



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA  
Ingeniería Química– Polímeros

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD DE TRANSPORTE DE  
OXÍGENO DE UNA CÉLULA ARTIFICIAL A PARTIR DE POLIMEROSOMAS**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN INGENIERÍA

PRESENTA:  
M en F Norma Angélica Noguez Méndez

TUTOR  
Dr. Ángel Enrique Chávez Castellanos- Facultad de Química

COMITÉ TUTOR  
Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez-Facultad de Química  
Dr. Rafael Herrera Najera,-Facultad de Química

MÉXICO, D. F. ENERO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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**

<b>Presidente</b>	Dra. Bernal Lugo Irma Ofelia
<b>Secretario</b>	Dra. Guadarrama Acosta Patricia
<b>1er Vocal</b>	Dr. Rivero Martínez Eligio Pastor
<b>2do. Vocal</b>	Dr. Pliego Díaz Máximo
<b>3er. Vocal</b>	Dr. Chávez Castellanos Ángel Enrique

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México

Laboratorio de Farmacia Molecular y de Liberación Controlada. Universidad Autónoma Metropolitana de Xochimilco

## **TUTOR DE TESIS**

Dr. Chávez Castellanos Ángel Enrique

---

DICIEMBRE 2014

## Contenido

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>12</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>12</b>
1.0 Transfusiones .....	12
1.1 Sangre artificial y los acarreadores de oxígeno (HBOC).....	13
1.1.1 Hemoglobina .....	18
1.1.2. Glóbulos rojos (GR).....	20
1.1.2.1 Índices eritrocíticos .....	20
1.1.3 Glóbulos rojos sintéticos (GR).....	21
1.2.1 Polimerosomas .....	26
1.2.2 Requisitos para la elaboración de polimerosomas .....	27
1.2.3. Elaboración de polimerosomas .....	28
1.2.4. Polimerosoma como sustituto sanguíneo .....	29
1.3 Copolímeros .....	30
1.3.1 Concentración micelar crítica (CMC).....	31
1.3.2 Tensión superficial .....	32
1.3.3 Viscosidad .....	33
1.4 Determinación de la temperatura de transición vítrea (Tg) del copolímero por calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	34
1.5 Síntesis del polimerosoma a partir de copolímeros hidrofílicos-hidrofobicos.....	34
1.6. Síntesis del polimerosoma a partir de los copolímeros de (PAA-PBA) mediante un dispositivo en T de vidrio.....	36
1.7. Difusión de oxígeno a través de la membrana polimérica .....	41
1.7.1 Cinética de absorción y desorción.....	42
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>52</b>
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	<b>52</b>
<b>2.0 Objetivo General</b> .....	<b>52</b>
2.1 Objetivos Específicos .....	52
2.2 Justificación.....	52
2.3 Hipótesis de trabajo .....	53
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>55</b>
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>55</b>

3.0 Reactivos y equipo .....	55
3.1 Síntesis del copolímero poliácido acrílico-poliacrilato de butilo (PAA-PBA) .....	55
3.1.1 Determinación del peso molecular por cromatografía en permeación en gel (GPC) .....	55
3.1.2 Determinación de la temperatura de transición vítrea (Tg) por calorimetría diferencial de barrido (DSC) .....	56
3.1.3 Determinación de la tensión superficial y de la concentración micelar crítica (CMC) de los copolímeros de PAA-PBA .....	57
3.1.4 Caracterización del copolímero de PAA-PBA por espectro de infrarrojo .....	57
3.2 Síntesis del polimerosoma mediante un dispositivo en T de vidrio .....	57
3.2.1 Cantidad de hemoglobina encapsulada por el polimerosoma .....	58
3.3. Determinación de la difusión de oxígeno a través de la membrana polimérica.....	59
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>61</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>61</b>
4.1 Determinación del peso molecular por cromatografía en permeación en gel (GPC) .....	61
4.1.1 Análisis estadístico de los pesos moleculares de los copolímeros de PAA-PBA obtenidos del diseño factorial $2^k$ .....	63
4.1.2 Determinación de la temperatura de transición vítrea (Tg) por calorimetría diferencial de barrido (DCS) .....	64
4.1.3 Caracterización del copolímero de PAA-PBA por espectroscopia de infrarrojo. ....	67
4.1.4 Determinación de la Concentración micelar crítica por medio de la Tensión Superficial de los copolímeros $Cp_1$ , $Cp_6$ y $Cp_{40}$ .....	68
4.2 Síntesis del polimerosoma a partir de los copolímeros de (PAA-PBA) mediante un dispositivo en T de vidrio.....	69
4.2.1 Distribución del tamaño de la vesícula formada (Polimerosoma) .....	70
4.2.2. Determinación de la cantidad de hemoglobina (Hb) encapsulada por el polimerosoma .....	72
4.2.3 Determinación de la difusión de oxígeno en el polimerosoma .....	76
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>80</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>80</b>
<b>CAPÍTULO VI .....</b>	<b>83</b>
<b>PERSPECTIVAS DEL TRABAJO .....</b>	<b>83</b>
<b>CAPÍTULO VII.....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>84</b>

<b>Índice</b>	<b>Página</b>
<b>TABLAS</b>	
<b>Tabla 1.</b> Unidades de sangre requerida por pacientes en diferentes situaciones	7
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los sustitutos sanguíneos de acuerdo con el desarrollo tecnológico	8
<b>Tabla 3.</b> Estrategias para el desarrollo de acarreadores de oxígeno	14
<b>Tabla 4.</b> Soluciones de hemoglobina modificada	15
<b>Tabla 5.</b> Células artificiales	16
<b>Tabla 6.</b> Productos desarrollados a base de hemoglobina (Hb) y la fase de investigación clínica en que se encuentra a diciembre 2013	17
<b>Tabla 7.</b> Conceptos y aplicaciones de las células artificiales poliméricas	22
<b>Tabla 8.</b> Los posibles mecanismos de (A) la fusión de vesículas y (B) la fisión de una vesícula	40
<b>Tabla 9.</b> Diseño factorial completo con la combinación de factores para la síntesis del copolímero PAA-PBA, obtenido mediante el paquete estadístico JMP 8 SAS	56
<b>Tabla 10.</b> Efecto de la prueba del perfil de predicción de la síntesis del copolímero PAA-PBA	64
<b>Tabla 11.</b> Composición porcentual del monómero del ácido acrílico (AA) y del acrilato de butilo (BA) obtenido mediante la ecuación de Gordon-Taylor en el copolímero con sus respectivos Tg y polidispersidad	66
<b>Tabla 12.</b> Concentración micelar crítica para los copolímeros de PAA-PBA (Cp1, Cp6, Cp40) con su respectiva proporción de monómero	69
<b>Tabla 13.</b> Número de capilaridad y número de Reynolds determinados para cada copolímero de PAA-PBA en el dispositivo en T	69
<b>Tabla 14.</b> Número de capilaridad y el diámetro promedio, área promedio y volumen promedio de las vesículas para cada copolímero de PAA-PBA	71
<b>Tabla 15.</b> Capacidad estimada de encapsulación en porciento para cada tamaño de vesículas de cada copolímero de PAA-PBA	72
<b>Tabla 16.</b> Características fisicoquímicas del copolímero de PAA-PBA (Cp1, Cp6 y Cp40)	78
<b>Tabla 17.</b> Comparación del eritrocito con los polimerosomas elaborados con los copolímeros de PAA-PBA (Cp1 y Cp40) seleccionados como posibles candidatos para glóbulos rojos sintéticos	79
<b>FIGURAS</b>	
<b>Fig. 1.0</b> Sustitutos de células rojas	15
<b>Fig. 1.1</b> Células artificiales en otros ámbitos	17
<b>Fig. 1.2</b> Modificación química de la hemoglobina	18
<b>Fig.1.3</b> Reacción de la hemoglobina con oxígeno	19
<b>Fig.1.4</b> Dimensiones del eritrocito o glóbulo rojo	21
<b>Fig. 1.5</b> Estructura típica de una vesícula lipídica y una vesícula polimérica	20
<b>Fig. 1.6</b> Esquema estructural de una capa anfipática de copolímero y la formación de la vesícula	28
<b>Fig. 1.7</b> Micrografías de diferentes tipos de vesículas	29
<b>Fig. 1.8</b> Determinación de CMC a partir de datos de tensión superficial	32

<b>Fig. 1.9</b> Anillo de Du-Noüy, método para medir la tensión superficial	33
<b>Fig. 1.10</b> Viscosímetro de Ostwal-Cannon-Fenske	33
<b>Fig.3.1</b> Dispositivo en T para la elaboración de los polimerosomas	57
<b>Fig. 3.2</b> Vesículas poliméricas	50
<b>Fig. 3.3</b> Polimerosomas cargadas con hemoglobina	58
<b>Fig. 3.4</b> Medidor de oxígeno disuelto Hanna (HI9146)	59
<b>Fig. 4.1</b> Linealidad del método analítico por GPC para la determinación de los Mw de los copolímeros de PAA-PBA	62
<b>Fig. 4.2</b> Cromatograma por GPC del copolímero de PAA-PBA	62
<b>Fig. 4.3</b> Distribución de los pesos moleculares de los copolímeros de PAA-PBA por el diseño factorial $2^k$ , determinados por el paquete estadístico JMP 8	63
<b>Fig. 4.4</b> Efectos de las variables del proceso sobre el peso molecular de los copolímeros de PAA-PBA	63
<b>Fig. 4.5</b> Perfil de predicción de las variables involucradas en la síntesis del copolímero PAA-PBA	64
<b>Fig. 4.6</b> Relación entre el Tg del copolímero PAA-PBA en función de la composición del monómero AA	65
<b>Fig. 4.7</b> Termograma del copolímero PAA-PBA	65
<b>Fig. 4.8</b> Infrarrojo comparativo del copolímero PAA-PBA con sus respectivos homopolímeros	67
<b>Fig. 4.9</b> Determinación de la CMC del copolímero PAA-PBA por medio de la tensión superficial	68
<b>Fig. 4.10</b> Imagen del Cp1 observada en el microscopio con el objetivo 100x con filtro amarillo y en la fotografía en gris con el procesador de imagen del paquete ScopePhoto 3.0	71
<b>Fig. 4.11</b> Linealidad del método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de la hemoglobina	72
<b>Fig. 4.12.</b> Vesículas formadas con el copolímero PAA-PBA (Cp1)	73
<b>Fig. 4.13</b> Se muestra la formación de un acantocito con el copolímero Cp1 (A) comparado con la misma formación que se presenta en el eritrocito (C)	74
<b>Fig. 4.14</b> Vesícula formada por el copolímero PAA-PBA (Cp6)	75
<b>Fig. 4.15</b> Vesículas del copolímero PAA-PBA (Cp40)	75
<b>Fig. 4.16</b> Comportamiento de la captación de oxígeno por parte de cada uno de los copolímeros PAA-PBA (Cp1, Cp6, Cp40)	76
<b>Fig. 4.17</b> Gráfica de $M_t / M_\infty$ vs la raíz cuadrada del tiempo para los copolímeros Cp1 y Cp40	77

## GLOSARIO

**CHCM:** concentración hemoglobínica corpuscular media

**CMC:** concentración micelar crítica

**DPG:** 2,3 difosfoglicerato

**Glóbulo rojo (GR):** los eritrocitos también llamados glóbulos rojos o hematíes, son los elementos formes más numerosos de la sangre.

**Hb:** hemoglobina

**HBOC:** Hemoglobin based oxygen carriers de sus siglas en inglés

**HCM:** hemoglobina corpuscular media

**Hetaalmidón:** expansor de volumen plasmático prescrito como coadyuvante en el shock y en la leucoféresis.

**Mn:** peso molecular promedio en número

**Mw:** peso molecular promedio en peso

**Perfluorocarbonos (PFC):** son líquidos sintéticos que disuelven grandes volúmenes de oxígeno y también tienen la capacidad de transportar CO<sub>2</sub>

**Reacciones madix:** significa diseño macromolecular a través de intercambio de xantano y pertenece a las nuevas técnicas de polimerización controladas por radicales como una necesidad de llevar a cabo el diseño y síntesis más controlados de los materiales poliméricos.

**Seroalbúmina o albúmina sérica:** es una de las proteínas más importante del plasma de la sangre. Las concentraciones bajas de esta sustancia se presentan en las personas que padecen de malnutrición, inflamación y enfermedades graves del hígado y el riñón.

**Shock hipovolémico:** estado de colapso físico y postración causado por la pérdida masiva de sangre, disfunción circulatoria y perfusión tisular inadecuada. Los signos habituales son hipotensión arterial, pulso débil, piel fría.

**VCM:** volumen corpuscular medio

## INTRODUCCIÓN

A pesar de las diferencias entre los antígenos eritrocitarios reflejadas en los sistemas de grupos sanguíneos, la sangre es el tejido humano que se comparte más fácilmente, tal es el caso de las transfusiones, que salvan miles de vidas anuales. Una transfusión es la transferencia de sangre entera o sus componentes (sólo eritrocitos o plasma) en el torrente sanguíneo. Si bien los componentes normales de las membranas plasmáticas eritrocitarias del donador pueden causar respuesta antígeno-anticuerpo nocivas en el receptor y aunado a ello se tiene como problema su limitada disponibilidad y vida corta de almacenamiento (estimada en 15 días en refrigeración, la cual puede ser extendida a 42 días empleando los agentes anticoagulantes), así como la posibilidad de transmisión de enfermedades infecciosas y posibles incompatibilidades, la demanda de este fluido en caso de cirugías de rutina y traumatológicas, desastres naturales, problemas sociales y guerras, lo hace un fluido biológico de alta importancia.

La transfusión de sangre es una necesidad, especialmente en los casos de emergencia (*tabla 1*) en los que se presenta choque hipovolémico, consistente en la pérdida mayor a un 20% del volumen normal de sangre o en traumas penetrantes que conlleva a la pérdida aguda de sangre externa secundaria.

*Tabla 1. Unidades de sangre requerida por pacientes en diferentes situaciones.*

Situaciones que involucran el empleo de sangre	Unidades requeridas por pacientes
Accidente automovilístico	50 unidades de sangre
Cirugía de corazón	6 unidades de sangre 6 unidades de plaquetas
Trasplante de órganos	40 unidades de sangre 30 unidades de plaquetas 25 unidades de plasma fresco o congelado
Trasplante de médula ósea	120 unidades de plaqueta 20 unidades de sangre

Fuente: <http://www.google.com/patents/EP2560625A2>, 14/01/2014; 21:37

El tratamiento médico inicial para el choque hipovolémico tiene como finalidad: maximizar el suministro de oxígeno, restaurar el flujo sanguíneo y la restitución de líquidos. Sin embargo, la escasa disponibilidad o la no existencia de volúmenes suficientes de sangre para atender la demanda de este fluido fisiológico ha llevado a países como Estados Unidos de Norteamérica, Japón, China y en algunas regiones

Europa, al desarrollo de “*sustitutos de sangre u oxígeno terapéutico*” con distinto nivel de proceso tecnológico, ver *tabla 2.0*

**Tabla 2.** *Clasificación de los sustitutos sanguíneos de acuerdo con el desarrollo tecnológico*

<b>SUSTITUTOS SANGUÍNEOS</b>	ACARREADORES DE OXÍGENO
	OXÍGENO TERAPÉUTICO
	SUSTITUTOS DE GLÓBULOS ROJOS

Aunque el desarrollo de esos tres tipos de sustitutos de sangre ha sido un activo campo de interés durante dos o tres decenios, estos sistemas no son todavía adecuados para reemplazar a la sangre debida, entre otros factores, a su limitado tiempo de retención en la circulación, a la producción de un efecto constrictor no deseado y a la incertidumbre sobre la efectividad del transporte de oxígeno.

Si bien, una célula completamente artificial equiparable al glóbulo rojo (GR) es todavía un sueño, el desarrollo de membranas lipídicas, poliméricas biodegradables y nanopartículas, son un paso hacia esa posibilidad.

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo es el “Desarrollo de una célula artificial, a partir de polimerosomas, que contenga como base hemoglobina (Hb) y que cumpla con las propiedades de transporte de oxígeno equiparable al eritrocito (GR)”

Para lograr esto se proponen los siguientes objetivos específicos:

- A. Sintetizar el copolímero de poli (ácido acrílico)-poli (acrilato de butilo) que funcionara como membrana sintética para el desarrollo del polimerosoma.
- B. Caracterizar los copolímeros de PAA-PBA mediante las técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopia infrarroja (IR) y cromatografía de permeación en gel (GPC)
- C. Seleccionar los copolímeros de PAA-PBA que permitan la síntesis del polimerosoma.
- D. Síntesis de los polimerosomas con carga de hemoglobina (Hb)

- E. Caracterización del polimerosoma-Hb mediante la determinación del porcentaje de encapsulación de hemoglobina, distribución del tamaño de la vesícula y formación de la bicapa polimérica mediante la microscopía de luz.
- F. Determinar la permeabilidad del oxígeno a través de la membrana polimérica del polimerosoma
- G. Comparar las características físicas del eritrocito con el polimerosoma-Hb
- H. Determinar las propiedades reológicas del polimerosoma mediante la elaboración de una suspensión de estos en una solución de poliacrilamida.

De los siete objetivos específicos planteados se lograron cubrir los incisos del A-G, quedando pendiente el inciso (H) el cual se desarrollará en una investigación futura, así como una mejor determinación del intercambio de oxígeno por parte del polimerosoma in vitro para posteriormente probarlo in vivo.

Para la exposición de este trabajo se desglosa a continuación su contenido: Capítulo I “*Antecedentes*” que refleja la necesidad del desarrollo de sustitutos sanguíneos artificiales para coadyuvar al sistema de salud, en la resolución de los problemas relacionados con la medicina transfusional y la línea del tiempo que describe los diferentes desarrollos de sustitutos sanguíneos que hay hasta nuestros días y una descripción de lo que son los polimerosomas. Capítulo II “*Objetivo e Hipótesis*” se definen los alcances del trabajo. Capítulo III, “*Parte Experimental*” se describe la síntesis al azar del copolímero de poliácido acrílico - poliacrilato de butilo (PAA-PBA) y su caracterización, asimismo se detalla el desarrollo de la vesícula polimérica, con capacidad de encapsular hemoglobina para desarrollar experimentalmente un prototipo de célula artificial tipo eritrocito y su evaluación para captar oxígeno. Capítulo IV “*Resultados y Discusión*” se hace énfasis sobre la selección de las vesículas poliméricas (polimerosomas) que pueden ser candidatas para el transporte de oxígeno. Capítulo V “*Conclusiones*” se da respuesta a los objetivos del trabajo y la hipótesis. Por último, en el Capítulo VI “*Perspectivas del trabajo*”, se proponen puntos que hay que realizar en etapas posteriores de la presente investigación y Capítulo VII “*Anexos*” se presenta el artículo publicado y los diplomas obtenidos de la presentación del trabajo en sus diferentes etapas en eventos científicos especializados.

## RESUMEN

Los polimerosomas son vesículas sintéticas que imitan el comportamiento de las membranas biológicas. El propósito de este trabajo es desarrollar una membrana sintética para la elaboración de un polimerosoma; para esto, se realizó la síntesis al azar de un copolímero de poliácido acrílico - poliacrilato de butilo (PAA-PBA), mediante el diseño factorial  $2^k$ , con características anfifílicas y con capacidad para encapsular hemoglobina. Se seleccionaron tres copolímeros para el desarrollo de los polimerosomas con un peso molecular (PM) que se encontrara en el intervalo de 2000-5000 g/mol. La contribución de la parte hidrofílica fue del 20 al 40% y de la parte hidrofóbica del 60 al 80%. La síntesis del polimerosoma se realizó en un dispositivo en forma de T de vidrio, las vesículas obtenidas se observaron bajo el microscopio óptico, se tomaron fotografías y se procesaron las imágenes con el paquete ScopePhoto 3.0; se determinó el tamaño quedando en el intervalo de 27 a 29  $\mu\text{m}$ . En relación a la encapsulación de la hemoglobina (Hb) ésta fue del 56 al 60%. El coeficientes de difusión para cada uno de los copolímeros de PAA-PBA fueron:  $\text{DCp1} = 7.92 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$  y para el  $\text{DCp40} = 4.24 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ . De acuerdo a los datos obtenidos experimentalmente para los copolímeros de PAA-PBA de Cp1 y Cp40, en comparación con el eritrocito, tienen una cierta aproximación a las características fisiológicas de éste, en relación a la formación de la membrana anfifílica y la difusión de oxígeno, posiblemente se logre equiparar a un glóbulo rojo

Palabras claves: *Polimerosoma, copolímero de PAA-PBA, AA ácido acrílico, BA acrilato de butilo*

## ABSTRACT

Polymersomes are synthetic vesicles that imitate biological membrane functions. The purpose of this work is to develop an artificial copolymer (acrylic acid-butyl acrylate) PAA-PBA membrane by random synthesis. A factorial design  $2^k$  was applied to determine the conditions for this reaction. The Fourier transform infrared spectrometer indicated that the polymerization reaction was complete without a  $-C=C-$  absorption peak. The Gordon-Taylor equation showed that the hydrophilic part of the PAA-PBA composition is 20 to 40% and the hydrophobic part 60 to 80%. The authors selected the copolymers with low molecular weight, within the range of 2000 - 5000 g / mol. The polymersome synthesis was development on a device in T glass form. The vesicles were observed under the microscope and their size was determined in the range of 27 to 29  $\mu\text{m}$ . In the case of hemoglobin (Hb) encapsulation, it was in the range of 56 to 60%. The diffusion coefficients for PAA-PBA copolymers were:  $DC_{p1} = 7.92 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$  for  $DC_{p40} = 4.24 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ .

Keywords: Artificial membrane, Gordon-Taylor equation, PAA-PBA copolymer, polymersomes,  $2^k$  factorial design

# CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

### 1.0 Transfusiones

La donación de sangre en México se realiza fundamentalmente por reposición familiar, aproximadamente el 98 por ciento de la sangre recolectada en México se obtiene de donantes emparentados. La medicina transfusional se volvió un recurso habitual proporcionando apoyo a numerosas ramas de la medicina clínica y quirúrgica, llegando alcanzar hoy en día una mayor demanda que supera con mucho a la oferta, pero frecuentemente acompañada de una valoración insuficiente de los beneficios y riesgos (Tena & Sánchez, 2005). La decisión de transfundir al paciente es para promover la hemostasia o mejorar la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre (Serrano, X.V. 2006). Actualmente, existe la iniciativa de cambiar esta manera de captar la sangre necesaria a partir de lo cual se intenta promover la donación voluntaria de sangre. Al igual que en la mayor parte de los países del mundo, la donación de sangre en México está regulada y se ciñe a una serie de lineamientos contenidos en la Norma Oficial Mexicana NOM 003-SSA2-1993 “Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos”, establece que el médico es el responsable de indicar una transfusión sanguínea, lo que vuelve imperativo que el profesional de la salud amplíe sus conocimientos sobre las indicaciones específicas, riesgos, beneficios y alternativas. Aún no se puede garantizar un riesgo cero de consecuencias nocivas para el paciente receptor de una transfusión, pues se adolece de deficiencias de magnitud diversa en varios de los siguientes rubros: **a)** indicación clínica inadecuada, **b)** manejo descuidado durante la metodología de aplicación, **c)** la existencia de una reserva suficiente para cubrir las necesidades de la población nacional, **d)** la obligación del tamizaje universal para la detección de los patógenos que pueden transmitirse por la transfusión sanguínea.

Los principales microorganismos que se pueden transmitir por sangre, identificados actualmente son: bacterias (*Treponema pallidum*), virus (hepatitis B, C (HVB y HVC) y de la inmunodeficiencia humana (VIH), parásitos (*Plasmodium vivax*, *Malariae* y *Falciparum*, *Trypanosoma cruzi*, *Babesia microti*) (Rodríguez, 2011; Serrano y col. 2009; Rojo, 2009).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda establecer una entidad que coordine un programa nacional de sangre con objeto de asegurar el aprovisionamiento adecuado y oportuno de productos sanguíneos, haciendo énfasis en la necesidad de contar con un programa eficaz de aseguramiento de la calidad. En este sentido, el Programa de Acciones Específicas 2007-2012 del Centro Nacional de la Transfusión Sanguínea reconoce que la realidad en México es que la legislación vigente no es congruente con las necesidades para que la operación de los servicios de sangre se realice bajo las condiciones que garanticen una producción de calidad, suficientemente segura y de acceso universal para la población (*Heddle, et al. 2012; Sánchez-Guerrero, 2010; Rojo, 2010*).

Presentar un estimado de las unidades de sangre que se requieren en una población y en un país como el nuestro es un trabajo difícil, pero se sabe que una cuarta parte de los decesos de mujeres embarazadas está asociado con la pérdida de sangre (*Klein, 2002*). En principio, el empleo de un sustituto sanguíneo podría resolver los problemas relacionados con la transfusión sanguínea. En las personas que rechazan la transfusión de sangre como los testigos de Jehová (*Casas-Martínez, 2010*) o los que no pueden recibir una transfusión por motivos clínicos (por ejemplo, pacientes con enfermedad hemolítica autoinmune), un sustituto eficaz de la sangre podría salvar sus vidas.

A partir de 1970 el desarrollo de sustitutos sanguíneos se estancó debido a la falta de interés por parte de los grupos de investigación militar en EU, esto debido al término de las grandes guerras, donde la estrategia era reclutar donadores voluntarios que satisficieran la demanda de sangre en caso de una confrontación directa (*Brig et al. 2003*).

En 1980 el progreso en este ámbito se aceleró con la aparición del SIDA y con la constatación de que la infección es transmitida a través de la sangre (*Lowe, 2006; Shander and Goodnough, 2009*)

### **1.1 Sangre artificial y los acarreadores de oxígeno (HBOC)**

El tratamiento tras una hemorragia masiva incluye la administración intravenosa de sangre total, eritrocitos en paquete o productos de la sangre y para la restitución de líquidos, es la administración de soluciones coloidales como seroalbúmina, el hetaalmidón y fracción de proteínas plasmáticas. También se usan soluciones como la de Ringer con lactato y solución salina al 0.9% (*Gaucher, et al. 2006*).

Estas terapias alternativas, pueden sustituir la transfusión en casos clínicos en los que la sangre no está disponible en el banco de sangre o es insuficiente. Las ventajas que presentan los substitutos de sangre artificial ante las transfusiones donde participan donadores son: **a)** la sangre artificial puede ser diseñada sin poseer ningún grupo antigénico en su superficie, **b)** puede garantizarse su esterilidad, eliminando la posibilidad de la transmisión de una infección y evitando las pruebas cruzadas de los grupos sanguíneos, **c)** facilidad de almacenamiento prolongado.

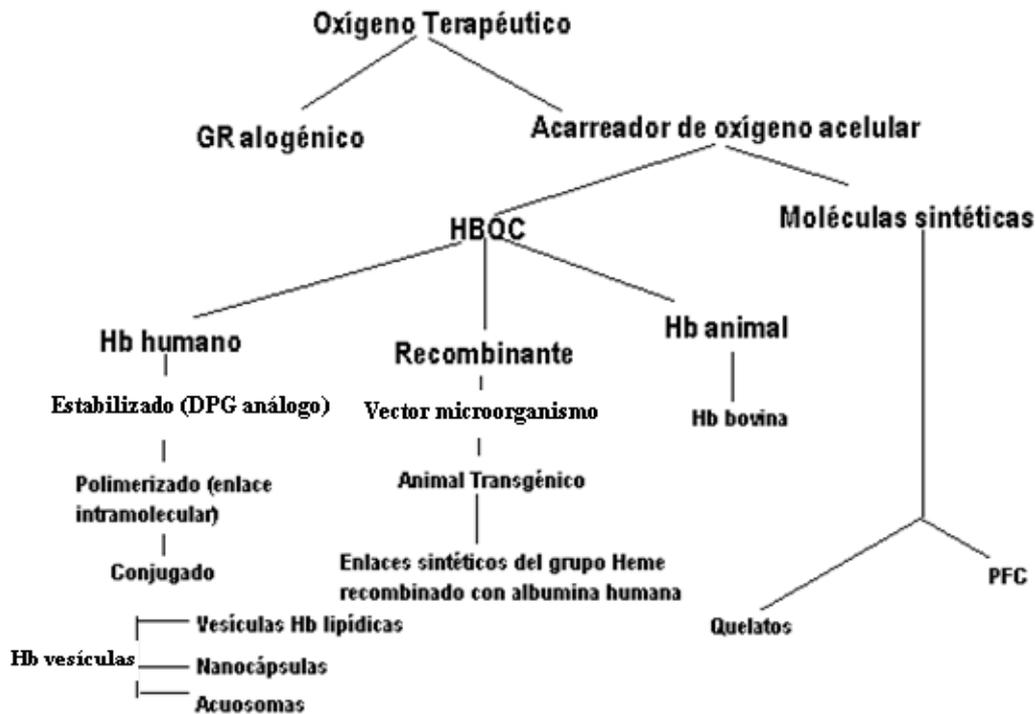
Para el desarrollo de substitutos de sangre artificial se toma en consideración la función principal de la sangre que es el transporte de oxígeno a los tejidos por medio del eritrocito (*Chang, 2006; Chang, 2009*). Se han sugerido dos estrategias para el desarrollo de acarreadores de oxígeno (HBOC), el enfoque biomimético y el enfoque abiótico (*tabla 3.0*)

**Tabla 3.0** Estrategias para el desarrollo de acarreadores de oxígeno

<b>Enfoque</b>	<b>Investigación</b>	<b>Bases</b>	<b>Tipo</b>
Biomiméticos	Imitación de la forma de suministrar oxígeno a los tejidos del cuerpo	Productos químicamente modificados de la Hb	Sustituto a base de Hb
Abióticos	Uso de productos químicos sintéticos para suministrar oxígeno a los tejidos	Producir emulsiones inyectables como PFC	Perfluorocarbono

El primer enfoque imita la naturaleza en la forma de transportar el oxígeno a los tejidos, mientras que el segundo enfoque utiliza productos químicos sintéticos para lograr el mismo resultado como se muestra *fig. 1.0* (*Kjellstrom, 2003; Smith et al. 2004; Ness and Cushing, 2007*).

Los efectos colaterales de las soluciones de hemoglobina (Hb) son: vaso actividad, nefrotoxicidad, interferencia con el sistema fagocitario mononuclear, oxidación durante su almacenamiento, antigenicidad, pobre acarreo de oxígeno, liberación de histamina y depósitos de hierro. Debido a esto, no es posible administrar a la hemoglobina en su forma nativa de ahí que sea necesario modificarla, ver *tabla 4*. El origen de las células artificiales está relacionado con los acarreadores de oxígeno en la forma de polihemoglobinas y hemoglobinas conjugadas (*Radillo-González y cols. 2004*)



**FIGURA 1.0** *Sustitutos de células rojas*

Fuente: Imagen tomada de Ness, PM., Cushing (2007). Oxygen therapeutics. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 131: 174-41

**Tabla 4.** *Soluciones de hemoglobina modificada*

1. Hemoglobina bovina polimerizada
2. Hemoglobina humana recombinante
3. Hemoglobina transgénica
4. Hemoglobina microencapsulada
5. Soluciones perfluoroquímicas

Los sustitutos sanguíneos consisten en entidades cada vez más complejas, por ejemplo, acarreadores de oxígeno, acarreadores de oxígeno con antioxidantes y sustitutos de glóbulos rojos, ver *tabla 5*, (Napolitano, 2009; Eastman and Minei, 2009; Alayash, 2004; Radillo- González, 2004; Brig et al, 2003; Lowe et al, 2003) .

**Tabla 5. Células Artificiales**

Acarreadores de oxígeno artificial(PEGylation)	Ness, P.M. et al 2007	Conjugados de albúmina-Heme	Eastman, A y Minel JP, 2009
Hemoglobina/Heme	Cheng, D.C. et al., 2004	Hb transgénico/recombinante	Dieryck, W et al., 1997
Hb polimerizado (glutaraldehído)	Kaneda, S. et al., 2009	Hbs anélidos (lombriz de tierra)	Hao Zhu et al., 1996
Hb conjugada (PEG)	Winslow, R.M. 2003	Perfluorocarbonos (PFC)	Lowe, K.C., 2002
Vesículas de Hb	Sakai, H. et al., 2006	Polimerosomas	Tanner, P. et al., 2011 y Ruth, D. et al., 2005
HBOCs (Ácido poliláctico-catalasa)	D'Agnillo, F. y Chang, T.M.S., 1998		

La primera célula artificial fue diseñada en 1957 en forma de célula roja y el uso clínico de células artificiales ha sido variado: como adsorbente para hemoperfusión, en forma rutinaria en proceso de intoxicación accidental o suicidas, cuando la diálisis no está disponible (*tabla 6*). Otras áreas de aplicación son en las que las células contienen enzimas para tratamientos enzimáticos, islotes para el tratamiento de diabetes, hepatocitos para la insuficiencia hepática, sistemas de suministro de medicamentos y hormonas (*Chang, 2006; Chang, 2004; Riess, 2001; Chang, 1999*). En las últimas décadas el interés por la biotecnología, la biología molecular, la nanotecnología y la medicina regeneradora ha estimulado aún más el desarrollo de las células artificiales en otros ámbitos (*Discher and Ahmed, 2006; Meng, et al 2005; Teramura, et al. 2003; Arifin and Palmer, 2003; Arifin, 2005*). Los tamaños de las células artificiales ahora oscilan entre las macrodimensiones, microdimensiones, dimensiones nanométricas y las dimensiones moleculares, ver *fig. 1.1. (Chang, 2005)*.

Las que están en tamaño macro son adecuadas para la bioencapsulación de células, microorganismos y bio-reactantes; aquellas en dimensiones de micra son adecuadas para la encapsulación de enzimas, péptidos, vacunas, fármacos y otros materiales. Las células artificiales que están en las nanodimensiones se han empleado para sustitutos de sangre y vehículos para enzimas, pépticos y fármacos, entre otras aplicaciones. Las células de dimensiones moleculares se utilizan como sustitutos de sangre y enzimas reticuladas (*Ming, 2004; Sharma, et al. 2011; Napolitano, 2009*). La modificación química de la hemoglobina (*fig. 1.2*), mantiene la estabilidad en el torrente sanguíneo y también permite la entrega de oxígeno a los tejidos.

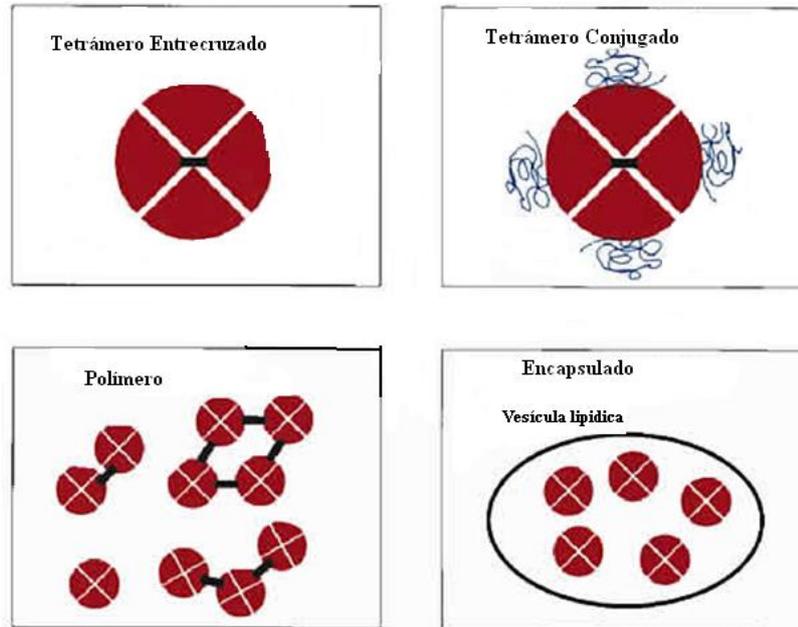
**Tabla 6.** Productos desarrollados a base de hemoglobina (Hb) y fase de investigación clínica en que se encuentran a diciembre de 2013

PRODUCTO	DERIVADO	FASE DE INVESTIGACIÓN	INDICACIÓN
Polyheme (Northfield Labs)	Hb humana	III	Trauma/cirugía
Hemopure (Biopure)	Hb bovina	III	Cirugía/hemodilución
Hemolink (Hemosol)	Hb humana	III	Cirugía/hemodilución
Sangart	Hb humana pegilada	I	Cirugía/hemodilución
HemAssist (Baxter)	Hb humana	Terminado	Shock hemorrágico
Optro (Somatogen)	Hb recombinante	Terminado	Cirugía/hemodilución
Oxygen (Alliance)	Perfluobron	III	Cirugía/hemodilución

Fuente: <http://www.cancernetwork.com/review-article/blood-substitutes-how-close-solution/page/0/2>, 15/01/2014, 12:45 pm



**FIGURA 1.1** Células artificiales en otros ámbitos

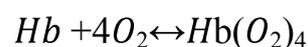


**FIGURA 1.2** *Modificación química de la hemoglobina*

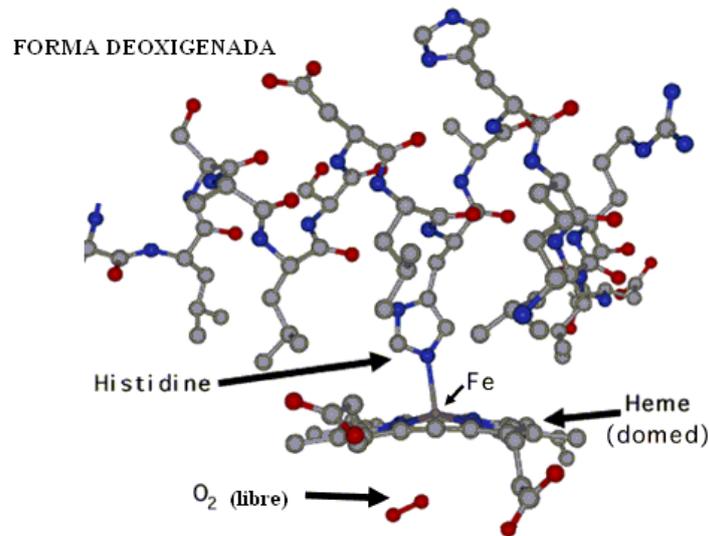
### 1.1.1 Hemoglobina

La hemoglobina es una heteroproteína de la sangre, de masa molecular 64 000 g/mol (64 kDa), de color rojo característico que transporta el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, el dióxido de carbono desde los tejidos hasta los pulmones que lo eliminan y también participa en la regulación del pH de la sangre.

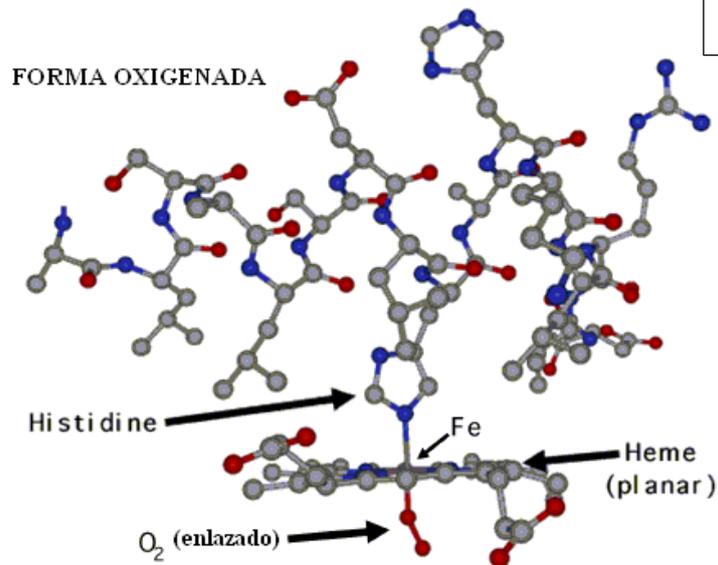
La hemoglobina es una proteína de estructura cuaternaria, que consta de cuatro subunidades, su función principal es el transporte de oxígeno; contiene una porción proteínica, llamada globulina, y otra de un pigmento que contiene hierro, el hem. Una molécula de hemoglobina posee cuatro grupos hem, cada uno de los cuales se combina con una molécula de oxígeno ( $O_2$ ), ver *fig. 1.3*. El oxígeno y la hemoglobina se combinan en una reacción fácilmente reversible y forma la oxihemoglobina (*Totora and Grobowski, 2000*).



desoxihemoglobin



oxihemoglobina



**FIGURA 1.3** *Reacción de la hemoglobina con oxígeno*

En el ámbito de la tecnología el desarrollo de sustitutos sanguíneos en el mundo científico sigue avanzando en la búsqueda de una alternativa eficaz para los procedimientos de transfusión, que son tan a menudo necesarios para salvar vidas. Dos son las perspectivas atractivas: **a)** la extracción de la hemoglobina de sangre de gusano y **b)** el desarrollo de glóbulos rojos sintéticos.

### **1.1.2. Glóbulos rojos (GR)**

El eritrocito, hematíe o glóbulo rojo es la célula sanguínea que se especializa en el transporte de oxígeno y dióxido de carbono para su eliminación. Son los elementos formes cuantitativamente más numerosos de la sangre. Contienen en su interior una proteína compleja, en cuya molécula está presente el hierro, que confiere a la sangre su color rojo característico y que se llama hemoglobina (Hb)

Antes de salir a la circulación sanguínea, el eritrocito expulsa su núcleo y al madurar, todas sus organelas citoplasmáticas degeneran. Lo cual significa que solo contienen una membrana plasmática formada por una bicapa lipídica y una red de proteínas que forman un citoesqueleto anclado a la membrana.

La función de este armazón proteínico determina la forma del glóbulo rojo, sino que permite su necesaria deformación al pasar por capilares muy estrechos, en los que el eritrocito adopta conformaciones elipsoidales y otras variedades. Los esfingolípidos presentes en la membrana constituyen los antígenos para los grupos sanguíneos del sistema ABO. El citoplasma tiene afinidad por los colorantes ácidos (eosina) con los que adquiere un tono rosado debido a la presencia de hemoglobina.

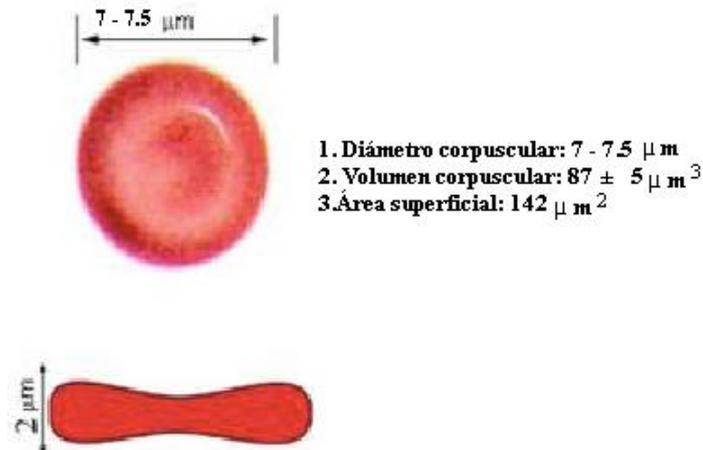
#### **1.1.2.1 Índices eritrocíticos**

Las concentraciones de eritrocitos, de hemoglobina y el valor hematocrito pueden ser usados para el cálculo de ciertos índices que definen el tamaño y el contenido de hemoglobina del eritrocito. Los principales índices eritrocíticos son: 1) volumen corpuscular medio (VCM), 2) hemoglobina corpuscular media (HCM) y 3) concentración hemoglobínica corpuscular media (CHCM).

Los eritrocitos normales presentan un VCM de  $87 \pm 5 \mu\text{m}^3$  (*normocitos*). Son microcitos aquellos eritrocitos cuyo VCM es inferior  $82 \mu\text{m}^3$  y macrocitos los que poseen un VCM superior a  $92 \mu\text{m}^3$ . El VCM representa solamente la medida del volumen medio de los eritrocitos.

La HCM constituye una expresión, en unidades absolutas, del peso medio de la hemoglobina contenida en un eritrocito. Los eritrocitos normales contienen  $29 \pm 2$  picogramos (pg) de hemoglobina. Mientras que la HCM representa el peso medio de la hemoglobina en cada eritrocito, la CHCM expresa la concentración media de la hemoglobina en cada célula. El resultado se expresa en porcentaje. Los eritrocitos

adultos normales contienen  $34 \pm 2$  % de hemoglobina (Totoro, J.G., Grobowski, R.S., 2000). En la *fig. 1.4* se muestran las dimensiones del eritrocito.



**FIGURA 1.4** Dimensiones del eritrocito o glóbulo rojo (GR)

### 1.1.3 Glóbulos rojos sintéticos (GR)

El desarrollo de glóbulos rojos sintéticos implica la encapsulación de la Hb dentro de la membrana de un polímero biodegradable. Esto estabiliza la Hb e impide su distribución en el torrente sanguíneo, lo que puede causar problemas renales.

En la *tabla 7* se muestra en línea de tiempo la evolución en el desarrollo de las células artificiales y sus aplicaciones. Los datos desde 1957 a 2006, corresponden a lo publicado por Chang (2007) y del 2007 al 2014, pertenece a la investigación que se realizó para conocer el estado del arte hasta, nuestros días.

En el ámbito de la tecnología, el desarrollo de sustitutos sanguíneos en el mundo científico sigue avanzando en la búsqueda de una alternativa eficaz para los procedimientos de transfusión (generación de glóbulos rojos artificiales), y para tratamiento de enfermedades antineoplásicas con la finalidad de buscar la mejora en la calidad de vida de la población.

**Tabla 7. Conceptos y aplicaciones de las células artificiales poliméricas**

<b>Año</b>	<b>Desarrollo</b>
1957 Chang	Primera célula artificial polimérica conteniendo hemoglobina y enzimas (método de extrusión)
1964 Chang (Science)	Célula artificial polimérica conteniendo enzimas y hemoglobinas (coacervación interfacial, polímero conjugado con proteína)
1964, 1965 Chang 1964, 1965 Chang 1966: Chang et. al	Nanobiotecnología; entrecruzamiento de proteína (PolyHb) y Conjugado de Hb Método de extrusión por gota para encapsular células intactas para terapia celular
1965 Bangham et al.	Microesferas de cristal líquido (liposoma) como modelo de membrana
1965, 1972 a 1973b Chang	Tamiz molecular por cromatografía para la separación de células artificiales
1965 Chang 1966 Chang <i>et al.</i> 1966 Chang	Células artificiales con multicomponentes intracelulares. Microesferas con proteína
1966 Chang	Células artificiales con materiales magnéticos y material biológico
1966, 1969a Chang	Célula artificial con membrana ultrafina conteniendo adsorbentes para hemoperfusión
1966 Clark & Gollan	Fluorocarbono como acarreador de oxígeno
1967 Chang <i>et al.</i>	Célula Artificial con membrana de complejo polisacárido para biocompatibilidad
1968 Chang & Poznansky (Nature)	Implante enzimático que contiene células artificiales para el empleo en terapia enzimática.(deficiencia congénita de catalasa en ratones acatalacémicos)
1968 Bunn & Jandl	Entrecruzamiento de moléculas de hemoglobina
1968 Geyer <i>et al.</i>	Efectividad del fluorocarbono en transfusión estudio animal
1969d Chang 1972a Chang	Célula artificial con membrana lípido-polímero o lípido entrecruzado con polímero con un transportador cíclico
1970 – 1975 Chang <i>et. al</i>	Primer uso clínico de células artificiales en pacientes para hemoperfusión.
1971a Chang (Nature)	Célula artificial con implante enzimático para el tratamiento de linfosarcoma en ratón Reticulado de hemoglobina con glutaraldehído (polihemoglobina)
1971b Chang	Nanobiotecnología: entrecruzamiento de hemoglobina con glutaraldehído en PolyHb. Substituto sanguíneo en pacientes
1972a Chang	Primera monografía de Célula artificial
1972b Chang (Lancet)	Hemoperfusión de células artificiales en paciente con Grado IV de coma hepático, recobra la consciencia

1973 Gregoriadis	Primer uso de liposomas para encapsular enzimas y fármacos. Empleo de liberación controlada
1975h Chang	Discusión del empleo de células artificiales en vacunas
1976 Tam, Blumenstein & Wong	Solución de Dextran con hemoglobina conjugada
1976 Bonhard <i>et al.</i>	Desarrollo de glutaraldehído entrecruzado Poly Hb y su empleo como sustituto sanguíneo
1977-1985 Chang whit Campbell, Cousineau, Ilan, Grunwald, Wahl, Yu etc.	Células artificiales con sistema de multienzimas con co-factor de reciclamiento por reacciones enzimáticas de varios pasos
1978 Naito & Yokoyama	Desarrollo de perfluorodecalin como sustituto sanguíneo
1980 Lim & Sun (Science)	Alginato-polilicina-alginato encapsulado en una célula artificial
1980 Rosenthal & Chang	Célula artificial con membrana de complejo lípido-polímero con Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , ATPase
1980 Djordjevich & Miller	Membrana lipídica encapsulando Hb
1985 Mitsuno, Ohyanagi	Tratamiento clínico de perfluorodecalin como sustituto sanguíneo
1986 Yuan & Chang	Célula artificial con microsomas y citosol
1986 Bourget & Chang	Presentación oral de célula artificial con enzimas para modificación del metabolismo (Phenyketonuria en rata)
1986 Sipehia, Bannard & Chang	Célula artificial con membrana que excluye a pequeñas moléculas hidrofílicas pero permea a moléculas grandes lipofílicas
1989 Chang, Bourget & Lister	Célula artificial para la remoción selectiva de aminoácidos no deseados en el organismo
1988 Grupo Tsuchida 2002 Tsuchida <i>et al.</i>	Desarrollo y prueba in vivo de un complejo sintético –hem en liposoma y albúmina recombinante como sustituto sanguíneo
1989a Chang 1989 Palmour <i>et al.</i>	Uso clínico de una forma farmacéutica oral de célula artificial con enzima en pacientes con la enfermedad Lesch-Nyhan
1988 Moss <i>et al.</i>	Tratamiento clínico con glutaraldehído entrecruzado Poly Hb
1990 Hoffman	Hemoglobina humana recombinada
1994 Yu & Chang	Membrana nanoartificial polimérica biodegradable de glóbulo rojo
1994 Soon-Shiong <i>et al.</i>	Trasplante de islotes encapsulados en una célula artificial en pacientes con diabetes tipo 1. Reportado como insulino dependiente
1996 Prakash & Chang (Nature Med.)	Célula artificial oral con células genéticamente modificadas en modelo de rata urémica.
1996 Aebischer, Lysaght <i>et al.</i> (Nature Med)	Fibra de polímero poroso para la encapsulación de células modificadas genéticamente para pacientes con esclerosis

1998 D'Agnillo & Chang (Nature Biotech)	Nanobiotecnología para hemoglobina entrecruzada, catalasa y superóxido dismutasa para la formación de PolyHb-CAT-SOD soluble
1998 Tsuchida	Vesícula lipídica con Hb desarrollo y prueba en animales
1999 Philips <i>et al.</i>	Membrana lipídica-PEG con Hb, incremento del tiempo de recirculación
2000 Liu & Chang	Co-encapsulación de hepatocitos y células madre adulta
2001 Lörh <i>et al.</i> (Lancet)	Pruebas clínicas con células artificiales con mediadores celulares para el tratamiento de carcinoma pancreático inoperable
2002 Gould <i>et al.</i>	Capacidad del soporte de vida de la polihemoglobina humana en cirugía.
2002 Sprung <i>et al.</i>	El uso de polihemoglobina bovina en pacientes quirúrgicos: resultados de un ensayo multicéntrico ciego y aleatorio
2003 Chang, Powanda, Yu	Membrana PEG-PLA con hemoglobina y enzimas de glóbulo rojo en nanodimensiones
2004 Bloch <i>et al.</i> , Aebischer	Estudio clínico fase I para terapia de la enfermedad de Huntington empleando células modificadas genéticamente para la secreción del factor neurotrófico
2004 Yu & Chang (Melanoma Res J)	Nanobiotecnológica de PolyHb-tyrosinasa en el crecimiento del melanoma en un modelo de rata
2006 Liu & Chang (J Liver Trans)	Célula artificial con encapsulación células regeneradoras del hígado en ratas con el 90% del hígado extirpado quirúrgicamente
2007 Yu & Roberts	Empleo de células artificiales para la selección de restricción de endonucleasas
2007 Abe, H. <i>et al.</i>	Efecto de vesículas de hemoglobina en reacción anafiláctica en un modelo de rata.
2007 Sakai, H. <i>et al.</i>	Reporte de la observación por un año de ratas Wistar después de una infusión intravenosa de vesículas de hemoglobina
2007 Tsai & Wong	Patente 7,307,150, 2007 Conjugado de Hemoglobina-Dextran como sustituto sanguíneo
2007 Discher, D. <i>et al</i>	Aplicación emergente de polimerosomas en el tratamiento de un tumor
2008 Chiellini, F., <i>et al.</i>	Polímeros micro/nanoestructurados para aplicación biomédica y farmacéutica
2009 Katz, JS., <i>et al</i>	Estabilización de la membrana en polimerosomas biodegradables con poli(caprolactona-b-etilenglicol)
2010 Katz, JS., <i>et al</i>	Nueva ruta de síntesis para el copolímero (PCL-b-PEG) para el desarrollo de una membrana funcionalizada en un polimerosoma biodegradable
2010 Rameez, S., <i>et al.</i>	Elaboración de polimerosomas con hemoglobina por el método de extrusión a gran escala
2010 Cho, HK., <i>et al</i>	Nanopartículas poliméricas, micelas y polimerosomas de bloques de copolímero anfífilas
2010 Sakai, H., <i>et al.</i>	Vesículas de hemoglobina que imita a los glóbulos rojos

2011 Mai'l'té, S., <i>et al.</i>	Coloide de gelatina con Hb empleado como fluido preoperatorio para el acarreo de oxígeno.
2011 Tanner, P., <i>et al</i>	Polimerosomas que imitan a las células biológicas que pueden emplearse en la liberación controlada de fármacos y biofármaco
2011 Kim, SH., <i>et al</i>	Polimerosomas múltiples para la liberación programada de múltiples componentes
2011 Kamat, NP., <i>et al</i>	Ingeniería de polimerosomas para el desarrollo de protocélulas.
2011 Perro, A., <i>et al.</i>	Generación de polimerosomas complejos por el método de doble emulsión con el empleo de microfluidos
2011 Meng, F., <i>et al.</i>	Polimerosomas de la nano a la microescala para el control de la liberación de fármacos y vesículas robustas para virus e imitación de células
2012 Li, S., <i>et al.</i>	Polimerosomas con membranas ionizables para liberación rápida de proteínas intracelular
2012 Liu, GY., <i>et al</i>	Polimerosomas como acarreadores de moléculas zwitterionic (PC@QDs)
2012 Mai'l'té, S., <i>et al.</i>	Polimerosomas "Gelly" en su interior con imitación de orgánulos y citoplasma
2012 Sakai, H., <i>et al.</i>	HBOC con hemoglobina de cerdo
2012 Taguchi, K., <i>et al</i>	Evaluación farmacocinética después de una infusión de vesículas de hemoglobina en monos cynomolgus durante 40 días
2012 Li, D., <i>et al.</i>	Esferas de hemoglobina como portadores de oxígeno
2012 Liu, M., <i>et al.</i>	Liposoma encapsulando hemoglobina/nanopartículas de silica como acarreador de oxígeno
2012 Rameez, S., <i>et al</i>	Encapsulación de hemoglobina dentro de liposomas con superficie conjugada con poli (etilenglicol) para regular la vasodilatación ocasionada por el óxido nítrico.
2012 Hamadi, M., <i>et al.</i>	Copolímeros: eficientes acarreadores de nanopartículas para la terapia génica y vectorización de fármacos

2014 J.M. Shah, N.H. Shah and Hadiya	Vesículas Novasomer de 0.1- 1.0 $\mu\text{m}$ de diámetro con siete capas de membranas que permiten la encapsulación de fármacos insolubles
2014 Richardson, J.J. <i>et al</i>	Microcápsulas poliméricas que pueden ser empleadas como biorreactores y células artificiales elaboradas por lecho fluido capa por capa (LbL)
2014 Tsai, A.G. <i>et al</i>	Demuestra que el polietilenglicol conjugado con Hb (MP40X, Sangart Inc.) solución para optimizar la perfusión microvascular y dirigir la administración de oxígeno al tejido anóxico.
2014 Keyhaniun, Sh., Ebrahimifard, M and Zamdy, M.	El artículo trata de dar un paso hacia la solución de algunos problemas de la transfusión de sangre a través de la descripción de las propiedades alternativas sanguíneas artificiales.
2014 Zhang, S. <i>et al</i>	La vasoconstricción inducida por HBOC y la inhibición del canal Bka dependiente de la dosis está contribuyendo al menos parcialmente a este efecto
2014 Bin Li <i>et al</i>	Los copolímeros de triple bloque hetero-anfifílico están diseñados con la capacidad de autoensamble para formar vesículas de copolímero (polimerosomas), se han considerado como candidatos prometedores para el transporte de oxígeno basados en hemoglobina
2014 Tao, Z. and Ghoroghchian, P.	Desarrollo futuro y uso racional en el diseño de substitutos sanguíneos

### 1.2.1 Polimerosomas

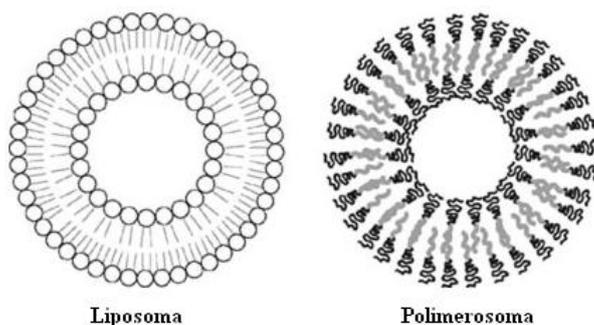
Los polimerosomas son vesículas sintéticas que imitan el comportamiento de las membranas biológicas y su diferencia radica en que los polimerosomas constan de cadenas poliméricas bien organizadas, mientras que las membranas son cadenas poliméricas organizadas al azar.

De las células artificiales mencionadas, las vesículas poliméricas (polimerosomas) son las que en años recientes han tenido una mayor atención, después del primer informe hecho en 1990 por Eisenberg, Bates y Discher (*Goliath, 2005*). Desde entonces los bloques de copolímeros anfipáticos, dendrímeros y derivados de fulerenos han sido clasificados como formadores de vesículas (*Förster and Borchert, 2005*) y a su vez representan una opción como vehículos de liberación de fármacos (*Pata and Dan, 2003*).

El empleo de bloques de copolímero para la generación de vesículas poliméricas es una nueva estrategia para el desarrollo de la encapsulación. Dependiendo de la longitud y la

naturaleza química del copolímero, el polimerosoma resultante puede ser más robusto que el liposoma comparable a su tamaño, ver *fig. 1.5*.

El grosor de la membrana se controla por la variación en el grado de polimerización de los bloques de las moléculas individuales mientras que la fluidez y la permeabilidad de la membrana puede ser ajustada por el cambio de la temperatura de transición vítrea (Tg) del bloque hidrofóbico (Lorenceanu, et al., 2005).



**FIGURA 1.5.** Estructura típica de una vesícula lipídica y una vesícula polimérica

Los polimerosomas pueden diseñarse de modo que se unan moléculas unas con otras con mucha firmeza. Sus átomos pueden enlazarse no sólo dentro de un polímero simple, sino también con los átomos de los polímeros cercanos. A esto se le conoce como enlace cruzado, lo cual aumenta enormemente la resistencia de las células artificiales. Se les puede almacenar fácilmente durante un período prolongado y sin ocupar demasiado espacio. En otras palabras, es la forma perfecta de transportar sangre adicional para las emergencias médicas que puedan surgir en desastres naturales, guerras y en los viajes espaciales (Discher D.E. and Ahmed F. 2006)

### 1.2.2 Requisitos para la elaboración de polimerosomas

Para la elaboración de un polimerosoma existen ciertos aspectos importantes que deben tomarse en cuenta.

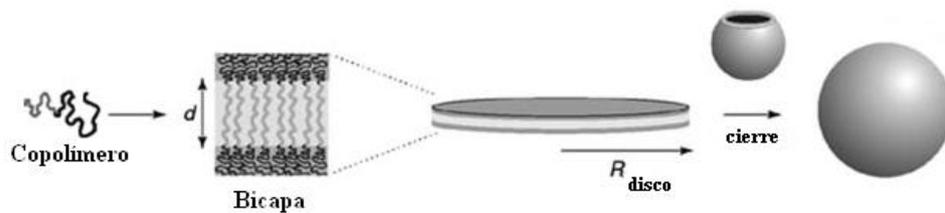
- Aparentemente no todos los bloques de copolímero pueden formar polimerosomas, es decir, se debe de cumplir ciertas características de composición (Xu, J.P. et al 2004)
- Para la formación de copolímeros en agua, el bloque de copolímero debe de tener entre 20 y 40% de una fracción hidrofílica, que es la misma proporción que presentan los lípidos naturales. Cuando se presenta una fracción de 45 a 55% se

forman micelas en forma cilíndrica y entre un 55 a 70% predominan las micelas esféricas (Meng, et al 2003)

- Con bloque de copolímeros en los cuales uno de los polímeros tiene baja temperatura de transición vítrea, los polimerosomas se pueden formar directamente en un medio acuoso (Afsaneh, Samuel and Kwon, 2002).

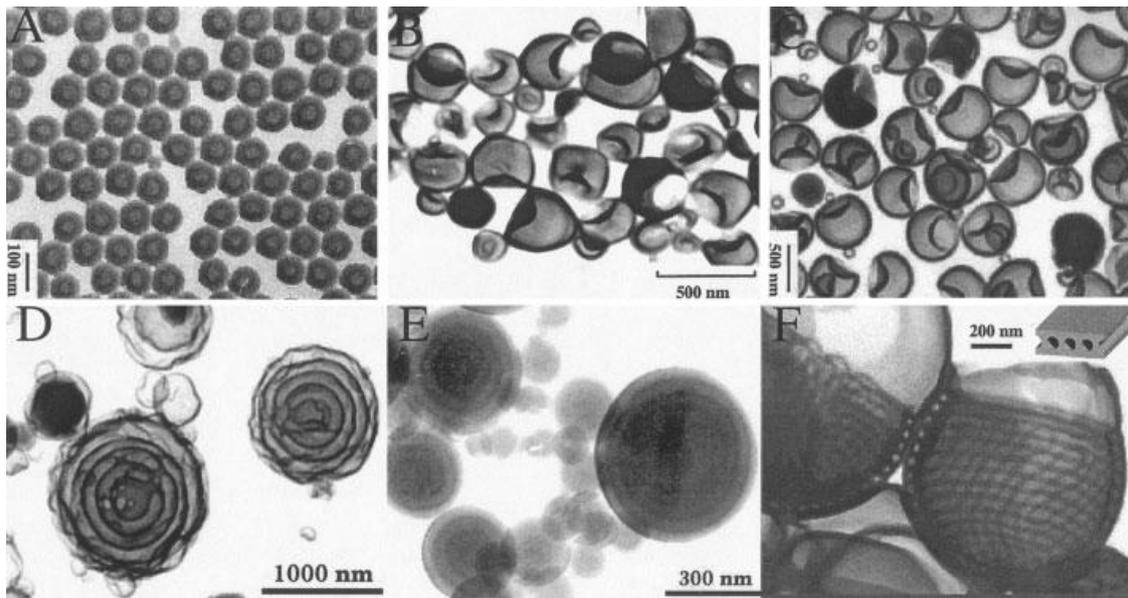
### 1.2.3. Elaboración de polimerosomas

El polimerosoma puede ser formado a partir de bloques de copolímero usando disolventes orgánicos, acuosos o una mezcla de ambos (Discher, et al 2001). La formación se lleva a cabo en dos pasos, el primero consiste de una bicapa anfipática y el segundo la formación de la vesícula, ver fig. 1.6 (Förster and Borchert, 2005).



**FIGURA 1.6.** Esquema estructural de una bicapa anfipática de copolímero y la formación de la vesícula.

Los polimerosomas pueden poseer diversas formas como se muestra en la fig. 1.7, esto va depender de las condiciones del proceso de preparación: composición del copolímero, la naturaleza del disolvente y la temperatura del sistema (Soo, P.L. and Eisenberg, A., 2004)



**FIGURA 1.7.** *Micrografías de diferentes tipos de vesículas: a) vesículas pequeñas y uniformes, b) vesículas grandes y polidispersas, c) vesículas atrapadas, d) vesículas de vacío concéntrico, e) cebollas, y f) vesículas con tubos en la pared.* Fuente: Imagen tomada de Soo, P.L. y Eisenberg, A. Preparation of block copolymer vesicle in solution. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, 42:923-938, 2004.

#### 1.2.4. Polimerosoma como sustituto sanguíneo

Arifin, R. D. (2005) propuso por primera vez el empleo de polimerosoma (PEH) como acarreador de oxígeno, a partir de combinación de lípidos conjugados con polietilenglicol para encapsular hemoglobina bovina. Aun cuando los PEH mostraron ser más estables que las vesículas lipídicas y tener afinidad para enlazar oxígeno, las dispersiones de estas vesículas resultaron ser una mezcla de polimerosomas, micelas y copolímeros precipitado por lo que una solución es investigar cual sería el mínimo peso molecular necesario del copolímero para la completa formación del polimerosoma.

Lorenceanu, E. et al. (2005) propuso la generación de polimerosomas por el método de doble emulsión partiendo de copolímeros de PAA-PBA, donde la síntesis del copolímero es controlada mediante el empleo de un catalizador (reacción MADIX) que permite determinar la composición de los bloques hidrofílicos e hidrofóbicos. En el trabajo de Lorenceanu se empleó un copolímero en el cual el peso molecular ( $M_w$ ) del bloque hidrofílico fue de 1.5 K y  $M_w$  del bloque hidrofóbico fue de 4K. La membrana formada a partir de este copolímero de PAA-PBA para el desarrollo del polimerosoma no fue uniforme en el grosor y no se logró la evaporación total del disolvente que se empleó en la síntesis de estos polimerosomas, lo que repercutió en su permeabilidad.

### 1.3 Copolímeros

Un copolímero es una macromolécula compuesta por dos o más monómeros (del griego mono, uno y meros, parte) o unidades repetitivas distintas, que se pueden unir de formas diferentes por medio de enlaces químicos.

Los monómeros pueden distribuirse de forma aleatoria o periódica. Si se alternan largas secuencias de uno y otro monómero, se denomina copolímero en bloque. Si el cambio de composición se produce en las ramificaciones, se trata de un copolímero ramificado. Para la síntesis de copolímeros existen diferentes técnicas de copolimerización; síntesis al azar y reacciones de radicales de Madix (*Anseth, Scott and Peppas 1996*).

La caracterización molecular de un polímero es el proceso por el cual se obtiene información acerca de:

- a) La estructura química de las macromoléculas
- b) El peso molecular del polímero
- c) La distribución de pesos moleculares
- d) El tamaño de las macromoléculas
- e) Los movimientos moleculares originados por el calentamiento del sistema
- f) La manera como se acomodan las cadenas macromoleculares para producir un ordenamiento tridimensional

El objetivo terminal de un proceso de caracterización debe ser correlacionar las características y propiedades de las moléculas de un polímero, como sus propiedades macroscópicas como: estructura química, peso molecular, distribución de pesos moleculares, movimientos moleculares, etc. Cuando se logra establecer este tipo de correlaciones se puede integrar adecuadamente las tres áreas que constituyen el proceso de producción de un material (*Palacios, Flores, Ambler y Guillot, 1982*).

Dentro de las técnicas analíticas de identificación se encuentran: cromatografía de permeación en gel (GPC), calorimetría diferencial de barrido (DSC), infrarrojo (FT-IR), etc.

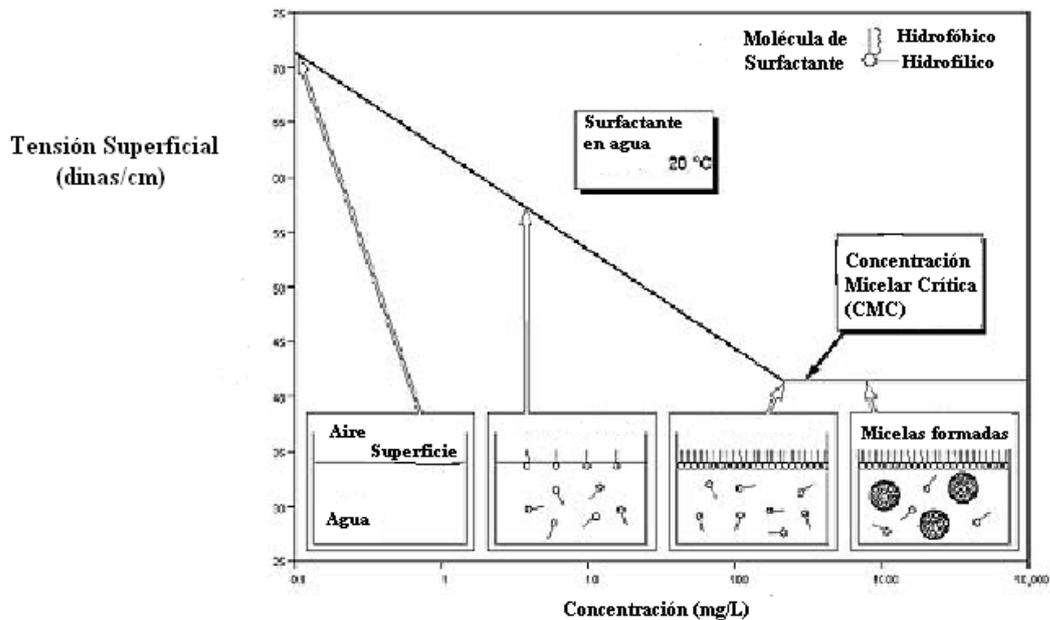
### 1.3.1 Concentración micelar crítica (CMC)

Los copolímeros compuestos de segmentos hidrófilos e hidrófobos poseen la capacidad de formar estructuras micelares en un medio acuoso. Aunque existen varios tipos de copolímeros de bloques potencialmente capaces de formar estructuras micelares, los copolímeros de bloque tipo AB son los candidatos más apropiados para diseñar la magnitud del bloque, el grado de agregación y la estabilidad de la micela formada debido a su arquitectura molecular simple (*Pratten, M.K. et. al.1985*). Se denomina concentración micelar crítica (CMC) a la concentración mínima de un tensoactivo a partir de la cual se forman micelas espontáneamente en una disolución (*Domínguez, A. y col. 1997*). Esta concentración se puede determinar mediante la realización de mediciones de tensión superficial en una serie de soluciones con concentraciones diferentes de tensoactivo.

Durante esta fase la tensión superficial disminuye linealmente con el logaritmo de la concentración del tensoactivo, la CMC se determina a partir de la intersección de las líneas rectas como se muestra en la *fig.1.8*.

Termodinámicamente la tensión superficial es un “fenómeno de superficie” y se relaciona con la tendencia de un líquido a disminuir dicha superficie hasta que su energía es mínima (condición necesaria para que el equilibrio sea estable). Como la esfera presenta un área mínima para un volumen dado, por la acción de la tensión superficial, la tendencia de una porción de un líquido lleva a formar una esfera (por ejemplo, gotas de agua) o a que se produzca una superficie curva o menisco cuando está en contacto un líquido con un recipiente.

Los tensoactivos, debido a la estructura polar-apolar de su molécula, presentan este fenómeno y disminuyen la tensión superficial del agua en concentraciones por debajo de la concentración en la que el tensoactivo ha cubierto la totalidad de la superficie. Por encima de esta concentración las moléculas del tensoactivo se dirigen hacia al interior del líquido formando agregados de moléculas sencillas, resultando una estructura con una orientación específica de alto peso molecular a partir de la cual se observan cambios bruscos en las propiedades fisicoquímicas, como en su conductividad, presión osmótica, turbidez, tensión superficial, etc. A este cambio se le llama concentración micelar crítica (CMC) (*Mitchell and Ninham 1981; Antunes, F.E. et. al 2009; Zhang and Eisenber1998*).



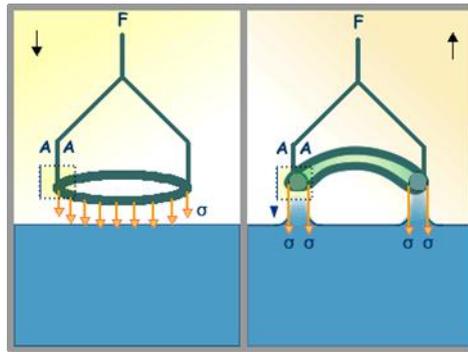
**FIGURA 1.8.** Determinación de la CMC a partir de datos de tensión superficial.

Fuente: imagen tomada de <http://www.kruss.de/en/theory/measurements/surface-tension/cm-c-measurement.html>. 10:02,23/01/2013.

### 1.3.2 Tensión superficial

Se denominan fenómenos superficiales a los fenómenos físicos en los que intervienen de forma fundamental las moléculas que se encuentran en la superficie de separación de dos medios no miscibles. Para la realización de esta determinación se emplea el método del desprendimiento del anillo (platino o de platino-iridio) el cual se encuentra colocado en el tensiómetro de Du Noüy. El funcionamiento consiste en medir la fuerza necesaria para desprender un anillo horizontal de alambre de la superficie del líquido ver *fig. 1.9*. Se introduce completamente el anillo en el líquido problema, equilibrar el mismo en una línea de referencia y a continuación se determina el valor de la tensión superficial retirando el anillo y el líquido lentamente de tal forma que el anillo no se separe bruscamente de la superficie libre del líquido. Para la determinación de la tensión superficial se emplea la *ecuación 1*:

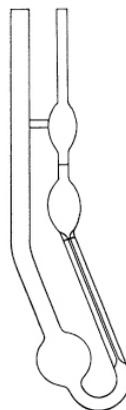
$$\gamma = (\text{lectura del dial en dinas}) / (2 \times \text{circunferencia del anillo}) \times \text{factor de corrección} \quad (1)$$



**FIGURA 1.9.** Anillo de Du-Noüy, método para medir tensión superficial. Mide la fuerza requerida para retirar el anillo de la superficie del líquido.

### 1.3.3 Viscosidad

Las propiedades de los polímeros en solución están determinadas por las características estructurales de la cadena macromolecular solvatada. La estructura depende de la naturaleza de la unidad repetitiva y, en el caso de copolímeros, de la composición y la distribución de los monómeros en la cadena. El método más sencillo para medir viscosidades es mediante un viscosímetro de Ostwald, *ver fig. 1.10*. Una molécula de polímero en solución no es una fibra estacionaria, sino que es una cadena que se enrolla y desenrolla constantemente cuya conformación en el espacio cambia. En una solución muy diluida, puede considerarse que las moléculas individuales actúan independientemente. La manipulación de las viscosidades de las soluciones diluidas da un parámetro importante de un polímero en un disolvente dado.



**FIGURA 1.10.** Viscosímetro de Ostwald-Cannon Fenske

$$\frac{\mu}{\rho} = K \cdot t \quad (2)$$

Donde  $t$  es el tiempo en que el menisco superior cae de la marca superior del viscosímetro a la inferior (de A a B),  $\mu$  es la viscosidad dinámica,  $\rho$  es la densidad y  $K$  es una constante del aparato que debe determinarse por calibración con un líquido de viscosidad conocida (por ejemplo, agua).

#### **1.4 Determinación de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) del copolímero por calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

La temperatura de transición vítrea o  $T_g$  es la temperatura en el cual los materiales plásticos, al enfriarse, pasan de ser flexibles a rígidos. Esta transición está relacionada con la movilidad de segmentos de cadena y con la disponibilidad de un cierto volumen (volumen libre) para que dicho segmento se mueva. Los factores que determinan la  $T_g$  son aquellos que afecten la facilidad de movimiento de los segmentos de las cadenas, siendo los más importantes la rigidez o flexibilidad de la cadena y la magnitud de las fuerzas intermoleculares. Las propiedades específicas dependen de la masa molar de las cadenas de polímeros y de si el sistema polimérico es semicristalino y amorfo o cruzado (*Armenides and Baer, 1977*).

Desde 1950, varios autores han intentado por distintos métodos, empleando modelos, obtener alguna expresión que permita predecir la  $T_g$  de los copolímeros como una función de la composición (*Brostow, W. et al 2008*). Uno de estos modelos es la ecuación de Gordon – Taylor la cual es aplicada por Penzel et.al (1997) para estudiar la contribución de la naturaleza química de los constituyentes A y B en la transición vítrea del copolímero acrílico AB ( $T_{gAB}$ ).

Para la aplicación de la ecuación de Gordon-Taylor (3) la transición vítrea de los homopolímeros deben cumplir con esta restricción:  $T_{gA} < T_{gB}$  y que el  $T_{gAB}$  del copolímero se encuentre dentro de este intervalo.

$$T_g - T_{gA} = (T_{gB} - T_g) \frac{w_B}{w_A} \quad (3)$$

#### **1.5 Síntesis del polimerosoma a partir de copolímeros hidrofílicos-hidrofóbicos**

Algunos métodos que son utilizados para la preparación de liposomas pueden usarse en la preparación de polimerosomas, como son:

a) **Rehidratación de la membrana.** Consiste en un proceso simple en el que se rehidrata un bloque de copolímero con una solución acuosa. La parte anfipática se mezcla con un disolvente orgánico; con esta solución se recubre una superficie de vidrio, y se evapora con vacío (*Bermudez, et al 2002*) posteriormente se adiciona una solución acuosa, la cual va provocar la formación de la vesícula (*Förster and Borchert, 2005*). Esta técnica es relativamente fácil de hacer ya que no requiere de mucho equipo; sin embargo, las vesículas que se obtienen no son muy estables (*Meng, Engbers and Feijen, 2005*). La encapsulación de la sustancia se puede realizar por dos sistemas: en el primero la encapsulación y rehidratación de la capa puede realizarse al mismo tiempo, poniendo en la solución acuosa el material que se desea encapsular; en el segundo el polimerosoma se forma y posteriormente se llena por medio de un proceso osmótico, sin embargo, en ambos casos el encapsulamiento tiene una baja eficiencia (*Lorenceanu, E. et al. 2005*)

b) **Electroformación.** La electroformación fue inventada por Angelova y Dimitrov 1986, la cual consiste en dos alambres de platino con un diámetro de 0.5 mm, con un espacio entre éstos de 0.5 cm, en los cuales se deposita la solución de copolímeros. Se utiliza un campo eléctrico que, en conjunto con una solución acuosa, provoca un decremento de la tensión superficial (*Förster and Borchert, 2005*) y una diferencia en la constante dieléctrica en los bloques del copolímero, lo cual ocasiona una reorientación que induce la formación de la microsfera; este es un método utilizado en la formación de vesículas de una membrana y de tamaño 10–100  $\mu\text{m}$  de diámetro (*Hamley, I.W. 2003*).

c) **Disolventes orgánicos.** En este método primero se disuelve el bloque de copolímero en un solvente miscible en agua, por ejemplo, dioxano, tetrahidrofurano (THF) o dimetilfurano (DMF); posteriormente se adiciona agua, la cual incrementa la tensión interfacial provocando la formación de las vesículas (*Meng, F. et al 2003*). Una vez que se obtienen los polimerosomas el disolvente se evapora con la finalidad de que dichas estructuras sean más estables.

d) **Microfluidos.** Con la ayuda de microcanales se induce la formación de microcápsulas mediante el uso de fluidos inmiscibles, lo cual permite generar estructuras perfectas (esféricas) de encapsulación. El diámetro de estas partículas depende del tamaño de los capilares, los cuales se encuentran dentro de un intervalo de

10-100  $\mu\text{m}$ ; este también puede ser modificado mediante la variación en el flujo de cada fase. Con esta técnica se pueden obtener emulsiones monodispersas y es posible realizar este tipo de vesículas en un solo paso, mediante la formación de una doble emulsión que consiste en una o más gotas pequeñas suspendidas en una gota más grande de un segundo líquido inmiscibles; el cual es suspendido en una tercera fase. De esta manera se puede generar dos tipos de emulsiones agua/aceite/agua (w/o/w) y la inversa aceite/agua/aceite (o/w/o).

El estudio de los **microfluidos** es un campo multidisciplinar que comprende partes de la Física, la Química, la Ingeniería y la Biotecnología. Estudia el comportamiento de los fluidos en la microescala y la mesoescala. También comprende el diseño de sistemas en los que diminutas cantidades de fluido serán utilizadas. El comportamiento de los fluidos en la microescala difiere sustancialmente de lo observado en la macroescala. La tensión superficial y la disipación de la energía son completamente diferentes. En microcanales de 10 a 500 nanómetros de diámetro el número de Reynolds es extremadamente bajo. Por lo tanto, el fluido es siempre laminar y no ocurren turbulencias; sólo la difusión interviene en la mezcla de fluidos (*Liu, R.H. et al. 2000; Bokenkamp et al. 1998*)

La mayoría de los dispositivos de microfluidos funcionan a bajo número de Reynolds pero aun así, el flujo no es lineal debido a las interacciones en la frontera entre los dos fluidos, los efectos importantes que se observan: **a)** es que el límite no es estático y **b)** el movimiento de un fluido puede arrastrar al otro. La inestabilidad resultante que impulsa la formación de gotitas es un desafío entre la tensión superficial y la fuerza de corte (*Thorsen, et al. 2001; Atencia & Beebe 2005; Kim, J. et. al. 2008*).

### **1.6. Síntesis del polimerosoma a partir de los copolímeros de (PAA-PBA) mediante un dispositivo en T de vidrio**

Un dispositivo simple para la producción y manipulación de gotitas es la unión en T (*Atencia J & Beebe, D. 2005*), se forman gotas espontánea de tamaño uniforme en los microcanales cuando dos corrientes de fluido inmiscibles se unen. Este proceso implica la física básica con la geometría local y química de la superficie del microcanal que tiene influencia sobre la competencia de las fuerzas viscosas debida al fluido y las fuerzas capilares que tienden a formar gotitas a fin de minimizar la superficie de contacto entre los dos fluidos (*Gupta, A. & Kumar, R. 2010*). Esto da como resultado

gotitas de tamaño comparable a los diámetros del canal y este tamaño se puede ajustar mediante el control de la velocidad del flujo volumétrico (*Joanicot and Ajdari, 2005, Utada, et al. 2005, Tice, J.D. et al 2003*)

La formación de gotas se han generado por una serie de métodos: por geometría del dispositivo, por ruptura a través de una matriz microporosa o microcanal, flujo perpendicular inducido, flujo hidrodinámico centrado a través de un orificio y formación de gotas por la ruptura en un cruce de microcanales. A pesar de los avances significativos realizados en los últimos años, sigue habiendo grandes retos en el desarrollo de técnicas de microcanales para la formación de gotitas y sus mecanismos.

Estudios previos para sistemas líquido-líquido mostraron que el tamaño de la gota se ve afectado por la viscosidad, tensión interfacial, los flujos volumétricos y las propiedades de mojabilidad (*Xu, J.H. et al 2006*).

La relación entre las fuerzas viscosas y la capilaridad está dada por el número de capilaridad (*Ca*) que representa el efecto relativo entre la viscosidad (fuerzas viscosas) y la tensión superficial que actúa a través de una interface entre un líquido y un gas, o entre dos líquidos inmiscibles (*Tice, J.D. et al 2004*).

$$Ca = \frac{\mu u}{\gamma} \dots\dots\dots(4)$$

Dónde:  $\mu$  es la viscosidad dinámica del líquido,  $u$  es la velocidad característica y  $\gamma$  es la tensión superficial entre las dos fases.

El flujo de un fluido se clasifica en dos regímenes de flujo: laminar y turbulento. El flujo laminar se caracteriza por el movimiento del fluido suave y constante, mientras que el flujo turbulento se caracteriza por los vórtices y las fluctuaciones de flujo.

Físicamente los dos regímenes difieren en términos de la importancia relativa de las fuerzas de viscosidad e inerciales. La importancia relativa de estos dos tipos e fuerzas para una condición de flujo dada se mide por el número de Reynolds (*Re*), como se indica en la siguiente ecuación:

$$Re = \frac{\text{fuerzas inerciales}}{\text{fuerzas viscosas}} = \frac{\rho v_s D}{\mu} \quad (5)$$

Dónde:  $\rho$  = densidad del fluido,  $v_s$  = velocidad característica del fluido,  $D$  = diámetro de la tubería a través de la cual circula el fluido o longitud características y  $\mu$  = viscosidad dinámica del fluido

A bajo número de Reynolds, los efectos viscosos dominan sobre los efectos inerciales y se produce un flujo completamente laminar. En el sistema de flujo laminar, las corrientes del flujo del fluido lo hacen en forma paralela y la velocidad en cualquier ubicación dentro de la corriente es invariante con el tiempo cuando las condiciones del entorno son constantes. Esto implica que se produce la transferencia de masa por convección sólo en la dirección del flujo y la mezcla puede lograrse sólo por la difusión molecular. Por el contrario, a altos valores de  $Re$ , el flujo es dominado por las fuerzas inerciales y se caracteriza por un flujo turbulento. En un flujo turbulento este es dominado por las fuerzas inerciales y el movimiento del fluido es al azar y el transporte de masa convectiva es en todas direcciones.

Entre los regímenes definidos de flujo laminar y turbulento hay un intervalo del número de Reynolds que se conoce como de transición. Los valores exactos de este intervalo son una función de muchos parámetros, tales como: la forma del canal y rugosidad de la superficie interna de este.

El valor numérico del  $Re$  de transición en la mayoría de las situaciones se espera se encuentre en el intervalo de 1 500 y 2 500. Para los sistemas de microfluidos, el  $Re$  es menor de 100 y el flujo se considera esencialmente laminar. Esta característica tiene una consecuencia directa de la mezcla dentro de los dispositivos de microfluidos.

En un ambiente donde el flujo de fluidos se restringe a flujo laminar, la mezcla está determinada en gran medida por la difusión molecular pasiva y de advección.

La difusión se define como el proceso de propagación de las moléculas de una región de mayor concentración a una de menor por el movimiento browniano que resulta en una mezcla gradual de material. La difusión se describe matemáticamente por la ley de Fick.

$$j = -D \frac{d\phi}{dx} \quad (6)$$

Dónde:  $\phi$  es la concentración de las especies,  $x$  es la posición de la especie y  $D$  es el coeficiente de difusión.

La difusión es un proceso no lineal en el que el tiempo,  $t$ , requerido para que una especie se difunda es una escala cuadrática con la distancia  $x$ . Un caso simple de difusión puede ser modelado en una dimensión por la siguiente ecuación:

$$x^2 = 2Dt \quad (7)$$

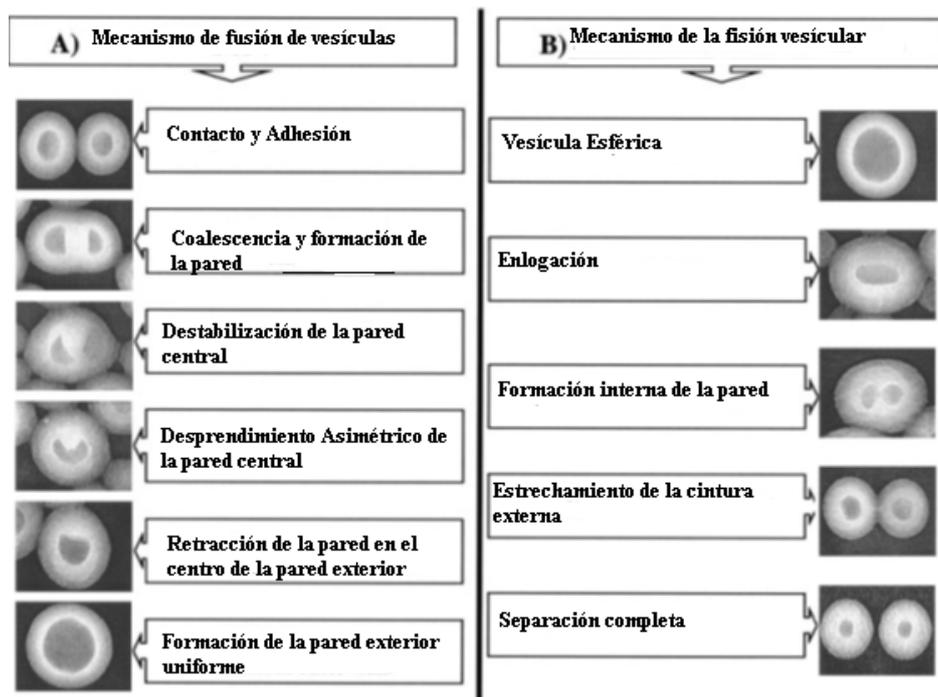
Dónde:  $t$  es el tiempo promedio en que las partículas se difunden sobre la distancia  $x$ .

En cuanto al canal del microfluído,  $x$  representa el ancho de la corriente del fluido a ser mezclado a lo largo del canal (*Dreyfus, R. et al. 2003*).

Durante más de tres décadas se ha sabido que los copolímeros de bloque, cuando se solubilizan en un disolvente selectivo, es decir, un disolvente que es bueno para sólo uno de los bloques, pueden formar micelas o agregados como un resultado de la asociación de los bloques insolubles. La formación de micelas requiere la presencia de dos fuerzas opuestas, es decir, una fuerza de atracción entre dos bloques insolubles, lo que conduce a la agregación y una fuerza de repulsión entre los bloques solubles que impiden el crecimiento ilimitado de la micela. Las micelas son estabilizadas en la solución debido a la interacción de los bloques solubles y el disolvente. En un disolvente polar, como el agua, se forman micelas regulares, que tienen un núcleo hidrófobo y una corona hidrófila. En un disolvente apolar (o baja polaridad), los bloques se invierten, es decir, el segmento hidrófilo que forma el núcleo es rodeado por una capa de corona hidrófoba. Cuando las longitudes de los bloques PAA llega a ser muy corta, los copolímeros de alta polidispersidad forman esferas (*Zhang, L and Eisenberg, A, 1998*). La morfología de estos agregados se rige por un balance de las contribuciones a la energía libre de agregación: a) el núcleo de la cadena de estiramiento, b) la energía interfacial, y c) las interacciones de la cadena intercoronal; estos factores representan la clave para la formación y modificación de las vesículas de copolímero de bloque en condiciones de equilibrio (*Opsteen, J. A. et al 2004; Soo, P.L y Eisenberg, A. 2003*).

Los mecanismos de fusión y fisión están relacionados con el incremento y decremento del tamaño de la vesícula. La propuesta de los mecanismos se muestra en la *tabla 8*.

**Tabla 8.** Los posibles mecanismos de (A) la fusión de vesículas y (B) la fisión de una vesícula (L.Luo and A. Eisenberg, *Langmuir* 17:6804 2001)



En el primer paso de la fusión se involucra el contacto y adhesión de las dos vesículas. Esta es seguida de una coalescencia que desestabiliza la pared y se retrae en la pared exterior. Por último se da la formación de una pared exterior para formar una vesícula uniforme.

El proceso de la fisión, implica el alargamiento de las vesículas, seguido por la formación de una cintura interna y estrechamiento de la cintura externa. En este punto una conexión entre los dos compartimentos se puede ver, con el tiempo se logra una separación completa (Soo, P.L y Eisenberg, A. 2004)

En muchos sistemas las micelas y las vesículas están íntimamente relacionadas, debido a que se puede dar una transición entre ellas micela-vesícula o viceversa puede ser inducido por variables controlables, como el pH, la composición y la temperatura.

Es sabido que las estructuras basadas en bicapa, tales como las vesículas, son la forma más extendida y relevante del autoensamblaje de tensoactivo en la naturaleza, ya que forman la base estructural de las membranas biológicas (Lipowsky, R., 1991).

Las vesículas son estructuras coloidales, típicamente de forma esférica, compuestas de una bicapa que se pliega sobre sí misma y atrapa parte del disolvente. Por lo tanto, una

vesícula tiene una coraza de tensoactivo interior y exterior y el disolvente interno, generalmente acuoso, en donde los solutos pueden estar presentes.

Moléculas solubles en agua, con carga, pueden ser adsorbidas electrostáticamente sobre la superficie de la vesícula o anclarse parcialmente a la bicapa, si tienen un segmento no polar; moléculas no polares pueden solubilizarse en el núcleo hidrofóbico de la bicapa (*Antunes, F.E. et al. 2009*).

Como regla general, los copolímeros con relaciones hidrófilo/hidrofobo mayor 1:1 generalmente forman micelas, copolímeros con una relación menor de 1:2 forman vesículas; aquellos con relaciones menores de 1:3 pueden formar vesículas, microestructuras invertidas, otras estructuras complejas y precipitados macroscópicos, estas relaciones no son características definitivas del diseño, la proporción hidrófilo/hidrofobo es un factor importante, pero no el único parámetro determinante (*Du, J. and O'Reilly, R. 2009*).

### **1.7. Difusión de oxígeno a través de la membrana polimérica**

La difusión y la permeabilidad de los polímeros depende de su estado físico: cristalino, amorfo elástico y amorfo vítreo. El transporte de pequeñas moléculas a través de la membrana polimérica se debe al movimiento molecular al azar de las moléculas individuales. La fuerza conductora de este proceso de transporte relacionada con la sorción, difusión y permeación es el gradiente de concentración entre las dos fases. Este proceso puede ser descrito en términos de la primera ley de Fick de la difusión, de acuerdo con el flux  $J$ , en la cual la dirección del flujo es proporcional al gradiente de concentración  $\delta c/\delta x$  (*Crank, 1975; Paul, 2010*).

$$J = -D \delta c / \delta x \quad (8)$$

El coeficiente de permeabilidad ( $P$ ), se define como el volumen de sustancia que atraviesa una unidad de área de espesor del polímero en una unidad de tiempo con una diferencia de presiones a través del sistema. La permeabilidad depende del coeficiente de solubilidad,  $S$ , y del coeficiente de difusión,  $D$ , (*Ashley, 1985*)

$$P = DS \quad (9)$$

Las unidades de  $P$  son  $\text{cm}^3/\text{s}$ , la solubilidad está relacionada con la naturaleza química de la sustancia, el polímero y la capacidad del polímero para tomar a dicha sustancia.

El transporte de pequeñas moléculas a través de la membrana polimérica se debe al movimiento molecular al azar de las moléculas individuales. La fuerza conductora de este proceso de transporte relacionado con: sorción, difusión y permeación es el gradiente de concentración entre las dos fases.

Las propiedades del transporte dependen del volumen libre del polímero y el segmento móvil de la cadena del polímero. El segmento móvil de la cadena del polímero está afectado por la extensión de la insaturación, el grado de entrecruzamiento, el grado de cristalinidad y la naturaleza del sustituyente.

La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) tiene influencia en las propiedades del transporte. Los polímeros con una baja de temperatura de  $T_g$  poseen un segmento de alta movilidad y por lo tanto tendrán alta difusividad.

Se sabe que la difusividad decrece cuando la extensión de insaturación en el esqueleto del polímero es menor que la hidrogenación. Esto es porque la insaturación en la cadena del polímero provee movilidad del segmento, mientras que la saturación tiende a restringirla y el peso molecular del polímero influye significativamente en el proceso del transporte. A medida que aumenta el peso molecular del polímero, disminuye el número de extremos de cadenas. Los extremos de cadena representan una discontinuidad y pueden formar sitios para la molécula permeante, a ser absorbido en polímeros cristalinos (*Soney, C.G. and Sabu, T. 2001*).

### 1.7.1 Cinética de absorción y desorción

La velocidad de sorción del gas se emplea para estimar el coeficiente de difusión. La medida de esta velocidad de transporte puede ser empleada para estudiar la velocidad de movilidad del agente penetrante y de la cadena polimérica durante el proceso de sorción. La movilidad relativa se clasifica como: Caso I (Fickiano) o Caso II (no Fickiano).

**Caso I.** La sorción ocurre cuando el penetrante-polímero obedece la difusión Fickiana donde la movilidad del penetrante es más lenta que la movilidad de la cadena del polímero. En el caso I, la velocidad de masa del penetrante es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo. La correlación matemática se presenta a continuación.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \sqrt{\frac{D}{\pi l^2}} \quad (10)$$

$M_t$  es la cantidad de la pérdida de la sustancia que atraviesa el polímero a un tiempo  $t$  y  $M_\infty$  es la cantidad final de la sustancia perdida hasta que se alcanza el equilibrio. El coeficiente de difusión puede ser fácilmente extrapolado por una observación del gradiente inicial de la gráfica  $M_t/M_\infty$  en función a la raíz cuadrada del tiempo ( $t^{1/2}$ ). En el caso donde el coeficiente de difusión es constante la gráfica de sorción es una línea recta.

**Caso II.** La velocidad de difusión del penetrante es tan rápida como la movilidad de la cadena, lo que conduce a la turgencia del polímero. La sorción se produce durante la movilidad del penetrante y la cadena del polímero. Debido a la naturaleza compleja de la cinética de sorción, este comportamiento se conoce como no fickiano (*Crank, J. 1975*)

## Referencias

- Afsaneh, L., Samuel, J., and Kwon, G.S. (2002). Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid). Micelles for Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54:169-190
- Alayash, A. I. (2004). Oxygen Therapeutics: Can We Tame Haemoglobin? *Nature*, 3: 152-159
- Angelova, M.I and Dimitrov, D.S. (1986) Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 81; 303-311.
- Anseth, K.S., Scott, R.A., and Peppas, N.A. (1996) Effects of Ionization on the Reaction Behavior and Kinetics of Acrylic Acid Polymerization. *Macromolecules* 29:8308-8312
- Antunes, F.E., Marques, E.F., Miguel, M.G., Lindman, B. (2009) Polymer-vesicle association. *Advances in Colloid and Interface Science* 147-148
- Arifin, D.R. (2005) Cellular Hemoglobin-Based Oxygen Carriers as Potential Artificial Blood Substitutes. *Notre Dame, Indiana*. 1-173
- Arifin, D.R. and Palmer, A.F. (2003) Determination of Size Distribution and Encapsulation Efficiencies of Liposomes Encapsulated Hemoglobin by Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation and Multi-Angle Light Scattering. *Biotechnology Progress*, 19: 1798-1811.
- Ashley, R.J. (1985). Permeability and Plastics Packaging, In: *Polymer Permeability*, J. Comyn, 269-308. Elsevier Applied Science, Northern Ireland
- Atencia J. & Beebe D.J. (2005) Controlled microfluidic interfaces. *Nature*, 437: 29  
Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-62302010000300002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-62302010000300002&lng=en&nrm=iso). ISSN 0120-6230.
- Bermudez, H., Brannan, A.K., Hammer, D., Bates, F.S., and Discher, D. (2002) Molecular Weight Dependence of Polymersome Membrane Structure, Elasticity and Stability. *Macromolecules*, 35: 8203-8208
- Bin Li, Yanxin Qi, ShaSha He, Yupen Wang, Zhigang Xie, Xiabin Jing and Yubin Huang (2014) Asymmetric copolymer vesicles to serve as hemoglobin vector for ischemia therapy. *Biomater. Sci.*, (2) 1254-1261
- Bokenkamp, D., Desai, A., Yong, X., Elaine, Yu Ch T. (1998) Microfabricated Silicon Mixers for Submilisecond Quench-Flow Analysis. *Anal. Chem.* 70, 232
- Brig, YKG., Maj P.D., Chatterjee, Lt. Col.T., Dhot, Col PS, Brig R.S (2003). *Artificial Blood*. *MJAF* 59. No. 1:49-50

- Casas-Martínez, M. **(2010)** Análisis Bioético del embarazo en testigos de Jehová y el rechazo transfusional. Cuad. Bioét. XXI. 327-329
- Chang T. M. S., **(1999)** Future Prospects for Artificial Blood. Trends in Biotechnology 17: 61-67.
- Chang T.M.S. **(2004)**.A New Red Blood Cell Substitute. Critical. Care Medical 32: 612-613
- Chang T.M.S. **(2006)** Evolution of Artificial cells Using Nanobiotechnology of Hemoglobin Based RBC Blood Substitutes as an Example. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology. 34:6,551-566
- Chang T.M.S. **(2009)** Nanobiotechnology for Hemoglobin Based Blood Substitutes. Critical Care Clinics. 25: 373-382
- Chang, T.M.S. **(2005)**. Therapeutic Applications of Polymeric Artificial Cells. Nature Reviews/Drug Discovery. March Vol. 4 (221-235)
- Chang, T.M.S. **(2007)** Artificial Cells: biothechnology, nanomedicine, regenerative medicine, blood substitutes, bioencapsulation, cell/stem cell/therapy.8-11 Vol. 1 World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- Cho, H.K., Cheong, I.W., Lee, J.M., Kim, J.H. **(2010)** Polymeris nanoparticles, micelles and polymersomes from amphiphillic block copolymer. Korean Journal of Chemical Engineering. Vol. 27 (3):731-740
- Crank, J. **(1975)** The Mathematics of Diffusion (Second Edition), Clarendon Press, England: 2-10
- Discher D.E. and Ahmed F. **(2006)** Polymersomes. Annual Review of Biomedical Engineering 8:323-41.
- Discher, D., Bermudez, H., Lee, J., Discher, B., Hammer, D. and Bates, F. **(2001)** Polymersomes: Thermomechanical Properties Through In vivo Testing. Bioengineering Conference. 543
- Domínguez, A., Fernández A., González N., Iglesias E., and Montenegro L. **(1997)** Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques, Journal of Chemical Education, Vol. 74 No. 10, 1227-1231
- Dreyfus, R., Tabeling, P. and Willaime, H. **(2003)** Ordered and Disordered Patterns in Two-Phase Flows in Microchannels. Physical Review Letters. Vol. 90 (14): 144505 (1-3)
- Du, J. and O'Reilly, R. **(2009)** Advances and challenges in smart and functional polymer vesicles. Soft Matter, 5, 3544-3561

Eastman, A. and Minei, J.P. **(2009)** Comparison of Hemoglobin-based Oxygen Carriers to Stored Human Red Blood Cells. *Critical Care Clinics* 25:303-310

Förster, S. and Borchert, K. **(2005)** Encyclopedia of Polymer Science and Technology. John Wiley & Sons.USA. 1-52

Garnet, C. and López, B. L.(2010) Medidas de la rigidez del quitosano en solución a través de la viscosidad intrínseca. *Rev.Fac.Ing.Univ. Antioquia* [online]. 2010, n.53 [cited 2014-05-20]. 20-29 .

Gaucher, C., Boura, C., Stoltz, J-F., Menu, P. **(2006)** Oxigen Therapeutics: Current Issues and New Challenges. *Acta Bioq.* 7: 67-71

Goliath (2005) Polymersomes Useful for Drug Delivery, Storage. *Membrane and Separation Technology News*. <[http://goliath.ecnext.com/com2/gi\\_0199-3618437/Polymersome-Useful-for-Drug-delivery.html](http://goliath.ecnext.com/com2/gi_0199-3618437/Polymersome-Useful-for-Drug-delivery.html)>

Hamidi, M., Shahbazi, M., Rostamizadeh, K. **(2012)** Copolymers: efficient carriers for intelligent nanoparticle drug targeting and gene therapy. *Macromolecular Bioscience*. Vol. 12 (2): 144-164.

Hamley, I.W. **(2003)** Nanostructure fabrication using block copolymer. *Nanotechnology*. 14: R39-R54.

Harding, S.E. (1997) The intrinsic viscosity of biological macromolecules. *Progress in measurement, interpretation and application to structure in dilute solution"*. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. Vol. 68. 207-262.

Heddle, N.M., Cook, R.J., Arnold, D.M., Crowther, M.A., Warkentin, T.E., Weber, K.E., Hirsh, J., Barty, R.L., Liu, Y., Lester, C., Eikelboom, J.W. **(2012)** Transfusion. Vol. 52, Issue 6: 1203-1212.

Joanicot, M. and Ajdari, A. (2005) Droplet Control for Microfluidics. *Science*. Vol. 309, 887:888

Kamat, N.P., Katz, J.S., Hammer, D.A. **(2011)** Engineering polymersomes protocells. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. Vol. 2 (13):1612-1623

Kamat, N.P., Robbins, G.P., Rawson, J., Therien, M.J., Dmoschowski, I. J., and Hammer, D. A. **(2010)** A generalized system for photoresponsive membrane rupture in polymersomes. *Advanced Functional Materials*. Vol. 20 (16):2588-2596

Katz, J.S., Levine, D.H., Davis, K., P., Bates, F.S., Hammer, D.A., Burdick, J.A. **(2009)** Membrane stabilization of biodegradable polymersomes. *Langmuir* Vol. 25 (8):4429-4434

Katz, J.S., Zhong, S., Ricart, B.G., Pochan, D.J., Hammer, D.A., Burdick, J.A. **(2010)** *Journal of the American Chemical Society*. Vol. 132 (11):3654-3655

- Keyhani, Sh., Ebrahimifard, M. and Zamdy, M. **(2014)** Investigation on artificial blood or substitute blood replace the natural blood. *Iran J. Ped. Hematol. Oncol.* 4(2): 72-77
- Kim, J., Lee, D. and Weitz, D. **(2008)** Microfluid and Nanofluidic Devices. *Bulletin of the American Physical Society.* Vol. 53, Number 2, APS March Meeting
- Kjellstrom, B. T. **(2003)**. Blood Substitutes: Where Do We stand Today? *Journal of Internal Medicine*, 253:495-497
- Klein, H. G. **(2002)**. Blood Substitutes: How Close to a Solution? *Oncology*, 16: 147-151
- Li, D., Yan, X., Wang, A., Jia, Y., and Li, J. **(2012)** Highly loaded hemoglobin spheres as promising artificial oxygen carriers. *ACS Nano* 6(8): 6897-6904 In American Chemical Society.
- Li, S., Meng, F., Wang, Z., Zhong, Y., Zheng, M., Liu, H., Zhong, Z., **(2012)** Biodegradable polymersomes with an ionizable membrane: facile preparation, superior protein loading and endosomal pH-responsive protein release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* Vol. 82 (1): 103-111
- Lipowsky, R. **(1991)** The conformation of membranes. *Nature*, Vol.349, 475-490
- Liu, G. Y., Xiang-Sheng, L., Shan-Shan, W., Chao-Jian, Ch., Jian, J. **(2012)** Biomimetic polymersomes as carriers for hydrophilic quantum dots. *Langmuir.* Vol. 28 (1):557-562
- Liu, R.H., Stremmer, M.A., Sharp, K.V., Olsen, M.G., Santiago, J.G., Adrian, R.J., Aref, H. and Beebe D.J. **(2000)** Passive Mixing in a Three-Dimensional Serpentine Microchannel *J Microelectromech. Syst.* 9,190-196
- Lorenceanu, E., Utada, A.S., Link, D.R., Cristóbal, G., Joanicot, M. and Weitz, D.A. **(2005)** Generation of Polymersomes from Double-Emulsions. *Langmuir*, 21:91183-9186.
- Lowe, K. C. **(2006)** Blood Substitutes: from chemistry to clinic. *Journal of Material Chemistry.* 16: 4189-4196
- Lowe, K. C. and Ferguson, E. Benefit, A., and Risks, C. **(2003)**. Perceptions in Transfusion Medicine: Blood and Blood Substitutes. *Journal of Internal Medicine.* 253: 498-507
- Mail' té, M., Sandre, O., Lecommandoux, S. **(2012)** Polymersomes in "Gelly" polymersomes: Toward structural cell mimicry. *Langmuir* Vol. 28 (4):2035-2043
- Mathivet, L., Cribier, S., and Devaux, P.F. **(1996)** Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophysical Journal.* 70:1112-1121

- Meng F., Engbers G.H.M. and Feijen J. **(2005)** Biodegradable polymersomes as a basis for artificial cells: encapsulation, release and targeting. *Journal of Controlled Release* 101:187-198
- Meng, F., and Zhong, Z. **(2011)** Polymersomes spanning from nano- to microscale: Advanced vehicles for controlled drug delivery and robust vesicle for virus and cell mimicking. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. Vol.2 (13): 1533-1539
- Meng, F., Hiemstra, C., Engbers, G., and Feijen, J. **(2003)**. Biodegradable Polymersomes. *Macromolecules*. 36:3004-3006
- Ming, T.S.Ch. **(2004)** Artificial Cell Bioencapsulation in Macro, Micro, Nano, and Molecular Dimensions: Keynote Lecture. *Artificial, Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*. Vol. 32, No.1, 1-23
- Mingxian, L., Lihuan, G., Lihua, Ch., Dazhang, Z., Zijie, X., Zhixian, H., Longwu, Ch. **(2012)** A novel liposome-encapsulated hemoglobin/silica nanoparticles as an oxygen carrier. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 427, Issue 2, 354-357
- Mitchell, J.D. and Ninham, B.W. **(1981)** Micelles, Vesicles and Microemulsiones. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, 77, 601-629
- Napolitano L.M. **(2009)** Hemoglobin-based Oxygen Carriers: First, Second or Third Generation? Human or Bovine? Where are we Now? *Critical Care Clinics*. 25:279-301
- Ness PM, Cushing MM **(2007)**. Oxygen Therapeutics. *Arch Phatol Lab Med*; 131:734-41.
- Opsteen, J.A., Cornelissen, J.J.L.M. and van Hest, J.C.M. **(2004)** Block copolymer vesicles. *Pure and Applied Chemistry*. 76, 1309-1319
- Palacios, A.J., Flores, R.H. y Guillot, J. **(1982)**. Caracterización de copolímeros. *Sociedad Química de México, México* 15-25
- Pata, V. and Dan, N. **(2003)** The effect of Chain Length on Protein Solubilization in Polymer- Based Vesicles (Polymersomes). *Biophysical Journal*. 85:2111-2118.
- Paul, D.R. **(2010)** Fundamentals of Transport Phenomena in Polymer Membranes. MESE 00043. University of Texas at Austin, Austin, TX, USA. Elsevier B.V. 1-10
- Phillips, W. T., Klipper, R. W., Vibhudutta, A. D., Rudolph, A. S., Cliff, R., Kwasiborski, V. and Goins, B. A. **(1999)** Polyethylene Glycol-Modified Liposome-Encapsulated Hemoglobin: A Long Circulating Red Cell Substitute. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 288: 665-670.
- Pratten, M.K., Lloyd, J.B., Hörpel, G., Ringsdorf, H. **(1985)** *Makrocol. Chem.* 186; 725 – 733

Radillo-González, A. **(2004)** Alternativas farmacológicas de la transfusión. *Gaceta Médica* Vol. 140, No. 3: S152-S156

Rameez, S., Bamba, I., Palmer, A.F. **(2010)** Large scale production of vesicles by hollow fiber extrusion: A novel method for generating polymersomes encapsulated hemoglobin dispersion. *Langmuir*. Vol. 26 (7):5279-5285

Rameez, S., Guzman, N., Banerjee, U., Fontes, J., Paulaitis, M.E., Palmer, M.E., Palmer, A.F., Patel, R.P. and Honavar, J. **(2012)** Encapsulation of hemoglobin inside liposomes surface conjugated with poly(ethylene glycol) attenuates their reactions with gaseous ligands and regulates nitric oxide dependent vasodilation. *Biotechnology. Progress*, 28:636-645

Richardson, J.J., Teng, D., Björnmalm, M., Gunawan, S.T., Guo, J., Cui, J., Franks, G.V. and Caruso, F. **(2014)** Fluidized Bed Layer by Layer Microcapsule Formation. *Langmuir*, 30 (33) pp 10028-10034.

Rodríguez, F. **(1984)** Principios de Sistemas de Polímeros. 2da. Edición. Ed. El Manual Moderno, S.A. de C.V. pp 157-167.

Rodríguez, M.H. **(2011)** Enfermedades infecciosas por transfusión en México. *Rev. Mex. Med. Tran.*, Vol. 4, Núm. 2: 78-90

Rojo J. **(2009)** Tamizaje de la enfermedad de Chagas en bancos de sangre. Situación actual en México. *Memorias del Centenario del descubrimiento de la Enfermedad de Chagas*, Fac. de Medicina, UNAM, 41-43

Rojo, J. **(2010)** El Centro Nacional de Transfusión Sanguínea. *Rev. Med. Hosp. Gen. Mex.* 73(4):209-210

Sakai, H. **(2012)** Present Situation of Development of Cellular-Type Hemoglobin-Based Oxygen Carrier (Hemoglobin-Vesicles). *Current Drug Discovery Technologies*, Vol. 9, No. 3, 188-193

Sakai, H., Sou, K., Horinouchi, H., Kobayashi, K., and Tsuchida, E. **(2010)** Hemoglobin-vesicle, a cellular artificial oxygen carrier that fulfills the physiological roles of the red blood cell structure. *Oxygen Transport to Tissue XXXI Advances in experimental Medicine and Biology* Vol. 662: 433-438

Salazar, B.Y., Makena, C.H., Martini, J., Messmer, C., Frienesenecker, B., Cabrales, P., Tsai, A.G., and Intaglietta, M. **(2011)**. Vasoactive hemoglobin improves survival in hemodilution followed by hemorrhagic shock. *Critical Care Medicine* 39(6):1461-1466

Sánchez-Guerrero, S.A. **(2010)** La seguridad de la transfusión sanguínea en México. *Rev. Medicina Universitaria* 12(46): 79-83

Schumacher Y. O. and Ashenden M. **(2004)** Doping with Artificial Oxygen Carriers. *Sports Medicine.*, 34: 141-150.

- Serrano, J.J.M., Villareal, E.R., Galicia, L.R., Vargas, E.R.D., Martínez, L.G. y Mejía, A.F.D. **(2009)** Detección de anticuerpos circulantes en donantes de sangre en México. *Rev. Panam. Salud Publica/Pan. Am. J. Public Health* 26 (4): 355-359
- Serrano, X.V. **(2006)** Hemotransfusión como factor de riesgo en cirugía cardíaca. *Archivos de Cardiología de México*. Vol.76. Supl. 2/S2, 86-91
- Shah, J.M., N.H. Shah, P.D. Hadiya **(2014)** Recent Advances in Novasome Formulation Technology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. Vol. 7 (2) April 2407-2411
- Shander, A. and Goodnough, L.T. **(2009)** Why an Alternative to Blood Trnasfusion?. *Critical Care Clinic*. 25: 261-277
- Sharma A., Arora, S., Grewal, P., Dhillon, V., Kumar, V. **(2011)** Recent Innovations in Delivery of Artificial Blood Substitute: A Review. *International Journal of Applied Pharmaceutica*, Vol. 3, (2): 1-5
- Shin-Hyun, K., Ho Cheung, S., Woong, J., Jun-Cheol, Ch., Weitz, D.A. **(2011)** Multiple Polymersomes for programmed release of multiple components. *Journal of American Chemical Society*. Vol. 133 (38): 15165-15171
- Soney, C.G. and Sabu, T. **(2001)** Transport phenomena through polymeric systems. *Progress in Polymer Science*. 26: 985-1017
- Soo, P.L. and Eisenberg, A. **(2004)** Preparation of Block Copolymer Vesicles in Solution. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics* 42: 923-938
- Tanner, P., Baumann, P., Enea, R., Onaca, O., Palivan, C., Meier, W. **(2011)** Polymeric vesicles: From drug carriers to nanoreactors and artificial organelles. *Accounts of Chemical Research*. Vol. 44 (10):1039-1049
- Tao, Z. and Ghoroghchian, P. **(2014)** Microparticle, nanoparticle and stem cell-based oxygen carriers as advanced blood substitutes. *Trends in Biotechnology* Vol. 32 (9) 466-473.
- Tena, C.T. y Sánchez, J.M.G. **(2005)** La transfusión sanguínea y los derechos del paciente. *Rev. CONAMED*, Vol. 10, Núm. 2, 20-26
- Teramura, Y., Kanazawa, H., Sakai, H., Takeoka, S. and Tsuchida, E. **(2003)** Prolonged Oxygen-Carrying Ability of Hemoglobin Vesicles by Coencapsulation of Catalase in Vivo. *Bioconjugate Chemistry*, 14: 1171-1176.
- Thorsen, T., Roberts, R.W., Arnold, F.H. and Quake, S.R. **(2001)** Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device. *Physical Review Letters*. Vol. 86, 18: 4163-4166

Tice, J.D., Song, H., Lyon, A.D. and Ismagilov, R.F. (2003) Formation of Droplets and Mixing in Multiphase Microfluidics at Low Values of Reynolds and the Capillary Numbers. *Langmuir*, 19, 9127-9133

Tice, J.D., Song, H., Lyon, A.D. and Ismagilov, R.F. (2004) Effects of viscosity on droplet formation and mixing in microfluidic channels. *Analytica Chimica Acta* 507: 73-77

Titora, J.G., Grobowski, R.S. (2000) "Principios de Anatomía y Fisiología". Ed. Oxford, 9nov. Edición. México. 636-638

Tsai, A.G., Cabrales, P., Young, M.A., Winslow, R.M. and Intaglietta, M. (2014) Effect of oxygenated polyethyleneglycol decorated hemoglobin on microvascular diameter and functional capillary density in the transgenic mouse model of sickle cell anemia. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 1-8 (doi: 10.3109/21691401.2014.936063)

Tsuchida, E., Komatsu, T., Yanagimoto, T., and Sakai, H. (2002) Preservation stability and in vivo administration of albumin-heme hydride solution as entirely synthetic oxygen-carrier. *Polymer Advances Technology* 13:845-850

Utada, A.S., Lorenceau, E., Link; D.R., Kaplan, P.D., Stone, H.A. and Weitz, D.A. (2005) Monodisperse Double Emulsions Generated from a Microcapillary Device. *Science* 308, 537-541

Xu, J.P., Chen, V.W. and Shen, J.C. (2004) Novel Biomimetic Polymersomes as Polymer Therapeutics of Drug Delivery. *Journal Controlled Release* 107:502-512

Zhang, L. and Eisenberg, A. (1998) Formation of Crew-cut Aggregates of Various Morphologies from Amphiphilic Block Copolymer in solution. *Polym. Adv. Technol.* 9, 677-699

Zhang, S., Luo, N., Li, S., Zhou, W., Liu, J., Yang, C., Xu, X., Gong, G., Liu, Y., Wu, W. and Li, T. (2014) Inhibition of Bka channel currents in vascular smooth muscle cells contributes to HBOC-induced vasoconstriction. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 1-4 (doi: 10.3109/21691401.2014.930746)

## CAPÍTULO II

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 2.0 Objetivo General

Desarrollo de una célula artificial, a partir de polimerosomas, que contenga como base hemoglobina (Hb) y que cumpla con las propiedades de transporte de oxígeno.

#### 2.1 Objetivos Específicos

- A. Sintetizar el copolímero de poli (ácido acrílico)-poli (acrilato de butilo) de bajo peso molecular que funcionara como membrana sintética para el desarrollo del polimerosoma.
- B. Caracterizar los copolímeros de PAA-PBA mediante las técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopia infrarroja (IR) y cromatografía de permeación en gel (GPC)
- C. Seleccionar los copolímeros de PAA-PBA que permitan la síntesis del polimerosoma.
- D. Síntesis de los polimerosomas con carga de hemoglobina (Hb)
- E. Caracterización del polimerosoma-Hb mediante la determinación del porcentaje de encapsulación de hemoglobina, distribución del tamaño de la vesícula y formación de la bicapa polimérica mediante la microscopía de luz.
- F. Determinar la permeabilidad del oxígeno a través de la membrana polimérica del polimerosoma
- G. Comparar las características físicas del eritrocito con el polimerosoma-Hb
- H. Determinar las propiedades reológicas del polimerosoma mediante la elaboración de una suspensión de estos en una solución de poliacrilamida.

#### 2.2 Justificación

La encapsulación de la Hb en vesículas permite ciertas ventajas en la manipulación de sus propiedades fisicoquímicas y una vida media más larga (*Riess, J. G., 2001*); así mismo, se pueden co-encapsular enzimas reductasas que suprimirían la formación de meta hemoglobina (*Wright, R.O. et al. 1996; Teramura, Y. et al. 2003; Takeoka, S. et al. 1997*).

En este sentido, los dos tipos de encapsulación, hasta ahora estudiados, son las nanocápsulas (ácido poliláctico y poliglicólico) y liposomas compuestos por

fosfolípidos. Ambas membranas sintéticas no contienen grupos antigénicos en su superficie, de manera que se facilita que sean potenciales acarreadores de oxígeno.

Los liposomas son permeables al agua y moléculas no polares, tal como el oxígeno; el tamaño de la partícula puede ser mayor de 100 nm, con lo cual se puede prevenir su filtración por los capilares y los túbulos renales, la desventaja que se presenta es que el período de circulación es de 12 a 18 horas (*Phillips, W. TR. et al. 1999; Farmer, M. C. and Gaber, B. P. 1987*) y después de varios días de almacenamiento se presenta agregación intervesicular y fusión. Para resolver esta problemática el liposoma fue conjugado con polietilenglicol (PEG), aumentando su vida de 36 a 48 horas. Sin embargo, la densidad de superficie y la longitud de la cadena del PEG para formar una bicapa en el liposoma está severamente limitada (*Shimada, K. et al. 2000; Bedu-Addo, F. K et al. 1996*) además de que se ha observado que se da una activación del sistema del complemento (reacción inmunológica) y activación de enzimas proteolíticas.

Las nanocápsulas son más fuertes y porosas que los liposomas, sin embargo, pequeñas moléculas hidrofílicas y proteínas pueden atravesar la membrana (*Arifin, D. R. and Palmer, A. F. 2003; Chang T. M. S.1999; Wallace, Maxwell and Caughey, 1974*).

A la luz de estos resultados se hace necesario continuar en el desarrollo de substitutos de sangre artificial confiable HBOC (Hemoglobin-based oxygen carriers de sus siglas en inglés) (<http://www.jdaross.mcmail.com/cell2.htm>15 nov.209.11:45 pm).

Con base a lo anterior, el propósito de esta investigación es desarrollar un prototipo de célula artificial tipo eritrocito a partir de un polimerosoma de PAA-PBA, que cumpla con las características fenomenológicas de esta célula in vivo y su capacidad de transporte de oxígeno.

### **2.3 Hipótesis de trabajo**

Si la versatilidad en la síntesis química de los copolímeros permite determinar el grosor de la membrana, la funcionalidad de la superficie y la cinética de degradación, entonces con la síntesis al azar de un copolímero formado con PAA-PBA que contenga hemoglobina, se logrará que el sistema desempeñe la función del transporte y liberación de oxígeno y sea considerado como un prototipo de célula artificial.

## Referencias

- Arifin, D. R. and Palmer, A. F. (2003). Determination of Size Distribution and Encapsulation Efficiencies of Liposomes Encapsulated Hemoglobin by Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation and Multi-Angle Light Scattering. *Biotech. Prog.*, 19: 1798-1811
- Bedu-Addo, F. K., Tang, P., Xu, Y. and Huang, L. (1996). Effect of Polyethyleneglycol Chain Length and Phospholipid Acyl Chain Composition in the Interaction of Polyethyleneglycol-Phospholipid Conjugates with Phospholipid: Implications in Liposomal Drug Delivery. *Pharm. Res.*, 13: 710-717
- Chang T. M. S. (1999) Future Prospects for Artificial Blood. *Trends Biotechnol.*, 17: 61-67
- Discher D.E. and Ahmed F. (2006). Polymersomes. *Annu.Rev.Biomed.Eng.* 8:323-41
- Farmer, M. C. and Gaber, B. P. (1987) Liposome-Encapsulated Hemoglobin as an Artificial.Oxygen-Carrying System. *Methods Enzymol.*, 149: 184-200
- Phillips, W. TR., Klipper, W., Awasthi, V. D., Rudolph, A. S., Cliff, R., Kwasiborski V. and Goins, B. A. (1999) Polyethylene Glycol-Modified Liposome-Encapsulated Hemoglobin: A Long Circulating Red Cell Substitute. *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, 288: 665-670.
- Riess, J. G. (2001) Oxygen Carriers ("Blood Substitutes")-Raison d'Etire, Chemistry and Some Physiology. *Chem. Rev.*, 101: 2797-2919
- Shimada, K., Matsuo, S., Sadzuka, Y., Miyagishima, A., Nozawa, Y., Hirota, S. and Sonobe, T. (2000). Determination of Incorporated Amounts of Poly(ethylene glycol)-Derivatized Lipids in Liposomes for the Physicochemical Characterization of Stealth Liposomes. *Int. J. Pharm.*, 203: 255-263
- Takeoka, S., Sakai, H., Kose, T., Mano, Y., Seino, Y., Nishide, H. and Tsuchida, E. (1997) Methemoglobin Formation in Hemoglobin Vesicles and Reduction by Encapsulated Thiols. *Bioconjugate Chem.*, 8: 539-544.
- Teramura, Y., Kanazawa, H., Sakai, H., Takeoka, S. and Tsuchida, E. (2003) Prolonged Oxygen-Carrying Ability of Hemoglobin Vesicles by Coencapsulation of Catalase in Vivo. *Bioconjugate Chem.*, 14: 1171-1176.
- Wallace, W. J. J., Maxwell, C. and Caughey, W. S. A. (1974) Role for Chloride in the Autoxidation of Hemoglobin under Conditions Similar to Those in Erythrocytes. *FEBS Lett.*, 43: 33-36.
- Wright, R. O., Magnani, B., Shannon, M. W. and Woolf, A. D. (1996) N-Acetylcysteine Reduces Methemoglobin in Vitro. *Ann. of Emergency Med.*, 28: 499-503.

## CAPÍTULO III

### PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.0 Reactivos y equipo

Ácido acrílico anhidro (Fluka), acrilato de butilo (Fluka), peróxido de benzoílo (Aldrich), estándares de poliestireno (Supelco), tetrahidrofurano HPLC (J.T.Baker), glicerol (J.T.Baker), baño de recirculación Lauda Brinkman RM6, Ultrasonido Vibra-cell, calorímetro Diferencial de Barrido (DSC-7) de Perkin- Elmer, cromatógrafo Shimatzu que consta de una bomba isocrática LC-10 AD, horno CTO-10 AD y detector de índice de refracción RID-10 A, columnas TSK gel<sup>TM</sup> GM-HHR-M de 30 cm x 7.8 mm ID, 5µm, tensiómetro de Du-Noüy, para la espectroscopia infrarroja el Spectrum 400 para IR/FIR Perkin- Elmer y para medir el oxígeno disuelto Dissolved Oxygen Meter HI9146 Hanna.

#### 3.1 Síntesis del copolímero poliácido acrílico-poliacrilato de butilo (PAA-PBA)

Se planteó un diseño factorial 2<sup>5</sup> (*Russell, K.G et.al. 2004: Voelkel, J.G. et al. 2005*) para determinar las condiciones de síntesis al azar del copolímero PAA-PBA, para obtener pesos moleculares bajos del copolímero que cumplan con las características de permeabilidad y flexibilidad.

Se seleccionaron como variables del proceso de síntesis: temperatura entre 60°C y 75°C, ultrasonido con frecuencias entre 50 y 100 amplitud en Hertz, tiempo de reacción entre 15 y 20 min, cantidad del iniciador entre 2.0 y 4.0 mg y la relación molar de los monómeros entre 1:2 (ácido acrílico:butil acrilato).

Para determinar la cantidad de experimentos a realizar en combinación con el factor bajo y el factor alto de las variables se empleó el paquete estadístico JMP 8 SAS Institute Inc., Cary, NC, ver *tabla 9*. Siendo la variable de respuesta el peso molecular de cada copolímero sintetizado.

##### 3.1.1 Determinación del peso molecular por cromatografía en permeación en gel (GPC)

Se construyó una curva de poliestireno en un intervalo de peso molecular de 250 – 9000 g/mol en una concentración de 10 mg/mL en THF. Condiciones del equipo: inyectar 50 µL de la solución estándar de poliestireno, con temperatura del horno a 30°C y un flujo

volumétrico de 1.0 mL/min (Heyden, Y.V et al, 2003; Juan, C.A. et al, 2010). Se determinó la relación lineal de la curva de los estándares de poliestireno contra los tiempos de retención (tr).

**Tabla 9** Diseño factorial completo con la combinación de factores para la síntesis del copolímero PAA-PBA, obtenido del paquete estadístico JMP 8 SAS.

Fila	Diseño	Frecuencia	Relación molar	Tiempo	Cantidad de iniciador	Temperatura	PM
1	----+	50	1A:1B	10	-1	75	
2	+---+	100	1A:1B	15	1	50	
3	----+	50	1A:1B	10	1	75	
4	+---+	100	2A:1B	10	1	75	
5	+0+++	100	1A:2B	15	1	75	
6	+++--	100	2A:1B	15	-1	75	
7	+---+	50	2A:1B	15	-1	75	
8	----+	100	1A:1B	10	-1	50	
9	+---+	50	1A:1B	15	1	75	
10	+---+	100	1A:1B	15	1	75	
11	-0---	50	1A:2B	10	-1	50	
12	+0---	100	1A:2B	10	-1	50	
13	+++--	100	2A:1B	15	-1	50	
14	+0--+	100	1A:2B	10	-1	75	
15	+0--+	100	1A:2B	10	1	50	
16	+---+	100	1A:1B	10	-1	75	
17	+++--	100	2A:1B	15	1	75	
18	+0+++	100	1A:2B	15	1	50	
19	+0+++	100	1A:2B	10	1	75	
20	+---+	100	1A:1B	10	1	75	
21	-0+++	50	1A:2B	15	1	75	
22	+++--	50	2A:1B	15	1	50	
23	+---+	50	1A:1B	15	-1	75	
24	+++--	100	2A:1B	15	1	50	
25	+---+	50	1A:1B	15	1	50	
26	-0--+	50	1A:2B	10	1	50	
27	----+	50	1A:1B	10	-1	50	
28	+---+	50	2A:1B	15	-1	50	
29	+---+	50	2A:1B	10	-1	50	
30	+---+	100	1A:1B	15	-1	75	
31	+---+	50	2A:1B	10	1	75	
32	+---+	100	2A:1B	10	-1	75	
33	+0---	100	1A:2B	15	-1	50	
34	+---+	100	1A:1B	15	-1	50	
35	-0--+	50	1A:2B	10	1	75	
36	+---+	50	2A:1B	10	1	50	
37	-0--+	50	1A:2B	15	1	75	
38	-0---	50	1A:2B	15	-1	50	
39	----+	50	1A:1B	10	1	50	
40	+0--+	100	1A:2B	15	-1	75	
41	+---+	100	2A:1B	10	1	50	
42	+---+	50	2A:1B	10	-1	75	
43	+---+	50	1A:1B	15	-1	50	
44	-0--+	50	1A:2B	10	-1	75	
45	-0--+	50	1A:2B	15	1	50	
46	+---+	100	2A:1B	10	-1	50	
47	+---+	50	2A:1B	15	1	75	
48	+---+	100	1A:1B	10	1	50	

### 3.1.2 Determinación de la temperatura de transición vítrea (Tg) por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para la realización de la prueba se emplearon crisoles de aluminio sellados con 4.88 mg aproximadamente cada uno de los copolímeros PAA-PBA sintetizados. Las muestras fueron enfriadas a -70°C y equilibradas a esa temperatura durante 3 min, después fueron calentadas hasta 110°C, a una tasa de cambio de 1.0 °C/min bajo corriente de nitrógeno.

### 3.1.3 Determinación de la tensión superficial y de la concentración micelar crítica (CMC) de los copolímeros de PAA-PBA

Se preparan soluciones de los diferentes copolímeros de PAA-PBA en un intervalo de concentración de  $2.0 \times 10^{-4}$  M a  $60 \times 10^{-4}$  M y se analizarán de acuerdo a lo indicado en el apartado 1.3.1 y 1.3.2.

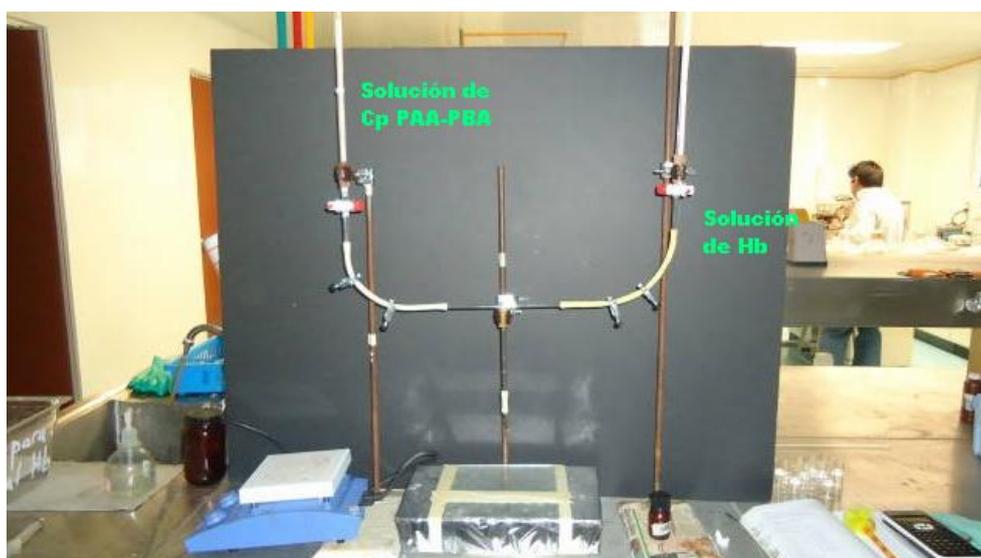
### 3.1.4 Caracterización del copolímero de PAA-PBA por espectro de infrarrojo

Las determinaciones se realizaron en Spectrum 400 FT/IR Perkin- Elmer.

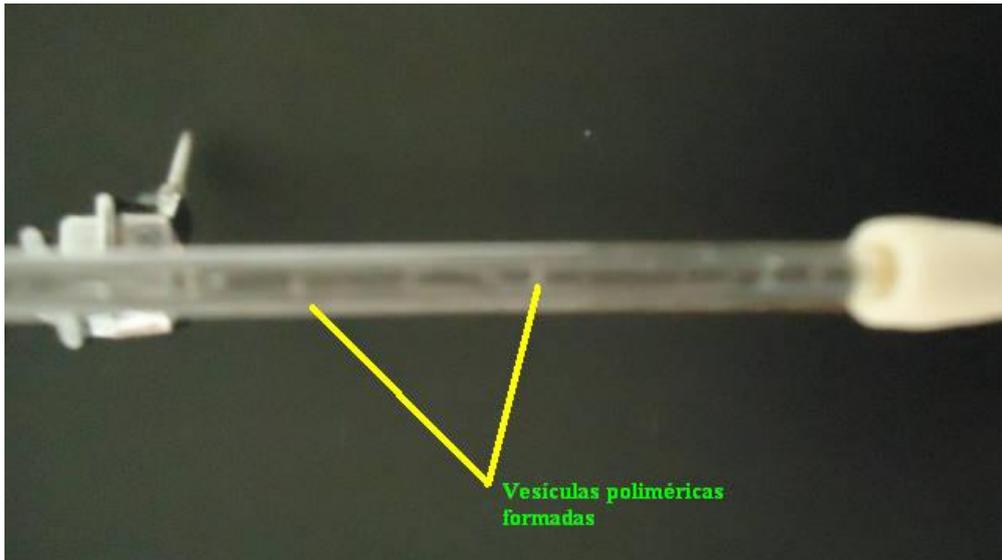
### 3.2 Síntesis del polimerosoma mediante un dispositivo en T de vidrio

Para la síntesis del polimerosoma se propone el empleo de la técnica de microfluidos en un dispositivo en T de vidrio con flujos convergentes y un flujo volumétrico 1.5 mL/min, para generar una doble emulsión que consiste en gotas de agua rodeada por una capa de disolvente orgánico (Okushima, S. et. al. 2004; Perro, A. et. al. 2011); el copolímero es disuelto en una mezcla orgánica de THF : Tolueno (50:50).

Los polimerosomas son formados por la evaporación completa del disolvente orgánico del armazón. La fase interna acuosa es una solución de hemoglobina y la fase externa es una mezcla que consiste de 80% (v/v) de glicerol en agua destilada. La evaporación causa que el copolímero anfifílico se ensamble, formando el polimerosoma ver *fig. 3.1*, *fig. 3.2* y *fig. 3.3*.



**FIGURA 3.1.** *Dispositivo en T para la elaboración de los polimerosomas*



**FIGURA 3.2.** *Vesículas poliméricas*



**FIGURA 3.3.** *Polimerosomas cargados con hemoglobina*

### **3.2.1 Cantidad de hemoglobina encapsulada por el polimerosoma**

La eficiencia de encapsulación durante la formación de los polimerosomas es importante para su aplicación (Lee, J.C.-M et al. 2001). Para determinar la eficiencia de encapsulación de hemoglobina por el polimerosoma elaborado con los diversos copolímeros de PAA-PBA, se procesa una curva de calibración de hemoglobina humana en un intervalo de concentración de 200 – 1000  $\mu\text{g/mL}$  en solución reguladora de fosfatos pH 7.4 y se leen en el espectrofotómetro a una longitud de onda de máxima

absorción de 430 nm (Yeo, Y. and Park, K., 2004). La eficiencia de encapsulación se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$EE = \frac{Hb \text{ encapsulada}}{Hb \text{ total}} \times 100 \quad (11)$$

### 3.3. Determinación de la difusión de oxígeno a través de la membrana polimérica

El procedimiento para determinar el paso del oxígeno a través de la membrana sintética (copolímero de PAA-PBA) del polimerosoma, se realiza lo siguiente:

- a) Adicionar 10 mL de una mezcla de glicerol: agua (50:50) a un vaso enchaquetado de 150 mL provisto con tapa, con un agitador magnético y conectado a un recirculador con agua a una temperatura de 37°C.
- b) Cerrar el vaso con la tapa y en agitación, dejar bajo extracción al vacío durante 24 horas.
- c) Pasado este tiempo, inyectar oxígeno durante 2 min y determinar la cantidad de oxígeno disuelto en la mezcla de glicerol: agua (50:50) por medio del oxígenometro, ver *fig. 3.4*, a una temperatura de 37°C.
- d) Adicionar 3.0 mL de los polimerosoma, agitar ligeramente durante un minuto y proceder con las determinaciones de la cantidad de oxígeno remanente.



**FIGURA 3.4** Medidor de oxígeno disuelto Hanna (HI9146)

## Referencias

Heyden Y.V., Popovici S.-T., Staal B.B.P., Schoenmakers P.J. **(2003)** Contribution of polymer standards' polydispersity to the observed band broadening in size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 986, 1-15

Juan C.A. y Bautista M.M.T. **(2010)** Relación estructura-propiedad de polímeros. *Educación Química*, 21 (4), 291-299

Lee, J.C.-M, Bermudez, H., Discher, B.M., Sheehan, M.A., Won Y.-Y, Bates, F.S. and Discher, D.E. **(2001)** Preparation, Stability, and In vitro Performance of Vesicles Made with Diblock Copolymers. *Biotechnol. Bioeng.* 73: 135-145

Okushima, S.; Nisisako, T; Torii, T; Kiguchi, T. **(2004)** Controlled Production of Monodisperse Double Emulsion by Two-Step Droplet Breakup in Microfluidic Devices. *Langmuir*, 20, 9905-9908

Perro, A., Nicolet, C., Anglie, J., Lecommandoux, S., Le Meins, J., Colin, A. **(2011)** Mastering a Double Emulsion in a simple Co-flow Microfluidic to Generate Complex Polymersomes. *Langmuir* Vol. 27 (14) 9034-9042

Russell, K.G., Lewis, S.M. & Dean, A. **(2004)** Fractional Factorial Designs for the Detection of Interactions between Design and Noise Factors. *Journal Applied Statistics*. Vol. 31, (5) 545-542.

Tanner, P., Enea, R., Onaca, O., Palivan, C., Meler, W. **(2011)** Polymeric Vesicles; From Drug Carriers to Nanoreactors and Artificial Organelles. *Accounts of Chemical Research*. Vol. 44 (10) 1039-1049

Voelkel, J.G. **(2005)** The Efficiencies of Fractional Factorial Designs. *Technometrics*. Vol. 47 (4) 488-494

Yeo, Y. and Park, K. **(2004)** Control of Encapsulation Efficiency and Initial Burst in Polymeric Microparticle Systems. *Arch. Pharm. Res.* Vol. 27, No. 1, 1-12,

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Determinación del peso molecular por cromatografía en permeación en gel (GPC)

La relación entre la variable dependiente (estándares de poliestireno de diferentes PM) y la variable independiente (tiempo de retención ( $t_r$ ) min) resultó ser lineal en el intervalo de los pesos moleculares de 250 – 9000 g/mol con una ordenada al origen de 23.587, una pendiente de -0.5861 y un coeficiente de correlación de 0.9911, ver *fig. 4.1* y en la *fig. 4.2* se muestra uno de los cromatogramas obtenidos.

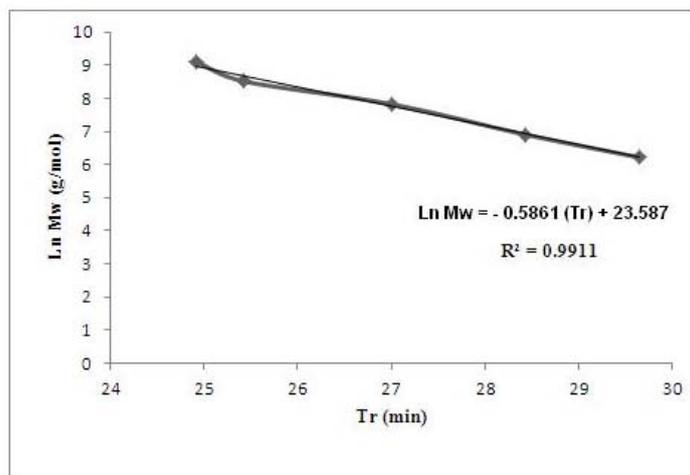
Con el empleo de esta técnica analítica permitió determinar el peso molecular promedio en número ( $M_n$ ); el cual está relacionado directamente con el grado de polimerización, que es una medida de la longitud de las cadenas poliméricas, además de que este valor está determinado por la fracción de bajo peso molecular, mientras que  $M_w$  (peso molecular promedio en peso) indica la fracción de alto peso molecular.

La relación  $M_w / M_n$  se emplea como una medida de la polidispersidad, que indica la homogeneidad de la muestra.

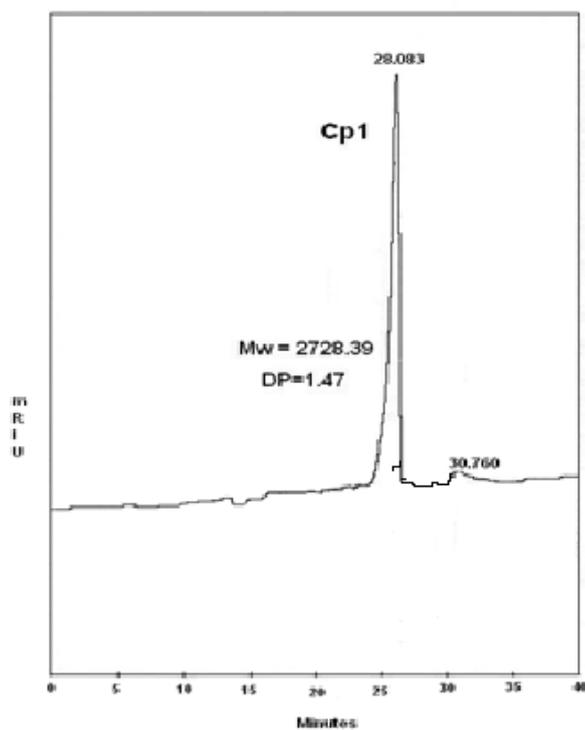
La longitud de las moléculas poliméricas tiene influencia notable en algunas de las propiedades de los polímeros, principalmente en las mecánicas (*Sauer and Pae ,1977; Meijer, H.E.H. and Govaert, L.E. 2005*).

Ki-Chang, L., Jai-Hyuk, H. & Kwang-Jea, K (2009) encontraron, que cuando el peso molecular del poliácido acrílico (PAA) decrece, el peso molecular del poliacrilato de butilo (PBA) aumenta junto con la velocidad de polimerización, mientras que el tamaño de partícula del PBA decrece debido a la formación del copolímero en bloque (PAA-PBA), el cual juega un papel importante en la estabilidad de la partícula.

Con los pesos moleculares de cada uno de los copolímeros de PAA-PBA determinados se ingresaron como variable de respuesta al diseño factorial completo que se mostró en la *tabla 9* con la finalidad de determinar el efecto de la temperatura, la frecuencia, el tiempo, la concentración del iniciador y la relación molar de los monómeros en el peso molecular por medio del paquete estadístico JMP 8 SAS Institute Inc., Cary, NC.



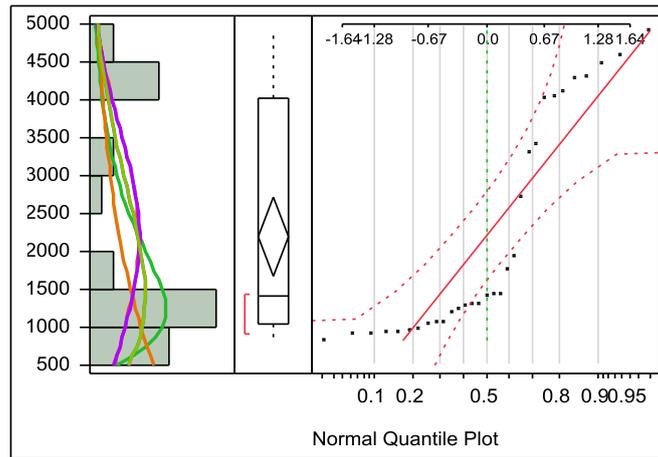
**FIGURA 4.1** Linealidad del método analítico por GPC para la determinación de los  $M_w$  de los copolímeros de PAA-PBA



**FIGURA 4.2** Cromatograma por GPC del copolímero de PAA-PBA

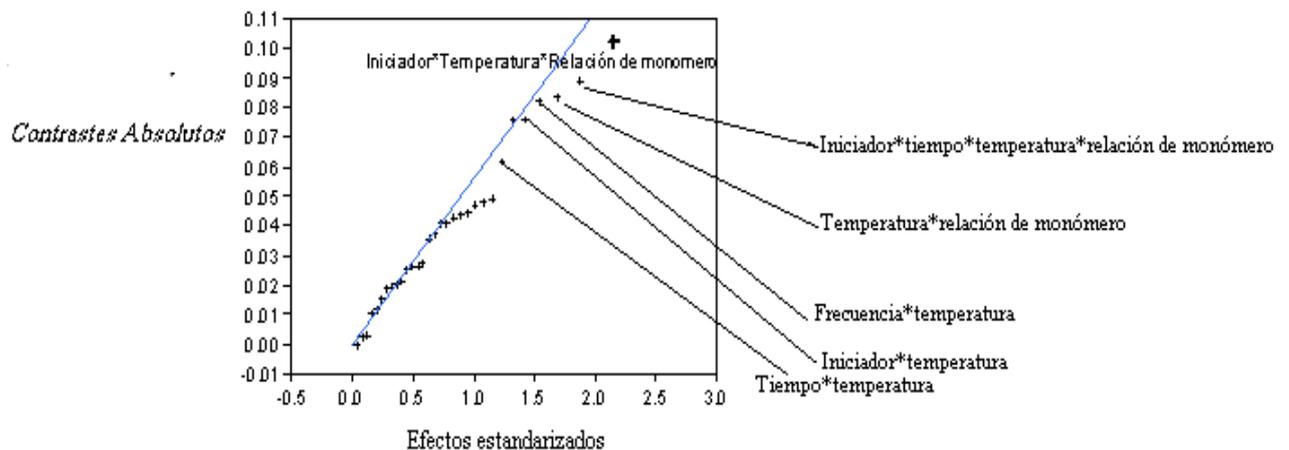
#### 4.1.1 Análisis estadístico de los pesos moleculares de los copolímeros de PAA-PBA obtenidos del diseño factorial $2^k$

Por medio del paquete estadístico se observa el grado de dispersión de los datos correspondientes a los pesos moleculares de los 46 copolímeros de PAA-PBA sintetizados al azar, cuyos pesos moleculares se encuentran en el intervalo de 500 a 5000 g/mol, ver la *fig. 4.3*.



**FIGURA 4.3.** Distribución de los pesos moleculares de los copolímeros de PAA-PBA por el diseño factorial  $2^k$ , determinados por el paquete estadístico JMP 8

En la *fig. 4.4* se observan los efectos principales de las variables del proceso sobre el peso molecular así como las interacciones entre ellas mediante los contrastes absolutos.

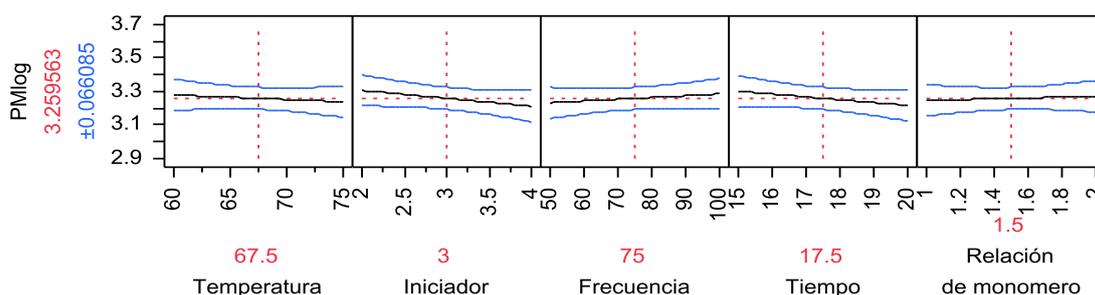


**FIGURA 4.4.** Efectos de las variables del proceso sobre el peso molecular de los copolímeros de PAA-PBA

En la *tabla 10* se muestra cómo la variable temperatura interactúa de manera significativa con el iniciador, con la frecuencia y con la relación del monómero. El efecto menos característico es con el tiempo. En la *fig.4.5* se observa el perfil de predicción con cambio de la pendiente de la variable temperatura y esta cómo influye en el cambio de la pendiente del iniciador, frecuencia, tiempo y relación de monómero, así como una propuesta de lo que sería el perfil deseable de la síntesis del copolímero de PAA-PBA para aminorar el grado de dispersión en los pesos moleculares.

**Tabla 10.** Efecto de la prueba del perfil de predicción de la síntesis del copolímero PAA-PBA

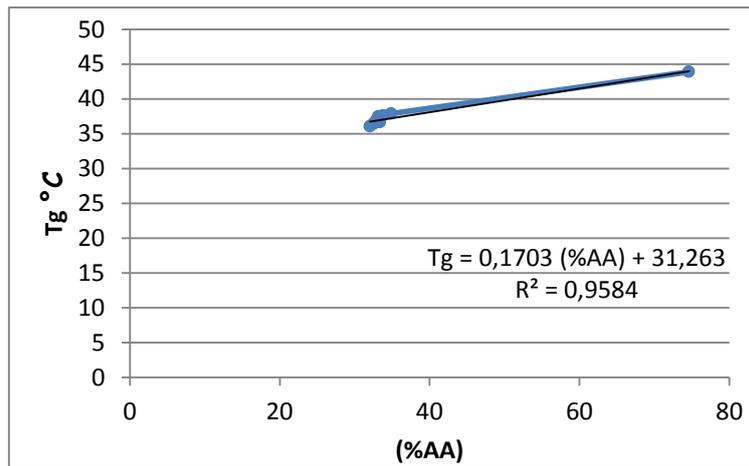
Fuente	Prob>ChiSq
Temperatura*iniciador	0.0294
Temperatura*frecuencia	0.0195
Temperatura*relación de monómero	0.0176
Temperatura*tiempo	0.0725



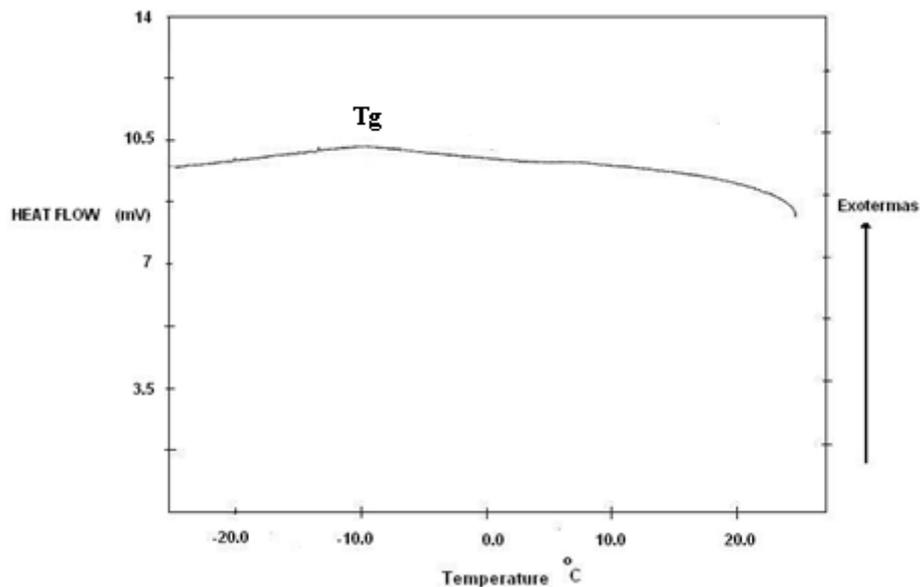
**FIGURA 4.5** Perfil de predicción de las variables involucradas en la síntesis del copolímero PAA-PBA

#### 4.1.2 Determinación de la temperatura de transición vítrea (Tg) por calorimetría diferencial de barrido (DCS)

La transición vítrea del homopolímero de acrilato de butilo (PBA) fue de  $-46.08^{\circ}\text{C}$  y el del homopolímero de ácido acrílico (PAA) fue de  $111.01^{\circ}\text{C}$  que coinciden con los reportados por Penzel et.al (1997). En la *fig. 4.6* muestra la gráfica del Tg con la composición del ácido acrílico en el copolímero (PAA-PBA) y en la *fig. 4.7* se observa el termograma. La ecuación de Gordon-Taylor explica la relación del Tg del copolímero con los datos experimentales de la síntesis de este.



**FIGURA 4.6.** Relación entre el Tg del copolímero PAA-PBA en función de la composición del monómero AA



**FIGURA 4.7** Termograma del copolímero PAA-PBA

Según esta ecuación, las unidades monoméricas del ácido acrílico (AA) contribuyen a la flexibilidad de la cadena y es aditiva. En la *tabla 11* se muestra la composición porcentual del monómero de ácido acrílico (AA) y del acrilato de butilo (BA) obtenido mediante la ecuación de Gordon-Taylor con sus respectivas Tg y polidispersidad, de los copolímeros de PAA-PBA que se seleccionaron en base a su peso molecular y se encuentran en el intervalo de 2000 a 5000 g/mol. En consecuencia, para pesos moleculares (PM) bajos puede encontrarse que la Tg disminuye, lo cual puede

explicarse considerando que, en un volumen dado, los polímeros de PM pequeño tienen más extremos de cadena que un polímero de PM mayor.

Se seleccionó este intervalo de pesos moleculares para abordar la propuesta de Arifin, D.R. (2005) como resultado de su propio desarrollo de polimerosomas cargado con hemoglobina en donde se menciona que las dispersiones de las vesículas poliméricas resultaron ser una mezcla de polimerosomas, micelas y copolímeros precipitado por lo que una solución es investigar ¿cuál sería el mínimo peso molecular necesario del copolímero para la completa formación del polimerosoma?

**Tabla 11.** Composición porcentual del monómero de ácido acrílico (AA) y del acrilato de butilo (BA) obtenido mediante la ecuación de Gordon-Taylor en el copolímero con sus respectivas Tg y polidispersidad

Cp	Tg (°C)	Mw (g/mol)	DP	% AA	%BA
<b>1</b>	<b>-2.90</b>	<b>2728.39</b>	<b>1.47</b>	<b>39.58</b>	<b>60.42</b>
<b>6</b>	<b>-8.99</b>	<b>3297.00</b>	<b>1.07</b>	<b>22.54</b>	<b>77.46</b>
7	-9.77	2539.21	1.34	21.96	78.04
8	-10.41	4048.00	1.49	21.62	78.38
13	-10.14	2744.03	1.67	21.59	78.51
24	-10.04	2814.64	1.75	21.55	78.45
39	-9.00	4299.88	1.20	21.32	78.68
<b>40</b>	<b>-10.74</b>	<b>4707.21</b>	<b>1.46</b>	<b>21.11</b>	<b>78.89</b>
41	-9.86	4488.39	1.19	20.84	79.16
42	-9.33	2432.57	1.17	21.96	78.04
44	-10.11	2128.70	1.60	21.35	78.65

Con los resultados anteriores observamos que los valores de la temperatura de transición vítrea (Tg) de los copolímeros se encuentran dentro del intervalo del TgA del homopolímero de acrilato de butilo (PBA) de -46.08°C y el TgB del homopolímero de ácido acrílico (PAA) de 111.01°C, mientras mayor sea la distancia entre las cadenas su Tg es más baja y esto es atribuible al aumento del volumen libre entre las cadenas (-CH<sub>2</sub>-) favoreciendo la flexibilidad; la permeabilidad de la membrana que puede ser ajustada por el cambio de Tg del bloque hidrofóbico.

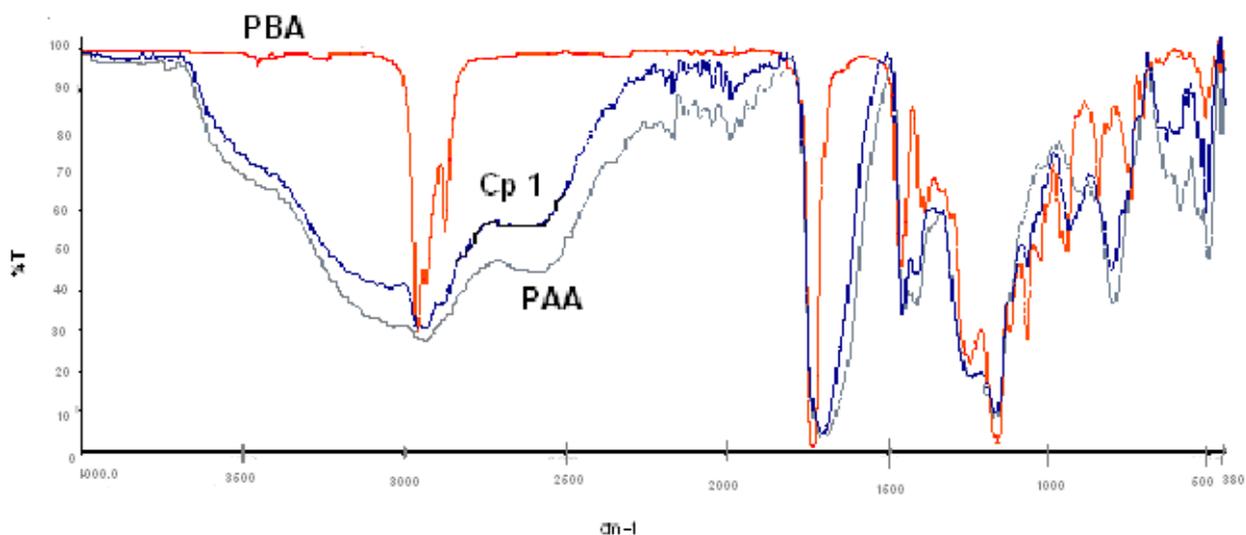
Tomando en cuenta la información de la temperatura de transición vítrea (Tg) y como se sabe que a una baja Tg, los polimerosomas se pueden formar directamente en medio

acuoso se seleccionaron al Cp1 con una Tg de -2.90, Cp6 con una Tg de -8.99 y Cp40 con una Tg de -10.74 °C, con un porcentaje de la parte hidrofílica del 39.58%, 22.54% y 21.11% respectivamente que es coincidente con la proporción que presentan los lípidos naturales, asimismo la contribución de la parte hidrofóbica fue: Cp1 del 60.42%, Cp6 del 77.46% y Cp40 del 78.89 .

En relación a la parte hidrofílica (AA) e hidrofóbica (BA) Discher y Eisenberg (2002) propusieron una ley empírica general en la que se establece que los copolímeros que poseen una fracción en peso hidrófila mayor 50%; probablemente formarán micelas esféricas, mientras que aquellos con menos de 25% se autoensamblan en micelas invertidas (hidrofílica-hidrofóbica). A su vez, predicen que los copolímeros con una fracción en peso hidrófila situada entre 25-50% formarán polimerosomas. De acuerdo a esta ley empírica se esperaba, que experimentalmente, el copolímero Cp1 con 39.58% de AA forme vesículas, mientras que los copolímeros Cp6 22.54% de AA y el Cp40 con 21.11% AA formen micelas invertidas

#### 4.1.3 Caracterización del copolímero de PAA-PBA por espectroscopia de infrarrojo

En la *fig. 4.8* muestra el espectro del copolímero de PAA-PBA (Cp1) comparado con el espectro de sus respectivos homopolímeros de acrilato de butilo (PBA) y ácido acrílico (PAA).

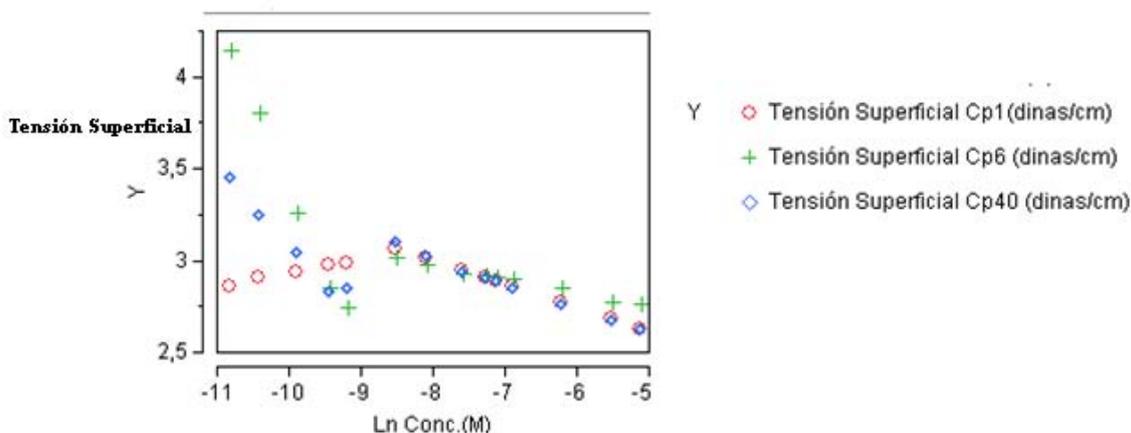


**FIGURA 4.8.** Infrarrojo comparativo del copolímero PAA-PBA con sus respectivos homopolímeros

La comparación entre los espectros de infrarrojo de los homopolímeros de PAA, PBA y el copolímero de PAA-PBA ponen en evidencia la copolimerización de los monómeros de (ácido acrílico) AA y (acrilato de butilo) BA debido a las bandas de absorción que se observan: en la señal de 1800 a 1600  $\text{cm}^{-1}$  este pico se debe al doble enlace  $\text{C} = \text{C}$  sin que haya una extensión de la vibración; el pico ancho de absorción a 3000  $\text{cm}^{-1}$  y la señal 2600-2800  $\text{cm}^{-1}$  debido al grupo  $-\text{COOH}$  desaparece. El pico de absorción 1733  $\text{cm}^{-1}$  pertenece a la extensión de la vibración de  $\text{C} = \text{O}$  y el pico de absorción 2872  $\text{cm}^{-1}$  es la extensión de la vibración de  $-\text{CH}_3$ , este espectro coincide con el obtenido por *Jing, H. et.al 2008*.

#### 4.1.4 Determinación de la Concentración micelar crítica por medio de la Tensión Superficial de los copolímeros Cp<sub>1</sub>, Cp<sub>6</sub> y Cp<sub>40</sub>

Debido a que el copolímero PAA-PBA tiene propiedades anfífilas fue posible determinar la CMC en el intervalo de concentración de  $2.0 \times 10^{-4} \text{ M}$  a  $60 \times 10^{-4} \text{ M}$ , como se observa en la *fig. 4.9*.



**FIGURA 4.9.** Determinación de la CMC del copolímero PAA-PBA por medio de la tensión superficial

Cuando la concentración del agente tensoactivo se incrementa, la tensión superficial continua decreciendo, hasta que ya no hay un cambio en la tensión superficial atribuible a la auto-asociación a bajas concentraciones, los anfífilos pueden lograr un adecuado decremento en la energía libre del sistema por acumulación en la superficie o interfase de tal forma que se elimina el grupo hidrofóbico del medio acuoso, situación que coincide para el copolímero Cp<sub>6</sub> y Cp<sub>40</sub> en donde se puede observar un decremento rápido de la tensión superficial, siendo diferente para el copolímero Cp<sub>1</sub> en el cual, el

cambio de tensión superficial es más suave; este comportamiento se puede deber a la diferente composición hidrofílica e hidrofóbica del copolímero, siendo semejantes entre el Cp6 y Cp40 y diferente para el Cp1 como se puede observar en la *tabla 12*. Las micelas están en equilibrio dinámico con las moléculas libres en la solución, la micela continuamente se rompe y se forma. A partir de estas concentraciones se formaran micelas espontáneamente (*Lasic, D. 1988*)

**Tabla 12.** *Concentración micelar crítica para el copolímero de PAA-PBA (Cp1, Cp6 y Cp40) con su respectiva proporción de monómeros.*

<b>Copolímero</b>	<b>CMC (M)</b>	<b>% AA</b>	<b>% BA</b>
Cp 1	$2.28 \times 10^{-4}$	39.58	60.42
Cp 6	$6.32 \times 10^{-5}$	22.54	77.46
Cp 40	$2.30 \times 10^{-4}$	21.11	78.89

#### **4.2 Síntesis del polimerosoma a partir de los copolímeros de (PAA-PBA) mediante un dispositivo en T de vidrio**

En base a lo expuesto en el apartado **1.6** se calculó el número de Reynolds y el número de capilaridad Ca para cada copolímero de PAA-PBA seleccionado, estos se muestran en la *tabla 13*.

**Tabla 13.** *Número de Capilaridad y Número de Reynolds determinados para cada copolímero de PAA-PBA en el dispositivo en T*

<b>Copolímero PAA-PBA</b>	<b>No de Reynolds (Re)</b>	<b>No. de Capilaridad (Ca)</b>
Cp1	8.20	$5.1673 \times 10^{-4}$
Cp6	8.51	$5.4035 \times 10^{-4}$
Cp40	6.07	$7.4981 \times 10^{-4}$

Con base a los resultados tenemos: **a)** antes de ponerse en contacto los dos fluidos inmiscibles en el cruce del dispositivo en T, primero deben de humectar las paredes, **b)** cuando los dos fluidos inmiscibles entran en contacto en el cruce de la T, se forma una emulsión donde un líquido se dispersa en otro, originando zonas de transición: la primera zona, en el cual el perfil de flujo es parabólico con el fluido en el centro del movimiento capilar a una velocidad más alta que el fluido cerca de las paredes.

Adicionalmente la dispersión también se produce debido a la difusión y el mezclado de las dos fases inmiscibles, de tal manera que se forma la gotita en la unión T; la segunda zona de transición, es el movimiento de esta en el canal y la tercera zona es el movimiento en el fluido lo que origina ligeras modificaciones del flujo en la superficie de la gota que afecta el movimiento de la gota vecina; este comportamiento en el dispositivo se explica por el número de Re crítico ( $Re_c$ ), este número determina el umbral entre el comportamiento laminar y turbulento en el movimiento de un fluido y se habla de flujos de transición.

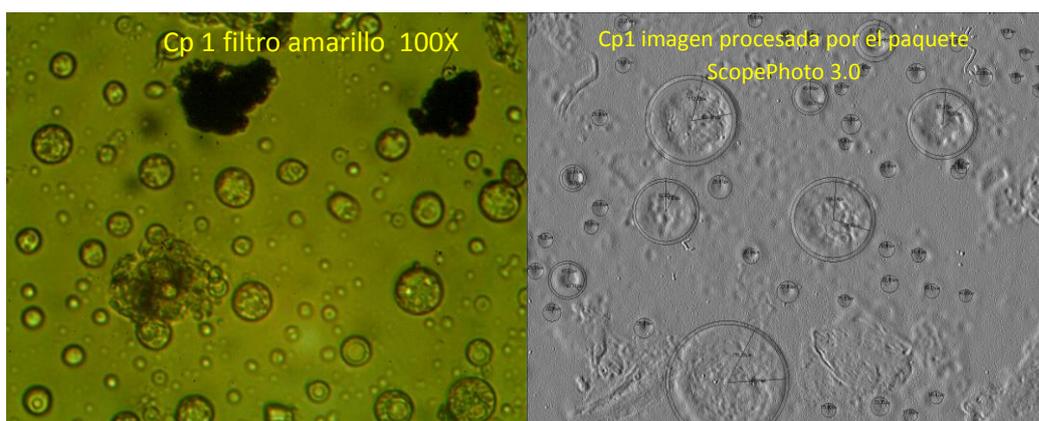
Los valores del número de Reynolds quedan expresados:  $Re < 1$  fuerzas viscosas dominantes,  $Re > 1$  fuerzas de inercia dominantes.  $Re > Re_c$  régimen turbulento (longitud característica: longitud del lado en dirección al flujo; geometría: placa plana),  $Re < Re_c$  régimen laminar (longitud característica: diámetro; geometría: cilindro vertical); por los valores observados en la *tabla 13* para el número de Re tenemos que el comportamiento del fluido es laminar.

Los valores típicos para el número de capilaridad (Ca) están en el orden de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$ , mostrando que las fuerzas capilares dominan el sistema contra las fuerzas viscosas (*Dreyfus, R. et al. 2003; Xu, J.H. et al 2006*), los valores del número de capilaridad calculados para cada copolímero (Cp1, Cp6 y Cp40) están en el orden  $10^{-4}$  coincidente en que la tensión superficial es la dominante.

#### **4.2.1 Distribución del tamaño de la vesícula formada (Polimerosoma)**

Se observaron las vesículas formadas por cada copolímero de PAA-PBA (Cp1, Cp6 y Cp40) con el microscopio de luz, empleando el objetivo de 100x; se tomaron fotografías y se procesaron las imágenes con el paquete ScopePhoto 3.0. Se determinó el número de vesículas formadas por cada copolímero de PAA-PBA, asimismo se determinó el tamaño de la vesícula por la medida del diámetro, ver *fig.4.10*.

La formación de vesícula totales para cada copolímero fueron: Cp1 con 334, Cp6 con 244 y Cp 40 con 585, quedando distribuidas de la siguiente manera: para el copolímero Cp1, formándose 63 vesículas de 16.37  $\mu\text{m}$  de diámetro, 132 de 23.92  $\mu\text{m}$ , 101 de 34.03  $\mu\text{m}$  y 38 de 44.68  $\mu\text{m}$ ; en el caso del copolímero Cp6 fueron 69 vesículas de 13.68  $\mu\text{m}$  de diámetro, 59 de 24.9  $\mu\text{m}$ , 79 de 34.39  $\mu\text{m}$  y 37 de 44.87  $\mu\text{m}$  y para el copolímero Cp40 se formaron 50 vesículas de 17.12  $\mu\text{m}$  de diámetro, 302 de 25.04  $\mu\text{m}$ , 159 de 34.0  $\mu\text{m}$ , 74 de 43.5  $\mu\text{m}$ .



**FIGURA 4.10** Imagen del Cp1 observada en el microscopio con el objetivo 100x con filtro amarillo y en la fotografía en gris con el procesador de imagen del paquete ScopePhoto 3.0

La distribución de los diferentes diámetros que se obtuvieron se puede atribuir al flujo volumétrico, debido a que al inicio del proceso éste fue de 1.57 mL/min y al final del proceso fue de 1.2 ml/min, esto debido al cambio de la presión hidrostática. Se realizó un tratamiento estadístico de los datos y se determinó el valor  $D_L$  (diámetro promedio que se basa en la longitud),  $A_{prom.}$  (área promedio) y  $V_{prom}$  (volumen promedio) ver tabla 13

**Tabla 14** No. de capilaridad y el diámetro promedio, área promedio y volumen promedio de las vesículas para cada copolímero de PAA-PBA

Copolímero PAA-PBA	No. de Capilaridad (Ca)	Vesículas		
		$D_L \mu\text{m}$	$A_{prom} \mu\text{m}^2$	$V_{prom} \mu\text{m}^3$
Cp1	$5.1673 \times 10^{-4}$	27.91	30.59	33.14
Cp6	$5.4035 \times 10^{-4}$	27.82	32.02	35.15
Cp40	$7.4981 \times 10^{-4}$	29.13	30.97	32.82

En la *tabla 14* se puede observar la relación entre el número de capilaridad (Ca) y los diámetros ( $D_L$ ) de las vesículas: para Cp1 27.91  $\mu\text{m}$ , Cp6 27.82  $\mu\text{m}$  y Cp 40 29.13  $\mu\text{m}$ , se corrobora que la tensión superficial es dominante ya que cuando el tamaño de la gota

es menor que el ancho del microcanal ( $d_{int}$  del dispositivo es de  $3.8\mu\text{m}$ ) las gotitas son suficientemente pequeñas, la humectabilidad debida por las paredes de los canales no son importantes y la ruptura para la formación de la gota se basa en el esfuerzo de la corriente impuesta (Tice, J.D. et al 2004). En la *tabla 15* se muestra la capacidad estimada de encapsulación de las vesículas de Cp1, Cp6 y Cp40.

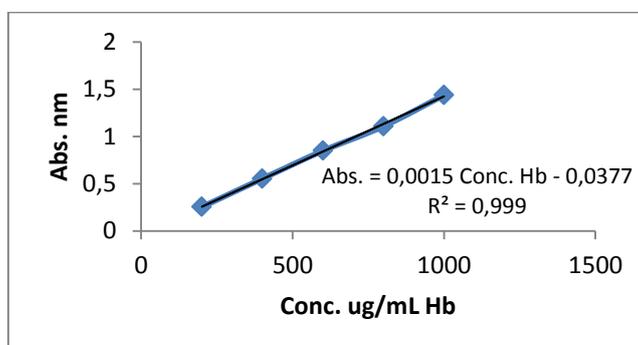
**Tabla 15.** Capacidad estimada de encapsulación en porciento para cada tamaño de vesícula de cada copolímero de PAA-PBA

Cp1			Cp6			Cp 40		
No de vesículas	Tamaño de vesícula ( $\mu\text{m}$ )	Capacidad estimada de encapsulación (%)	No de vesículas	Tamaño de vesícula ( $\mu\text{m}$ )	Capacidad estimada de encapsulación (%)	No de vesículas	Tamaño de vesícula ( $\mu\text{m}$ )	Capacidad estimada de encapsulación (%)
63	16.37	3.09	69	13.68	2.46	50	17.12	1.44
132	23.92	19.16	59	24.9	12.0	302	25.04	27.5
101	34.03	41.98	79	34.39	41.93	159	34.0	36.24
38	44.68	35.78	37	44.87	43.61	74	43.5	35.32

La capacidad estimada de la encapsulación se determinó en función del volumen y del número de vesículas formadas: para Cp1 de 19.16%, para Cp6 41.93% y para Cp40 27.5%, si la membrana sintética de la vesícula no es flexible, experimentalmente se esperaría que el por ciento de encapsulación esté cerca de estos valores.

#### 4.2.2. Determinación de la cantidad de hemoglobina (Hb) encapsulada por el polimerosoma

La relación lineal entre la absorción vs la concentración de hemoglobina en el intervalo 200 – 1000  $\mu\text{g/mL}$ , se muestra en la *fig. 4.11* con un intercepto de -0.0377, una pendiente de 0.0015 y un coeficiente de correlación de 0.999.



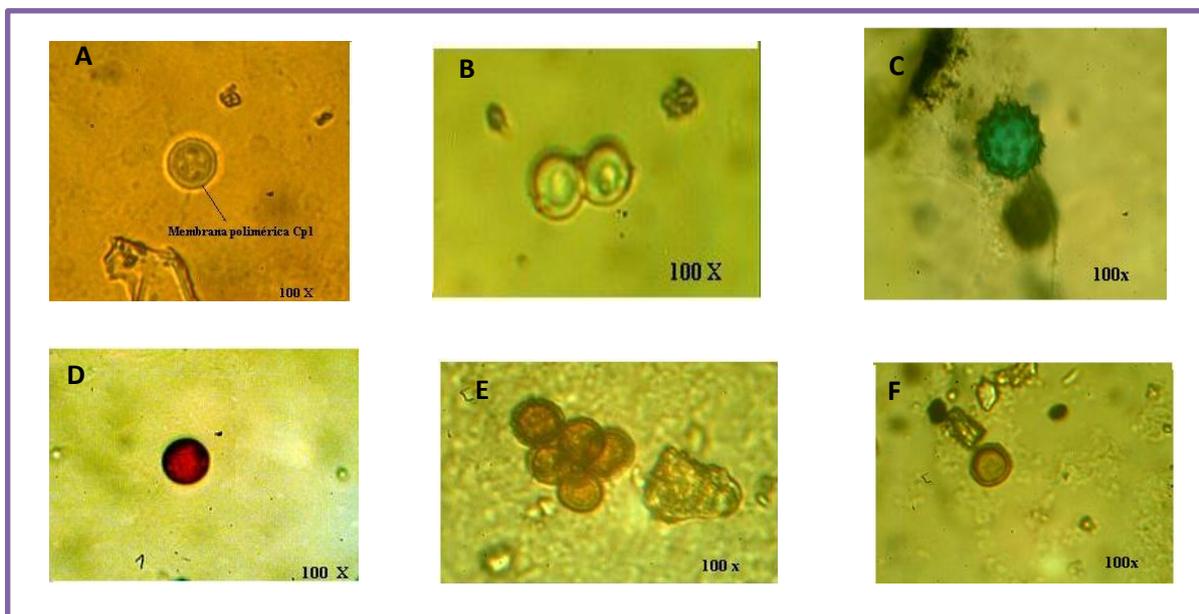
**FIGURA 4.11** Linealidad del método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de hemoglobina

Con base en la ecuación obtenida se determinó el porcentaje de encapsulación de hemoglobina para cada copolímero de PAA-PBA, siendo los siguientes:  $Cp1 = 56.9 \pm 2.23$ ,  $Cp6 = 39.57 \pm 2.33$  y  $Cp40 = 59.76 \pm 1.54$

Al comparar los porcentaje de encapsulación de hemoglobina determinados experimentalmente, comparados con la capacidad estimada para cada copolímero determinada teóricamente tenemos:  $Cp1_{\text{capacidad estimada}} = 19.16 \%$  y  $Cp1_{\% \text{encapsulado}} = 56.9\%$ , lo que muestra que hay un crecimiento de la vesícula 37.74 veces,  $Cp6_{\text{capacidad estimada}} = 41.93 \%$  y  $Cp6_{\% \text{encapsulado}} = 39.57$ , en este caso la vesícula se aproxima al valor estimado, para  $Cp40_{\text{capacidad estimada}} = 27.5\%$  y  $Cp40_{\% \text{encapsulado}} = 59.76\%$ , mostrando un crecimiento de 32.26 veces.

Con base a los resultados obtenidos el copolímero Cp1 y Cp40 muestran cierto crecimiento en su volumen que permitió encapsular a la hemoglobina más allá del valor estimado, en el caso del copolímero Cp6 no se mostró este comportamiento.

En la *fig. 4.12*, *fig. 4.13*, *fig. 4.14* y *fig. 4.15* se muestran las imágenes de las vesículas poliméricas formadas.

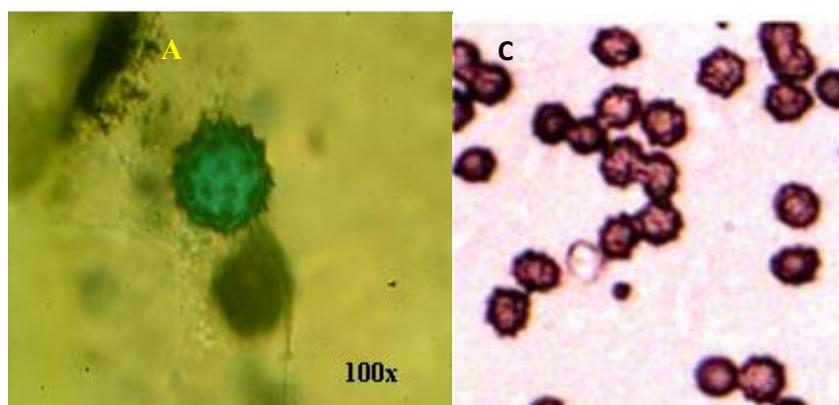


**FIGURA 4.12.** *Vesículas formadas con el Copolímero de PAA-PBA (Cp1)*

*Todas las observaciones se realizaron empleando el filtro amarillo para mejorar la visibilidad de la bicapa polimérica. A) vesícula esférica con bicapa, B) vesículas con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4, se observa coalescencia entre las vesículas, C) vesícula con azul de metileno, se forma un acantocito (eritrocito deformado de tal manera que parece estar formado de espinas), fenómeno que se presenta cuando hay electrolitos en la solución. D) vesícula con hemoglobina. E) aglomerado de vesículas con hemoglobina y se observa la bicapa, F) vesícula con hemoglobina*

De acuerdo con los resultados obtenidos con el copolímero de PAA-PBA (Cp1) (39.58% de AA y 60.42% PBA) con PM 2728.39 g/mol se lograron formar polimerosomas como lo evidencian las imágenes A, B, D, E y F.

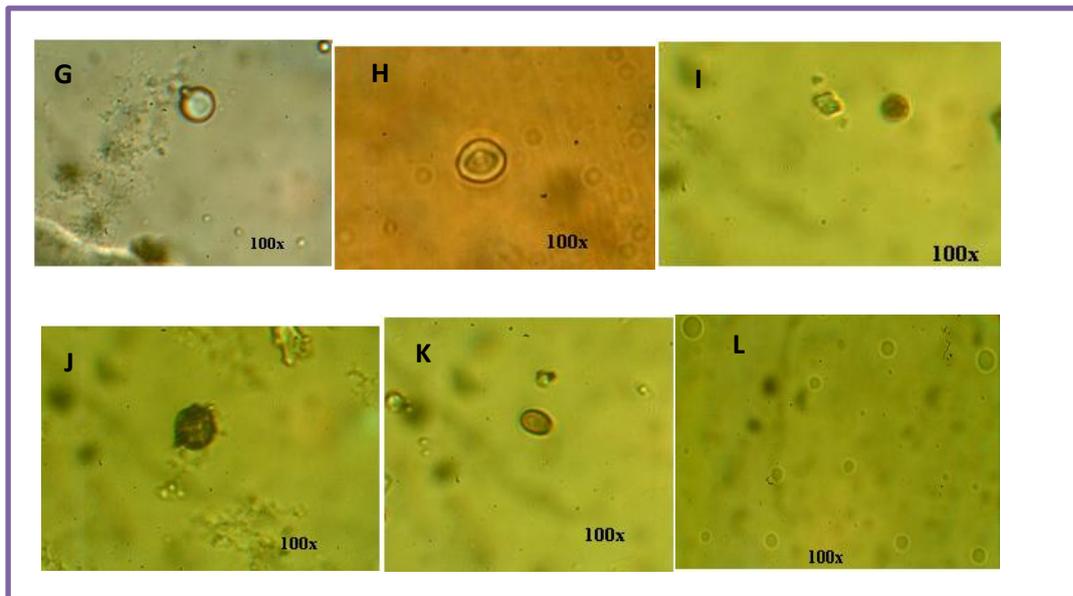
En la imagen A se observa una posible flexibilidad de la membrana, que da lugar a la formación de un acantocito, que es un fenómeno que le sucede al eritrocito. Se caracterizan por presentar proyecciones protoplasmáticas en diferentes formas y tamaños separadas de modo irregular, que proporcionan a la célula un aspecto espinoso.



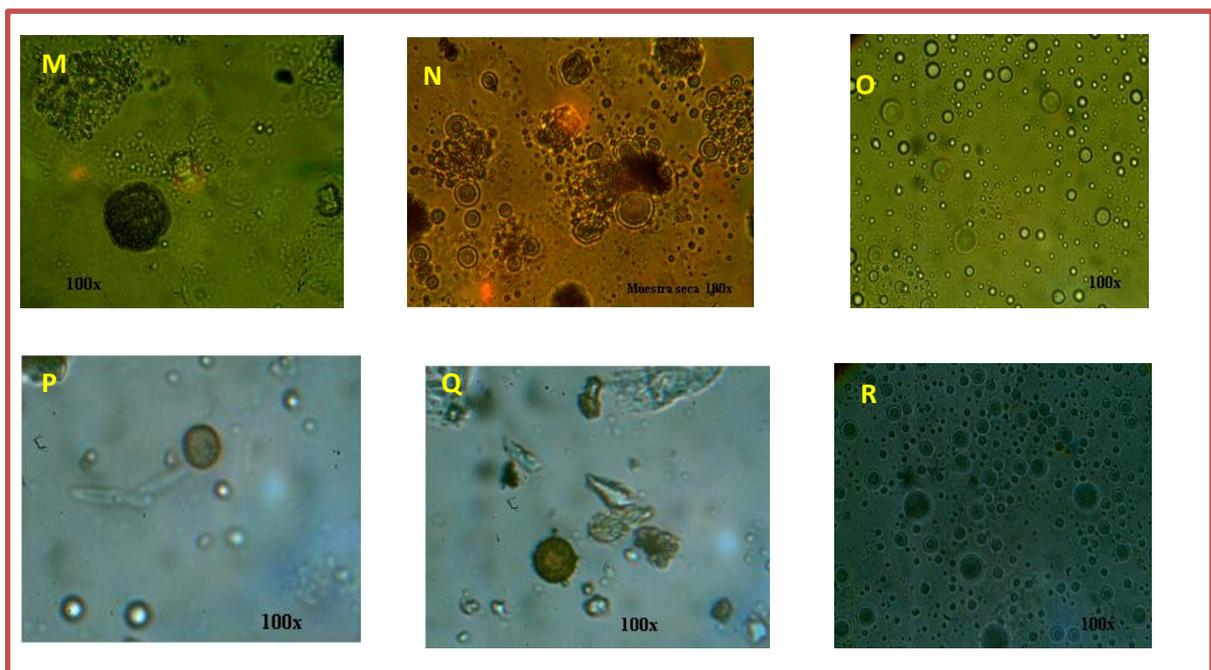
**FIGURA 4.13** *Se muestra la formación de un acantocito con el copolímero Cp1 (A) comparado con la misma formación que se presenta en el eritrocito (C)*

Gálvez, M., Bravo, E., Rodríguez, P., Fariás, M., Cerda, J. Rev. Chilena de Radiología. Vol 12 No 4 (2006)

Con el copolímero Cp6 de PAA-PBA (22.54% AA y 77.46% de BA) y PM 3297 g/mol de acuerdo con lo que plantea Discher y Eisenberg (2002) que un copolímero con una fracción en peso hidrófila, menor al 25% se autoensamblarán en micelas y como regla general como lo expone Du, J. y O'Reilly, R. (2009), los copolímeros con relaciones hidrófilo/hidrófobo mayor 1:1 generalmente forman micelas como se observan en I, J, K y L. En la imagen H observamos una bicapa pero la vesícula posee defectos topológicos en los polos elipsoidales como lo muestra Lin, J. et al (2009). Como se sabe, las gotas de líquido generalmente tienen una forma esférica que está gobernada por la tensión interfacial, las formas no esféricas no pueden ser explicadas por dicha tensión, pero sí por la introducción de otros parámetros que son: flexión y curvatura (Lipowsky, R. 1991), que no es el alcance de este trabajo.



**FIGURA 4.14.** *Vesículas formadas por el Copolímero de PAA-PBA (Cp6)*  
**G)** expulsión de una pequeña vesícula de una mayor (brote). **H)** vesícula no esférica con bicapa, **I)** esferocito con hemoglobina **J)** la hemoglobina no logra ser totalmente encapsulada **K)** se observa una vesícula esméctica, **L)** vesículas pequeñas con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4



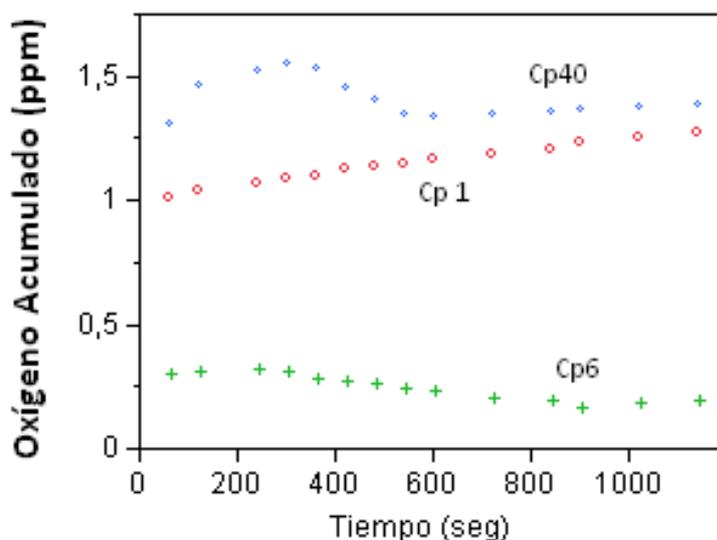
**FIGURA 4.15.** *Vesículas del copolímero de PAA-PBA (Cp 40).*  
 Las imágenes M, N, O se observaron con el filtro amarillo y las P, Q, R se realizaron con filtro azul, se percibe la formación de la bicapa y la encapsulación de la hemoglobina.

El copolímero Cp 40 (21.11% AA y 78.89% BA) con PM 4707.21 g/mol, es la excepción a la regla empírica propuesta por Discher y Eisenberg, que predicen que los

copolímeros del bloque con una fracción en peso hidrófila situada entre 25 – 50% formarán polimerosomas; pero este copolímero forma vesículas como se observa en las imágenes aun cuando su fracción hidrófila es del 21.11%, esto tal vez se puede explicar en que coincide en los parámetros de síntesis con el copolímero Cp 1, con una relación de monómeros (hidrófilo/hidrófobo) 1:2 y con base a lo que indica Du, J.y O'Reilly, R., con esta relación formaran vesículas y con la transición vítrea (Tg) de -2.90 y de -10.74 para el copolímero Cp1 y Cp40 respectivamente se favorece la flexibilidad, de la membrana.

#### 4.2.3 Determinación de la difusión de oxígeno en el polimerosoma

Después de la cuantificación del oxígeno disuelto en una mezcla de glicerol: agua (50:50) por medio del equipo Dissolved Oxygen Meter Hanna (HI9146) a una temperatura de 37°C y para cada uno de los copolímeros, se determinó el comportamiento de estos en cuanto a la transferencia de oxígeno, como se puede ver en la *fig.4.16*.



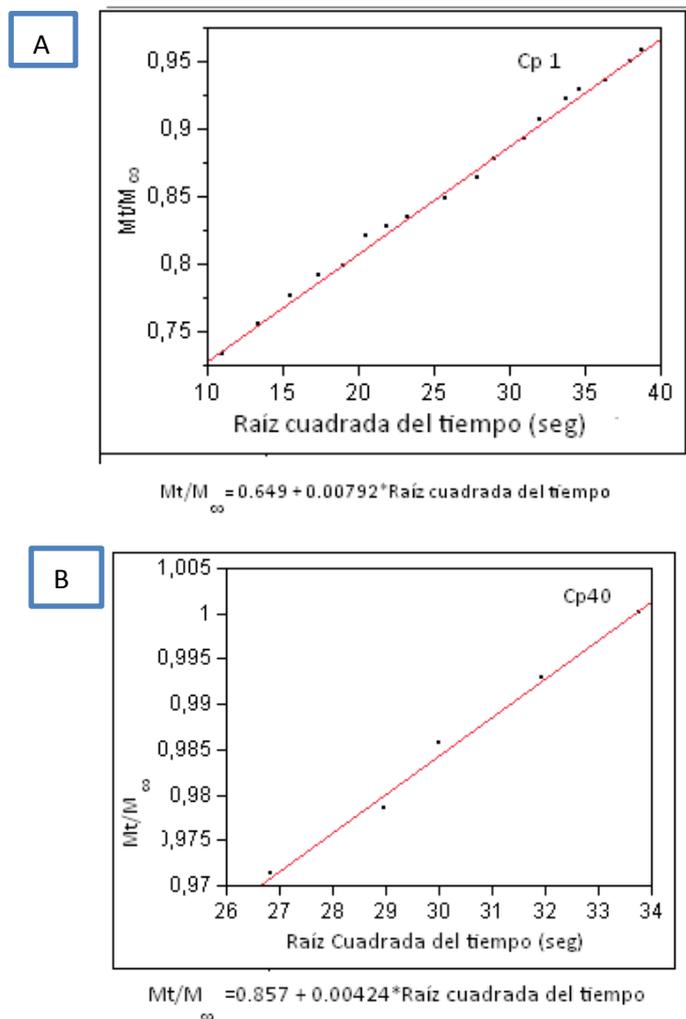
**FIGURA 4.16.** *Comportamiento de la captación de oxígeno por parte de cada uno de los copolímeros PAA-PBA (Cp1, Cp6, Cp40)*

En la gráfica se observa la captación de oxígeno por el copolímero Cp1 durante el tiempo estudiado, muestra un comportamiento fickiano. En el caso del copolímero Cp40 se obtiene un comportamiento no fickiano que tiende a la linealidad después de los 600 segundos. Este comportamiento lineal está relacionado con el valor de la transición

vítrea para cada copolímero:  $T_{g_{Cp1}} = -2.90^{\circ}\text{C}$  y el  $T_{g_{Cp40}} = -10.74^{\circ}\text{C}$ ; como se sabe, los polímeros con una baja de temperatura de  $T_g$  poseen un segmento de alta movilidad y por lo tanto tendrán alta difusividad.

En el copolímero Cp6 no se logra la captación de oxígeno, comportamiento probable debido a que el copolímero formó micelas, su geometría es ovalada y no se logra por completo la encapsulación de la hemoglobina.

A continuación se determinó el coeficiente de difusión del copolímero Cp1 y del copolímero Cp40, ver la *fig. 4.17*



**FIGURA 4.17** Gráfica de  $M_t/M_{\infty}$  vs la raíz cuadrada del tiempo para los copolímeros Cp1 y Cp40

En la *tabla 16* se resumen las características de cada copolímero de PAA-PBA (Cp1, Cp6 y Cp 40) en donde podemos observar que el copolímero Cp1 y Cp40 son los candidatos para el desarrollo de una célula artificial para el transporte de oxígeno. En la *tabla 17* se muestra la comparación del eritrocito con los copolímeros de PAA-PBA (Cp1 y Cp40)

**Tabla 16** *Características fisicoquímicas del copolímero de PAA-PBA (Cp1, Cp6 y Cp40)*

<b>Características</b>	<b>Cp1</b>	<b>Cp6</b>	<b>Cp40</b>
<b>Peso molecular (g/mol)</b>	2728.29	3297	4907.21
<b>AA% (parte hidrofílica)</b>	39.58	22.54	21.11
<b>BA% (parte hidrofóbica)</b>	60.42	77.46	78.89
<b>Tg (°C)</b>	-2.90	-8.99	-10.74
<b>Tamaño de la vesícula (µm) promedio</b>	27.91	27.82	29.13
<b>% Encapsulación de la hemoglobina</b>	56.9	39.57	59,76
<b>Formación de vesículas</b>	334 POLIMEROSOMA	244 MICELAS	585 POIMEROSOMA
<b>Coefficiente de difusión de oxígeno (cm<sup>2</sup>/s)</b>	0.00792	-----	0.00424

**Tabla 17** Comparación del eritrocito con los polimerosomas elaborados con los copolímeros de PAA-PBA (Cp1 y Cp40) seleccionados como posibles candidatos para glóbulo rojo sintético

	<b>Diámetro (D<sub>L</sub> μm)</b>	<b>Área (A<sub>prom</sub> μm<sup>2</sup>)</b>	<b>Volumen (V<sub>prom</sub> μm<sup>3</sup>)</b>	<b>Contenido de Hb (%)</b>	<b>Composición Hidrofílica (AA%)</b>	<b>Composición Hidrofóbica (BA)</b>	<b>Coefficiente de difusión de oxígeno (cm<sup>2</sup>/s)</b>
<b>Eritrocito</b>	7 – 7.5	142	82-92	34	Los lípidos se disponen en una doble capa que constituyen un 40% y donde se encuentran embebidas las proteínas que constituyen aproximadamente el 50% del peso seco de la membrana		2 x 10 <sup>-5</sup>
<b>Copolímero PAA-PBA (Cp1)</b>	27.91	30.59	33.14	56.9	39.58	60.42	7.92 x 10 <sup>-3</sup>
<b>Copolímero PAA-PBA (Cp40)</b>	29.13	30.97	32.82	59.76	21.11	78.89	4.24 x 10 <sup>-3</sup>

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

- a) Se logró determinar que los pesos moleculares de los copolímeros de PAA-PBA comprendidos entre 2000 a 5000 g/mol permiten la obtención de polimerosoma.
- b) Por medio de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) se estableció la composición del monómero de ácido acrílico, AA (parte hidrofílica) y acrilato de butilo, BA (parte hidrofóbica) en el copolímero mediante la determinación de la temperatura de transición vítrea (Tg) de estos, y con el empleo de la ecuación de Gordon-Taylor se logró evaluar los porcentajes de contribución de AA para el copolímero encontrándose en el intervalo de 20.84% a 39.58 % y para el BA fue de 60.42% a 79.16%.
- c) La síntesis de la vesícula polimérica se realizó en un dispositivo en forma de T caracterizado con un número de Reynolds ( $Re < 1$ ) que indica que la fuerza dominante es la viscosidad y el número de capilaridad se encuentra en el intervalo de  $10^{-5}$  a  $10^{-3}$  que es coincidente en que la tensión superficial es la dominante para la elaboración de las vesículas.
- d) Se observaron las vesículas bajo el microscopio óptico, empleando el objetivo de 100x, se tomaron fotografías y se procesaron las imágenes con el paquete ScopePhoto 3.0. Se logró la síntesis del polimerosomas con el copolímero Cp1 y Cp40 donde se observa la formación de vesículas con bicapa y con el copolímero Cp6 se formaron sólo micelas.
- e) La encapsulación de la hemoglobina: para el copolímero Cp1 fue de 56.9%, y para el Cp40 de 59.76% y se determinó la captación de oxígeno por parte del polimerosoma siendo para el copolímero Cp1 de  $D_{Cp1} = 7.92 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$  y para el copolímero Cp40 fue de  $D_{Cp40} = 4.24 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ .
- f) De acuerdo a los datos obtenidos experimentalmente para los copolímeros de PAA-PBA de Cp1 y Cp40, en comparación con el eritrocito, tienen una cierta aproximación a las características fisiológicas de éste, en relación a la formación de la membrana anfifílica y la difusión de oxígeno, posiblemente se logre equiparar a un glóbulo rojo. Pero es imperativo hacer la caracterización reológica de estos polimerosomas, hacer pruebas in vitro y después pruebas in vivo.

## Referencias

- Arifin, D.R. (2005) Cellular Hemoglobin-Based Oxygen Carriers as Potential Artificial Blood Substitutes. Notre Dame, Indiana. Pp 1-173
- Discher, D.E. and Eisenberg, A. (2002) Polymer Vesicles. *Science*. Vol. 297: 967-973
- Dreyfus, R., Tabeling, P. and Willaime, H. (2003) Ordered and Disordered Patterns in Two-Phase Flows in Microchannels. *Physical Review Letters*. Vol. 90 (14): 144505 (1-3)
- Du, J. and O'Reilly, R. (2009) Advances and challenges in smart and functional polymer vesicles. *Soft Matter*, 5, 3544-3561
- Gálvez, M., Bravo, E., Rodríguez, P., Farías, M., Cerda, J. *Rev. Chilena de Radiología*. Vol 12 No 4 (2006)
- Jing, H., Jianzhong M. and Weijun, D. (2008). Sythesis of alkali-soluble copolymer (butyl acrylate/acrylic acid) and its application in leather finishing agent. *European Polymer Journal* 44:2695-2701
- Ki-Chang, L., Jai-Hyuk, H. & Kwang-Jea, K. (2009) Effects of Reaction Parameters on particle size, Molecular weight, and Kinetics for Dispersion Polymerization of n-butyl acrylate. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*. Vol. 14:600-616
- Lasic, D.D. (1988) The mechanism of vesicle formation. *Biochem. J.* 256: 1-11
- Le Meins, J.F., Sandre, O., Lecommandoux, S. (2011).Recent trends in the tuning of polymersomes “membrane properties”. *The European Physical Journal E*. Vol. 34 (2) 1-17
- Lin, J., Cao, A., Lévy, D., Xu, B., Albouy, P.A., Xiangjun, X. (2009) Smectic Polymer Vesicles. *Soft Matter* 5: 3446-3451
- Lipowsky, R. (1991) The conformation of membranes. *Nature*, Vol.349, 475-490
- Meijer, H.E.H and Govaert, L.E. (2005) Mechanical Performance of polymer systems: The relation between structure and properties. *Prog. Polym. Sci.* 30: 915-938
- Penzel, E., Rieger, J. and Schneider, H.A. (1997) The glass transition temperature of random copolymers: 1 Experimental data and the Gordon-Taylor equation. *Polymer* 38 (2), 325-337
- Sauer, J.A. and Pae K.P. (1977). *Introduction to Polymer Science and Technology* (Wiley, New York), pp. 302-423

Tice, J.D., Song, H., Lyon, A.D. and Ismagilov, R.F. **(2004)** Effects of viscosity on droplet formation and mixing in microfluidic channels. *Analytica Chimica Acta* 507: 73-77

## CAPÍTULO VI

### PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

- a) Realizar nuevamente la síntesis de los copolímeros de PAA-PBA con los parámetros determinados mediante el análisis estadístico del diseño de experimentos para tener un mayor control en la dispersión de los pesos moleculares. Condiciones determinadas para la síntesis: temperatura de 67.5°C, iniciador 3.0 mg, frecuencia 75 Hz, tiempo 17.5 min y relación del monómero de 1.5 mol.
- b) Determinar la estabilidad de los polimerosomas en una solución de poliacrilamida, para lograr diseñar una sangre artificial.
- c) Determinar las características reológicas de una suspensión de polimerosomas en poliacrilamida y compararla con una suspensión de glóbulos rojos en sangre.
- d) Realizar un estudio in vivo con animales de laboratorio para verificar su inocuidad y la eficiencia en la entrega de oxígeno.
- e) Extraer, purificar y caracterizar la hemoglobina de la *Lumbricus terrestris* como un posible sustituto de hemoglobina humana.
- f) Caracterizar al copolímero de PAA-PBA para emplearlo en la encapsulación de la hemoglobina de lombriz y hacer los estudios de caracterización para esta nueva entidad de polimerosoma.

## CAPÍTULO VII

### ANEXOS

Este trabajo se publicó y fue presentado en diferentes foros, que se mencionan a continuación.

a) Publicación internacional:

N. A. Noguez Méndez , E. B. Naranjo Rodríguez , R. Herrera Nájera & A. E. Chávez Castellanos (2014) **Synthesis of Artificial Membrane of Copolymer (Acrylic Acid/Butyl Acrylate) PAA-PBA for the Design of Polymersomes**, International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 63:3, 143-148, DOI: 10.1080/00914037.2013.800982 To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/00914037.2013.800982>

b) Conferencia: **Desarrollo de una célula artificial**” celebrada el 18 de noviembre de 2009, dentro del Ciclo de Seminarios del Trimestre 09-Otoño de la Maestría de Ciencias Farmacéuticas. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

c) Presentación de la ponencia **“Síntesis de una membrana artificial para el diseño de un polimerosoma”**. Primer Congreso Multidisciplinario de Ciencias Aplicadas en Latinoamérica. Realizado en Granada Nicaragua del 9 al 12 de noviembre, 2010

d) Presentación del poster **“Caracterización de una vesícula polimérica para el transporte de oxígeno”** The International Multidisciplinary Joint Meeting 2013 Nanoscience and Condensed Matter Physics. Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelia. Morelia México, May 15-17, 2013.

e) Presentación del poster **“Desarrollo de un polimerosoma para el transporte de oxígeno”**. XVI Conferencia Ibero-Americana de Facultades de Farmacia COIFFA. Brasilia-DF, 5 a 7 de junio 2013.

f) Publicación de un artículo de difusión.

Revista Interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. **De los acarreadores de oxígeno (HbCO) a los polimerosomas. Una mirada a las células artificiales.** [www.mundonano.unam.mx](http://www.mundonano.unam.mx) Vol 7, No. 12, enero-junio 2014. Pp83-105.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Constancia

Educación Continua

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

## UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Otorga la presente

A: M. en C. Norma Angélica Noguez Méndez  
Investigadora del Dept. de Sistemas Biológicos , UAM-Xoc

Por haber *impartido* la Conferencia: “**Desarrollo de una célula artificial**”,  
celebrada el día 18 de Noviembre de 2009, dentro del Ciclo de Seminarios del  
Trimestre *09-Otoño* de la Maestría de Ciencias Farmacéuticas.

  
Dr. Salvador Vega y León  
Director de la División de CBS

  
Dra. Patricia E. Alfaro Moctezuma  
Secretaría Académica de la División de CBS

  
Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda  
Coordinador  
Maestría en Ciencias Farmacéuticas



## PRIMER CONGRESO MULTIDISCIPLINARIO DE CIENCIAS APLICADAS EN LATINOAMÉRICA



### RECONOCIMIENTO

A

**Noguez Méndez N.A., Chávez Castellanos A.E., Naranjo  
Rodríguez E.B. y Herrera Nájera R.**

**por la presentación del trabajo titulado**

**“SÍNTESIS DE UNA MEMBRANA ARTIFICIAL PARA EL DISEÑO DE UN  
POLIMEROSOMA”**

Realizado en Granada, Nicaragua del 9 al 12 de noviembre, 2010

Dra. Manuela Díaz Cruz  
Presidente del Comité Organizador

 Conselho Federal de Farmácia

 COIFFA

**XVI Conferência Ibero-Americana de Faculdades de Farmácia - Coiffa**  
**V Congresso Ibero-Americano de Ciências Farmacêuticas**  
**VIII Conferência Nacional de Educação Farmacêutica**

Brasília-DF, 5 a 7 de junho de 2013  
Informações: [www.coiffa.org.br](http://www.coiffa.org.br)



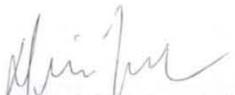
# CERTIFICADO

Certificamos que

*Carlos T. Quirino*

apresentou o trabalho científico, “DESARROLLO DE UN POLIMEROSOMA PARA EL TRANSPORTE DE OXÍGENO” como autor principal e co-autoria de Norma A. Noguez, Ángel E. Chávez, Alejandro Rubio, Susana A. Macín, no **XVI Conferência Ibero-Americana de Faculdades de Farmácia - Coiffa, V Congresso Ibero-Americano de Ciências Farmacêuticas, VIII Conferência Nacional de Educação Farmacêutica**, com carga horária de 24 horas, realizados pelo Conselho Federal de Farmácia, de 5 a 7 de junho de 2013, em Brasília-DF.

Brasília-DF, 7 de junho de 2013.

  
**Dr. Walter da Silva Jorge João**  
Presidente do CFF

  
**Dr. Raül Demingos**  
Presidente do Comitê Organizador do Congresso

Farmacêutico. Indispensável à sua saúde.



## CERTIFICATE OF ATTENDANCE

This is to certify that

***Norma Angélica Noguez***

has attended

***THE INTERNATIONAL MULTIDISCIPLINARY JOINT MEETING 2013***

*Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Morelia*

*Morelia, Mexico, May 15 - 17, 2013*

Oracio Navarro Chávez

Chairman



Universidad Nacional Autónoma de México  
Consorcio Académico nanoUNAM



La Revista Mundo Nano  
hace constar que el artículo

De los acarreadores de oxígeno (HbCO) a los  
polimerosomas. Una mirada a las células artificiales

de la autoría de

**Norma Angélica Noguez-Méndez, Carlos Tomás Quirino-  
Barreda, Susana Aurora Macín-Cabrera, Virginia Eustolia  
Melo-Ruiz y Alejandro Rubio-Martínez**

ha sido aceptado para su publicación

Ciudad Universitaria, 3 de Diciembre de 2013, México D.F., México

Dr. Gian Carlos Delgado Ramos  
Editor