmersión, de la oblea en solución “piraña” ( $H_2SO_4:H_2O_2$  5:1v/v) por dos días para eliminar posible materia orgánica. Posteriormente se lavaron con jabón neutro y se enjuagó con agua destilada.
- Se calentó la oblea por 5 minutos a 200 °C, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se colocó dentro del *Spin coater* previamente programado a dos pasos: Paso 1: 500 rpm por 12 segundos, con una aceleración de 100 prm/s, y paso 2: 1000 rpm por 30 segundos, con una aceleración de 300 prm/s. Se sometió a un ciclo bajo estas condiciones, para comprobar que la oblea estaba sujeta adecuadamente.
- Se colocaron aproximadamente 3 g de la fotoresina y se aplicaron los dos pasos previamente mencionados. Una vez terminado el segundo paso se retiró la oblea del equipo y se calentó a 95 °C por 30 minutos (*pre-bake*).
- Los pasos anteriores otorgan una película de fotoresina de aproximadamente 80 μm de grosor; por lo que se repitió el procedimiento para obtener una capa de 160 μm, aproximadamente.

- Cuando la oblea llegó a temperatura ambiente, se colocó la fotomáscara sobre la oblea y cada diseño de microchip se expuso a luz ultravioleta (UV) mediante el uso de una lámpara (B-100AP, Black-Ray®, 100W, 365nm), durante 76 segundos.
- Después de que todos los diseños fueron expuestos a luz UV se retiró la máscara maestra y se realizó un segundo calentamiento (*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 cristizador, se añadió el agente revelador (acetato de propilenglicolmetiléter) y se mantuvo con agitación manual, por aproximadamente 12 minutos, trascurrido 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.

### 6.2.3. Fabricación de microchips de PDMS mediante litografía suave

La oblea con los diseños plasmados en alto relieve (molde maestro) se colocó dentro de una caja Petri, se limpió con aire comprimido, para eliminar cualquier partícula de polvo y se agregó una mezcla PDMS y agente curante (10:1) hasta alcanzar una altura de 1 cm. Enseguida se introdujo en un desecador para eliminar las burbujas de aire, dentro de la mezcla, y posteriormente se incubó a una temperatura de 70 °C por dos horas. Una vez polimerizados el PDMS los microchips fueron cortados uno por uno, se perforaron las entradas y la salida con un punzón de 0.75 mm (EMS, Rapid Core); para posteriormente 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, para favorecer la adhesión del microchip sobre el portaobjetos. Para la caracterización de los microcanales de cada uno de los microchips, se realizaron varios

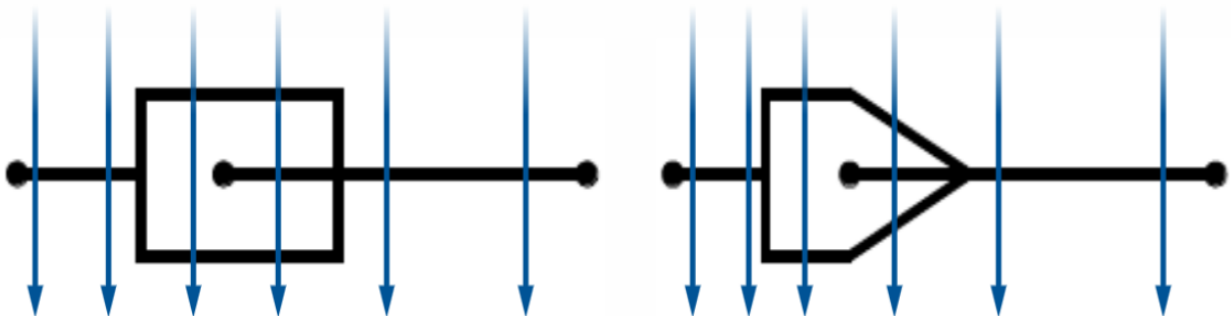


Figura 14. Zonas de corte para la determinación de las dimensiones de los microcanales de los microchips.

cortes transversales en microchips sin fijar, según lo muestra la Figura 14. Cada corte fue observado al microscopio a 10x y fotografiado. La altura y anchura fueron determinadas empleando el programa ImageJ (National Institutes of Health).

#### 6.2.4. Modificación superficial de microcanales

Con el fin de aumentar la resistencia a disolventes orgánicos, se realizó un recubrimiento con PVA. Para las variables del recubrimiento de PDMS, se realizaron 8 experimentos. Con estos experimentos se evaluaron el efecto del recubrimiento en función de: el número de tratamientos de plasma, el peso molecular del PVA y la concentración de PVA utilizada en el tratamiento; cada variable fue evaluada a dos niveles. Se cortaron ocho placas de PDMS de 4 cm<sup>2</sup> las cuales fueron tratadas con plasma a diferentes números de ciclos, posteriormente puestas en contacto en disoluciones de PVA a diferente concentración y peso molecular, durante 10 minutos a temperatura ambiente y lavadas con agua desionizada; las condiciones de cada uno de los experimentos se muestran en la Tabla III. Como variable de respuesta se midió el ángulo de contacto, entre la superficie tratada y 10 µl de agua desionizada, mediante el análisis de fotografías con el software ImageJ (National Institutes of Health).

**Tabla III. Condiciones de experimentación, para la evaluación del recubrimiento de PDMS con PVA.**

Variable	Nivel		Experimentos							
	Bajo (-)	Alto (+)	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Número de ciclos de plasma de descarga 115V 50/60 Hz.</b>	1	3	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>Concentración de PVA (% m/v)</b>	1	4	-	-	+	+	-	-	+	+
<b>Peso molecular PVA (kDa)</b>	13-23	124-186	-	-	-	-	+	+	+	+

Para el recubrimiento de los microcanales, se preparó una disolución 1% m/v de PVA (13-23kDa) en agua desionizada, y se filtró antes de ser empleada. A un microchip previamente fijado en la base de vidrio, se le aplicó un tratamiento con plasma en la entrada de la fase discontinua y en la salida por 45 segundos en cada una; enseguida se introdujo en el canal la disolución de PVA, la cual permaneció en contacto por 10 minutos. Posteriormente el tiempo se retiró la disolución y se realizó un lavado con agua

desionizada y posteriormente con aire mediante una jeringa vacía; finalmente se incubo por 10 minutos a 70 °C para eliminar todo el rastro de humedad. Además, al PDMS recubierto y sin recubrir fue analizado mediante FTIR.

### 6.3. Síntesis de nanopartículas magnéticas hidrofóbicas

La síntesis de NPM de magnetita se llevó a cabo mediante una coprecipitación con temperatura controlada. Se agregaron 0.368 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1.850 mmol) y 1 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (3.7 mmol) en 18.6 ml de agua con una atmósfera de  $\text{N}_2$ , la mezcla de reacción fue llevada a una temperatura de 85-90 °C; al llegar a la temperatura de reacción se adicionaron 8 ml de NaOH 2M y 0.8 ml de ácido oleico; durante la adición se formó un precipitado negro. El precipitado se lavó dos veces con acetona para remover el exceso de ácido oleico, y fue secado a temperatura ambiente durante 12 horas. Las partículas obtenidas fueron analizadas por TEM y por FTIR. Además, se midió el incremento de la temperatura de una muestra al aplicar un campo magnético; Se utilizó un generador que produce una intensidad de campo de  $17.4 \text{ kAm}^{-1}$  a una frecuencia de 104 kHz, la medición del incremento de temperatura se realizó con un sensor de temperatura de fibra óptica (FOTEMP1-OEM-MNT, Micronor Inc.) conectado a un equipo de cómputo (precisión de 0.2 °C); cada 500 milisegundos durante 20 minutos, obteniendo una curva de calentamiento. Este procedimiento se realizó por duplicado.

### 6.4. Fabricación de micropartículas porosas

#### 6.4.1. Efecto de la cantidad de PLC

Las micropartículas se fabricaron a partir de una emulsión o/w, la cual se elaboró dentro de un microchip previamente recubierto con PVA. La fase continua estuvo constituida de una disolución de PVA (84-126 kDa) 2% m/v en agua, y la fase discontinua por PLC (1.5-5% m/v), y canfeno (10 %m/v) en DCM. Con ayuda de dos bombas para jeringas (New Era Pump Systems, Inc.), las cuales fueron conectadas a cada uno de los orificios en el microchip (Figura 15), la fase discontinua se adicionó con un caudal de  $Q_c=100 \mu\text{l}/\text{min}$ , mientras que la fase discontinua se adicionó a un caudal de  $Q_d=50 \mu\text{l}/\text{min}$ , en un microchip de 90°. Una vez iniciado la adición de ambas fases el sistema se dejó estabilizar por 5 minutos y posteriormente se recolectó una muestra de fase discontinua de 3ml en un matraz redondo de 500ml. Para la solidificación de las gotas el DCM fue eliminado mediante presión reducida a -40 cmHg a temperatura ambiente, con la ayuda

de un rotaevaporador. Una vez solidificadas las micropartículas fueron filtradas y lavadas con agua desionizada para eliminar los restos de PVA. Posteriormente las partículas fueron redispersadas en aproximadamente 2 ml de agua desionizada, congeladas y liofilizadas, para eliminar el canfeno y generar los poros. Las muestras obtenidas fueron observadas mediante SEM, para evaluar la porosidad.

#### 6.4.2. Efecto de cantidad de canfeno en porosidad

Se realizó el mismo procedimiento utilizado en el numeral anterior, con la diferencia de que la fase continua estuvo constituida de una disolución de PVA (84-126 kDa) 2% m/v en agua, y la fase discontinua por PLC (5% m/v), NPM (0.1 %m/v), y canfeno (0-20 %m/v) en DCM. El caudal de la fase continua fue de  $Q_c=160 \mu\text{l}/\text{min}$ , mientras que la fase discontinua se adicionó a un caudal de  $Q_d=40 \mu\text{l}/\text{min}$ . Una vez iniciado la adición de ambas fases el sistema se dejó estabilizar por 5 minutos y posteriormente se recolectó una muestra de fase discontinua de 10 ml en un matraz redondo de 100 ml. Después de solidificar las micropartículas y liofilizar las muestras obtenidas fueron observadas mediante SEM, para evaluar la porosidad.

#### 6.4.3. Caracterización de los regímenes de flujo en función del ángulo de corte y caudales de las fases

Una vez elegida la cantidad de canfeno adecuada, se evaluaron los regímenes de flujo de la formación de las gotas, en función del ángulo de corte y relación de caudales ( $q$ ), donde:

$$q = \frac{Q_c}{Q_d} \dots\dots\dots \text{(Ecuación 3)}$$

Diferentes relaciones de caudal ( $q$ ) fueron evaluadas para diferentes  $Q_d$ , para cada uno de los ángulos de microchips, previamente fabricados, como se muestra en la Tabla IV. Con ayuda de un microscopio óptico (Leica Microsystems) y de una cámara Phantom de alta velocidad (Ametek, Inc), se observó y se registró, la formación de las gotas dentro del microchip. Una vez accionadas las bombas de alimentación de ambas fases, el flujo se dejó estabilizar por 3-5 minutos, para iniciar con el registro. Posteriormente mediante el uso del programa ImageJ (National Institutes of Health) se determinó el diámetro equivalente al volumen de las gotas dentro del canal, midiendo las dimensiones de la gota desde la parte superior de canal.

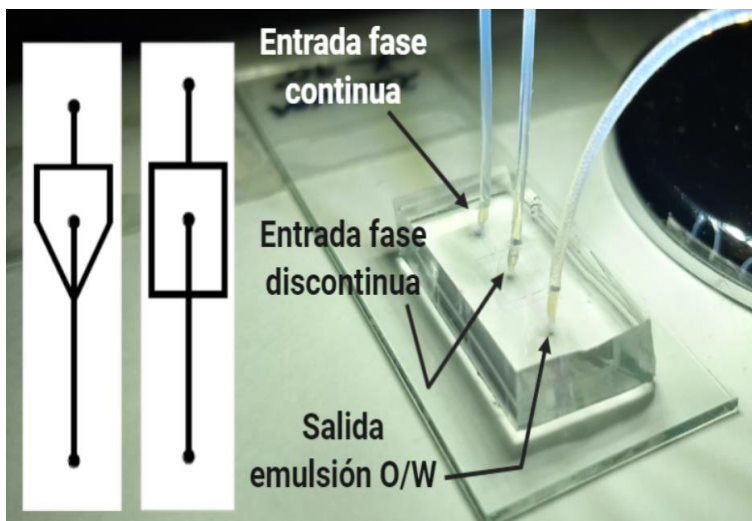


Figura 15. Diseños e imagen de un microchip unido a un portaobjetos en funcionamiento.

**Tabla IV. Caudales de ambas fases trabajadas para la caracterización de los regímenes de flujos para cada una de las dos geometrías de dispositivos microfluídicos.**

Qd (µl/min)	Microchip 30°	Microchip 90°
5	q= 2, 4, 8, 12, 20, 40 y 80	q= 2, 4, 8, 12, 20, 40 y 80
10	q= 2, 4, 8, 12, 20 y 40	q= 2, 4, 8, 12, 20 y 40
20	q= 2, 4, 8, 12, 16 y 20	q= 2, 4, 8, 12 y 16
30	q= 2, 4, 8, 10 y 12	q= 2, 4, 8 y 10
40	q= 1, 2, 4 y 8	q= 1, 2, 4 y 8

Debido a que microchip está constituido de canales rectángulos el confinamiento de las gotas podría dar tres formas diferentes: elipsoides, esfera sin dos casquetes y esfera completa; para calcular el volumen se utilizaron las siguientes ecuaciones de volumen:

- Cuando la gota tuvo forma de elipsoide se utilizó la ecuación correspondiente, tomando las dimensiones del canal como el ancho ( $w_c$ ) y el alto ( $h_c$ ) del elipsoide, y realizando la medición únicamente el largo ( $l$ ). Si el elipsoide poseía una altura menor al canal, se media y este valor se toma en consideración.

$$V_{elipsoide} = \frac{4\pi}{3} w_c h_c h l \dots \dots \dots \text{(Ecuación 4)}$$

- Para gotas circulares donde el diámetro medido fuera mayor a la altura del canal, se utilizó la fórmula de una esfera sin dos casquetes circulares, donde la altura de los casquetes se determinó mediante la mitad de la diferencia entre la altura del canal y el diámetro del círculo medido.

$$V_{esfera\ sc} = \frac{4\pi r^3}{3} - 2V_c = \frac{4\pi r^3}{3} - 2\left(\frac{\pi h_c^2}{3}(3r - h_c)\right) \dots \dots \text{(Ecuación 5)}$$

- Para gotas donde el diámetro medido fuera menor a la altura del canal, el volumen se determinó mediante la ecuación de una esfera.

$$V_{esfera} = \frac{4\pi r^3}{3} \dots \dots \dots \text{(Ecuación 6)}$$

## 6.5. Recubrimiento termosensible

### 6.5.1. Evaluación de la cantidad de ácido metacrilato sobre LCST en nanogeles

Para evaluar el efecto del ácido metacrílico sobre la LCST, se sintetizaron varios lotes de nanogeles, con diferentes porcentajes molares de ácido metacrílico/NIPAM (0,1.5,3 %mol). En 50.0 ml de agua desionizada se disolvió 1.08 g de NIPAM, 84 mg de MBA, 60mg de PSA, 48 mg SDS, y la cantidad seleccionada de ácido metacrílico; una vez disuelto la mezcla se agregó en un matraz redondo de tres vías, se selló, se purgó la solución con nitrógeno mediante burbujeo y se colocó en una incubadora a 35 °C con una agitación orbital a 200 rpm. Una vez estabilizada la temperatura se adicionó una disolución de TEMED, equivalente a 60 mg; la reacción se mantuvo por 5 horas manteniendo una atmosfera de nitrógeno, en la Figura 16 se muestra la ecuación química de polimerización. Una vez concluido el tiempo de reacción la muestra fue colocada en una membrana de diálisis (12-14 kDa) durante 24 horas, para su purificación. La determinación de la LCST se realizó mediante turbidimetría, midiendo transmitancia en un intervalo de temperatura de 25-55 °C, con la ayuda de un espectrómetro UV-Vis (Ocean Optics Inc.); se realizó un ajuste matemático de Boltzmann mediante software (Origin Pro-8).

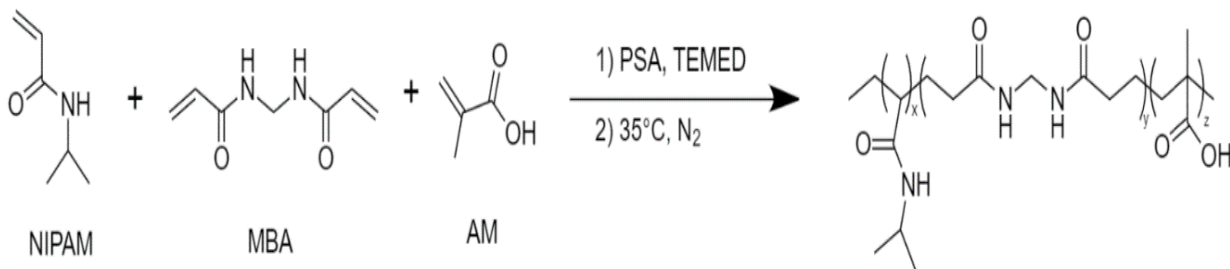


Figura 16. Ecuación química de la reacción de polimerización-precipitación mediada por radicales libre de nanogeles de NIPAM.



### 6.5.2. Recubrimiento de micropartículas porosas

Una vez seleccionado el %mol de la cantidad de ácido metacrílico adecuado se realizó el recubrimiento de las micropartículas en las mismas condiciones con las que se sintetizaron los nanogeles. El volumen total utilizado de la disolución de reacción fue el equivalente para que la masa de las micropartículas porosas correspondiera con la masa conjunta de NIPAM, MBA y ácido metacrílico en una relación 1:1. En un matraz redondo de tres vías se colocó una muestra de micropartículas porosas, se adicionó 5 ml de agua desionizada y la cantidad necesaria de TEMED; se selló, se purgó la solución con nitrógeno mediante burbujeo y se colocó en una incubadora a 35 °C con una agitación orbital a 200 rpm. Una vez estabilizada la temperatura se adicionó el 20% del volumen total, y cada 30 minutos se adicionó 20% más hasta adicionar la totalidad del volumen, manteniendo siempre la atmósfera de nitrógeno durante 6 horas. Una vez transcurrido el tiempo de reacción las partículas fueron filtradas, lavadas con agua desionizadas y secadas al vacío a una temperatura de 35 °C. Par evaluar el recubrimiento las partículas fueron analizadas mediante espectroscopia Raman y de energía dispersiva de rayos-X (EDS).

## 6.6. Carga y liberación de 6-mercaptopurina

### 6.6.1. Curvas calibración

Para la cuantificación del fármaco antineoplásico 6-mercaptopurina, se realizaron curvas de calibración, por triplicado en disolución de HCl 0.2N y buffer de HOAc/NAOAc a pH=5; los espectros de absorción y el ajuste lineal se muestran en el Anexo I.

### 6.6.2. Inclusión de 6-mercaptopurina en el sistema completo

Para incorporar la 6-mercaptopurina a los sistemas completos se realizó la carga del fármaco disuelto en HCl 0.2N a diferentes concentraciones (0.07-0.37 mg/ml), por duplicado. El estudio de inclusión se realizó colocando una masa de 5 mg de partículas aproximadamente, dentro de una bolsa de nylon (poro 36  $\mu$ m, RinoXL), en 20 ml de disolución a una temperatura constante de 25 °C mediante agitación orbital a 200 rpm durante 9 horas. El tiempo óptimo de adsorción fue determinado previamente; transcurrido el tiempo se realizó la cuantificación del fármaco remanente en disolución mediante espectroscopia UV-Vis a  $\lambda=330.18$  nm. Una vez incluido el fármaco al sistema final, la muestra fue liofilizada para ser utilizada en los estudios posteriores de liberación.

### 6.6.3. Estudios de liberación *in vitro* de 6-mercaptopurina.

Los estudios de liberación se llevaron a cabo en buffer HOAc/NAOAc a pH=5 y 40 °C, para simular condiciones intratumorales, en presencia y ausencia de un campo magnético alterno (1.41 kAm<sup>-1</sup>, 104 kHz). El estudio de liberación sin la aplicación de un campo magnético alterno se realizó por cuadruplicado colocando una masa de 10 mg aproximadamente, dentro de una bolsa de nylon (poro 36 μm, RinoXL), en 20 ml de disolución a una temperatura constante de 40 °C mediante agitación orbital a 200 rpm durante 24 horas. Por su parte el estudio de liberación en presencia de un campo magnético alterno se realizó por duplicado, colocando una masa aproximada de 10 mg del sistema final cargado, dentro de una bolsa de nylon (poro 36 μm, RinoXL), en 20 ml de disolución a una temperatura constante de 40 °C mediante agitación orbital a 200 rpm durante 10 horas, la aplicación del campo magnético permaneció durante todo el tiempo del estudio, a excepciones del muestreo. La cuantificación del fármaco liberado se realizó mediante espectroscopia UV-Vis a λ=327 nm.

## 7. Resultados y discusión

### 7.1. Fabricación del dispositivo microfluídico

Debido a las dimensiones totales (20x5 mm) de los diseños utilizados se decidió colocar cuatro réplicas de cada una de las geometrías en la misma oblea de silicio. Se eligió la geometría tipo *cross-flow* debido a que es una de las geometrías más simples con la cual son producidas gotas monodispersas ( $CV < 2\%$ ) [85]. Por otra parte, se decidió evaluar dos diferentes ángulos en la intersección de ambas fases:  $90^\circ$ , el cual es el ángulo de corte más común y por el cual esta geometría recibe su nombre; y a  $30^\circ$ , ángulo en el cual se ha reportado resultados más contrastantes [86] con respecto a  $90^\circ$ , que otros ángulos intermedios entre  $45-120^\circ$ . El calibre de los canales se fijó a  $300\ \mu\text{m}$ ; con el cual dependiendo el régimen flujo se podría tener gotas de menor tamaño, trabajando con caudales considerables para una fabricación en masa. La fotomáscara fue utilizada para la fabricación del molde maestro, de todas las réplicas esperadas, solo las cuatro centrales se formaron adecuadamente (Figura 17a), los cuatro microchips restantes sufrieron daños durante el proceso de revelado, algunos de los diseños se desprendieron parcialmente, o presentaban alguna alteración en el mismo. Los microchips que

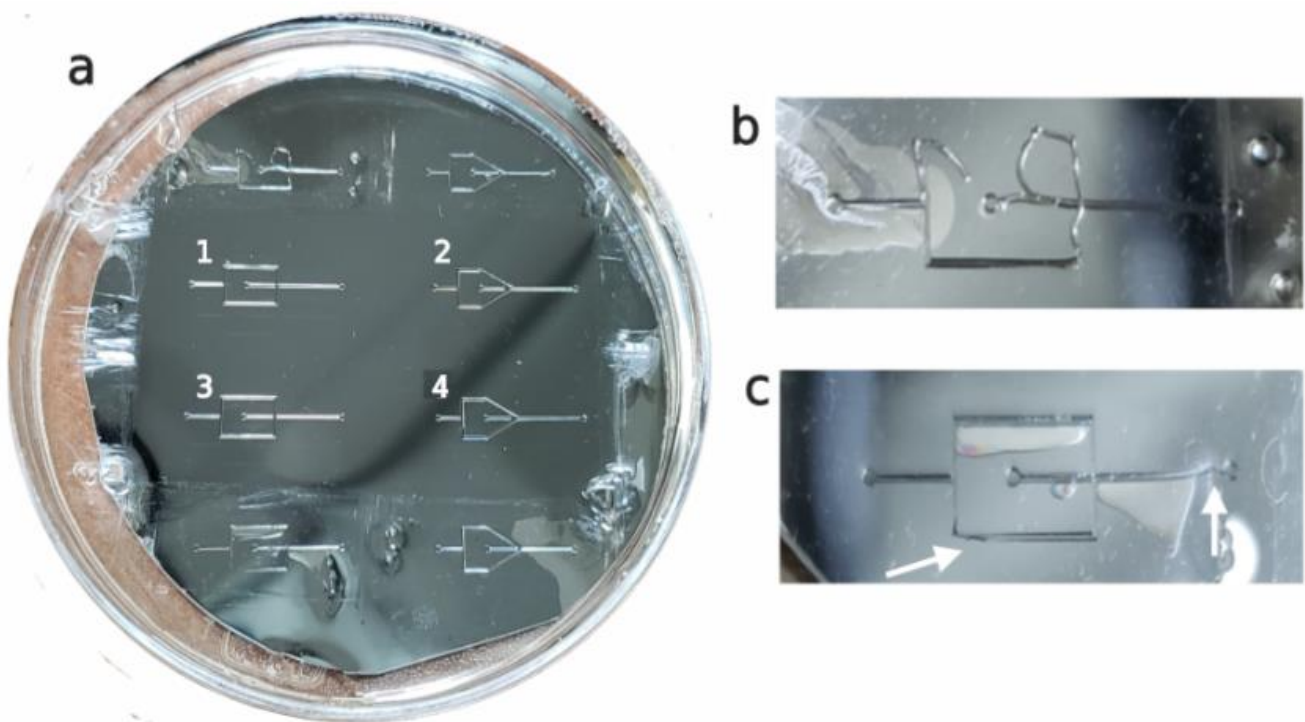


Figura 17. Fotografías de (a) molde maestro en la caja Petri cubierto de PDMS, los diseños 1-4 son los únicos utilizados para la fabricación de microchips, (b) diseño desprendido de oblea durante proceso de revelado y, (c) diseño con ligeras perturbaciones en algunos canales (flechas blancas).

presentaron algún desprendimiento de la oblea fueron los que se encontraban en la periferia de esta (Figuras 17b-c); según lo reportado, después de llevar a cabo la deposición de la resina un paso importante es el *pre-bake*, paso con el cual se elimina cierta cantidad de solvente de la fotoresina y además promueve la adhesión de esta en la oblea de silicio [87]. Por lo que el desprendimiento de los microchips en la periferia se debe muy probablemente a un inadecuado tiempo de calentamiento en el *pre-bake*, debido a que este se llevó a cabo en una parrilla de calentamiento en donde las mejores áreas de calentamiento son las centrales, utilizar un equipo diferente de calentamiento, como un horno podría generar un calentamiento uniforme evitando los problemas asociados a esta etapa. Por otra parte, la aplicación de una segunda capa de fotoresina potenció esta ineficiencia en el calentamiento. Este molde fue utilizado para la fabricación de microchips de PDMS, utilizando únicamente los diseños 1-4.

Una vez fabricados los microchips de PDMS mediante la técnica de litografía suave, se midieron sus dimensiones mediante una serie de cortes transversales; se obtuvo como resultado que los microcanales poseen un tamaño de **301.1±10.7 μm** de ancho, y **200.5±9.9 μm** de alto. La altura esperada de molde maestro, y por consecuencia de los microchips era de aproximadamente 160 μm, debido a las especificaciones de la fotoresina SU-8 3035 utilizada. El aumento en la altura del molde maestro se debe a alguna variación en la etapa de recubrimiento, muy probablemente al aumento de la viscosidad de la fotoresina empleada que generó una capa más gruesa de esta. Por otra parte, la anchura de los canales obtenida fue la esperada, sin embargo, la desviación de aproximadamente 10 μm aproximadamente, se debe a que la forma de algunos canales no fue completamente rectangular (Figura 18a), sino en forma de trapecoide (Figura 18b-c). La forma trapecoide de algunos se debe a la subestimación del grosor de la fotoresina, lo que provocó que el tiempo de exposición no fuera suficiente para que la reacción se llevara hasta la base del molde haciendo esta sección, fenómeno reportado en subexposiciones de la fotoresina [87]; por tal motivo los microchips fabricados presentan una zona más estrecha en el área en que los microchips son fijados en el soporte de vidrio. Algunas otras irregularidades en las paredes de los canales pueden deberse a alguna partícula atrapada previo a la polimerización del PDMS, por tal motivo es de gran importancia minimizar la presencia de estas durante la fabricación de los microchips.

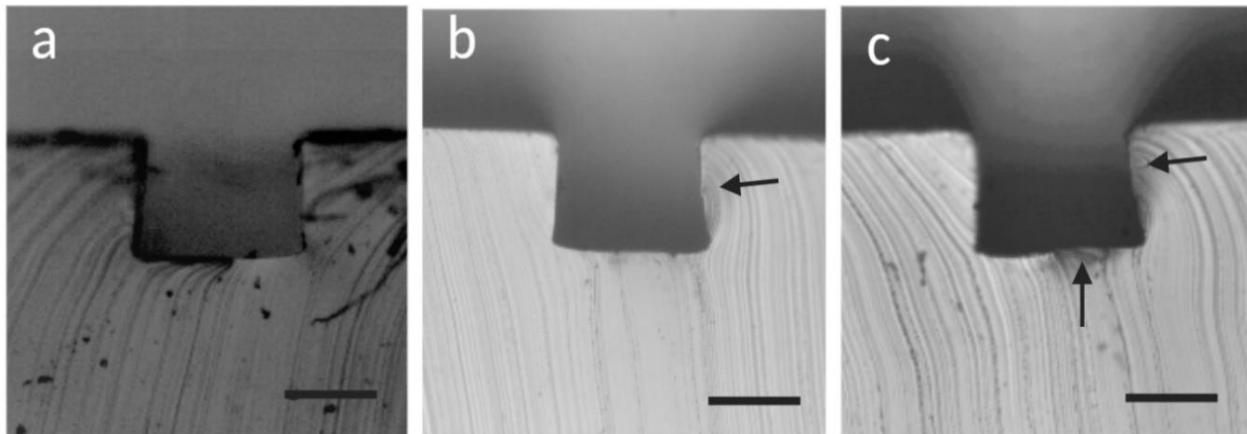


Figura 18. Micrografías de cortes transversales de microchip, (a) canal rectangular sin irregularidades, (b) flecha marca irregularidad debida a la forma del molde (forma trapezoide) y, (c) además se marca una irregularidad debida al proceso de litografía suave. Tamaño de escala 200  $\mu\text{m}$ .

La fase discontinua está compuesta de diclorometano, un disolvente orgánico con el cual los microchips de PDMS son incompatibles, debido a que presenta un hinchamiento considerable en contacto con este disolvente [88], lo que provoca el desprendimiento de la base de vidrio o de los conductos de alimentación. Así, hubo que llevar a cabo tratamientos del microchip para lograr la compatibilidad. Como primera alternativa se decidió realizar una oxidación del PDMS sobre la superficie de los canales antes de ser utilizados los microchips; con esta estrategia fue posible trabajar con la fase discontinua sin ningún inconveniente, únicamente en un periodo de 30 minutos aproximadamente. Aunque el microchip no se desprendía de la base, la entrada de la fase discontinua presenta fugas excesivas que hacían imposible el uso del microchip por un tiempo más prolongado, esto debido a que la propiedad hidrofóbica del PDMS es recuperada después de un tiempo debido a un reordenamiento de las cadenas del polímero [89].

Otra alternativa es la modificación superficial mediante la unión covalente o deposición de alguna sustancia hidrofílica, muchas de estas técnicas involucran protocolos experimentales complejos o que modifican la geometría del canal considerablemente [89]. Sin embargo, una alternativa que no presenta las limitantes anteriores es el recubrimiento con PVA, esta técnica surgió en áreas de separación de macromoléculas para la modificación de capilares de silicio [90] y es utilizada en la modificación de microchips de PDMS tratados previamente con plasma de oxígeno. Como la meta era maximizar el tiempo de resistencia del PDMS al diclorometano, se decidió evaluar tres variables en la modificación de los microchips estos fueron: el número de tratamientos de plasma (115V 50/60 Hz), el peso molecular del PVA y la concentración de la disolución

de PVA utilizada en el tratamiento; para evaluar la disminución de la hidrofobicidad de las superficies de PDMS se determinó el ángulo de contacto de una gota de 10  $\mu\text{l}$ , en la Tabla V se muestran las condiciones de cada experimento así como el ángulo de contacto obtenido. Después de realizar el análisis de los ángulos de contacto obtenidos, se obtuvo que el peso molecular del PVA fue la única variable significativa (Anexo II), por lo que el anterior diseño experimental se colapsó teniendo así una réplica adicional para la evaluación de las dos variables restantes

**Tabla V. Ángulos de contacto obtenidos de los diferentes tratamientos de recubrimiento**

PM PVA	Concentración PVA	Ciclos de Plasma	Ángulo de contacto (grados)
1	1	-1	53.27
1	1	1	48.59
-1	-1	1	26.21
-1	-1	-1	23.03
1	-1	1	40.62
1	-1	-1	39.09
-1	1	-1	30.27

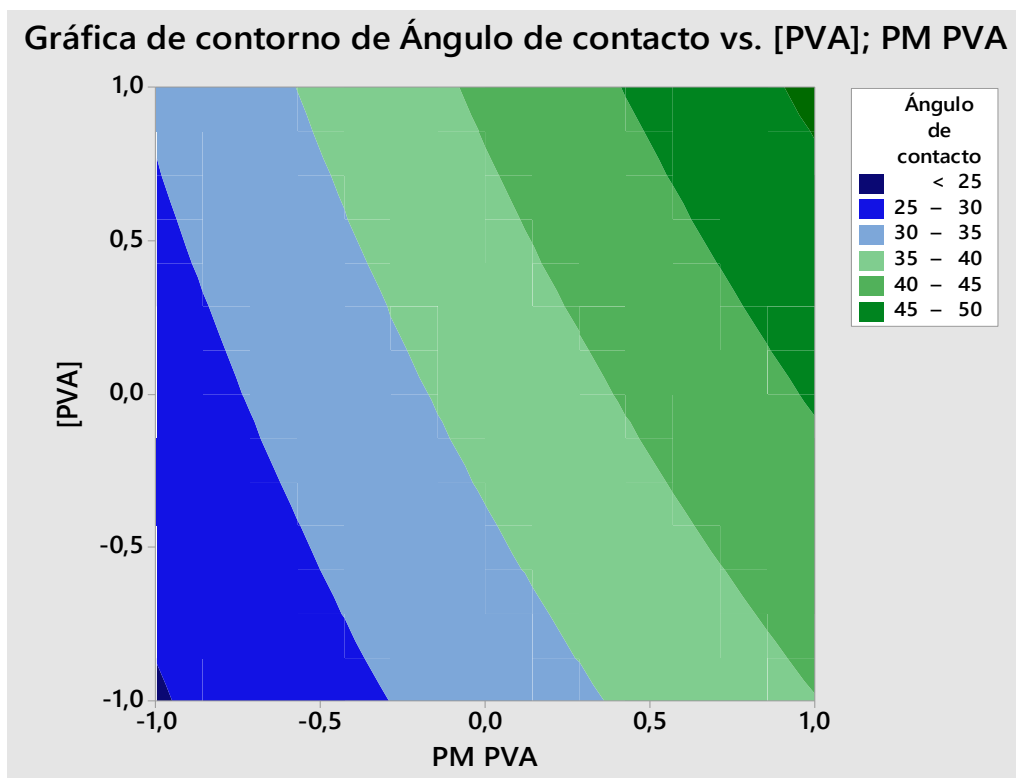


Figura 19. Gráfica de contornos de los ángulos de contacto obtenidos en función del peso molecular de PVA y [PVA].

Fijando a uno los tratamientos de plasma se construyó una gráfica de superficie de respuesta (Figura 19), en ella se aprecia que la mayor reducción de ángulo de contacto se obtuvo con el menor peso molecular de PVA y con la menor concentración. De acuerdo con lo reportado [73], la modificación con PVA se trata de una unión tipo injerto de las cadenas poliméricas de PVA sobre el PDMS, por lo que una mayor cantidad de cadenas cortas favorece una disminución del ángulo de contacto; además de que un menor peso molecular hace que las interacciones entre los extremos de la cadena de PVA con la superficie de PDMS se favorezcan.

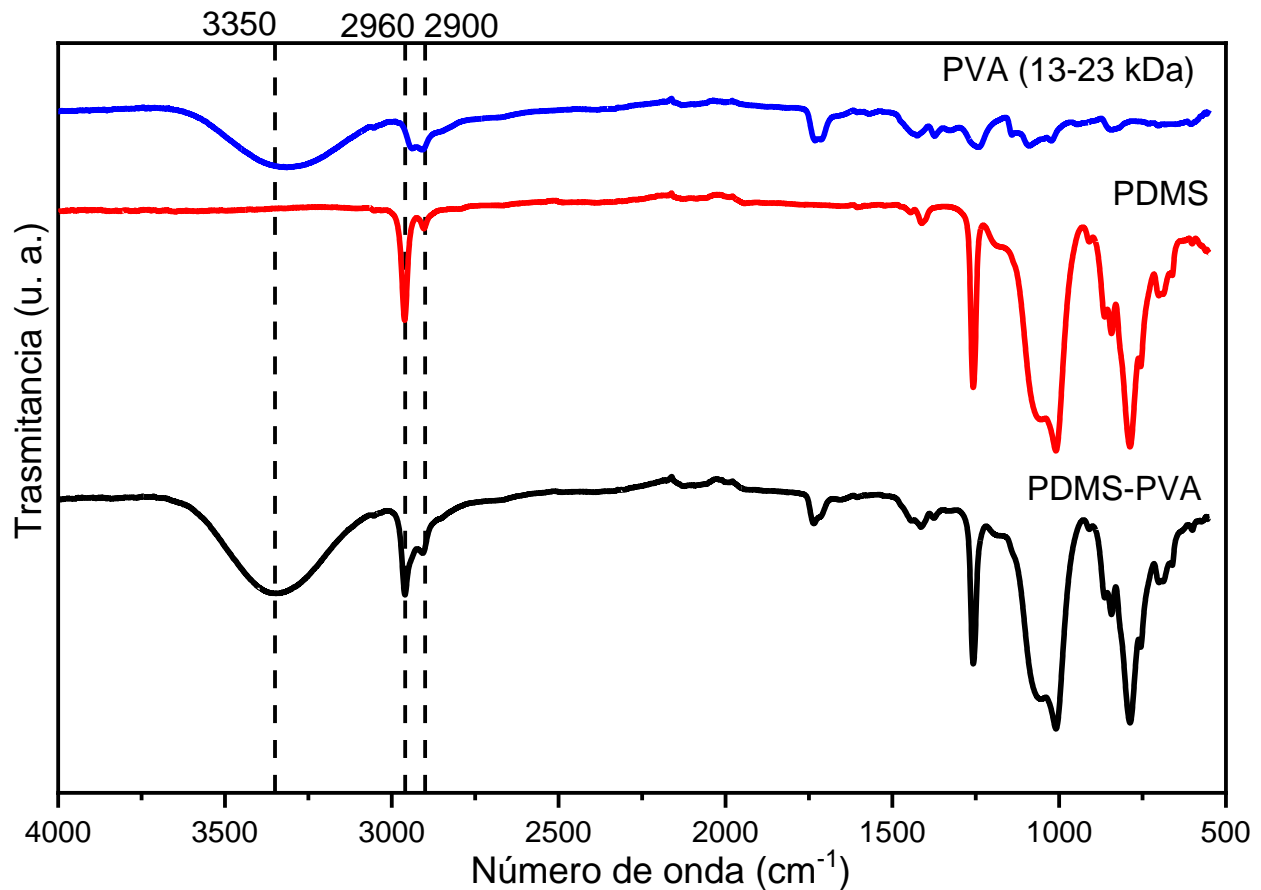


Figura 20. Espectro de FT-IR para confirmar el recubrimiento del PDMS con PVA.

Se le realizó una espectroscopia de FT-IR a una superficie recubierta y sin recubrir, ya que se ha reportado que el tratamiento con plasma genera especies radicales de grupos de silanol (Si-OH), hidroxilos alcohólicos (C-OH) y ácidos carboxílicos (COOH) en la superficie del PDMS, los cuales pueden formar enlaces covalentes con el PVA [80]. Como se aprecia en el espectro (Figura 20) la muestra de PDMS tratada con PVA presenta una banda ancha e intensa alrededor de 3350 cm<sup>-1</sup> que corresponde solo al estiramiento

vibracional O-H perteneciente del PVA, ya que el grupo  $-\text{OSi}(-\text{CH}_3)_2\text{O}-$  del PDMS no presenta absorción infrarroja entre  $3100\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ . En la muestra de PDMS tratada con PVA se aprecia un traslape de las señales debidas al estiramiento asimétrico de  $\text{Si-CH}_3$ , banda angosta en  $2960\text{ cm}^{-1}$ , y la banda en  $2900\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a grupos  $-\text{CH}_2-$  y  $-\text{CH}_3$  del PVA.

## 7.2. Síntesis de nanopartículas magnéticas hidrofóbicas

Para aprovechar las propiedades superparamagnéticas de las nanopartículas de magnetita, se decidió incluir estas mismas dentro de la matriz de las micropartículas de PCL; por lo que para tener una buena dispersión dentro de las micropartículas fue de gran importancia que las NPM fueran hidrofóbicas mediante el recubrimiento de ácido oleico (NPM-AO). Además de las NPM hidrofóbicas se sintetizaron un lote de NPM hidrofílicas (sin la adición de ácido oleico), como resultado de ambas síntesis se obtuvo un polvo fino de color negro. Para comprobar las propiedades de ambos lotes una muestra de cada uno de los lotes fue dispersada en un sistema bifásico compuesto de agua/diclorometano, después de ser sometidos a sonicación ambas muestras se dejaron reposar para promover la separación de ambas fases. Como se muestra en la Figura 21a, las NPM-AO se dispersaron en la fase orgánica, a diferencia de las NPM sin recubrir (Figura 21b) las cuales se dispersaron en la fase acuosa. El recubrimiento de ácido oleico sobre la superficie de la nanopartícula se lleva a cabo mediante una esterificación o por la interacción electrostática entre el grupo carboxílico, del ácido oleico, y el grupo hidroxilo de la nanopartícula [91]. Por tal motivo el recubrimiento primario se encuentra bien organizado; un exceso de ácido oleico es adsorbido débilmente sobre la primera capa de

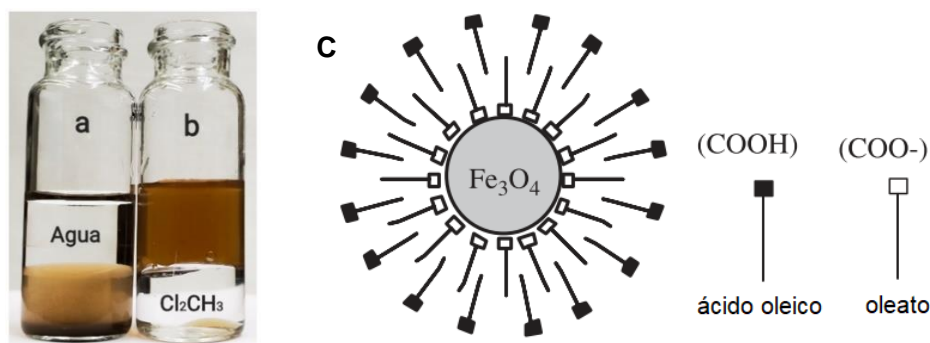


Figura 21. Dispersiones de NPM (a) recubiertas con ácido oleico y (b) sin recubrir. Representación del recubrimiento de NPM con ácido oleico (c) [89]

recubrimiento, mediante la interacción de las cadenas hidrocarbonada del ácido oleico,



tal como se muestra en la Figura 21c. Se ha reportado que se encuentra desprotonado el ácido carboxílico de las capas secundarias de ácido oleico y por ello, se puede presentar la formación de flóculos y dependiendo de la concentración hasta geles, que pueden ser dispersados en disolventes polares [92]; por tal motivo se realizó una serie de lavados a fin de evitar este escenario en etapas posteriores. Por otra parte, el análisis de espectroscopia infrarroja realizado a las NPM-AO y NPM sin recubrir, confirma el recubrimiento (Figura 22). Se puede apreciar que en ambos espectros existe la presencia de una señal alrededor de los  $550\text{ cm}^{-1}$  la cual corresponde a la vibración de enlaces Fe-O en la red cristalina de la magnetita; mientras que la banda ancha en  $3400\text{ cm}^{-1}$  está relacionada con moléculas de agua remanentes en la superficie [91]. Para la muestra de las NPM-AO además presenta bandas en  $1420$  y  $1520\text{ cm}^{-1}$  correspondientes con el estiramiento simétrico y asimétrico del grupo  $(-\text{COO}^-)$  en el oleato, y las señales en  $2850$  y  $2920\text{ cm}^{-1}$  corresponden a los estiramientos de los C-H de la cadena hidrocarbonada del oleato.

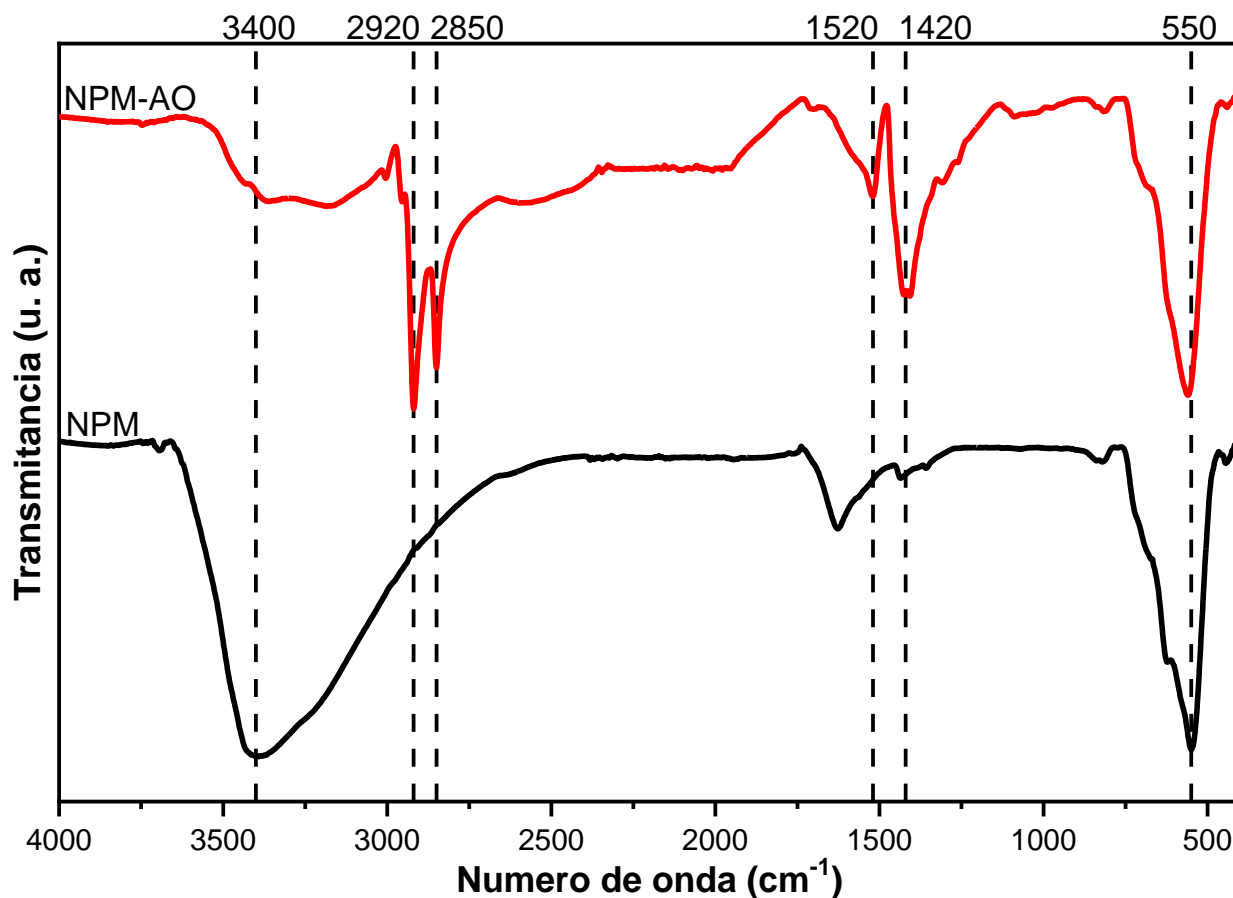


Figura 22. Espectro FT-IR de NPM recubiertas con ácido oleico (línea roja) y sin recubrir (línea negra). Las barras de color azul indican las señales de interés.

La morfología y la distribución de tamaño de la muestra NPM-AO fue obtenida mediante el análisis de imágenes obtenidas mediante microscopías electrónicas de transmisión (TEM), las que se muestran en la Figura 23. La morfología obtenida fue de cubos con bordes redondeados o incluso cercanas a esferas, consistente a lo ya reportado [91], [93], [94]. La distribución de tamaño se realizó mediante la utilización del programa ImageJ, mediante el análisis de 250 partículas a diferentes acercamientos, como se puede apreciar en la Figura 23a las muestras analizadas se encontraban principalmente en nano-agregados (conjunto de varias partículas), los cuales pudieron estar presente desde el recubrimiento [92] o formarse durante el proceso de secado; en esta misma imagen se puede apreciar un entramado de franjas, lo que indica áreas altamente cristalinas en la superficie de las nanopartículas. Debido a esta aglomeración que presentan las NPM técnicas como dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés) no son adecuadas para obtener el tamaño de partícula de NPM individuales. A partir de los datos obtenidos de los tamaños de partícula se construyó un histograma y una gráfica de probabilidad acumulada (Figura 24); como se aprecia en el histograma la muestra posee sesgo hacia la izquierda, donde las clases de mayor frecuencia son las que comprenden tamaños de partícula de 4.5-6.5 nm; mientras que el gráfico de probabilidad acumulada indica que el 50% de la población de la muestra posee un tamaño menor a 6.5 nm y que el 95% de esta misma posee un tamaño menor a 10.5 nm. A pesar de que la muestra presenta un poco de dispersión en su tamaño, aún se encuentra por debajo de los 20 nm tamaño necesario para conservar sus propiedades

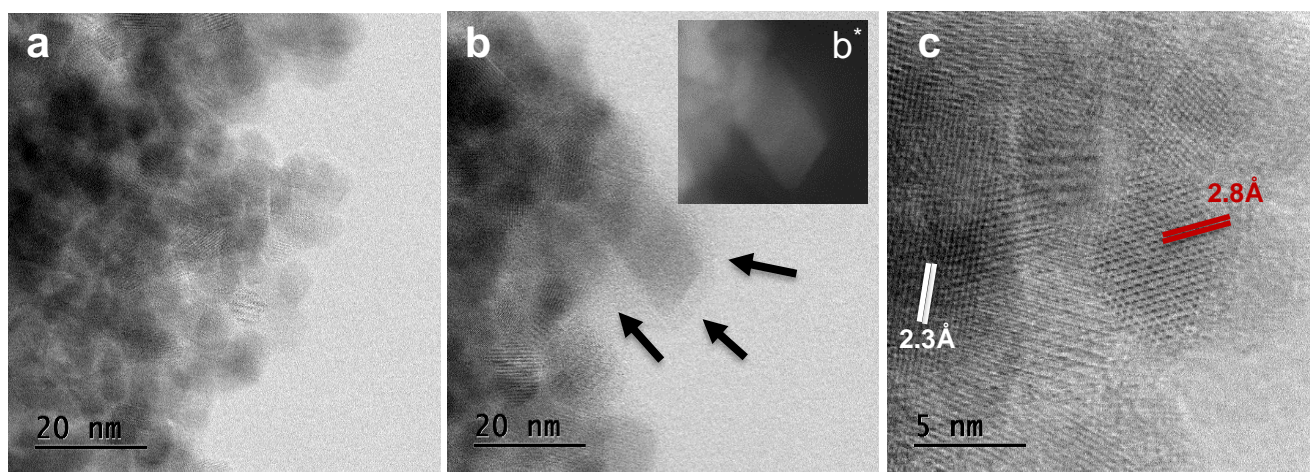


Figura 23. Imágenes de TEM de la muestra NPM-AO. (a) Aglomerado de nanopartículas, partículas unitarias se aprecian en el borde. (b) Nanopartícula rodeada por halo difuso que corresponde al recubrimiento de ácido oleico, parte superior derecha se muestra una imagen de la misma zona en campo oscuro. (c) Red cristalina y distancia interplanares entre franjas 2.3 Å (blanco) y 2.8 Å (rojo).

superparamagnéticas [49]. Mediante el análisis de TEM también se pudo comprobar la presencia de un recubrimiento en las nanopartículas, como se puede observar en la Figura 23b, en el borde de un aglomerado se aprecia una nanopartícula cúbica que presenta un halo menos denso; al comparar la misma zona con imagen de TEM en campo oscuro (Figura 23b\*) dicho halo ya no es perceptible, confirmando que se trata de otro material diferente al núcleo además de que la morfología de la nanopartícula es muy parecida a un cubo. Con un mayor acercamiento a una nanopartícula se logró apreciar el entramado cristalino de la nanopartícula (Figura 23c) y con ayuda del programa ImageJ se determinó las distancias interplanares, dicha distancia ronda entre 2.3-2.8Å, que según lo reportado dicha distancia corresponde a una espinela cubica de óxido de hierro (ICDD código 01-088-0315) [94].

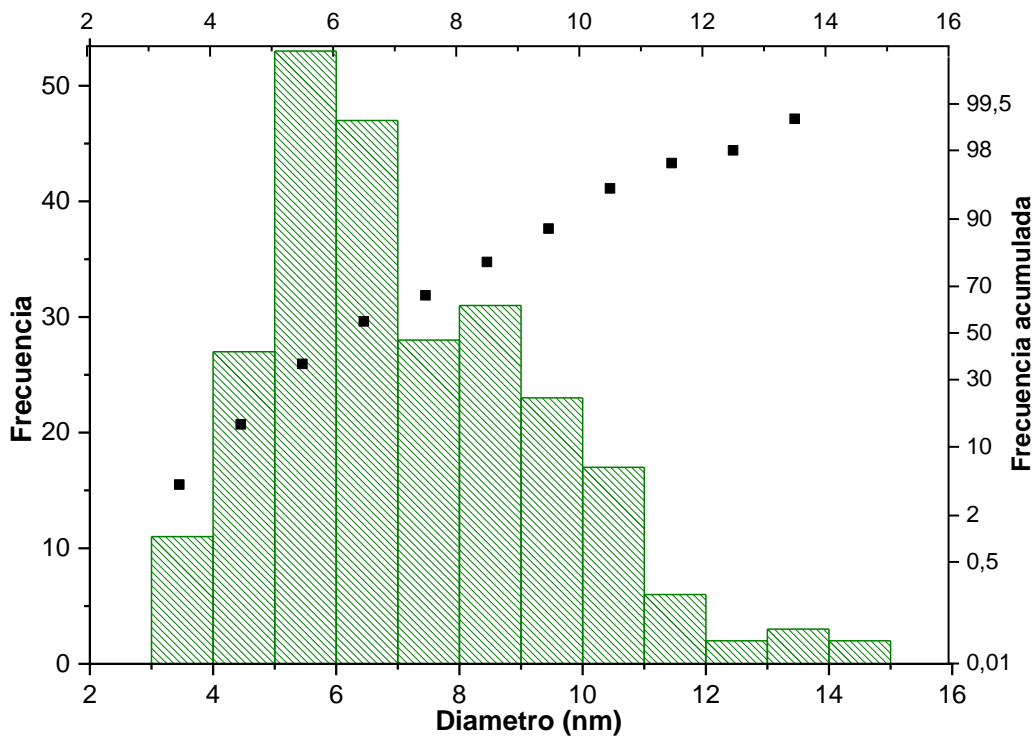


Figura 24. Histograma y grafica de probabilidades acumuladas del tamaño de partícula de NPM-AO.

En cuanto a la evaluación del incremento de temperatura de una dispersión de NPM-AO en agua, sometidas a un campo magnético alterno, se obtuvo que con una concentración de 1mg/ml de la muestra se obtiene un  $\Delta T = 0.95 \pm 0.05^\circ\text{C}$  (Figura 25) durante el tiempo de muestreo. El resultado obtenido es prometedor ya que la concentración trabajada es muy baja; además de que es posible que el valor de  $\Delta T$  se encuentre subvalorado ya que la medición de la temperatura es en el dispersante el cual estaba contenido en una celda

de vidrio; por lo que por efectos de dispersión térmica la temperatura en las cercanías de la partícula y del sistema es mayor.

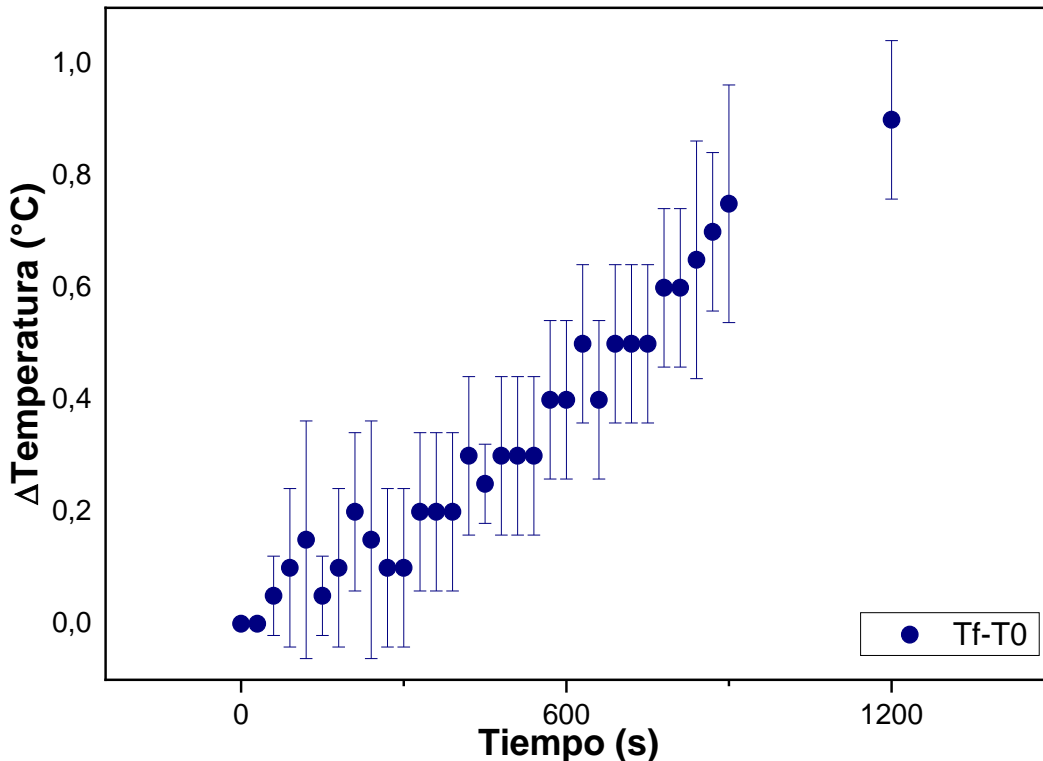


Figura 25. Gráfica de  $\Delta T$  vs. Tiempo (s) obtenida de la una muestra en dispersión de NPM-AO a 1mg/ml.

### 7.3. Fabricación de micropartículas porosas

La finalidad de generar un núcleo poroso fue tener un área superficial mayor que micropartículas lisas; por tal motivo además de poseer poros estos tenían que estar interconectados entre sí, y expuestos hacia la superficie de la micropartícula. Durante las primeras etapas de experimentación fueron evaluadas diferentes técnicas y sustancias como porógenos (Anexo III), como el uso de polivinil pirrolidona o carbonato de calcio, como molde para los poros. Sin embargo, estas técnicas tenían como resultado la formación de poros aislados entre ellos y/o no estar expuestos a la superficie, y la incompatibilidad con el uso de dispositivos microfluídicos, ya que estos poroformadores dispersos en la fase oleosa precipitaban dentro de las jeringas de alimentación de esta fase. Como alternativa a estas limitantes se decidió utilizar canfeno como sustancia porogénica capaz de formar poros interconectados [35]; el canfeno es un monoterpeno bicíclico altamente soluble en una gran variedad de compuestos orgánicos y volátil a temperatura ambiente por tales motivos éste compuesto se adicionó fácilmente a la fase oleosa sin generar obstrucciones en el dispositivo microfluídico, además de ser retirado

mediante un proceso rápido de liofilizado. Considerando la composición final de la fase discontinua, se decidió realizar el secado a presión reducida mediante el uso de un rotaevaporador a temperatura ambiente, en lugar de una agitación. En primer lugar, se determinó el efecto de la concentración de la PLC utilizada, para ello se prepararon tres lotes de micropartículas, utilizando 1.5, 3 y 5% m/v de PLC, manteniendo una cantidad de canfeno en 10% m/v. Después de ser fabricadas los tres lotes fueron analizados mediante SEM (Figura 26).

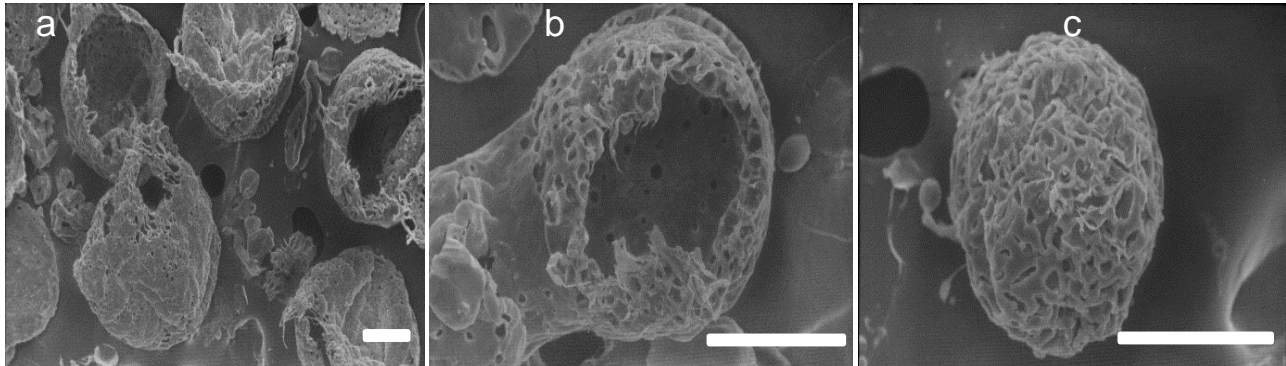


Figura 26. Imágenes de SEM de micropartículas a diferentes concentraciones de PCL, (a) 1.5%, (b) 3%, y (c) 5% m/v en DCL, manteniendo en todas ellas una concentración de canfeno de 10% m/v. Escala 100  $\mu$ m.

Como se aprecia en la Figura 26a-b utilizar bajas concentraciones de PCL propicia la formación de cápsulas en lugar de partículas, y a su vez la concentración del polímero influye en la integridad de la capsula formada. Cuando se utilizó una concentración de 1.5% m/v las cápsulas formadas presentaban una pared muy delgada en donde un gran número de ellas se encontraron rotas o colapsadas (Figura 26a), debido al proceso de secado; por otra parte cuando la concentración utilizada fue 3% m/v el grosor de las paredes de las cápsulas aumento considerablemente además de presentar una porosidad en la misma, la mayoría de las partículas se encontraban íntegras y solo unas cuantas se encontraban fracturadas (Figura 26b), lo que se puede interpretar como estabilidad estructural mayor, en comparación a la muestra anterior. En cuanto al lote con una concentración de PCL mayor (Figura 26c), se obtuvieron partículas porosas las cuales presentaron una ligera contracción, sin embargo, todas las partículas analizadas permanecieron íntegras. La formación de las microcápsulas y la ligera contracción de las micropartículas puede ser explicado por el proceso de secado, el cual se lleva a cabo desde el exterior de la gota hacia el interior. En el caso de una menor concentración de PLC, el tamaño de la gota obtenido no alcanza a formar una capa alrededor de esta por lo que al secarse las capsulas se encuentra incompletas o si logran formarse en la etapa

de la eliminación del canfeno estas terminan fracturándose. Por el lado contrario cuando se utilizó la concentración de PCL intermedia se logró formar una capa más gruesa la cual además logró contener una cantidad considerable de poros en ella por tal motivo las cápsulas presentan poros y una estabilidad estructural mayor; y consecutivamente al aumentar la cantidad de PCL se formaron partículas en lugar de cápsulas, por lo que se decidió trabajar con una concentración de PLC del 5% m/v en todos los lotes posteriores. Una vez establecida la concentración de PCL, se evaluó el efecto de la cantidad utilizada de canfeno sobre la cantidad de poros formados, para ellos se evaluaron lotes fabricados a diferentes concentraciones de canfeno (5, 10, 15, 20% m/v) manteniendo a 5% la concentración de PLC en DCM, todos los lotes fueron fabricados utilizando un microchip con un ángulo de corte de 90°, una vez obtenidas las micropartículas fueron analizadas mediante SEM (Figura 27). Durante el proceso de secado los lotes con una concentración de canfeno de 5 a 15% m/v, se lograron secar adecuadamente, obteniendo una dispersión de partículas en la superficie de la fase continua, debido a las propiedades hidrofóbicas de la PLC; sin embargo, en el lote con una concentración de 20% m/v de canfeno, durante el proceso de secado, se generaron grandes aglomerados dispersos o adheridos a las paredes del matraz. Esta inestabilidad se debe a que la cantidad de canfeno es tan alta que la PLC no la puede contener dentro de ella, lo que aunado al tamaño del lote generó la formación de aglomerados, por tal motivo se decidió descartar la utilización de esta concentración de canfeno. En cuanto a los demás lotes fabricados, la generación de poros fue proporcional a la concentración utilizada. Como se observa en las Figuras 27a-c, el uso de una concentración de canfeno de 5% m/v genera una baja densidad de poros en la superficie de la micropartícula, además de que algunos de ellos se encuentran cubiertos por una delgada capa que parece ser PLC, la forma de la micropartícula es muy parecida a una esfera perfecta. En contraste el uso de una concentración de 10% (Figura 27d-f), la forma esférica comienza a presentar ciertas zonas irregulares, y a pesar de que posee poros mayormente expuestos en la superficie, la densidad de estos siguió siendo baja. Por último, una concentración de canfeno de 15% m/v propició la formación de poros expuestos en la superficie y con una mayor densidad sobre la superficie (Figuras 27h-i), y también las irregularidades en la superficie fue mayor en comparación con los otros dos lotes. La poros formados con canfeno tienen la característica de estar altamente interconectados, debido a un reacomodo dendrítico cuando el canfeno se solidifica [95],

[96]. Por tal motivo conforme se va evaporando el DCM de las gotas formadas, el canfeno se concentra en el interior de la gota y eventualmente forma ramificaciones, las cuales pueden llegar a superficie si se encuentra a una proporción correcta, o excederse en la expulsión formando cantidades excesivas en superficie formando aglomerados, como sucedió a la concentración de 20% m/V. Por otra parte, el tamaño de los poros formados por el canfeno depende de la temperatura de secado [35], obteniendo poros más pequeños a menor temperatura y de mayor tamaño a temperaturas mayores. Los poros obtenidos a las tres diferentes concentraciones de canfeno y analizadas en SEM, poseen un tamaño similar los cuales son menores a los 10  $\mu\text{m}$ , dicho tamaño es menor a los 50 $\mu\text{m}$  obtenidos a 25°C por Jeong-Hui Park [35] y colaboradores; a pesar de que se

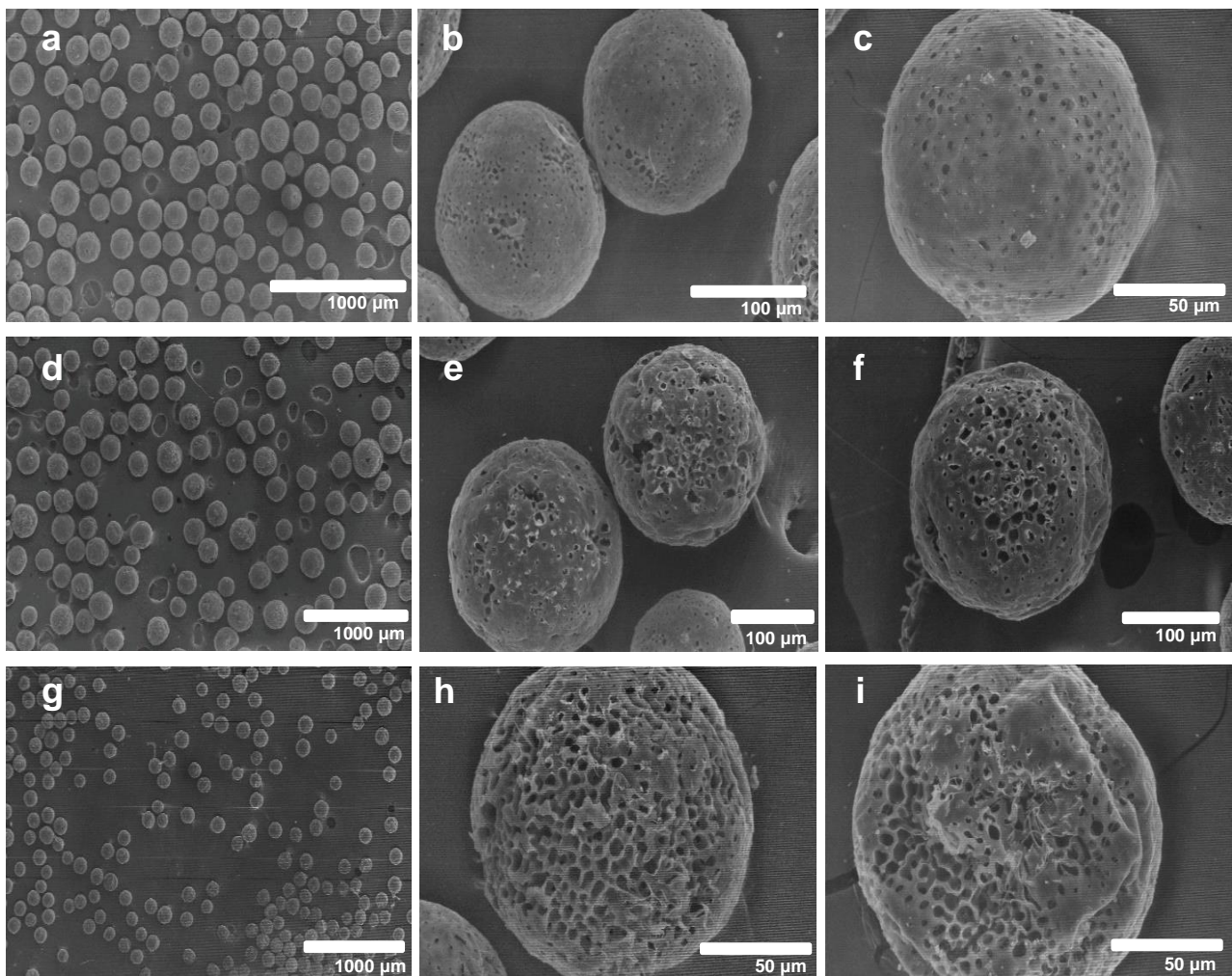


Figura 27. Imágenes de SEM de lotes fabricadas a diferentes concentraciones canfeno; (a-c) 5% m/v, (d-f) 10% m/v, y (g-i) 15% m/v.

realizó a temperatura ambiente, debido a que el secado fue a presión reducida la temperatura en las gotas fue menor debido a que la evaporación del diclorometano, como

muchos otros disolventes orgánicos, se trata de un fenómeno endotérmico. En las Figuras 27a, d y g, se pueden apreciar una muestra de los lotes de canfeno al 5,10 y 15% m/v, respectivamente, en planos alejados de la muestra; a partir de este tipo de imágenes y mediante el uso del programa ImageJ se determinó el tamaño de partícula para cada uno de los lotes. A partir de los datos obtenidos se construyó una gráfica de cajas para comparar la dispersión de las tres muestras (Figura 28a), además se presenta una gráfica de cajas de una muestra de micropartículas de polilactico-co-glicolico (PLGA) (Figura 28b), otro poliéster biodegradable, fabricado mediante emulsión evaporación generada mediante un homogeneizador de alto corte, Ultraturrax, IKA® (Anexo IV).

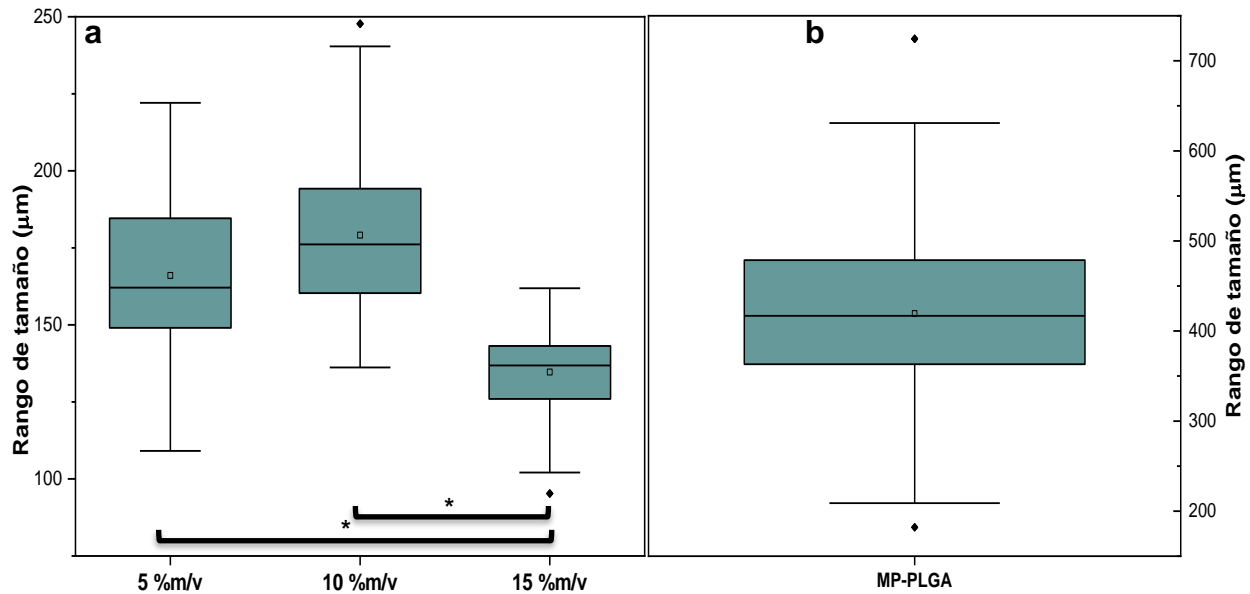


Figura 28. Graficas de caja de la dispersión de tamaños de (a) lotes a diferentes concentraciones de canfeno, (\*) indican una diferencia estadísticamente significativa a  $p < 0.01$ ; (b) grafica de cajas de una muestra de micropartículas de PLGA fabricadas mediante ultraturrax.

Como se aprecia en las gráficas de cajas correspondientes a los lotes con las diferentes concentraciones de canfeno (Figura 28a) las muestras poseen una distribución normal, ya que las distancias entre los cuartiles Q1-Q3, así como la distancia entre los bigotes se encuentra equilibrados, aunque con ligeros desplazamientos de la media y ciertos tamaños atípicos (datos fuera de los bigotes). Sin embargo, al comparar el intervalo de las tres muestras fabricadas con los dispositivos microfluídicos y el intervalo de tamaño de la muestra de PLGA fabricada mediante Ultraturrax, es evidente que existe una menor distribución de tamaños de las muestras fabricadas con microfluídica, ya que las muestras poseen un rango aproximado de 100  $\mu\text{m}$ , mientras que la obtenida por ultraturrax posee un rango de casi 500  $\mu\text{m}$ . Después de realizar el análisis estadístico



pertinente (Anexo V) a las tres muestras, se determinó que no existe ninguna diferencia entre los lotes de 5 y 10% m/v de canfeno, pero si existe una diferencia significativa entre ambas y la muestra de 20% m/v ( $p < 0.01$ ). Durante el proceso de secado conforme la cantidad de canfeno en la muestra aumentaba, la generación de mermas también lo hacía; debido a la incompatibilidad del canfeno y de la PLC (razón por que forma poros) es por eso que en las muestras de 5 y 10 % existen partículas de gran tamaño (datos atípicos en las gráficas de caja), es posible que en la muestra de 20% las mermas estuvieron constituidas de aquellas gotas grandes que se secaron lentamente, por lo que aparentemente la muestra posee un menor tamaño de partícula, porque las más grandes fueron descartadas con las mermas. Dentro del grupo de trabajo [97] se evaluó el efecto de diferentes variables y tipos de secados de gotas y se determinó que existe una disminución de las mermas en el proceso de secado si existe un tiempo de latencia entre la formación de la emulsión y el secado de esta. Según los resultados obtenidos se decidió seguir trabajando con una concentración de 15% m/v de canfeno para todos los lotes siguientes, además la emulsión fue secada 48 horas después de su fabricación, para disminuir las mermas de fabricación debidas a este proceso.

Una vez obtenida la composición final de la fase discontinua, se realizó la caracterización de los regímenes de flujo para la formación de las gotas, utilizando diferentes relaciones de caudales de ambas fases y los microchips a las dos diferentes geometrías, ángulo de corte a 30 y 90°. Generalmente el uso de dispositivos microfluídicos, en diversas aplicaciones, se lleva a cabo con caudales de la orden de  $\mu\text{l/h}$  o  $\text{nl/min}$ ; sin embargo, se decidió trabajar con caudales mayores con la finalidad de maximizar la producción de gotas y por tal motivo la de partículas, a fin de establecer el potencial que poseen los microchips para producir lotes de interés comercial. Por lo anterior y después de realizar pequeñas pruebas, se determinó trabajar en un intervalo de 5-40  $\mu\text{l/min}$  de caudal para la fase discontinua a diferentes relaciones con respecto a la fase continua. Después de ser determinado el tamaño de las gotas, se construyó una gráfica de tamaño de gota contra la relación de caudales ( $q$ ), para 30° (Figura 29) y 90° (Figura 30). Como se puede apreciar en las gráficas en ambas geometrías se presentaron los tres tipos de flujo principales en la formación de gotas: *squeezing*, *dripping* y *jetting*, las cuales están marcadas en las áreas de color gris, verde y azul, respectivamente. Además, junto a cada gráfica se encuentran tres micrografías enumeradas que corresponden a cada tipo de

flujo observado; *squeezing* (#1), *dripping* (#2) y *jetting* (#3). Acorde con lo reportado [76], [77] las micrografías #1 corresponden a un flujo tipo *squeezing*, debido a que las gotas formadas presentan un tamaño mayor a las dimensiones del canal adoptando una forma elipsoide; las micrografías #2 corresponden a un flujo tipo *dripping* ya que el tamaño son menores a las dimensiones del canal y el desprendimiento de las gotas sucede en la intersección de ambas fases; y las micrografías #3 pertenecen a un flujo tipo *jetting* por formar tamaños de gota aun menores mediante el desprendimiento de gotas en la punta de un continuo o hilo de fase discontinua sobre el canal principal, es importante que la longitud de esta hebra sea menor a 20 veces la altura del canal. Un hilo con una longitud mayor a 20 veces la altura del canal corresponde a un flujo tipo *threading* [98], en donde se pueden formar gotas con un tamaño muy variable entre ellas o inclusive no formarlas; de acuerdo con las dimensiones del canal de salida eso sucedería a 4 mm después de la intersección, durante la medición se comprobó que ningún resultado excedía esta restricción.

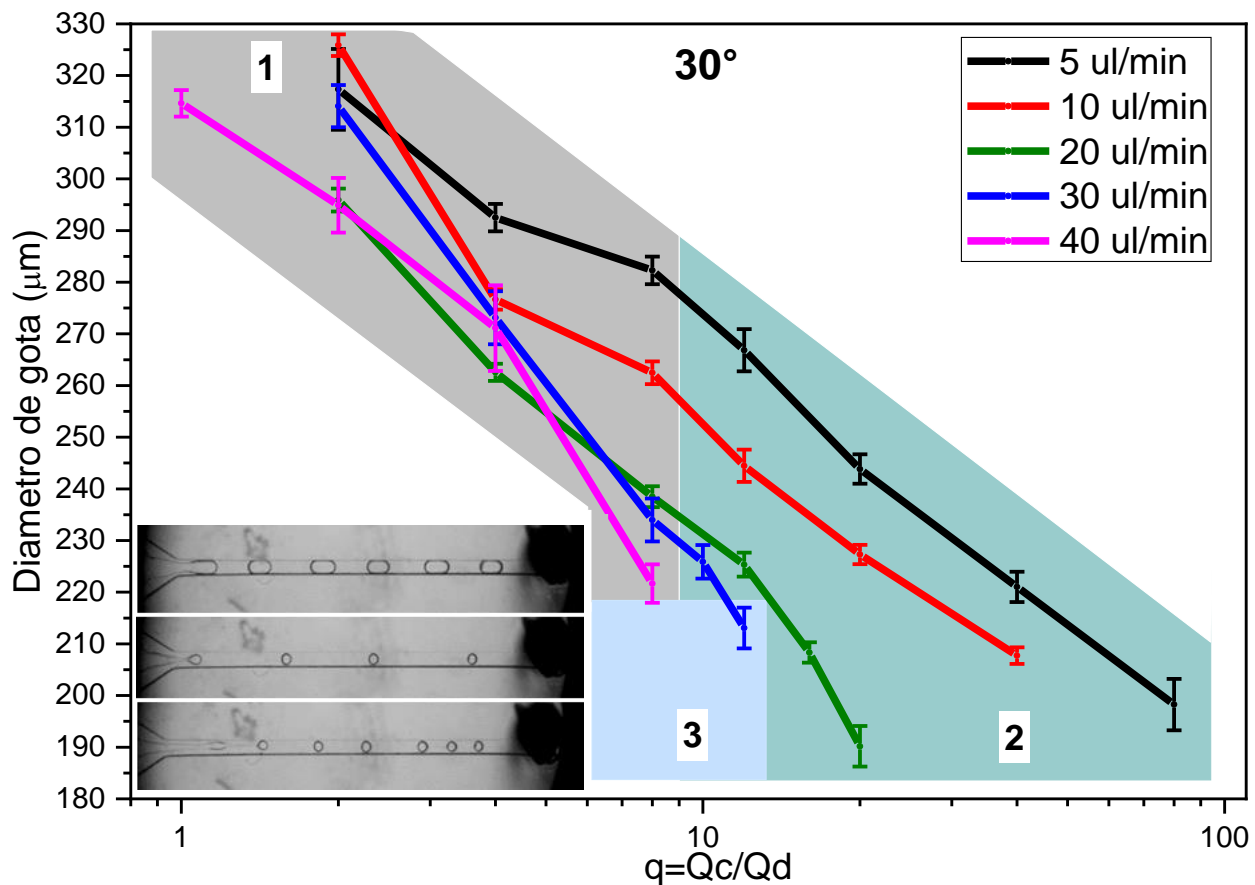


Figura 29. Gráfica de tamaño de gota contra relación de caudales para microchip de ángulo de corte a 30°. Se muestran micrografías de los diferentes tipos de flujo (1) *squeezing*, (2) *dripping*, y (3) *jetting*; y de las ares en donde se presentan los mismos.

En comparación con el microchip de 90°, donde la formación de gotas se debe a los tres tipos de flujos; en el microchip a 30° la formación de gotas es llevada a cabo principalmente mediante flujos tipo *squeezing* y *dripping*, lo anterior es fácilmente apreciable al comparar las áreas azules (*jetting*) de las Figuras 29 y 30; a su vez la variación en el tamaño de gota obtenidas por *jetting* es mayor que la obtenida por los otros dos tipos de flujo. En cuanto a la zona de flujo tipo *squeezing* de microchip a 30° existen traslapes en varios puntos de la zona, que es más evidente en  $q=4$  para los caudales  $Q_d=10-40 \mu\text{l}/\text{min}$ , lo que supone que a esta relación la formación de las gotas se debe principalmente a la geometría del microchip en vez del caudal de la fase discontinua. Es fácilmente apreciable que independientemente del tipo de flujo, conforme se aumenta  $q$  el tamaño de gota obtenido disminuye, a su vez esta disminución de tamaño es aún más marcada en el microchip a 90°, por lo que para obtener cierto tamaño a un  $Q_d$  determinado se necesita una menor  $q$ , lo que se traduciría en un menor gasto de fase continua por requerir un  $Q_c$  menor.

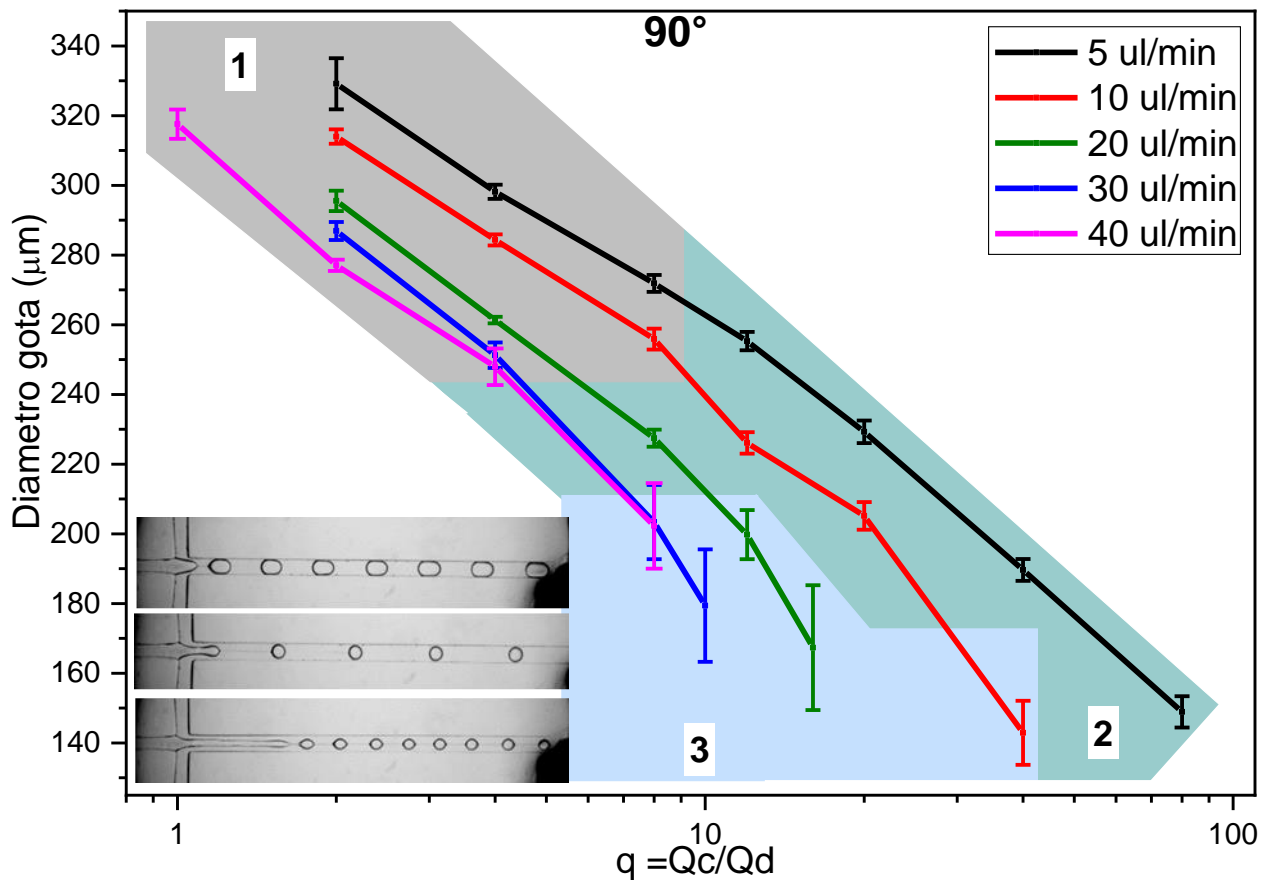


Figura 30. Gráfica de tamaño de gota contra relación de caudales para microchip de ángulo de corte a 90°. Se muestran micrografías de los diferentes tipos de flujo (1) *squeezing*, (2) *dripping*, y (3) *jetting*; y de las áreas en donde se presentan los mismos.

Además de que este tipo de geometría presento una menor variación de tamaño de gota en flujos tipo *squeezing* y *dripping*, en comparación a la de 30°. A partir de lo anterior se decidió utilizar un microchip con un ángulo de corte a 90°, con caudales de  $Q_d=30 \mu\text{l}/\text{min}$  y  $Q_c=120 \mu\text{l}/\text{min}$ , para las etapas de experimentación posteriores.

Previo al proceso de secado se tomó una muestra de la emulsión fabricada y se midió el tamaño de las gotas fuera del canal; así como también de partículas secas. mediante una serie de micrografías y el programa ImageJ. A partir de las mediciones obtenidas de construyeron graficas de caja (Figura 31). Como se puede observar en la gráfica de cajas existe una diferencia significativa entre el tamaño de gota obtenido de  $228.6 \pm 13.0 \mu\text{m}$  y el tamaño de las micropartículas  $134.7 \pm 14.9 \mu\text{m}$ , que se debe principalmente a la concentración de PLC utilizada y en menor medida al peso molecular la misma [64]. Esta diferencia de tamaño entre gotas y partículas también fue confirmada dentro del mismo grupo de investigación [97] en el que independientemente de la concentración de canfeno la reducción de las gotas era muy cercana al 50%. Además de obtener el tamaño las micropartículas obtenidas fueron analizadas en SEM para evaluar el cambio en la porosidad debido a la modificación de secado. Por su parte las diferencias entre las variaciones de tamaño de las partículas, se debe al proceso de secado. En cuanto a los poros obtenidos debido al cambio en el proceso de secado, se puede apreciar en la

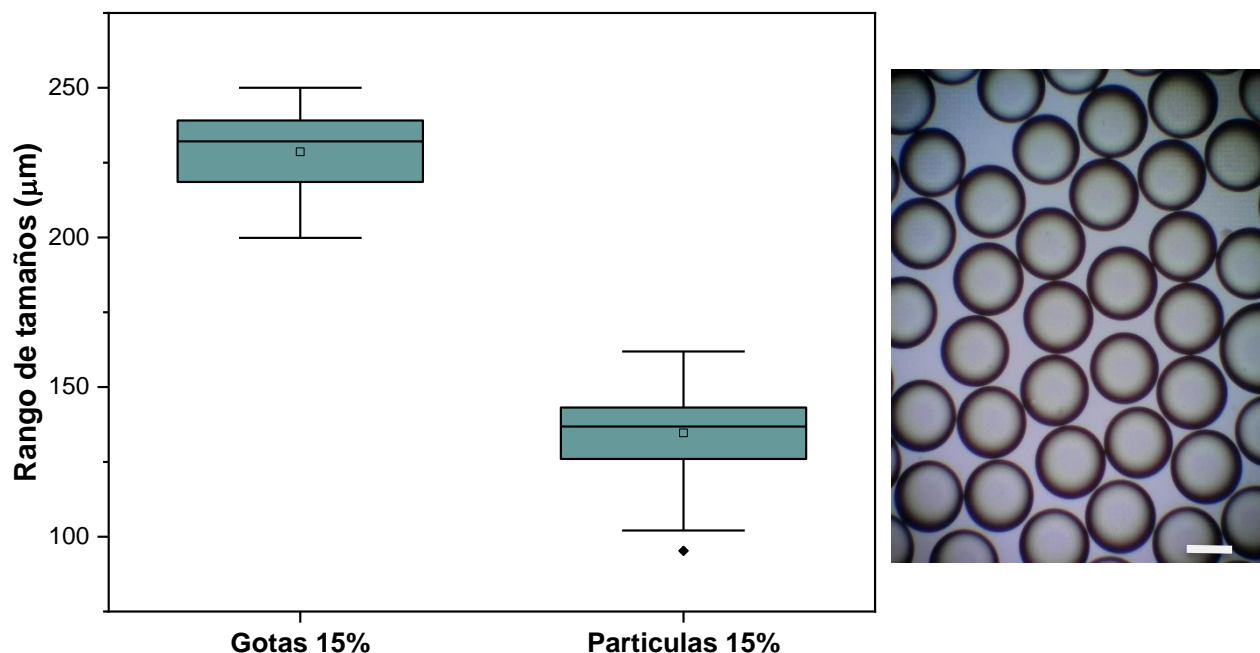


Figura 31. Gráfica de cajas para el tamaño de microgota ( $228.6 \pm 13.0 \mu\text{m}$ ) y micropartícula ( $134.7 \pm 14.9 \mu\text{m}$ ) de muestra con 15 %m/v de canfeno. Microscopia óptica de una muestra de microgotas, barra de escala 200  $\mu\text{m}$ .

Figura 32 que la densidad de poros expuesto disminuyó y que sobre algunos de ellos existe una ligera capa de PLC; a pesar de esto las micropartículas presenta una adecuada porosidad, además de que se disminuyeron las mermas considerablemente por la modificación realizada en el proceso de secado.

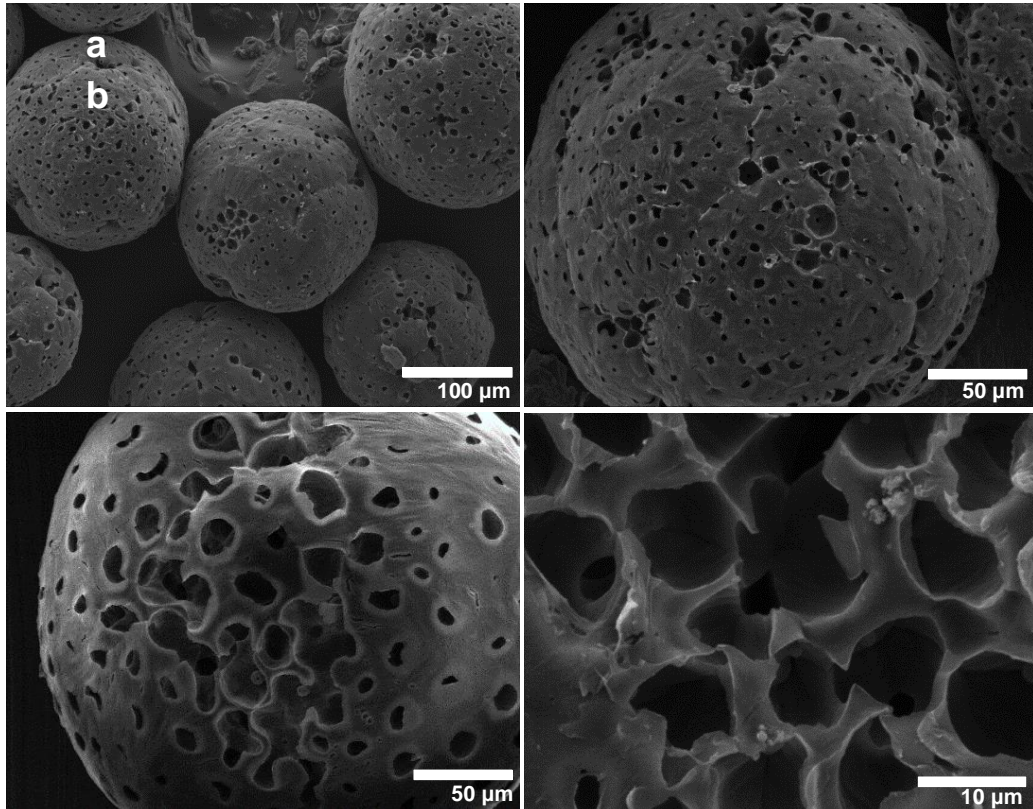


Figura 32. Imágenes SEM de las partículas, todas fabricadas a  $Q_d=30 \mu\text{l}/\text{min}$  y  $Q_c=120 \mu\text{l}/\text{min}$  en un microchip de  $90^\circ$  y la modificación del tiempo de secado.

#### 7.4. Recubrimiento termosensible

Se decidió utilizar pNIPAM para el recubrimiento de las micropartículas, debido a que presenta una  $LCST=32^\circ\text{C}$  y además puede ser incrementado mediante la adición de monómeros hidrofílicos [99]. Generalmente en la síntesis de nanogeles de pNIPAM es utilizado un entrecruzador, el cual ancla las cadenas de pNIPAM entre sí y propicia la formación de los nanogeles, de los entrecruzadores más utilizados se encuentra el MBA. Por si solo el MBA aumenta el valor de la  $LCST$  del pNIPAM, sin embargo, se ha reportado que una concentración mayor a 10 %mol de MBA produce una gran estabilidad en la estructura del nanogel que hace perder la capacidad de ser termosensible del pNIPAM [100]. Como alternativa se decidió usar ácido metacrilato (AM) como comonomero, manteniendo fija la concentración de MBA a una concentración menor a 10% mol; se

sintetizaron nanogeles de manera independiente, para determinar el más adecuado para el recubrimiento de las micropartículas de PLC. En la Tabla VI se muestran las composiciones de cada uno de los nanogeles de pNIPAM sintetizados.

**Tabla VI. Composición de los nano geles de pNIPAM sintetizados\*.**

Muestra	NIPAM (mg)	MBA (mg)	AM (mg)	SDS (mg)	Agua (ml)
<b>NG-1</b>	1.08	84 (5.8% mol)	0	48	50
<b>NG-2</b>	1.08	84 (5.8% mol)	12 (1.5%mol)	48	50
<b>NG-3</b>	1.08	84 (5.8% mol)	24 (3.0% mol)	48	50

\*Como iniciador y catalizador se utilizó 60 mg de PSA y de TEMED, respectivamente, para todas las muestras.

Después de purificados a cada una de las muestras se le determinó la LCST mediante turbidimetría en función de la temperatura, a dos valores diferentes de pH diferentes; a partir de los datos obtenidos se construyeron graficas de transmitancia contra temperatura con pH=5 (Figura 33) y pH=7 (Figura 34). Ajustando a un modelo de Boltzmann para una sigmoide (Anexo VI) para determinar la temperatura exacta de transición de las muestras, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla VII.

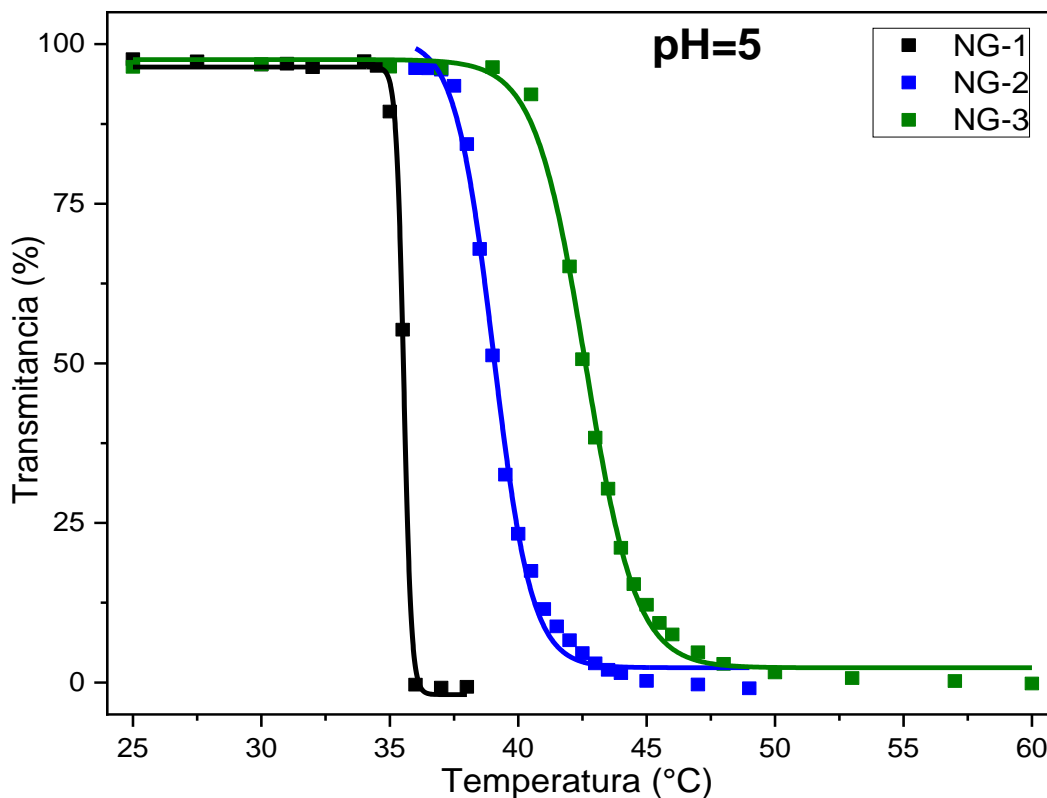


Figura 33. Gráfica de transmitancia contra temperatura a pH=5 para evaluación de las LCST de NG-1 (cuadrados negros), NG-2 (cuadrados azules), y NG-3 (cuadrados verdes). Las líneas representan el ajuste al modelo de Boltzmann para una sigmoide.

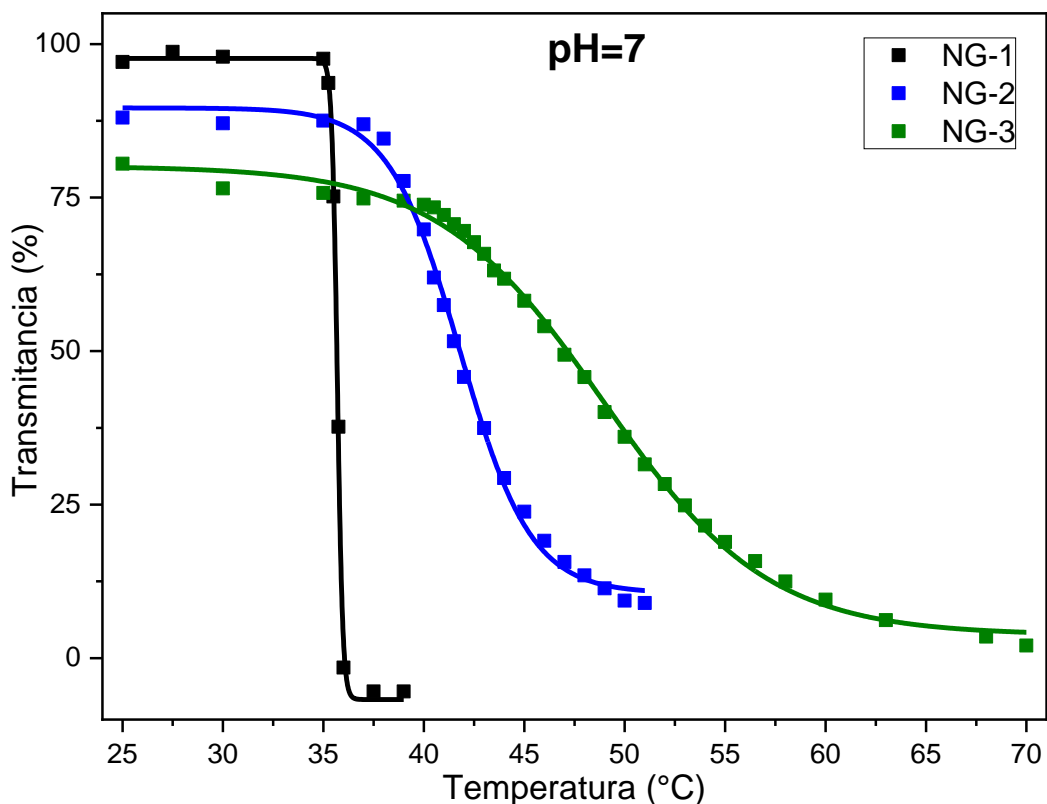


Figura 34. Gráfica de transmitancia contra temperatura a pH=7 para evaluación de las LCST de NG-1 (cuadrados negros), NG-2 (cuadrados azules), y NG-3 (cuadrados verdes). Las líneas representan el ajuste al modelo de Boltzmann para una sigmoide.

**Tabla VII. Valores de LCST determinadas a partir del ajuste de Boltzmann (Anexo VI) para una sigmoide.**

pH de medición	NG-1	NG-2	NG-3
5	35.5 °C	39.0 °C	42.6 °C
7	35.7 °C	41.7 °C	48.9 °C

Como se puede apreciar en las gráficas de la Figura 33 la adición de AM aumentó el valor de la temperatura de transición en función a la cantidad adicionada, por tal motivo los valores más altos de temperatura corresponden a la muestra NG-3. Por si sola la muestra NG-1 presentó un aumento de la LCST en comparación del homopolímero de pNIPAM, de 32°C poco más de 35°C. Sin embargo, a pH=5 se observa un decaimiento abrupto de la transmitancia en las tres muestras analizadas, mientras que a pH=7 la única muestra

que presente este decaimiento es la NG-1; el decaimiento de la transmitancia de las muestras restante es más suave, en estos casos la temperatura de transición es llamada *LCST-like* [101], [102]. La adición de un ácido carboxílico como comonomero en un nanogel de pNIPAM, como es el caso del AM hace que sensibilidad térmica dependa del pH [99], por tal motivo el NG-1, al cual no se adiciono AM, no presenta cambio entre ambas condiciones de medición. El efecto que presentan las muestras NG-2 y NG-3, puede explicarse debido a que el AM posee un  $pK_a \sim 4.8$ . A pesar de que ambas condiciones de pH superan el valor de  $pK_a$ , a  $pH=7$  hay un mayor número de grupos carboxilo desprotonados, que a  $pH=5$ . Estos grupos  $-COO^-$  interaccionan con el agua de forma ion-dipolo, mientras que estando protonados la interacción con el agua es dipolo-dipolo inducido, haciendo que se necesite una mayor energía para desestabilizar estas interacciones a  $pH=7$ ; por tal motivo la temperatura de transición es mayor conforme se aumenta el pH [103]. Para el recubrimiento de las micropartículas de PCL se utilizó la composición de la muestran NG-3 y a la misma concentración de síntesis; la cantidad de disolución de reactivo fue la necesaria para que la sumatoria de las masas de los comonomeros (pNIPAM, MBA y AM) fuera igual a la masa de las micropartículas a recubrir; la adición de este volumen se realizó de manera fraccionada para que el recubrimiento se llevara a cabo con un mayor control [104], [105]. A diferencia del inicio, al finalizar la reacción las micropartículas se encontraban en el fondo del matraz, esto fue un indicio de que se llevó a cabo el recubrimiento; ya que la PLC es un polímero hidrofóbico por lo que al inicio de la reacción se encontraba en la interfase del líquido y la atmósfera de nitrógeno. Después de ser filtradas y lavadas varias veces con agua desionizada, las micropartículas fueron liofilizadas y analizadas mediante espectroscopia Raman. En la Figura 35 se presenta el espectro Raman de la muestra NG-3, previamente liofilizada, determinada a una longitud de onda de 535 nm. A pesar de que el espectro obtenido no está del todo resuelto, conserva señales que han sido reportadas en copolímeros de pNIPAM [106], [107]. En la región  $835\text{ cm}^{-1}$  se observa la señal asignada a varios estiramientos de cadena  $-C-C-$ , otra señal asociada a este fenómeno está a  $940\text{ cm}^{-1}$ , la cual no es apreciable en la Figura 35. En  $1450\text{ cm}^{-1}$  está presente la señal debido al doblamiento vibracional de  $-CH_2-$  que se traslapa con la señal de amida II debida a las vibraciones N-H. En la región de número de ondas  $>2800\text{ cm}^{-1}$  se detectaron cuatro señales asignadas a los modos de estiramiento C-H del nanogel: estiramiento C-H



simétrico de  $-CH_3$  ( $2870\text{ cm}^{-1}$ ), estiramiento C-H asimétrico de  $-CH_2-$  ( $2920$  y  $2945\text{ cm}^{-1}$ ), y estiramiento C-H asimétrico de  $-CH_3$  ( $2970\text{ cm}^{-1}$ ).

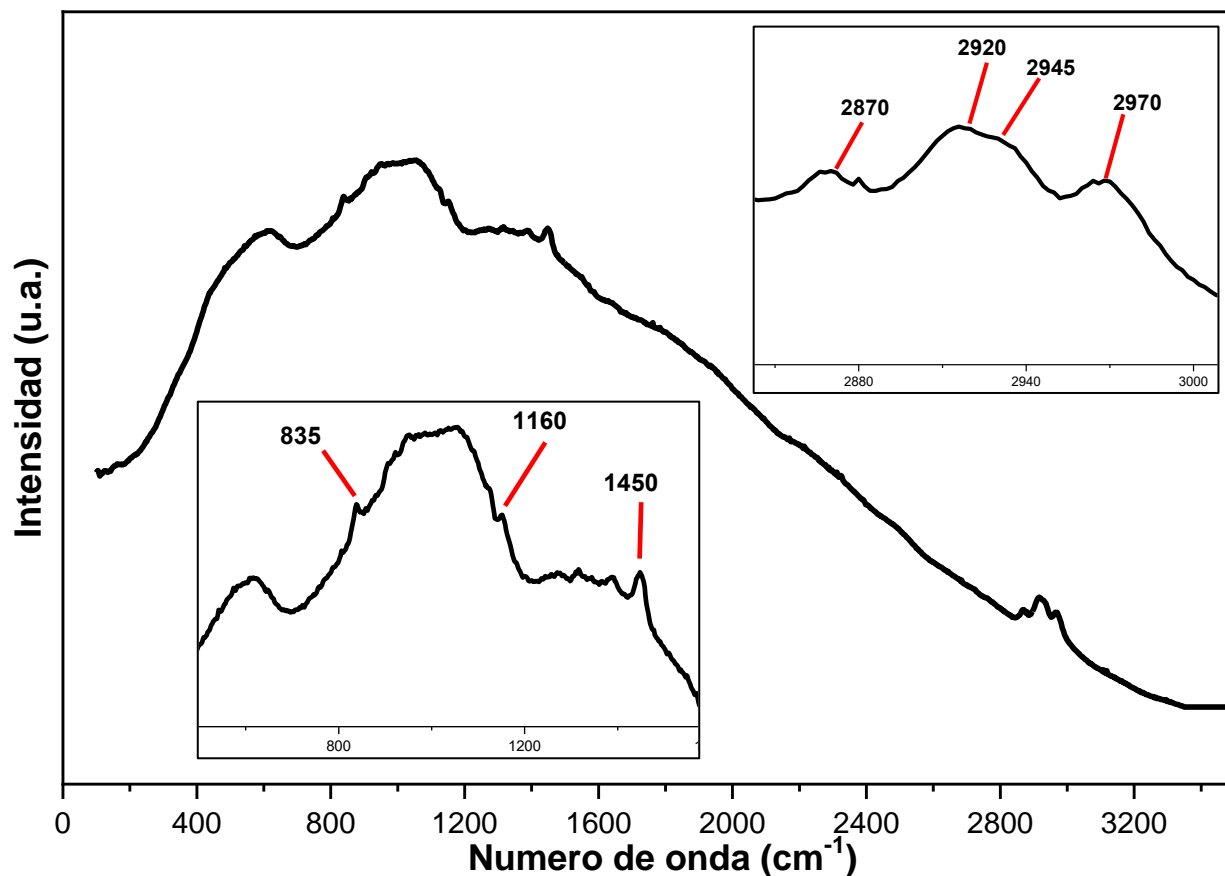


Figura 35. Espectro Raman de la muestra NG-3. Imágenes en recuadros son acercamientos a diferentes zonas del espectro

Al comparar los espectros Raman de la muestra NG-3, de las micropartículas recubiertas (MP-NG), y de la PLC (Figura 36), se puede apreciar que el espectro de MP-NG es muy parecido a la de la PCL, pero con las señales atenuadas y con la línea base distorsionada. Además de que la mayoría de las señales se traslapan, con el de la muestra NG-3, pero al ser más intensas y definidas solapan a las del nanogel, como: las señales alrededor de los  $2900\text{ cm}^{-1}$  debido a los diferentes estiramientos de C-H, las señales en  $1300$  y  $1450\text{ cm}^{-1}$  debido los giros- y doblamiento de  $-CH_2-$ , y en cercanos a  $1100\text{ cm}^{-1}$  a los estiramientos  $-C-C-$ . De manera específica el espectro Raman de las micropartículas recubiertas, al igual que el de la PLC [108], presentan señales cercanas a  $900\text{ cm}^{-1}$  debido a los estiramientos  $-C-COO$ , así como una señal en  $1730\text{ cm}^{-1}$  debido al estiramiento  $C=O$ . Estos resultados sugieren que el copolímero NG-3, recubrió a las micropartículas depositándose sobre ellas sin formar algún enlace entre ambos materiales.

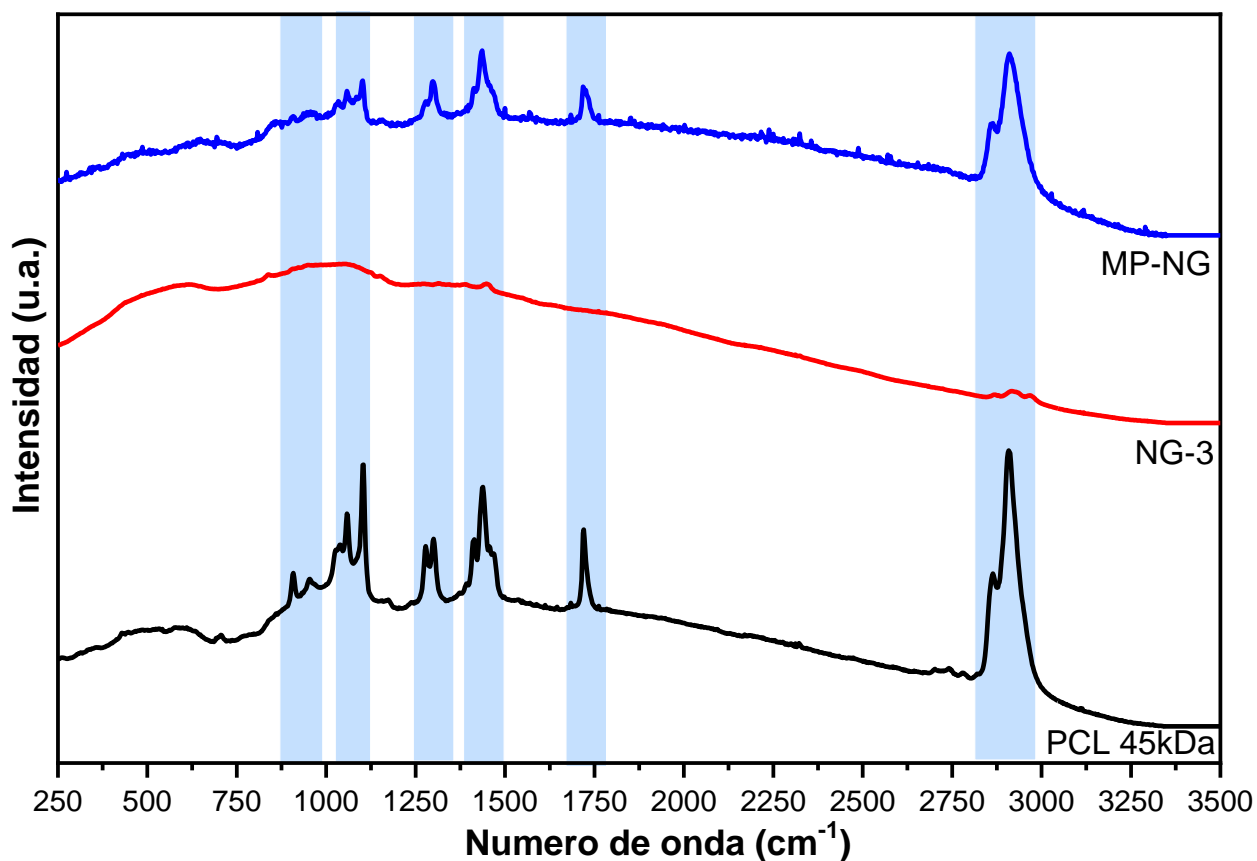


Figura 36. Comparación de espectro Raman de MP-NG (línea azul), NG-3 (línea roja), y PLC 45kDa (línea negra). Las barras de color azul indican las señales de interés.

Para realizar la evaluación del recubrimiento, mediante una técnica más sensible, se decidió realizar espectroscopias de energía dispersiva de rayos-X (EDS) a dos muestras de micropartículas, con y sin recubrimiento (Figura 37). Los análisis EDS se llevaron a cabo mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (JSM-7600F, Jeol). Como se muestran en la Figura 37 los espectros de las muestras analizadas los principales picos detectados corresponden a carbono, oxígeno y nitrógeno, para el caso de la muestra recubierta, a pesar de que en algunas muestras se presentaron otras señales, el valor porcentual de dichas señales fue cero. En algunas muestras se observaron señales de hierro las cuales correspondían a las NPM dentro de la matriz de la micropartícula cercanas a la superficie. Los valores obtenidos de los porcentajes atómicos (Tabla VIII), para el caso de la muestra sin recubrir el porcentaje de oxígeno es ligeramente mayor al 25% esperado, sin embargo, no existe señal para nitrógeno, a diferencia de la muestra recubierta. La señal de nitrógeno presente en la

muestra recubierta indica la presencia del copolímero en muestra, sin embargo, no se puede tener un porcentaje estimado preciso.

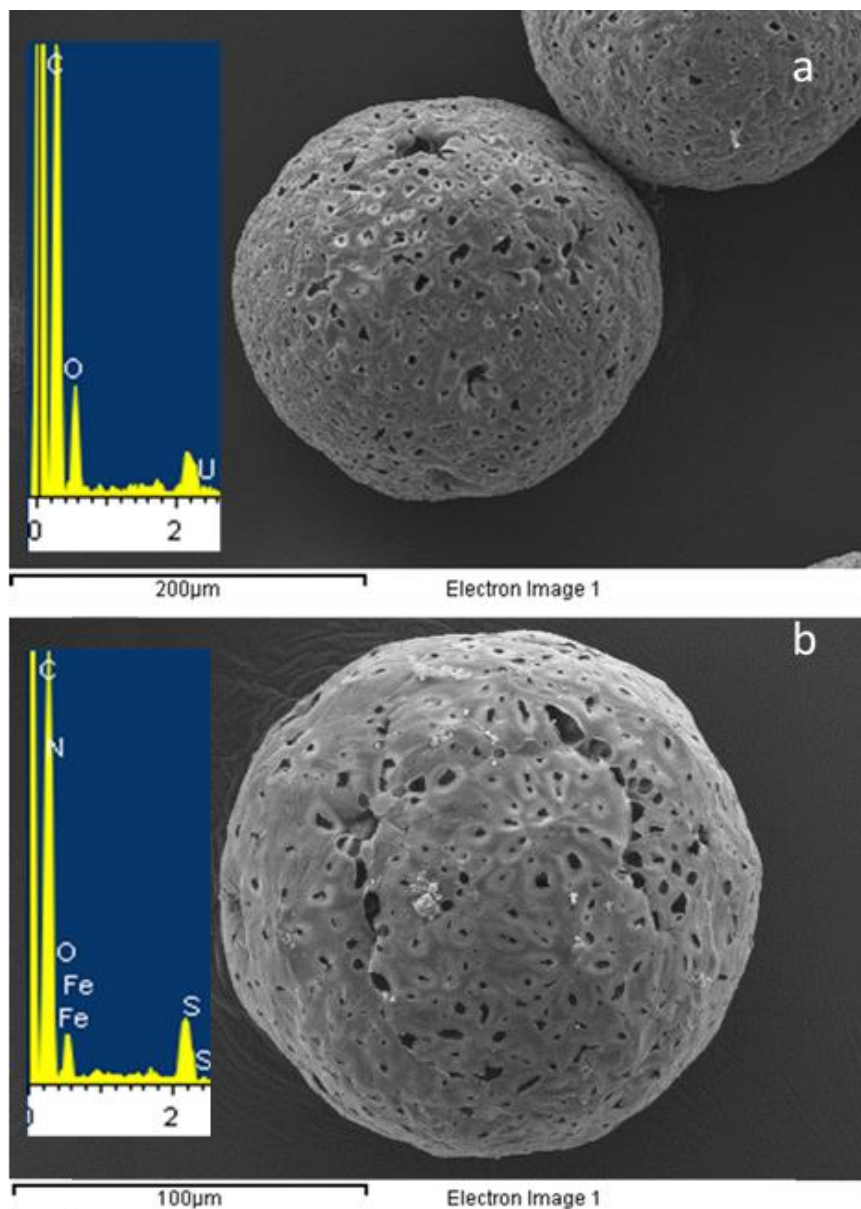


Figura 37. Espectros de EDS e imágenes SEM de micropartículas (a) sin recubrir y (b) recubiertas con co-polímero termosensible.

**Tabla VIII. Porcentajes atómicos obtenidos de estudios de EDS.**

Elemento	MP (% atómico)	MP-NG (%atómico)
<b>C</b>	66.6 ±3.4	49.8 ±2.9
<b>O</b>	33.3 ±3.4	24.5 ±5.3
<b>N</b>	N/A	25.6 ±4.7

### 7.5. Carga y liberación 6-mercaptopurina

Después de determinar que la mayor inclusión de la 6-mercaptopurina en las MP-NG es llevada a un tiempo de 9 horas, se evaluó la cantidad, en miligramos, cargada de fármaco por cada miligramo de sistema (MP-NG) a diferentes concentraciones. En primer lugar, se utilizaron 5 diferentes concentraciones entre 0.068-0.222 mg/ml, y posteriormente se evaluaron 5 concentraciones diferentes entre 0.212-0.375 mg/ml; ambas pruebas se realizaron por duplicado. Como se puede apreciar en la Figura 38, a pesar de que la inclusión de la 6-mercaptopurina en MP-NG presenta variaciones, en disoluciones con una concentración mayor a 0.2 mg/ml, se logra incluir aproximadamente 0.06 mg de 6-mercaptopurina por cada mg de MP-NG, es decir el 6% en masa. Para los estudios de liberación cierta masa de MP-NG fue colocada en una disolución a una concentración de 0.388 mg/ml, a 25 °C con agitación constante durante nueve horas. Concluido el tiempo se determinó la concentración de la disolución y por diferencia de la cantidad inicial se determinó que el porcentaje de carga fue de  $6.0 \pm 0.21 \%$

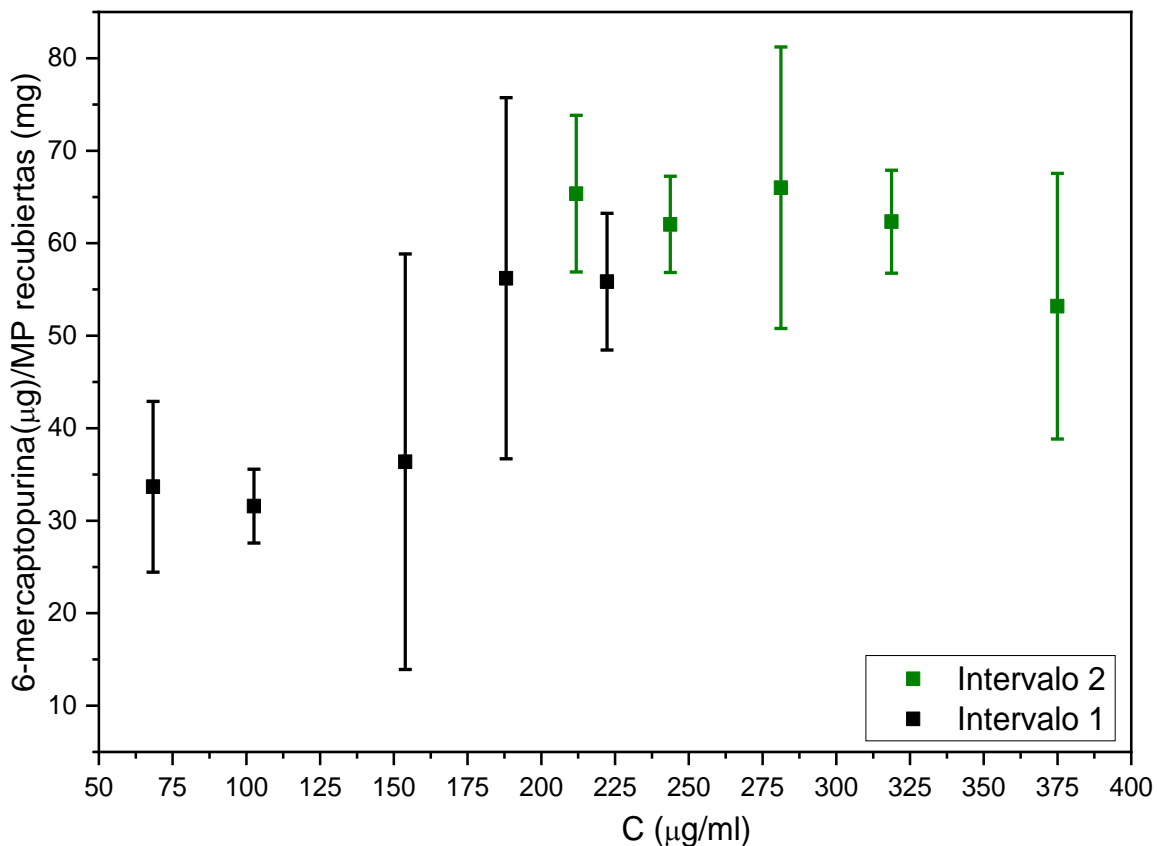


Figura 38. Gráfica de 6-mercaptopurina ( $\mu\text{g}$ )/ MP-NG (mg) contra concentración (mg/ml), del intervalo 1 (cuadrados negros) e intervalo 2 (cuadrados verdes).

En primer lugar, se realizó la liberación en ausencia del campo magnético, se tomaron muestras regulares hasta las diez horas y después hasta las 24 horas, debido a que después de las 6 horas no presentó grandes cambios en la liberación. Por tal motivo la liberación con la aplicación del campo magnético se detuvo a las 10 horas. En la Figura 39 se puede observar las cinéticas de liberación de 6-mercaptopurina a las dos diferentes condiciones, es fácilmente apreciable que en presencia del campo magnético se libera

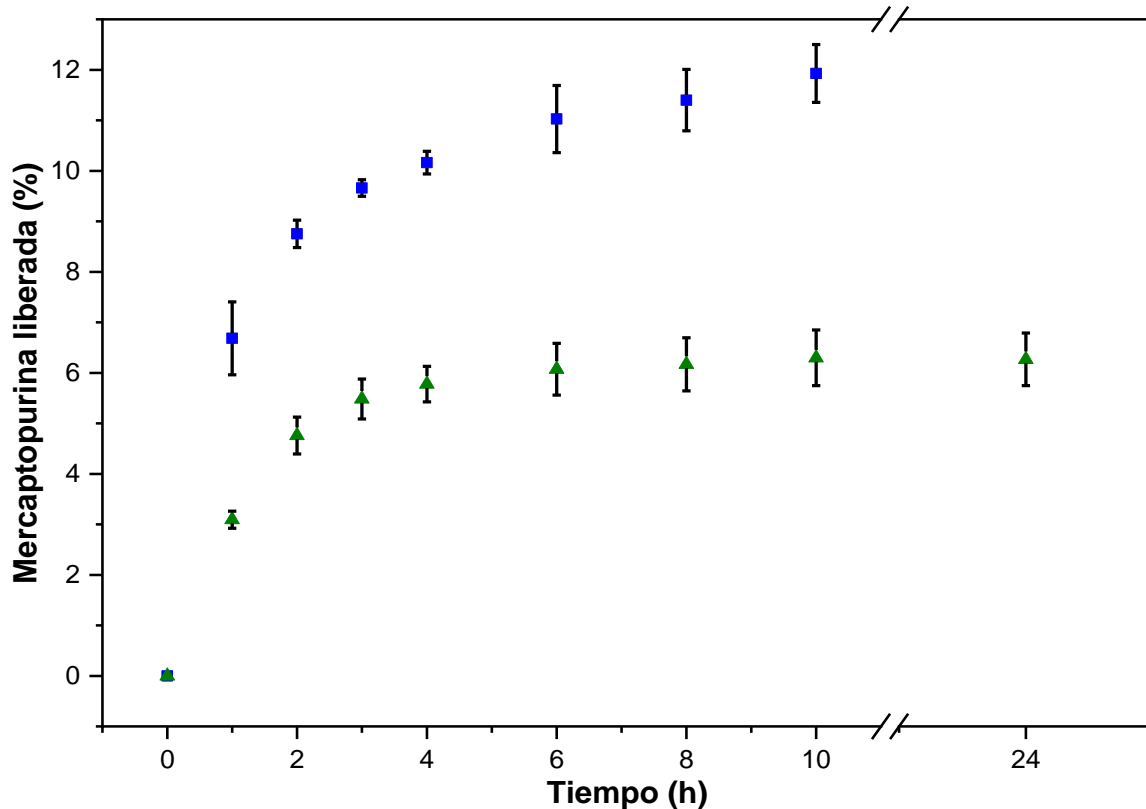


Figura 39. Cinética de liberación de 6-mercaptopurina a 40°C en sin la aplicación de un campo magnético alterno (triángulos) y con la aplicación de un campo magnético (cuadrados).

un mayor porcentaje de 6-mercaptopurina.

Cada una de las cinéticas de liberación se ajustaron a diferentes modelos cinéticos de liberación; los cuales son presentados en las Tablas IX y X, para las liberaciones sin y con la aplicación del campo magnético. Para ambas condiciones de liberación el mejor ajuste se obtuvo para el modelo Peppas-Sahalin, debido a que cada uno posee el mayor coeficiente de correlación (RSQR), la mayor suma de cuadrados (MSC), la menor desviación estándar (DS) y el menor criterios de Akaike (AIC) [109]. En la Figura 40 se muestran las gráficas de ajuste del modelo Peppas-Sahalin, así como el valor de los tres parámetros del modelo, estos parámetros se relacionan entre sí mediante la Ecuación 7.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^m + k_2 t^{2m} \dots\dots\dots(\text{Ecuación 7})$$

Donde  $M_t/M_\infty$  es la fracción del fármaco liberado a un tiempo determinado,  $k_1$  y  $k_2$  son constantes cinéticas,  $t$  es el tiempo de cada medición y  $m$  es el coeficiente de difusión de Fick, el cual se relaciona con la forma geométrica del sistema.

Tabla IX. Parámetros de ajuste de diferentes modelos cinéticos para la liberación en ausencia del campo magnético.

Modelo	Parámetros	RSQR	MSC	DS	AIC
Orden cero	k0	-10.4420	-2.6873	96.3429	38.5433
Primer orden	k1	-10.0342	-2.6510	92.9095	38.2530
Higuchi	k1	-2.1076	-1.3838	26.1660	28.1157
Korsmeyer-Peppas	k1, n	0.6300	0.4944	3.1151	13.0900
Peppas-Sahlin	k1, k2	0.9226	1.8082	0.6521	2.5795
Weibull	$\alpha, \beta$	0.6360	0.5106	3.0650	12.9605

Tabla X. Parámetros de ajuste de diferentes modelos cinéticos para la liberación en presencia del campo magnético.

Modelo	Parámetros	RSQR	MSC	DS	AIC
Orden cero	k0	-4.9283	-2.0655	115.0033	35.2147
Primer orden	k1	-4.4756	-1.9860	106.2217	34.6587
Higuchi	k1	-0.1533	-0.4284	22.3731	23.7550
Korsmeyer-Peppas	k1, n	0.9583	2.6047	0.8098	2.5236
Peppas-Sahlin	k1, k2	0.9906	3.8106	0.1822	-5.9179
Weibull	$\alpha, \beta$	0.9603	2.6537	0.7711	2.1804

El modelo de Peppas-Sahlin explica que la liberación está compuesta por dos procesos, la difusión Fickiana del fármaco a través del material ( $k_1$ ) y por la liberación debida a la relajación de cadenas poliméricas ( $k_2$ ) [110], [111]. En ambos casos  $k_1 > k_2$  lo que sugiere que el fenómeno que rige la liberación es la difusión, y en menor proporción a la relajación de las cadenas, esto se debe a que el nanogel que recubre las micropartículas posee cierta estabilidad estructural debido a los entrecruzadores utilizados. El valor  $k_1$  cuando se aplica el campo magnético es mayor que cuando no se aplica, es decir que sí existe un efecto en la liberación del fármaco en función de un campo magnético para la generar

un aumento de temperatura aun a 40 °C. En cuanto al coeficiente m en ambos casos es de 0.45, que sugiere que el recubrimiento en las micropartículas no posee una morfología definida, y que es diferente a una película (m=0.5).

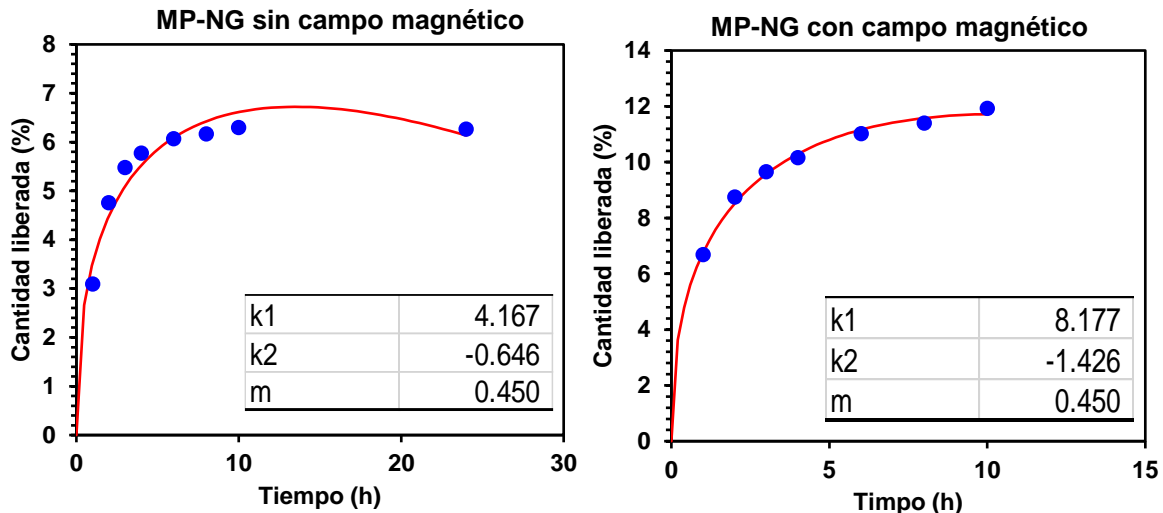


Figura 40. Gráficas de ajuste al modelo Peppas-Sahlin de cantidad liberada (%) contra tiempo (h) para ambas condiciones de liberación. Puntos azules representan los datos muestreados y línea roja al ajuste.

## 8. Conclusiones

Se diseñó y fabricó un molde maestro, mediante fotolitografía, para la fabricación de dispositivos microfluídicos de PDMS tipo *cross-flow* a dos diferentes ángulos de corte, 30 y 90°.

Mediante la técnica de litografía suave, se fabricaron dispositivos microfluídicos de PDMS, con dimensiones de canal de  $301.1 \pm 10.7 \mu\text{m}$  de ancho, y  $200.5 \pm 9.9 \mu\text{m}$  de alto. Se modificó la superficie de los canales de PDMS de manera irreversible para aumentar la resistencia de este material frente a disolventes orgánicos como el DCM; y mediante un diseño experimental  $2^3$  se logró determinar el efecto de las variables de recubrimiento para alcanzar un mejor recubrimiento, inferido a partir de la medición de ángulo de contacto de agua sobre el PDMS recubierto.

Se sintetizaron y caracterizaron, nanopartículas magnéticas de magnetita recubiertas de ácido oleico, para favorecer su dispersión en DCM. El 95% de la muestra obtenida presento un tamaño menor a 10.5 nm y el 100% un tamaño de 14.5 nm, tamaño adecuado para aprovechar su propiedad superparamagnética; que en presencia de un campo

magnético alterno generaron un  $\Delta T=0.95\pm 0.05$  °C en una dispersión a una concentración de 1 mg/ml.

Se evaluó la concentración de PLC y de canfeno para la generación adecuada de micropartículas porosas, la composición adecuada fue de PCL=5% m/v y canfeno=15% m/v, así como las condiciones de secado adecuadas para un mejor rendimiento.

Se evaluó el efecto que tienen la relación de caudales de las fases discontinua y continua sobre el tamaño de gota, de una emulsión O/W fabricadas en microchips con ángulos de corte a 30 y 90°; para lograr tamaños de gota en un intervalo de 140-340  $\mu\text{m}$ . También se definieron las zonas de regímenes de flujo *squeezing*, *dripping* y *jetting* para la generación de gotas.

Se sintetizaron y caracterizaron copolímeros de pNIPAM, a diferentes proporciones de MBA y ácido metacrílico, los cuales presentaron un aumento de la LCST a 35.5, 39.0 y 42.6 °C a pH=5; y 35.7, 41.7 y 48.9 °C a pH=7. Se logró recubrir las micropartículas poliméricas porosas con el copolímero que presento una LCST de 42.6 °C (pH=5) y 48.9 °C (pH=7), lo cual fue comprobada por espectroscopia Raman y EDS.

Se cargó 6-mercaptopurina en las micropartículas porosas recubiertas con un porcentaje de carga de  $6.0\pm 0.21$  %. Las cuales presentaron una cinética de liberación ajustada a un modelo de Peppas-Shalin, predominado por difusión, en condiciones intratumorales (40 °C, pH=5). La liberación en presencia de un campo magnético alterno favoreció la liberación de la 6-mercaptopurina, por efecto del aumento de temperatura generadas por las NPM, de  $6.30\pm 0.55\%$  (10 horas) a  $11.93\pm 0.57\%$  (10 horas).

## 9. Perspectivas

- Caracterizar y evaluar a profundidad el efecto del proceso de secado de las gotas, para hacer más robusto la fabricación de micropartículas porosas.
- Evaluar la liberación *in vitro* a diferentes condiciones de campo magnético alterno, para tener un mayor conocimiento de la liberación en función de este.
- Realizar estudios *in vivo* para evaluar eficacia del sistema desarrollado contra la terapéutica convencional.
- Evaluar el potencial del sistema desarrollado en: la embolización de tumores, efectos termos ablativos y como agente de contraste; para ser utilizado como un sistema multifuncional.



- Evaluar la factibilidad de que todos los procesos de fabricación del sistema sean llevados a cabo mediante el uso de la microfluídica, para tener un mayor control de los procesos.
- Evaluar y aprovechar las propiedades aerodinámicas de las micropartículas porosas para el tratamiento de cáncer de pulmón.

## 10. Referencias

- [1] (INEGI) Instituto Nacional de Estadística y Geografía, “Comunicado de prensa no. 61/18 2 de febrero de 2018 página 1/13; estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero); Datos nacionales,” p. 13, 2018.
- [2] N. Reynoso-Noverón and J. A. Torres-Domínguez, “Epidemiología del cáncer en México: carga global y proyecciones 2000-2020,” *Rev. Latinoam. Med. Conduct.*, vol. 8, no. 1, pp. 9–15, 2018.
- [3] A. Alsuraifi, A. Curtis, D. A. Lamprou, and C. Hoskins, “Stimuli responsive polymeric systems for cancer therapy,” *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 3, pp. 1–17, 2018.
- [4] L. Zhou, H. Wang, and Y. Li, “Stimuli-responsive nanomedicines for overcoming cancer multidrug resistance,” *Theranostics*, vol. 8, no. 4, pp. 1059–1074, 2018.
- [5] Q. Yin, J. Shen, Z. Zhang, H. Yu, and Y. Li, “Reversal of multidrug resistance by stimuli-responsive drug delivery systems for therapy of tumor,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 13–14, pp. 1699–1715, 2013.
- [6] H. S. El-Sawy, A. M. Al-Abd, T. A. Ahmed, K. M. El-Say, and V. P. Torchilin, “Stimuli-Responsive Nano-Architecture Drug-Delivery Systems to Solid Tumor Micromilieu: Past, Present, and Future Perspectives,” *ACS Nano*, vol. 12, no. 11, pp. 10636–10664, 2018.
- [7] N. V. Rao, H. Ko, J. Lee, and J. H. Park, “Recent Progress and Advances in Stimuli-Responsive Polymers for Cancer Therapy,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 6, no. August, 2018.
- [8] F. Rossi, G. Perale, and M. Masi, *Controlled Drug Delivery Systems Towards New Frontiers in Patient Care*. Milano, 2016.
- [9] Y. W. Chien, *Novel Drug Delivery Systems.*, 2a ed., vol. 48, no. 3. 1993.
- [10] M. Rangasamy and K. G. Parthiban, “RECENT ADVANCES IN NOVEL DRUG

- DELIVERY SYSTEMS," *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.*, vol. 1, no. 12, pp. 316–326, 2010.
- [11] R. R. Bhagwat and I. S. Vaidhya, "NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEMS: AN OVERVIEW," vol. 4, no. 3, pp. 970–982, 2013.
- [12] H. C. Ansel, N. G. Popovich, and L. V. Allen, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 9th ed. 2011.
- [13] C. Zhai, J. Yuan, and Q. Gao, "Stimuli-Sensitive Chitosan-based Systems for biopharmaceuticals," *Chitosan-Based Syst. Biopharm. Deliv. Target. Polym. Ther.*, pp. 319–332, 2012.
- [14] 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.
- [15] A. D. Sezer, "Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery," in *Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, B. Devasier and K. Sanghyo, Eds. InTech, 2014, p. 552.
- [16] A. Van Herk, J. Forcada, and G. Pastorin, *Controlled Release Systems; Advances in Nanobottles and Active Nanoparticles*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2016.
- [17] R. A. Bader and D. A. Putman, *Engineering Polymer Systems for Improved Drug Delivery*. 2014.
- [18] S. R. Shah *et al.*, "Verteporfin-Loaded Polymeric Microparticles for Intratumoral Treatment of Brain Cancer," *Mol. Pharm.*, vol. 16, p. acs.molpharmaceut.8b00959, 2019.
- [19] P. Huang *et al.*, "Nano-, micro-, and macroscale drug delivery systems for cancer immunotherapy," *Acta Biomater.*, vol. 85, pp. 1–26, 2019.
- [20] M. Hamoudeh, R. Diab, H. Fessi, C. Dumontet, and D. Cuchet, "Paclitaxel-loaded microparticles for intratumoral administration via the TMT technique: Preparation, characterization, and preliminary antitumoral evaluation," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 34, no. 7, pp. 698–707, 2008.
- [21] 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, 2012.

- [22] S. Bhatia, *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. 2016.
- [23] N. G. Shimpi, *Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites*, 1st ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2018.
- [24] R. Dwivedi *et al.*, "Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature," *J. Oral Biol. Craniofacial Res.*, vol. 10, no. 1, pp. 381–388, 2020.
- [25] T. K. Dash and V. B. Konkimalla, "Poly- $\epsilon$ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review," *J. Control. Release*, vol. 158, no. 1, pp. 15–33, 2012.
- [26] C. Wang *et al.*, "Porous PLGA microparticles to encapsulate doxorubicin and polyethylenimine/miR-34a for inhibiting the proliferation and migration of lung cancer," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 99, pp. 81445–81448, 2015.
- [27] C. Wang *et al.*, "Disulfiram-loaded porous PLGA microparticle for inhibiting the proliferation and migration of non-small-cell lung cancer," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, pp. 827–837, 2017.
- [28] D. Wu *et al.*, "Improving the intracellular drug concentration in lung cancer treatment through the codelivery of doxorubicin and miR-519c mediated by porous PLGA microparticle," *Mol. Pharm.*, vol. 13, no. 11, pp. 3925–3933, 2016.
- [29] Y. Wang, A. Benzina, D. G. M. Molin, N. Van Den Akker, M. Gagliardi, and L. H. Koole, "Preparation and structure of drug-carrying biodegradable microspheres designed for transarterial chemoembolization therapy," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 26, no. 2, pp. 77–91, 2015.
- [30] I. Kim *et al.*, "Doxorubicin-loaded highly porous large PLGA microparticles as a sustained- release inhalation system for the treatment of metastatic lung cancer," *Biomaterials*, vol. 33, no. 22, pp. 5574–5583, 2012.
- [31] I. Kim *et al.*, "Biomaterials Doxorubicin-loaded porous PLGA microparticles with surface attached TRAIL for the inhalation treatment of metastatic lung cancer," *Biomaterials*, vol. 34, no. 27, pp. 6444–6453, 2013.
- [32] S. K. Sahoo, A. K. Panda, and V. Labhasetwar, "Characterization of porous PLGA/PLA microparticles as a scaffold for three dimensional growth of breast cancer cells," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 2, pp. 1132–1139, 2005.
- [33] N. D. Sempertegui, A. A. Narkhede, V. Thomas, and S. S. Rao, "A combined compression molding, heating, and leaching process for fabrication of micro-

- porous poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 29, no. 16, pp. 1978–1993, 2018.
- [34] J. H. Park *et al.*, “Bioactive and porous-structured nanocomposite microspheres effective for cell delivery: A feasibility study for bone tissue engineering,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 55, pp. 29062–29071, 2014.
- [35] 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.
- [36] B. Taghizadeh *et al.*, “Classification of stimuli-responsive polymers as anticancer drug delivery systems,” *Drug Deliv.*, vol. 22, no. 2, pp. 145–155, 2015.
- [37] V. P. Torchilin, “Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 13, no. 11, pp. 813–827, 2014.
- [38] R. Cheng, F. Meng, C. Deng, H. A. Klok, and Z. Zhong, “Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 14, pp. 3647–3657, 2013.
- [39] Y. Shu, R. Song, A. Zheng, J. Huang, M. Chen, and J. Wang, “Thermo/pH dual-stimuli-responsive drug delivery for chemo-/photothermal therapy monitored by cell imaging,” *Talanta*, vol. 181, no. December 2017, pp. 278–285, 2018.
- [40] E. Guisasola, L. Asín, L. Beola, J. M. De La Fuente, A. Baeza, and M. Vallet-Regí, “Beyond Traditional Hyperthermia: In Vivo Cancer Treatment with Magnetic-Responsive Mesoporous Silica Nanocarriers,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 15, pp. 12518–12525, 2018.
- [41] A. S. H. Makhlof and N. Y. Abu-Thabit, Eds., *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications: Types and Triggers. Volumen 1*, 1st ed., vol. 1. Kidlington: Woodhead Publishing, 2018.
- [42] S. Mura, J. Nicolas, and P. Couvreur, “Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery,” *Nat. Mater.*, vol. 12, no. 11, pp. 991–1003, 2013.
- [43] F. Eeckman, A. J. Moës, and K. Amighi, “Synthesis and characterization of thermosensitive copolymers for oral controlled drug delivery,” *Eur. Polym. J.*, vol. 40, no. 4, pp. 873–881, 2004.
- [44] R. Begum, Z. H. Farooqi, and S. R. Khan, “Poly(N-isopropylacrylamide-acrylic acid) copolymer microgels for various applications: A review,” *Int. J. Polym. Mater.*

*Polym. Biomater.*, vol. 65, no. 16, pp. 841–852, 2016.

- [45] Z. H. Farooqi, H. U. Khan, S. M. Shah, and M. Siddiq, "Stability of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) polymer microgels under various conditions of temperature, pH and salt concentration," *Arab. J. Chem.*, vol. 10, no. 3, pp. 329–335, 2017.
- [46] Z. Wang, J. Wu, P. Zhao, N. Dai, Z. Zhai, and T. Ai, "Improving cracking resistance of cement mortar by thermo-sensitive poly N-isopropyl acrylamide (PNIPAM) gels," *J. Clean. Prod.*, vol. 176, pp. 1292–1303, 2018.
- [47] W. D. Callister Jr., *Materials Science and Engineering. An Introduction*, 7th ed. New York, USA: John Wiley & Sons Inc, 2007.
- [48] C. M. Rooney, *Hitchhiker's guide Magnetism*, vol. 11, no. 10. 2005.
- [49] A. A. Abd Elrahman and F. R. Mansour, "Targeted magnetic iron oxide nanoparticles: Preparation, functionalization and biomedical application," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 52, no. May, pp. 702–712, 2019.
- [50] K. D., A. M., and S. A., "An arsenal of magnetic nanoparticles; Perspectives in the treatment of cancer," *Nanomedicine*, vol. 11, no. 16, pp. 2215–2232, 2016.
- [51] S. Shabestari Khiabani, M. Farshbaf, A. Akbarzadeh, and S. Davaran, "Magnetic nanoparticles: preparation methods, applications in cancer diagnosis and cancer therapy," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 45, no. 1, pp. 6–17, 2017.
- [52] A. Yadollahpour, "Magnetic nanoparticles in medicine: A review of synthesis methods and important characteristics," *Orient. J. Chem.*, vol. 31, pp. 271–277, 2015.
- [53] H. Zhang *et al.*, "Magnetic nanoparticles based cancer therapy: current status and applications," *Sci. China Life Sci.*, vol. 61, no. 4, pp. 400–414, 2018.
- [54] S. Selvan, K. Narayanan, P. Parasuraman, and P. Ramasamy, *Nanomedicine for Cancer Therapy: From Chemotherapeutic to Hyperthermia- Based Therapy*, 1st ed. Cham: Springer, 2017.
- [55] B. R. Mineev, *Cancer Management in Man: Chemotherapy, Biological Therapy, Hyperthermia and Supporting Measures*, 1st ed. La Jolla, CA: Springer, 2011.
- [56] R. W. Rand, H. D. Snow, and W. J. Brown, "Thermomagnetic surgery for renal cancer.," *Prog. Clin. Biol. Res.*, vol. 100, pp. 673–685, 1982.
- [57] Q. Pankhurst, J. Connolly, S. Jones, and J. Dobson, "Applications of magnetic

- nanoparticles in biomedicine : Biomedical applications of magnetic nanoparticles,” *J. physics. D, Appl. Phys.*, vol. 36, no. 13, 2003.
- [58] P. Tabeling, *Introduction to Microfluidics*, 1st ed. Oxford University Press, 2005.
- [59] B. Giri, *Laboratory Methods in Microfluidics*. Cambridge: Elsevier, 2017.
- [60] Y. Song, D. Cheng, L. Zhao, J. Ma, and Y. Song, *Microfluidics: Fundamentals, Devices, and Applications*, 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2018.
- [61] L. Y. Chu and W. Wang, *Microfluidics for Advanced Functional Polymeric Materials*. Wiley-VCH, 2017.
- [62] Q. Xu *et al.*, “Preparation of Monodisperse Biodegradable Polymer Microparticles Using a Microfluidic Flow-focusing Device for Controlled Drug Delivery,” *Natl. Inst. Heal. Public Access*, vol. 5, no. 13, pp. 1575–1581, 2010.
- [63] E. Lallana *et al.*, “Microfluidic-assisted nanoprecipitation of (PEGylated) poly (d,l-lactic acid-co-caprolactone): Effect of macromolecular and microfluidic parameters on particle size and paclitaxel encapsulation,” *Int. J. Pharm.*, vol. 548, no. 1, pp. 530–539, Sep. 2018.
- [64] J. Li, A. T. L. Lam, J. P. W. Toh, S. Reuveny, S. K. W. Oh, and W. R. Birch, “Fabrication of uniform-sized poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres and their applications in human embryonic stem cell culture,” *Biomed. Microdevices*, vol. 17, no. 6, 2015.
- [65] T. Watanabe, T. Ono, and Y. Kimura, “Continuous fabrication of monodisperse polylactide microspheres by droplet-to-particle technology using microfluidic emulsification and emulsion-solvent diffusion,” *Soft Matter*, vol. 7, no. 21, pp. 9894–9897, 2011.
- [66] J. De Jong, R. G. H. Lammertink, and M. Wessling, “Membranes and microfluidics: A review,” *Lab Chip*, vol. 6, no. 9, pp. 1125–1139, 2006.
- [67] X. H. He *et al.*, “Microfluidic Fabrication of Bio-Inspired Microfibers with Controllable Magnetic Spindle-Knots for 3D Assembly and Water Collection,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 31, pp. 17471–17481, 2015.
- [68] W. Lan, S. Li, Y. Lu, J. Xu, and G. Luo, “Controllable preparation of microscale tubes with multiphase co-laminar flow in a double co-axial microdevice,” *Lab Chip*, vol. 9, no. 22, pp. 3282–3288, 2009.
- [69] S. Ding, N. Anton, T. F. Vandamme, and C. A. Serra, “Microfluidic

nanoprecipitation systems for preparing pure drug or polymeric drug loaded nanoparticles: an overview," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 13, no. 10, pp. 1447–1460, Oct. 2016.

- [70] S. Rezvantalab and M. Keshavarz Moraveji, "Microfluidic assisted synthesis of PLGA drug delivery systems," *RSC Adv.*, vol. 9, no. 4, pp. 2055–2072, 2019.
- [71] A. J. C. Kuehne and D. A. Weitz, "Highly monodisperse conjugated polymer particles synthesized with drop-based microfluidics," *Chem. Commun.*, vol. 47, no. 45, pp. 12379–12381, 2011.
- [72] 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.
- [73] A. Dietzel, *Microsystems for Pharmatechnology*. 2016.
- [74] E. Sollier, C. Murray, P. Maoddi, and D. Di Carlo, "Rapid prototyping polymers for microfluidic devices and high pressure injections," *Lab Chip*, vol. 11, no. 22, pp. 3752–3765, 2011.
- [75] J. J. Zartman and D. J. Hoelzle, "Microfluidic device design , fabrication , and testing protocols," no. July, pp. 1–26, 2015.
- [76] European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, "Linear Polydimethylsiloxanes," *Linear Polydimethylsiloxanes CAS No. 63148-62-9 (second Ed.*, vol. 9, no. 63148, pp. 3–8, 2011.
- [77] D. Bodas and C. Khan-Malek, "Formation of more stable hydrophilic surfaces of PDMS by plasma and chemical treatments," *Microelectron. Eng.*, vol. 83, no. 4-9 SPEC. ISS., pp. 1277–1279, 2006.
- [78] 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.
- [79] 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.
- [80] 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, p. 16091, 2017.
- [81] T. J. Plegue, K. M. Kovach, A. J. Thompson, and J. A. Potkay, “Stability of Polyethylene Glycol and Zwitterionic Surface Modifications in PDMS Microfluidic Flow Chambers,” *Langmuir*, vol. 34, no. 1, pp. 492–502, 2018.
- [82] S. Nicum *et al.*, “A phase II clinical trial of 6-mercaptopurine (6MP) and methotrexate in patients with BRCA defective tumours: A study protocol,” *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, pp. 1–6, 2014.
- [83] E. Amstad *et al.*, “Parallelization of microfluidic flow-focusing devices,” *Phys. Rev. E*, vol. 95, no. 4, pp. 1–6, 2017.
- [84] A. L. R. Costa, A. Gomes, and R. L. Cunha, “Studies of droplets formation regime and actual flow rate of liquid-liquid flows in flow-focusing microfluidic devices,” *Exp. Therm. Fluid Sci.*, vol. 85, pp. 167–175, 2017.
- [85] P. Zhu and L. Wang, “Passive and active droplet generation with microfluidics: a review,” *Lab Chip*, vol. 17, no. 1, pp. 34–75, 2017.
- [86] K. Liu, L. B. Zhao, Q. Zeng, Z. X. Guo, J. Liu, and X. Z. Zhao, “Injection angle dependence in flow focusing based droplet formation,” *2007 1st Int. Conf. Bioinforma. Biomed. Eng. ICBBE*, no. Cv, pp. 1121–1124, 2007.
- [87] R. Martinez-Duarte and M. Madou, “SU-8 Photolithography and Its Impact on Microfluidics,” *Microfluid. Nanofluidics Handb.*, no. 2006, pp. 231–268, 2011.
- [88] J. N. Lee, C. Park, and G. M. Whitesides, “Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices,” *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 23, pp. 6544–6554, 2003.
- [89] W. A. C. Bauer, M. Fischlechner, C. Abell, and W. T. S. Huck, “Hydrophilic PDMS microchannels for high-throughput formation of oil-in-water microdroplets and water-in-oil-in-water double emulsions,” *Lab Chip*, vol. 10, no. 14, pp. 1814–1819, 2010.
- [90] 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. April 2016, 2017.
- [91] N. C. C. Lobato, M. B. Mansur, and A. De Mello Ferreira, “Characterization and chemical stability of hydrophilic and hydrophobic magnetic nanoparticles,” *Mater.*



*Res.*, vol. 20, no. 3, pp. 736–746, 2017.

- [92] X. Liu, M. D. Kaminski, Y. Guan, H. Chen, H. Liu, and A. J. Rosengart, “Preparation and characterization of hydrophobic superparamagnetic magnetite gel,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 306, no. 2, pp. 248–253, 2006.
- [93] Q. Yuan, R. Venkatasubramanian, S. Hein, and R. D. K. Misra, “A stimulus-responsive magnetic nanoparticle drug carrier: Magnetite encapsulated by chitosan-grafted-copolymer,” *Acta Biomater.*, vol. 4, no. 4, pp. 1024–1037, 2008.
- [94] V. Yathindranath, L. Rebbouh, D. F. Moore, D. W. Miller, J. Van Lierop, and T. Hegmann, “A versatile method for the reductive, one-pot synthesis of bare, hydrophilic and hydrophobic magnetite nanoparticles,” *Adv. Funct. Mater.*, vol. 21, no. 8, pp. 1457–1464, 2011.
- [95] B. H. Yoon, W. Y. Choi, H. E. Kim, J. H. Kim, and Y. H. Koh, “Aligned porous alumina ceramics with high compressive strengths for bone tissue engineering,” *Scr. Mater.*, vol. 58, no. 7, pp. 537–540, 2008.
- [96] S. W. Yook, B. H. Yoon, H. E. Kim, Y. H. Koh, and Y. S. Kim, “Porous titanium (Ti) scaffolds by freezing TiH<sub>2</sub>/camphene slurries,” *Mater. Lett.*, vol. 62, no. 30, pp. 4506–4508, 2008.
- [97] A. Murillo-Sanchez, “Desarrollo y caracterización de micropartículas porosas de policaprolactona fabricadas con microfluídica,” Universidad Nacional Autónoma de México, 2019.
- [98] T. Cubaud and T. G. Mason, “Capillary threads and viscous droplets in square microchannels,” *Phys. Fluids*, vol. 20, no. 5, 2008.
- [99] R. Salgado-Rodríguez, A. Licea-Claveríe, and K. F. Arndt, “Random copolymers of N-isopropylacrylamide and methacrylic acid monomers with hydrophobic spacers: pH-tunable temperature sensitive materials,” *Eur. Polym. J.*, vol. 40, no. 8, pp. 1931–1946, 2004.
- [100] R. Contreras-Cáceres, L. Schellkopf, C. Fernández-López, I. Pastoriza-Santos, J. Pérez-Juste, and M. Stamm, “Effect of the cross-linking density on the thermoresponsive behavior of hollow PNIPAM microgels,” *Langmuir*, vol. 31, no. 3, pp. 1142–1149, 2015.
- [101] A. Prhashanna, P. A. Taylor, J. Qin, K. L. Kiick, and A. Jayaraman, “Effect of Peptide Sequence on the LCST-Like Transition of Elastin-Like Peptides and

- Elastin-Like Peptide-Collagen-Like Peptide Conjugates: Simulations and Experiments,” *Biomacromolecules*, vol. 20, no. 3, pp. 1178–1189, 2019.
- [102] A. Burkhart and H. Ritter, “Influence of cyclodextrin on the UCST- and LCST-Behavior of poly(2-methacrylamido-caprolactam)- Co-(N,N-dimethylacrylamide),” *Beilstein J. Org. Chem.*, vol. 10, pp. 1951–1958, 2014.
- [103] M. S. Lee, E. Y. Mok, and J. C. Kim, “Temperature-driven precipitation of poly(N-isopropylacrylamide-co- methacrylic acid) in cationic, anionic and nonionic surfactant solutions,” *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.*, vol. 50, no. 10, pp. 1054–1059, 2013.
- [104] T. Basu, B. Pal, and S. Singh, “Fabrication of core–shell PLGA/PLA–pNIPAM nanocomposites for improved entrapment and release kinetics of antihypertensive drugs,” *Particuology*, vol. 40, pp. 169–176, 2018.
- [105] A. M. Kosinski, J. L. Brugnano, B. L. Seal, F. C. Knight, and A. Panitch, “Synthesis and characterization of a poly(lactic-co-glycolic acid) core + poly(N-isopropylacrylamide) shell nanoparticle system.,” *Biomatter*, vol. 2, no. 4, pp. 195–201, 2012.
- [106] Y. Tsuboi, M. Nishino, and N. Kitamura, “Laser-induced reversible volume phase transition of a poly(N- isopropylacrylamide) gel explored by Raman microspectroscopy,” *Polym. J.*, vol. 40, no. 4, pp. 367–374, 2008.
- [107] B. Sanz *et al.*, “Thermally-induced softening of PNIPAm-based nanopillar arrays,” *Soft Matter*, vol. 13, no. 13, pp. 2453–2464, 2017.
- [108] A. P. Kotula, C. R. Snyder, and K. B. Migler, “Determining conformational order and crystallinity in polycaprolactone via Raman spectroscopy,” *Polymer (Guildf)*., vol. 117, pp. 1–10, 2017.
- [109] W. Pan, “Akaike’s Information criterion in generalized estimating equations,” *Biometrics*, vol. 57, no. March, pp. 120–125, 2001.
- [110] M. L. Bschi, “Mathematical models of drug release,” in *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, Cambridge: Woodhead Publishing, 2015, pp. 63–86.
- [111] M. C. L. C. Freire *et al.*, “Understanding drug release data through thermodynamic analysis,” *Materials (Basel)*., vol. 10, no. 6, pp. 1–18, 2017.

## 11. Anexos

- I. Curva de calibración de 6-mercaptopurina en HCl 0.2 N y buffer de acetatos 0.1M pH=5.

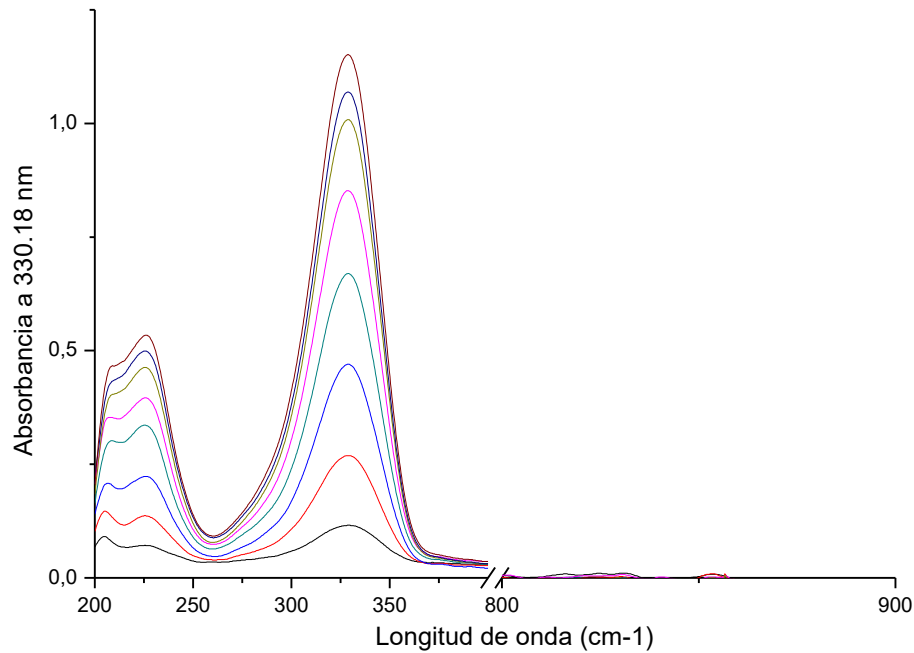


Figura 41. Espectro UV-Vis de 6-mercaptopurina en HCl 0.2N.

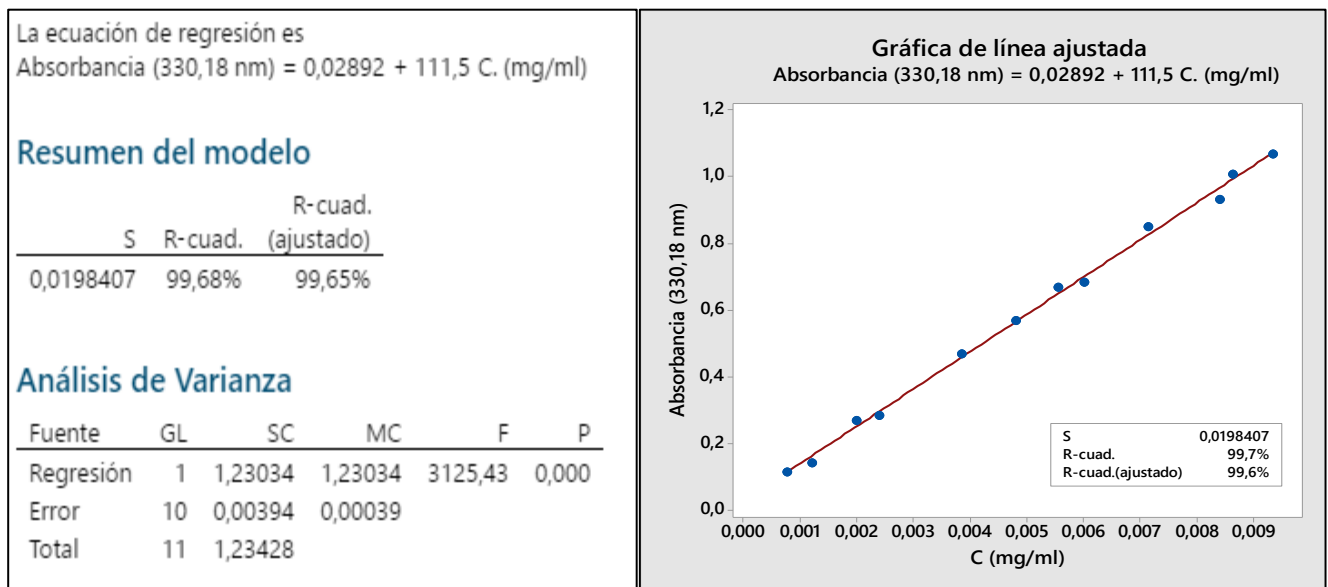


Figura 42 Análisis de regresión y grafica de línea ajustada de curva de calibración de 6-mercaptopurina en HCl 0.2N.

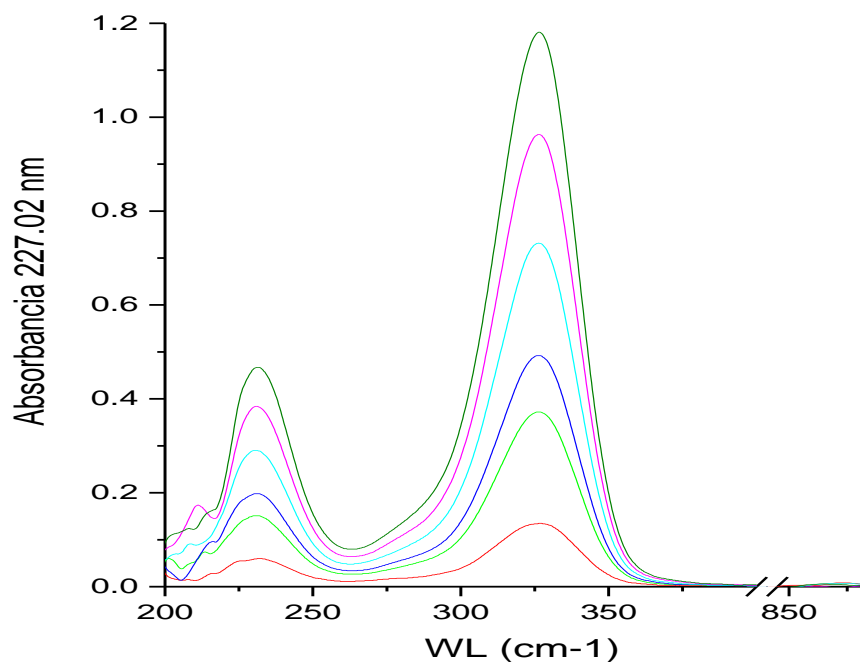


Figura 43 Espectro UV-VIS de 6-mercaptopurina en buffer de acetatos 0.1M a pH=5

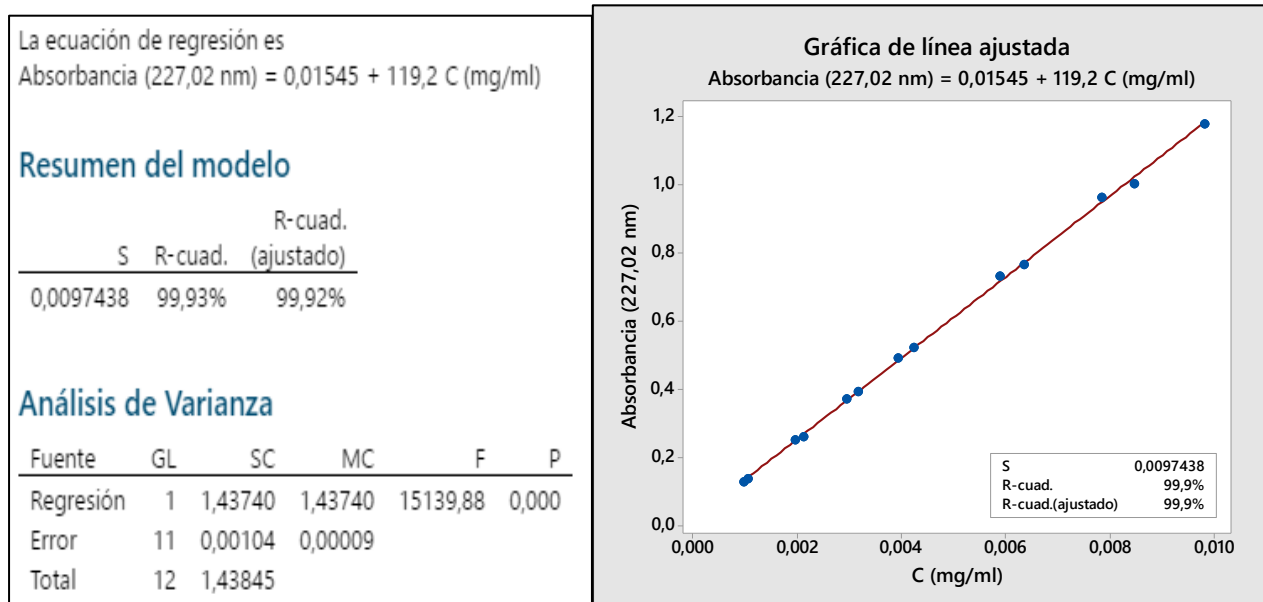


Figura 44. Análisis de regresión y grafica de línea ajustada de curva de calibración de 6-mercaptopurina en buffer de acetatos 0.1M pH=5.

II. Resultados del diseño experimental (2<sup>3</sup>) para evaluar el efecto de: el número de tratamientos de plasma, el peso molecular del PVA y la concentración de la disolución PVA, sobre el recubrimiento de microchips de PDMS.

Regresión factorial: Ángulo de contacto vs. PM PVA; [PVA]; Ciclos plasma  
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	6	804,044	134,007	70,48	0,091
Lineal	3	776,040	258,680	136,06	0,063
PM PVA	1	628,706	628,706	330,68	0,035
[PVA]	1	147,233	147,233	77,44	0,072
Ciclos plasma	1	0,101	0,101	0,05	0,856
Interacciones de 2 términos	3	28,004	9,335	4,91	0,318
PM PVA*[PVA]	1	12,450	12,450	6,55	0,237
PM PVA*Ciclos plasma	1	6,480	6,480	3,41	0,316
[PVA]*Ciclos plasma	1	9,074	9,074	4,77	0,273
Error	1	1,901	1,901		
Total	7	805,945			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,37886	99,76%	98,35%	84,90%

Coefficientes codificados

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		36,528	0,487	74,93	0,008	
PM PVA	17,730	8,865	0,487	18,18	0,035	1,00
[PVA]	8,580	4,290	0,487	8,80	0,072	1,00
Ciclos plasma	0,225	0,112	0,487	0,23	0,856	1,00
PM PVA*[PVA]	2,495	1,248	0,487	2,56	0,237	1,00
PM PVA*Ciclos plasma	-1,800	-0,900	0,487	-1,85	0,316	1,00
[PVA]*Ciclos plasma	-2,130	-1,065	0,487	-2,18	0,273	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\begin{aligned} \text{Ángulo de contacto} = & 36,528 + 8,865 \text{ PM PVA} + 4,290 \text{ [PVA]} + 0,112 \text{ Ciclos plasma} \\ & + 1,248 \text{ PM PVA*[PVA]} - 0,900 \text{ PM PVA*Ciclos plasma} \\ & - 1,065 \text{ [PVA]*Ciclos plasma} \end{aligned}$$

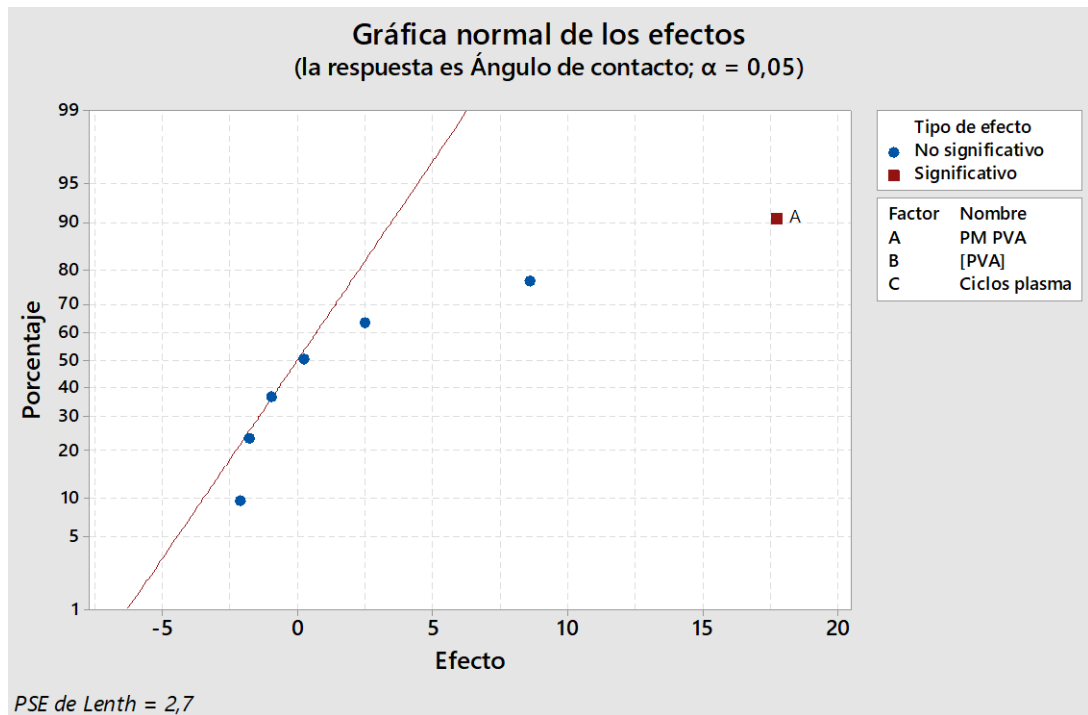


Figura 45. Gráfica normal estandarizada de los efectos. Única variable significativa PM PVA (cuadrado rojo)

Regresión factorial: Ángulo de contacto vs. PM PVA; [PVA]  
(Despreciando el número de tratamientos de plasma).

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	788,39	262,796	59,88	0,001
Lineal	2	775,94	387,969	88,39	0,000
PM PVA	1	628,71	628,706	143,24	0,000
[PVA]	1	147,23	147,233	33,55	0,004
Interacciones de 2 términos	1	12,45	12,450	2,84	0,167
PM PVA*[PVA]	1	12,45	12,450	2,84	0,167
Error	4	17,56	4,389		
Total	7	805,94			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2,09501	97,82%	96,19%	91,29%

#### Coefficientes codificados

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		36,528	0,741	49,31	0,000	
PM PVA	17,730	8,865	0,741	11,97	0,000	1,00
[PVA]	8,580	4,290	0,741	5,79	0,004	1,00
PM PVA*[PVA]	2,495	1,248	0,741	1,68	0,167	1,00

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$\text{Ángulo de contacto} = 36,528 + 8,865 \text{ PM PVA} + 4,290 [\text{PVA}] + 1,248 \text{ PM PVA} * [\text{PVA}]$$

### III. Micrografías de otros poroformadores

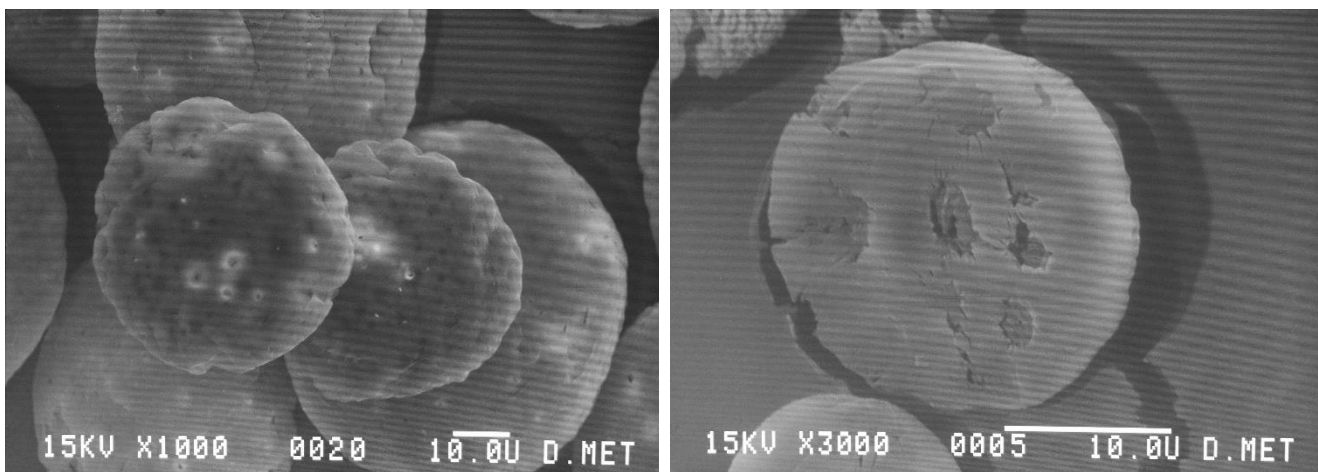
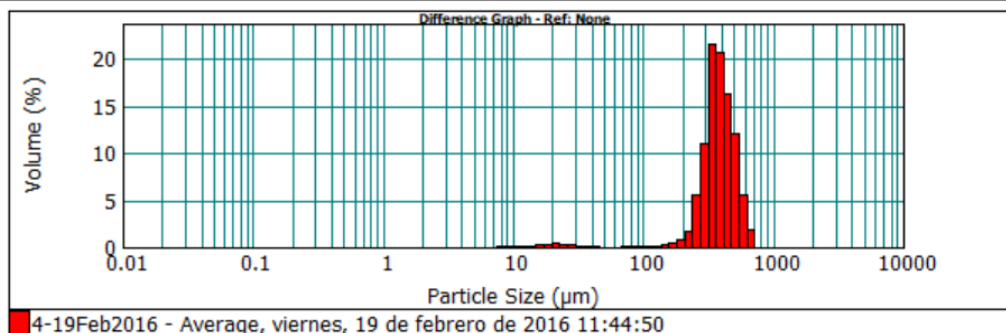


Figura 46. Micropartículas de PCL fabricadas utilizando polivinilpirrolidona como poroformador. Una vez solidificada la micropartícula estas fueron lavadas con agua desionizada para eliminar el poroformador. Los poros obtenidos variaban en su tamaño además de ser superficiales. Barra de escala 10 µm.

**IV. Resultado de tamaño de micropartículas de PLGA (65:35, Sigma Aldrich®). Fabricadas mediante el uso de un homogeneizador Ultraturrax IKA®, a 3000 rpm durante 5 minutos.**

<b>Sample Name:</b> 4-19Feb2016 - Average	<b>SOP Name:</b>	<b>Measured:</b> viernes, 19 de febrero de 2016 11:44:50	
<b>Sample Source &amp; type:</b> ingenieria	<b>Measured by:</b> Gabriel Jaramillo	<b>Analysed:</b> viernes, 19 de febrero de 2016 11:44:51	
<b>Sample bulk lot ref:</b> 4-19Feb2016	<b>Result Source:</b> Averaged		
<b>Particle Name:</b> PLGA	<b>Accessory Name:</b> Hydro 2000MU (A)	<b>Analysis model:</b> Multiple narrow modes	<b>Sensitivity:</b> Enhanced
<b>Particle Rl:</b> 1.560	<b>Absorption:</b> 1	<b>Size range:</b> 0.020 to 2000.000 um	<b>Obscuration:</b> 18.42 %
<b>Dispersant Name:</b> Water	<b>Dispersant Rl:</b> 1.330	<b>Weighted Residual:</b> 20.015 %	<b>Result Emulation:</b> Off
<b>Concentration:</b> 1.0545 %Vol	<b>Span :</b> 0.690	<b>Uniformity:</b> 0.227	<b>Result units:</b> Volume
<b>Specific Surface Area:</b> 0.0221 m <sup>2</sup> /g	<b>Surface Weighted Mean D[3,2]:</b> 271.427 um	<b>Vol. Weighted Mean D[4,3]:</b> 386.508 um	
<b>d(0.1): 268.835 um</b>		<b>d(0.5): 377.013 um</b>	
		<b>d(0.9): 528.921 um</b>	



No	Size (µm)	Mean In%	1*S.D.	No	Size (µm)	Mean In%	1*S.D.	No	Size (µm)	Mean In%	1*S.D.	No	Size (µm)	Mean In%	1*S.D.
1	0.010	0.00	0.00	27	0.363	0.00	0.00	53	13.183	0.11	0.00	79	478.630	12.05	0.00
2	0.011	0.00	0.00	28	0.417	0.00	0.00	54	15.136	0.19	0.00	80	549.541	5.52	0.00
3	0.013	0.00	0.00	29	0.479	0.00	0.00	55	17.378	0.29	0.00	81	630.957	1.79	0.00
4	0.015	0.00	0.00	30	0.550	0.00	0.00	56	19.953	0.36	0.00	82	724.436	0.00	0.00
5	0.017	0.00	0.00	31	0.631	0.00	0.00	57	22.909	0.34	0.00	83	831.764	0.00	0.00
6	0.020	0.00	0.00	32	0.724	0.00	0.00	58	26.303	0.24	0.00	84	954.993	0.00	0.00
7	0.023	0.00	0.00	33	0.832	0.00	0.00	59	30.200	0.12	0.00	85	1096.478	0.00	0.00
8	0.026	0.00	0.00	34	0.955	0.00	0.00	60	34.674	0.02	0.00	86	1258.925	0.00	0.00
9	0.030	0.00	0.00	35	1.096	0.00	0.00	61	39.811	0.00	0.00	87	1445.440	0.00	0.00
10	0.035	0.00	0.00	36	1.259	0.00	0.00	62	45.709	0.00	0.00	88	1659.587	0.00	0.00
11	0.040	0.00	0.00	37	1.445	0.00	0.00	63	52.481	0.00	0.00	89	1905.461	0.00	0.00
12	0.046	0.00	0.00	38	1.660	0.00	0.00	64	60.256	0.00	0.00	90	2187.762	0.00	0.00
13	0.052	0.00	0.00	39	1.905	0.00	0.00	65	69.183	0.07	0.00	91	2511.886	0.00	0.00
14	0.060	0.00	0.00	40	2.188	0.00	0.00	66	79.433	0.00	0.00	92	2884.032	0.00	0.00
15	0.069	0.00	0.00	41	2.512	0.00	0.00	67	91.201	0.15	0.00	93	3311.311	0.00	0.00
16	0.079	0.00	0.00	42	2.884	0.00	0.00	68	104.713	0.11	0.00	94	3801.894	0.00	0.00
17	0.091	0.00	0.00	43	3.311	0.00	0.00	69	120.226	0.08	0.00	95	4365.158	0.00	0.00
18	0.105	0.00	0.00	44	3.802	0.00	0.00	70	138.038	0.18	0.00	96	5011.872	0.00	0.00
19	0.120	0.00	0.00	45	4.365	0.00	0.00	71	158.489	0.48	0.00	97	5754.399	0.00	0.00
20	0.138	0.00	0.00	46	5.012	0.00	0.00	72	181.970	0.79	0.00	98	6606.934	0.00	0.00
21	0.158	0.00	0.00	47	5.754	0.00	0.00	73	208.930	1.74	0.00	99	7585.776	0.00	0.00
22	0.182	0.00	0.00	48	6.607	0.00	0.00	74	239.883	5.53	0.00	100	8709.636	0.00	0.00
23	0.209	0.00	0.00	49	7.586	0.04	0.00	75	275.423	10.92	0.00		10000.000	0.00	0.00
24	0.240	0.00	0.00	50	8.710	0.05	0.00	76	316.228	21.59	0.00				
25	0.275	0.00	0.00	51	10.000	0.06	0.00	77	363.078	20.66	0.00				
26	0.316	0.00	0.00	52	11.482	0.07	0.00	78	416.869	16.31	0.00				
	0.363				13.183				478.630						



## V. Tratamiento estadístico (ANOVA una vía y prueba de Tukey) para muestra para determinar tamaño en función de la cantidad de canfeno utilizado.

ANOVA de un solo factor: A; B; C

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales

Nivel de significancia  $\alpha = 0,01$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	3	A; B; C

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	2	208672	104336	230,20	0,000
Error	597	270587	453		
Total	599	479259			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
21,2895	43,54%	43,35%	42,97%

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 99%
A	200	166,02	22,71	(162,13; 169,91)
B	200	179,14	24,98	(175,25; 183,03)
C	200	134,68	14,84	(130,79; 138,57)

*Desv.Est. agrupada = 21,2895*

### Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 99%

Factor	N	Media	Agrupación
B	200	179,14	A
A	200	166,02	B
C	200	134,68	C

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

### Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 99%	Valor T	Valor p ajustado
-----------------------	--------------------------	------------------	-----------	---------	------------------

B - A	13,12	2,13	(6,92; 19,32)	6,16	0,000
C - A	-31,33	2,13	(-37,54; -25,13)	-14,72	0,000
C - B	-44,45	2,13	(-50,66; -38,25)	-20,88	0,000

Nivel de confianza individual = 99,63%

## VI. Resultados de ajuste a modelo de Boltzmann para determinar LCST de muestra de copolímeros de pNIPAM

### NG-1

pH=5

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
A	A1	96,41672	0,76749	125,626	1,79856E-14	0,09738
	A2	-1,89296	1,42795	-1,32565	0,22156	0,30353
	x0	35,54281	0,01531	2321,5031	0	0,3237
	dx	0,14708	0,0226	6,50731	1,86661E-4	0,33472
	span	98,30968	1,67859			
	EC50	2,72928E15	4,17859E13			

Reduced Chi-sqr = 4,40204279581

COD(R<sup>2</sup>) = 0,99829276265184

### NG-2

pH=5

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
B	A1	100,97418	2,10832	47,89312	0	0,69148
	A2	2,32167	0,95766	2,42431	0,02755	0,36014
	x0	39,03216	0,06163	633,37427	0	0,57737
	dx	0,74201	0,05318	13,95288	2,25015E-10	0,55677
	span	98,65251	2,49914			
	EC50	8,94236E16	5,5108E15			

Reduced Chi-sqr = 7,01456534971

COD(R<sup>2</sup>) = 0,9961055734451

### NG-3

pH=5

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
C	A1	97,58725	0,9141	106,75766	0	0,29922
	A2	2,30902	0,78022	2,95944	0,00878	0,42239
	x0	42,61813	0,05166	824,89588	0	0,41311
	dx	0,98418	0,04963	19,83152	3,43725E-13	0,37496
	span	95,27823	1,26168			
	EC50	3,22716E18	1,66731E17			

Reduced Chi-sqr = 3,96163077803

COD(R<sup>2</sup>) = 0,99789981208911

**NG-1**  
**pH=7**

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
A	A1	97,65949	1,25993	77,51197	3,10422E-10	0,2537
	A2	-6,73754	1,75596	-3,83695	0,00859	0,3173
	x0	35,69283	0,01362	2620,71546	0	0,32101
	dx	0,13456	0,01155	11,64564	2,41515E-5	0,23549
	span	104,39703	2,22991			
	EC50	3,17102E15	4,31877E13			

Reduced Chi-sqr = 6,79391553625  
COD(R^2) = 0,99795358815393

**NG-2**  
**pH=7**

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
B	A1	89,60254	1,11225	80,56007	0	0,58638
	A2	10,57069	1,0726	9,85516	3,3638E-8	0,60235
	x0	41,79045	0,1077	388,02989	0	0,59405
	dx	1,77171	0,10401	17,03416	1,11886E-11	0,54897

Iterations Performed = 7  
Total Iterations in Session = 7

**NG-3**  
**pH=7**

		Value	Standard Error	t-Value	Prob> t	Dependency
C	A1	80,11333	0,78015	102,68997	0	0,78157
	A2	3,76271	0,80363	4,68212	7,15689E-5	0,70294
	x0	48,90838	0,1636	298,95707	0	0,73215
	dx	4,11427	0,14277	28,8178	0	0,70553
	span	76,35062	1,27565			
	EC50	1,74036E21	2,84718E20			

Reduced Chi-sqr = 1,79630535657  
COD(R^2) = 0,99766097385565