



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**MICROESFERAS DE BIOPOLÍMEROS MEDIANTE  
MICROFLUÍDICA PARA APLICACIÓN BIOMÉDICA**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL  
QUÍMICA

**NATALIA BEATRIZ ARIAS DÍAZ**

**PROFESOR GUÍA:**  
HUMBERTO PALZA CORDERO

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:**  
RAÚL QUIJADA ABARCA  
MARÍA LUISA CORDERO

SANTIAGO DE CHILE  
2017

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE: INGENIERA CIVIL QUÍMICA  
POR: NATALIA BEATRIZ ARIAS DÍAZ  
FECHA: 24/05/2017  
PROFESOR GUÍA: HUMBERTO PALZA CORDERO**

## **MICROESFERAS DE BIOPOLÍMEROS MEDIANTE MICROFLUÍDICA PARA APLICACIÓN BIOMÉDICA**

El cáncer de hígado tiene una tasa de mortalidad en hombres del 14,3% y en mujeres del 5,1% a nivel mundial. Terapia de embolización, se basa en bloquear el suministro de sangre al tumor mientras que simultáneamente se administra la quimioterapia. Para realizarla se utilizan microesferas de polímeros sintéticos que en su mayoría pueden ser citotóxicos, lo que conduce muchas veces a respuestas inmunes indeseadas e inflamación del tejido.

Para evitar este problema, en este trabajo se presenta como alternativa, microesferas de mezclas de biopolímeros, que sean biocompatibles. En particular, alginato sódico y quitosano, los que presentan una fuerte afinidad debido a la naturaleza polianiónica del primero y policationica del segundo.

Se proponen cuatro metodologías diferentes para la generación de esferas de hidrogel milimétricas, denominadas alginato cálcico, recubiertas, blendas y core shell.

Las esferas se sometieron a diferentes ensayos: estabilidad en el tiempo, propiedades mecánicas al ser dejadas en soluciones de agua destilada, cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) y suero fisiológico (PBS), fotografías SEM y análisis termogravimétrico, los que permitieron determinar que las esferas del tipo blenda obtienen los mejores resultados. Paralelamente fue necesario implementar un ensayo para determinar las propiedades mecánicas y obtener resultados comparables entre los diferentes tipos de esferas.

Finalmente, para obtener microesferas, se recurrió a la microfluídica, replicando las metodologías presentadas a nivel milimétrico. A pesar de los buenos resultados obtenidos para las esferas blendas, su reproducción en microfluídica no fue posible, es por ello que se estudió una cuarta metodología microesferas denominadas core shell, obteniéndose del orden de 200 [ $\mu\text{m}$ ].

Esferas core shell milimétricas, tienen resultados similares a las esferas blendas, tanto en estabilidad como en propiedades mecánicas, por lo que se concluye que son potencialmente aptas para la aplicación en terapia de embolización.

*Todos somos genios.  
Pero si juzgas a un pez por su habilidad de trepar árboles,  
vivirá toda su vida pensando que es un inútil.*

## AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecer a Dios por permitirme vivir esta vida, aprendiendo día a día algo nuevo.

A mis padres, que me han dado el soporte en todo mi camino de formación tanto académica como personal, gracias por siempre confiar en mí y permitirme elegir mi camino.

A mi única hermana: Sofía, que me enseña todos los días la definición de hermana entregándome su amor incondicional.

A mi tío Carol y mi tía Betty que son unos segundos padres.

A mi profesor guía Humberto Palza, que me permitió desarrollar este tema interesante.

A Juanito por toda la ayuda prestada en el laboratorio.

A mis amigas del liceo: Catalina, Javiera y Paula, que han estado en todas conmigo.

A María-Jesús, la mejor amiga que me pudo entregar la universidad, gracias por todo. A la Vale por tantas alegrías y penas vividas con la U, al Roberto por hacerme reír en plan común, a la Cony y la Naty mis amigas IQBT.

A mis amigas Alicia y Camila, que han aportado con su apoyo constante desde que nos conocimos.

A mis compañeros de laboratorio.

A todos los profesores que me enseñaron a lo largo de mi formación académica entregándome las herramientas para enfrentar el mundo.

A la Florencia y la Milagros que me han permitido conocer la responsabilidad y son las más felices cuando llego a casa, bueno más la Flor que la Mily.

Finalmente, a mi compañero de vida Diego, que ha estado conmigo casi la mitad de ella siendo mi cable a tierra, mi consuelo, mi mejor amigo, apoyo fundamental y mi fan número uno, gracias por tanto amor.

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	11
1.1. EMBOLIZACIÓN HEPÁTICA .....	11
1.2. BASE DE LA TERAPIA DE EMBOLIZACIÓN HEPÁTICA .....	12
1.3. AGENTES EMBÓLICOS.....	13
1.3.1. Primera generación.....	13
1.3.2. Segunda generación .....	14
1.3.3. Tercera generación.....	14
1.4. MOTIVACIÓN .....	15
1.5. ANTECEDENTES .....	16
1.5.1. Alginato como agente embólico.....	16
1.5.2. Esferas de alginato-quitosano .....	19
1.5.3. Mezcla de alginato-quitosano .....	25
1.5.4. Propiedades químicas y físicas de los hidrogeles de alginato-quitosano. ....	27
1.5.5. Microfluídica .....	32
1.5.6. Microfluídica alginato.....	33
2. OBJETIVOS.....	38
2.1. GENERAL.....	38
2.2. ESPECÍFICOS.....	38
3. METODOLOGÍA .....	38
3.1. ESCALA MILIMÉTRICA .....	38
3.1.1. Preparación de esferas de alginato cálcico .....	38
3.1.2. Preparación de esferas recubiertas.....	39
3.1.3. Preparación de esferas blendas .....	40
3.1.4. Preparación de esferas core shell .....	40
3.1.5. Análisis termogravimétrico (TGA) y Scanning Electron Microscope (SEM) .....	41
3.1.6. Ensayo estabilidad de las esferas en el tiempo.....	41
3.1.7. Ensayo propiedades mecánicas .....	42
3.2. ESCALA MICROMÉTRICA .....	42
3.2.1. Preparación microcanal .....	42
3.2.2. Preparación microesferas de alginato cálcico .....	43
3.2.3. Preparación microesferas recubiertas .....	44
3.2.4. Preparación microesferas blendas.....	44

3.2.5.	Preparación microesferas core shell.....	45
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	46
4.1.	ESCALA MILIMÉTRICA.....	46
4.1.1.	Esferas de alginato cálcico.....	46
4.1.2.	Esferas recubiertas.....	47
4.1.3.	Esferas blendas.....	49
4.1.4.	Esferas core shell.....	51
4.1.5.	Análisis termogravimétrico (TGA) y Scanning Electron Microscope (SEM).....	52
4.1.6.	Ensayo estabilidad de las esferas en el tiempo.....	57
4.1.7.	Ensayo propiedades mecánicas.....	59
4.2.	ESCALA MICROMÉTRICA.....	63
4.2.1.	Preparación microcanal.....	63
4.2.2.	Preparación microesferas de alginato cálcico.....	63
4.2.3.	Preparación de microesferas recubiertas.....	66
4.2.4.	Preparación de microesferas blendas.....	67
4.2.5.	Preparación de microesferas core shell.....	69
5.	CONCLUSIONES.....	71
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	75
7.	ANEXOS.....	79
7.1.	RESULTADOS OBTENIDOS EN ANÁLISIS TG.....	79
7.2.	ENSAYO ESTABILIDAD ESFERAS EN EL TIEMPO.....	80
7.3.	DATOS OBTENIDOS EN ENSAYO PROPIEDADES MECÁNICAS.....	81
7.4.	OBTENCIÓN DEL MODELO DE MICROCANAL.....	83
7.5.	MICROESFERAS DE ALGINATO CÁLCICO CON MAYOR CONCENTRACIÓN DE $CaCl_2$ EN SOLUCIÓN ENTRECruzante.....	83
7.6.	QUITOSANO EN ALCOHOL ISOAMÍLICO.....	84
7.7.	ESFERAS DE ALGINATO CÁLCICO EN ACETONA.....	84
7.8.	MICROESFERAS CORE SHELL.....	84

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Cánceres más comunes y el cáncer de hígado [1].....	11
Ilustración 2: Agentes embólicos no agresivos: (a) polvo de gelatina absorbible, (b) microesferas de PVA calibradas, (c) microesferas de hidrogel de PVA, (d) microesferas de trisacrilo [3].....	13
Ilustración 3: Agentes embólicos de tercera generación: (a) microesferas cerámicas de itrio-90, en fotomicrografía adyacente al cabello humano (flecha). (b) Microesferas de resina ytrio-90. (c) Microesferas de polímero superabsorbente cargadas con doxorubicina, (d) Microesferas de hidrogel PVA [3] .....	15
Ilustración 4: Estructura de alginato y mecanismo de reacción. (A) El alginato es un copolímero de polisacárido hecho de grupos ácido gulurónico (G) y manurónico (M). La estereoquímica del ácido G proporciona sitios reactivos de ácido carboxílico. Los ácidos M no son reactivos. (B) En presencia de iones de calcio divalentes, el calcio está sustituido iónicamente en el sitio carboxílico. Una segunda cadena de alginato también puede conectarse al ion de calcio. El resultado cadenas de alginato unidos al calcio que forman un gel sólido [6].....	17
Ilustración 5: Ion de calcio se asienta y reticula dos cadenas de alginato sódico, interacción iónica [9].....	17
Ilustración 6: Módulo de perlas de alginato junto con las esferas embólicas comercialmente disponibles, las esferas de alginato son parecidas en módulo de compresión a las Bead Block® [8] .....	18
Ilustración 7: Estructura molecular del quitosano [12].....	20
Ilustración 8: Estructura molecular de la quitina [12] .....	20
Ilustración 9: Protonación del grupo amino del quitosano.....	20
Ilustración 10: Estabilidad a corto plazo monitorizada por el ensayo de explosión luego de 60 [min] en agua desionizada. Esferas generadas por una etapa, gelificadas al caer en solución (x) y gelificadas luego de la formación de la membrana de quitosano (☆). Esferas de dos etapas hechas con (Δ) y sin (∇) CaCl <sub>2</sub> en la solución de quitosano, y las que se lavaron con PBS previo al traspaso a la solución de quitosano (◇). Las cápsulas homogéneas están representadas por los símbolos rellenos mientras que las no homogéneas son las vacías [13] .....	22
Ilustración 11: Estabilidad a corto plazo monitorizada por el ensayo de explosión en agua desionizada para (a): cápsulas homogéneas y (b) no homogéneas, con el procedimiento de dos etapas y tiempos de reacción en la solución de quitosano con CaCl <sub>2</sub> de 15 (+), 30 minutos (◇), 2 (o) y 5 horas (Δ) [13] .....	23
Ilustración 12: Estabilidad a corto plazo monitorizada por el ensayo de explosión en esferas no homogéneas de dos etapas, reacciones en la solución de quitosano de 10 [min] a 24 [h] con MM que oscilan entre 15.000 y 62.000 [13] .....	24
Ilustración 13: Estabilidad a largo plazo en una solución salina de esferas de una etapa (o) (gelificado después de la formación de la membrana) y cápsulas homogéneas de dos etapas reaccionadas en 5 [h] con diferentes MM de quitosano: 17.000 (Δ) y 62.000 (□). Los símbolos rellenos representan cápsulas reaccionadas con CaCl <sub>2</sub> y los símbolos vacíos sin CaCl <sub>2</sub> [13] .....	24

Ilustración 14: Comportamiento de hinchazón de esferas de hidrogel, de diferentes proporciones de mezcla de alginato-quitosano reticuladas con $\text{Ca}^{2+}$ [17].....	26
Ilustración 15: Perfiles de hinchamiento de perlas húmedas en $\text{H}_2\text{O}$ , PBS y SGF (a) perlas de alginato cálcico, (b) perlas de alginato recubiertas con quitosano y (c) perlas mixtas de alginato-quitosano. Los valores son media $\pm$ desviación estándar (S.D.) de tres experimentos [18].....	28
Ilustración 16: FTIR espectros de perlas de calcio-alginato después de hincharse en SGF, $\text{H}_2\text{O}$ y PBS. Los espectros se han desplazado verticalmente para mayor claridad [18] ...	29
Ilustración 17: Micrografías SEM de esferas de alginato cálcico secadas con dos métodos diferentes; aire (a y b) y etanol (c y d); (a y c) muestran esferas individuales mientras que (b y d) muestran las respectivas microestructuras superficiales [18].....	29
Ilustración 18: Imágenes SEM de perlas de alginato recubiertas con quitosano secadas en aire (a) y con etanol (b y d); (c) muestra una sección transversal, mientras que (d) muestra la microestructura de la superficie externa [18].....	30
Ilustración 19: SEM de una sección transversal de una esfera de alginato revestido con quitosano y el correspondiente análisis EDS de la parte interna (A) y externa (B) [18].	30
Ilustración 20: FT-IR de (a) esfera alginato-quitosano, (b) alginato de sodio y (c) quitosano, eje de las ordenadas: % transmitancia y eje de las abscisas: longitud de onda $\text{cm}^{-1}$ [22].....	31
Ilustración 21: Termograma de esferas alginato-quitosano, eje de las ordenadas: mg y eje de las abscisas: $^{\circ}\text{C}$ [22].....	32
Ilustración 22: Chip microfluídico o microcanal.....	33
Ilustración 23: Esquema e ilustración de la configuración y mecanismo del sistema. (A, superior) dibujo esquemático del generador de flujo multifásico de alginato mediante la forma en "Y" y del tránsito de microgotitas de alginato a través de la interfaz agua/aceite que causa la formación de microesferas en forma de cola (A, inferior). (B) formación de flujo multifásico en el dispositivo. (C) fotomicrografía de microesferas de alginato producidas por el procedimiento de "gelificación externa", mostrando la típica forma de cola no deseada, escala 500 [ $\mu\text{m}$ ] [26] .....	35
Ilustración 24: Fotomicrografías de campo oscuro de microesferas de alginato-Ba preparadas mediante el procedimiento de "gelificación interna". Las microesferas se prepararon dispersando (A) 5 [mM], (B) 7,5 [mM] y (C) 10 [mM] de $\text{BaCO}_3$ . Las barras corresponden a 1.000 [ $\mu\text{m}$ ] [26].....	36
Ilustración 25: Fotomicrografías de campo oscuro de microesferas de alginato-Ba preparadas mediante el procedimiento de "gelificación interna". Las microesferas se prepararon dispersando 7,5 mM de $\text{BaCO}_3$ en el WP en presencia de (A) 0,2% y (B) 0,4% (p/v) de span 80 como estabilizador. Las barras corresponden a 1.000 [ $\mu\text{m}$ ] [26] .....	36
Ilustración 26: Esquema e ilustración de la configuración y mecanismo del sistema: (a) dibujo esquemático del generador de emulsión de alginato de sodio en un microcanal de sección cruzada, (b) estructura química de la emulsión de alginato de sodio, (c) un depósito y (d) gelificación de alginato [29] .....	37
Ilustración 27: Representación del sistema de entrecruzamiento para esferas de alginato cálcico a nivel macro .....	39
Ilustración 28: Representación del sistema de entrecruzamiento para esferas recubiertas a nivel macro .....	40

Ilustración 29: Representación del sistema de entrecruzamiento para esferas blendas a nivel macro .....	40
Ilustración 30: Representación del sistema de entrecruzamiento para esferas core shell a nivel macro .....	41
Ilustración 31: Esquema del ensayo de compresión, a la izquierda una monocapa de esferas y a la derecha, las esferas rodeadas por una copla de PVC. ....	42
Ilustración 32: Fotomáscara de transparencia, modelo de microcanal utilizado en este trabajo.....	43
Ilustración 33: Arriba se muestra la sección del canal que se representa, abajo representación del sistema de entrecruzamiento para esferas de alginato cálcico .....	44
Ilustración 34: Representación del sistema de entrecruzamiento para esferas recubiertas .....	44
Ilustración 35: Representación del sistema de entrecruzamiento para esferas blendas ..	45
Ilustración 36: Representación del sistema de entrecruzamiento para esferas core shell .....	45
Ilustración 37: Esferas de alginato obtenidas.....	46
Ilustración 38: Diámetro esferas de alginato obtenidas.....	46
Ilustración 39: Mezcla obtenida de alginato/quitosano en razón 1:1 en agua destilada y ácido acético .....	47
Ilustración 40: Representación esquemática de la reacción de formación de complejos iónicos entre el grupo aniónico (COO <sup>-</sup> ) de alginato sódico y el grupo catiónico protonado (NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) de quitosano.....	47
Ilustración 41: Mezcla obtenida de alginato/quitosano en razón 9:1 en agua destilada y ácido acético .....	48
Ilustración 42: Generación de esferas, con la mezcla de alginato/quitosano en razón 1:1 .....	48
Ilustración 43: Esferas recubiertas obtenidas .....	49
Ilustración 44: Diámetro esferas recubiertas obtenidas .....	49
Ilustración 45: Esferas blendas obtenidas .....	50
Ilustración 46: Diámetro esferas blendas obtenidas .....	50
Ilustración 47: Esferas core shell obtenidas .....	51
Ilustración 48: Diámetro esferas core shell obtenidas .....	51
Ilustración 49: Datos obtenidos en análisis TG desde los 100°C para esferas de alginato cálcico .....	52
Ilustración 50: Datos obtenidos en análisis TG desde los 100°C para esferas recubiertas .....	53
Ilustración 51: Datos obtenidos en análisis TG desde los 100°C para esferas blendas ....	53
Ilustración 52: SEM de las esferas secadas con etanol. a) Esferas de alginato cálcico, b) Esferas recubiertas, c) Esferas blendas y d) Esferas core shell. ....	54
Ilustración 53: SEM de las esferas liofilizadas. a) Esferas de alginato cálcico, b) Esferas recubiertas, c) Esferas blendas y d) Esferas core shell. ....	55
Ilustración 54: SEM de la superficie de las esferas. a) Esfera de alginato cálcico, b) Esferas recubierta, c) Esfera blenda y d) Esfera core shell .....	56
Ilustración 55: 88 días desde la preparación. A la izquierda esferas de alginato puro, en medio esferas recubiertas y a la derecha esferas blendas en agua destilada .....	57

Ilustración 56: Variación del diámetro para los diferentes tipos de esferas en PBS hasta los 27 días. ....	58
Ilustración 57: Esferas en agua destilada, a la izquierda luego de 3 horas desde su preparación, a la derecha luego de 10 días. ....	60
Ilustración 58: Esferas en CaCl <sub>2</sub> , a la izquierda luego de 3 horas desde su preparación, a la derecha luego de 10 días. ....	61
Ilustración 59: Esferas en PBS, a la izquierda luego de 3 horas desde su preparación, a la derecha luego de 10 días. ....	62
Ilustración 60: Microcanal unido a placa de microscopio .....	63
Ilustración 61: Formación de esferas en microcanal .....	63
Ilustración 62: Primeras esferas obtenidas de alginato cálcico a través de microfluídica	64
Ilustración 63: Microcanal unido a placa de microscopio con un modelo que permite un tiempo de residencia mayor de las microesferas .....	64
Ilustración 64: Microesferas de alginato cálcico formadas al dejar caer en una solución de CaCl <sub>2</sub> en agitación contante .....	65
Ilustración 65: Esferas de alginato cálcico dejadas caer por gravedad con una solución entrecruzante de concentración 1,5% CaCl <sub>2</sub> (p/v) .....	66
Ilustración 66: Dos fases generadas cuando caen las gotas desde el microcanal a una solución de quitosano.....	66
Ilustración 67: Microesferas obtenidas dejándolas caer a un petri. Las microesferas traspasan la fase oleosa por gravedad y pasan a una fase de quitosano con CaCl <sub>2</sub> , que las gelifica.....	67
Ilustración 68: Esferas de alginato cálcico sin entrecruzar coalesciendo antes de caer a la solución entrecruzante .....	68
Ilustración 69: Esferas core shell en solución de quitosano con CaCl <sub>2</sub> .....	69
Ilustración 70: Microesferas core shell con surfactante a una concentración de 0,05%..	70
Ilustración 71: Diámetro de las microesferas core shell luego de agitación.....	70
Ilustración 72: Resultados TGA obtenidos para esferas de alginato cálcico.....	79
Ilustración 73: Resultados TGA obtenidos para esferas recubiertas .....	79
Ilustración 74: Resultados TGA obtenidos para esferas blendas .....	80
Ilustración 75: 3 días desde la preparación. A la izquierda esferas de alginato puro, en medio esferas recubiertas y a la derecha esferas blendas en agua destilada. ....	80
Ilustración 76: 26 días desde la preparación. A la izquierda esferas de alginato puro, en medio esferas recubiertas y a la derecha esferas blendas en agua destilada .....	80
Ilustración 77: Esferas de alginato cálcico en PBS, a la izquierda a 1 día, en medio a 5 días, a la derecha a 27 días desde su preparación .....	81
Ilustración 78: Esferas recubiertas en PBS, a la izquierda a 1 día, en medio a 5 días, a la derecha a 27 días desde su preparación.....	81
Ilustración 79: Esferas blendas en PBS, a la izquierda a 1 día, en medio a 5 días, a la derecha a 27 días desde su preparación.....	81
Ilustración 80: Modelo grabado en placa de silicio .....	83
Ilustración 81: Microesferas de alginato cálcico dejadas caer por gravedad en una solución entrecruzante al 3% de CaCl <sub>2</sub> (p/v).....	83
Ilustración 82: Prueba disolución de quitosano en alcohol isoamílico.....	84
Ilustración 83: Esferas milimétricas de alginato puro en acetona .....	84

Ilustración 84: Microesferas core shell, luego de 7 días en solución de quitosano con  $\text{CaCl}_2$  y posteriormente agitadas ..... 84

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. EMBOLIZACIÓN HEPÁTICA

Se conocen más de 200 tipos diferentes de cáncer, siendo los más comunes: boca, esófago, pulmón, riñón, hígado, estómago, páncreas, colon, recto y vejiga, Ilustración 1. En particular, el de hígado tiene una tasa de mortalidad en hombres del 14,3% y en mujeres del 5,1% a nivel mundial [1].

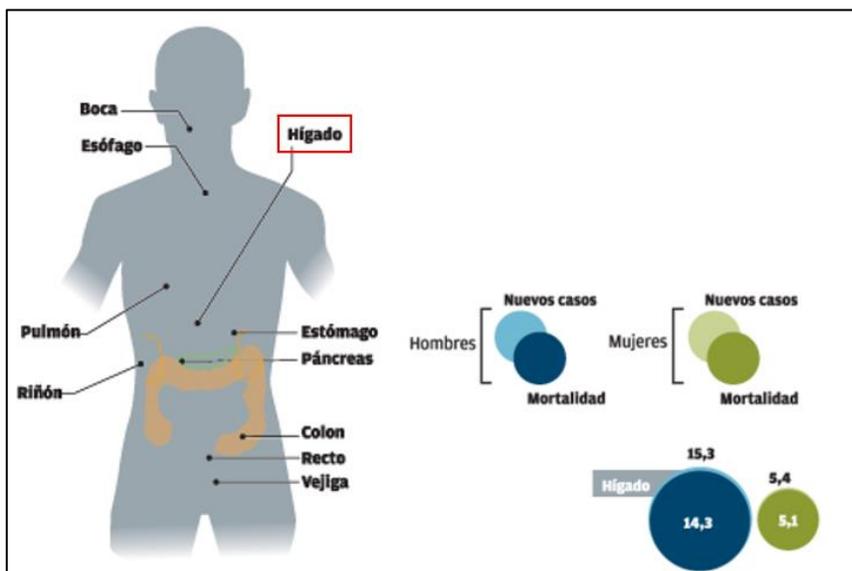


Ilustración 1: Cánceres más comunes y el cáncer de hígado [1]

Este tipo de cáncer se resiste generalmente a los medicamentos de quimioterapia. En la mayoría de los estudios solo son encogidos una pequeña porción de tumores en los casos que se utiliza quimioterapia sistémica (todo el cuerpo), y las respuestas a menudo no duran mucho tiempo, aún con el uso de combinaciones de medicamentos este procedimiento no ha ayudado a los pacientes a prolongar su esperanza de vida [2].

Debido a la pobre respuesta, los médicos han estudiado administrar medicamentos de quimioterapia directamente en la arteria hepática para determinar su eficacia. En este tipo de tratamiento, la quimioterapia llega a todo el hígado a través de la arteria, pero el hígado saludable descompone la mayor parte del medicamento antes de que alcance el resto del cuerpo. Esto lleva mayor cantidad al tumor, en comparación con la quimioterapia sistémica, sin aumentar los efectos secundarios.

Terapia de embolización es un creciente campo de la radiología intervencionista, que utiliza agentes embólicos y terapéuticos, en particular para el cáncer de hígado a través de la arteria hepática, para realizarla. Se basa en bloquear el suministro de sangre al tumor, una vez que esto sucede, es decir, que está embolizado, la quimioterapia se administra directamente en el tumor.

Quimioembolización transarterial (*transarterial chemoembolization*, TACE) con aceite yodado o lipiodol, quimioterapia intrarterial con esferas liberadora de drogas

(*drug-eluting beads*, DEB), y terapia de radiación interna selectiva (*selective internal radiation therapy*, SIRT) son técnicas utilizadas para el tratamiento primario de tumores malignos del hígado, como el hepatocarcinoma no resecable (no extraíble con cirugía, HCC), además de tumores de hígado malignos secundarios, tales como carcinoma colorrectal metastásico, tumores neuroendocrinos y un sinnúmero de otras neoplasias con predilección a metástasis hepática. Idealmente, estos tratamientos son abordados con una estrategia de equipo multidisciplinario, que puede incluir cirujanos, hepatólogos, oncólogos y radiólogos intervencionistas. En el ajuste clínico correcto, las estrategias transarteriales han demostrado un aumento significativo en la supervivencia de la enfermedad, en comparación con la quimioterapia sistémica, eliminando el cáncer por completo y también su reaparición en el paciente [3].

Los estudios preliminares han encontrado que la infusión en la arteria hepática a menudo es eficaz encogiendo a los tumores, pero se necesita más investigación sobre estos procedimientos, ya que es posible que estas técnicas no sean útiles en todos los pacientes, pues a menudo requieren cirugía para insertar un catéter en la arteria hepática, una operación que muchos pacientes de cáncer de hígado pueden no tolerar.

Los ensayos clínicos están en curso y con el desarrollo y el avance de nuevos agentes embólicos/portadores de medicamento, el campo de la terapia de embolización hepática seguirá creciendo y desempeñará un papel integral en el tratamiento de las neoplasias hepáticas [3].

## **1.2. BASE DE LA TERAPIA DE EMBOLIZACIÓN HEPÁTICA**

La compleja interacción entre las células tumorales y el parénquima hepático normal, se realiza en el proceso de angiogénesis tumoral (proceso fisiológico que consiste en la formación de vasos sanguíneos). Una característica única de los tumores hepáticos, es el reclutamiento casi exclusivo del suministro vascular del sistema arterial hepático, lo que implica que recibe más del 80% de su suministro de sangre de la arteria hepática, en comparación con el parénquima hepático normal, que recibe sólo un tercio de su suministro de sangre de la arteria (y los correspondientes dos tercios de la vena porta), creando un conducto natural para terapia dirigida a través de ella [3].

La patología de la vascularidad tumoral hepática también se ha estudiado con gran detalle y demuestra un mayor diámetro y longitud capilar, unas mayores distancias intercapilares, altas tasas de proliferación tanto endotelial como de fístulas arteriovenosas y pérdida de una jerarquía vascular normal. Lien y Ackerman en 1970 [4], produjeron moldes de caucho de silicona de los vasos sanguíneos tumorales, que demostró un intrincado plexo de las arterias, con diámetros entre 25 y 75 [ $\mu\text{m}$ ], formando un anillo alrededor de la periferia del tumor.

El conocimiento del diámetro de los vasos y su naturaleza desorganizada ha llevado a una terapia más adaptada y juega un papel fundamental en la determinación del tamaño ideal de los agentes embólicos o portadores de medicamento a utilizar [3].

Estas características representan la base para la terapia arterial, ya que cualquier tratamiento, o agente embólico que se administre resultará en una deposición terapéutica en el tumor a través de su vasculatura, reduciendo así la exposición (y protegiendo) el parénquima hepático normal circundante.

En la evolución de los agentes embólicos y terapéuticos se han utilizado una gama amplia, incluyendo la embolización poco agresiva para el cuerpo humano (primera generación), la embolización con agentes portadores basados en aceite (segunda generación) y la embolización cuando la administración de un agente terapéutico es el objetivo principal (tercera generación) [3].

### 1.3.AGENTES EMBÓLICOS

#### 1.3.1. Primera generación

Se han utilizado muchos agentes embólicos de materiales diferentes para embolización poco agresiva. Estos pueden ser divididos en subgrupos: no esféricos y esféricos. Los agentes embólicos no esféricos de esponja de gelatina absorbible cortadas en el tamaño deseado y partículas de acetato de polivinilo (PVA, no absorbibles) se usaron predominantemente antes del advenimiento de los productos avanzados. Los agentes embólicos esféricos o microesferas están ahora disponibles a través de muchos fabricantes, y aunque vienen en rangos de tamaño similares, difieren en rigidez, elasticidad y deformabilidad que dictan las propiedades superficiales físicas, tales como hidrofilia, tensión superficial y carga eléctrica. Algunos ejemplos de este tipo de agentes se pueden observar en la Ilustración 2, la uniformidad y la naturaleza hidrófila de estos permiten una penetración mejorada en comparación con sus contrapartes no esféricas; Sin embargo, cada clase y tipo de partícula presenta características únicas relativas al nivel de embolización vascular, reacción inflamatoria post-implante y comportamiento durante la embolización.

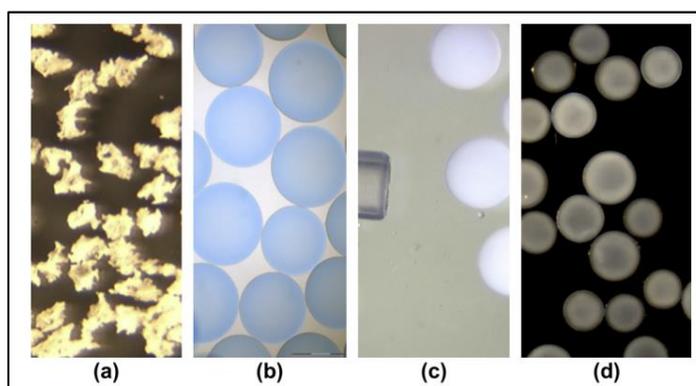


Ilustración 2: Agentes embólicos no agresivos: (a) polvo de gelatina absorbible, (b) microesferas de PVA calibradas, (c) microesferas de hidrogel de PVA, (d) microesferas de trisacrilo [3]

La intención de la embolización no agresiva es crear un ambiente de hipoxia/anoxia (la hipoxia es un estado de los tejidos del organismo en el cual no tienen suficiente oxígeno y anoxia se refiere a la falta total de oxígeno) en el tumor. La discusión sobre los tamaños específicos, sigue en curso, sin embargo, el grupo Memorial Sloan

Kettering [5], utilizó partículas pequeñas en el rango de 80 a 300 [ $\mu\text{m}$ ] con resultados clínicos aceptables para su uso en HCC y tumores neuroendocrinos (NET) [3].

### **1.3.2. Segunda generación**

Las emulsiones a base de aceite etiodizadas, que se denominan comúnmente por sus nombres comerciales, Lipiodol y Etiodol, son mezclas de yodo y ésteres etílicos de ácidos grasos de aceite de semilla de amapola y sirven como portadores para agentes quimioterapéuticos solubles en agua. Exámenes tanto radiológicos como histológicos han demostrado que la suspensión de un agente quimioterapéutico en un vehículo oleoso, permite permanecer selectivamente en la vasculatura y los espacios extravasculares de los tumores hepáticos cuando se inyecta en la arteria hepática.

La aplicación del soporte a base de aceite es doble: crear una emulsión de aceite y agua para suspender el agente quimioterapéutico acuoso (independientemente del tipo) con la consiguiente viscosidad incrementada necesaria para la embolización una vez que se expone al tejido tumoral y, permitir una imagen mejorada durante el procedimiento. Este novedoso concepto ha generado toda la base de la terapia *transarterial chemoembolization* (TACE). Se han descrito otros perfeccionamientos de la técnica utilizando algunas estrategias embólicas particuladas luego de la inyección del aceite, y así aumentar la retención del medicamento.

La dosis óptima, el método de administración y el agente o combinación de agentes quimioterapéuticos aún no se ha establecido. Este procedimiento, ha demostrado un resultado clínico positivo en el tratamiento de HCC, a pesar del alto grado de variación en técnicas e indicación. Sin embargo, la naturaleza impredecible de la dispersión del agente terapéutico puede tener implicaciones relacionadas con toxicidades y síndromes de post-embolización.

### **1.3.3. Tercera generación**

La administración selectiva de agentes terapéuticos, es el objetivo principal de los agentes embólicos de tercera generación. En esencia, la "porción embólica" del dispositivo (perla de liberación de fármaco o microesfera embólica radioactiva) sirve como soporte físico para la colocación de un agente terapéutico, esto permite una doble función y es lo que las diferencia con los de primera generación.

Las perlas utilizadas en quimioterapia intrarterial, *drug-eluting beads* (DEB), son microesferas cargadas con un agente quimioterapéutico y dan como resultado una unión iónica debido a la afinidad polar. Un beneficio de las DEB en comparación con la quimioterapia basada en Etiodol y la quimioterapia convencional sistémica, son las concentraciones plasmáticas mínimas de medicamento, lo que sugiere una menor absorción sistémica y, por lo tanto, una mayor absorción en el tumor.

Las plataformas comerciales DEB están disponibles en una variedad de tamaños como se pueden observar en la Ilustración 3.

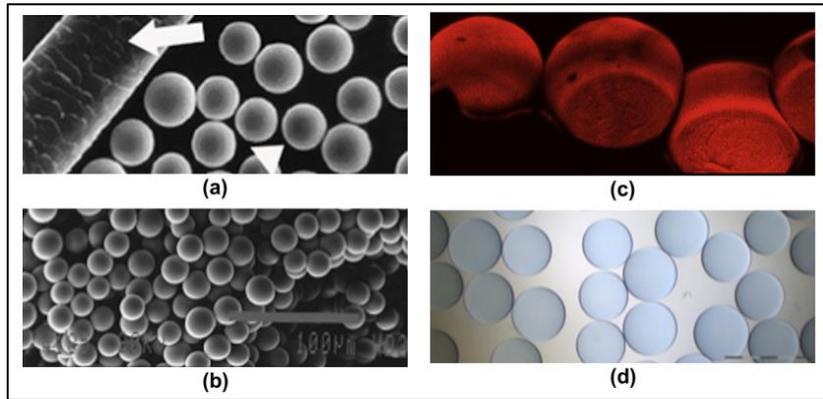


Ilustración 3: Agentes embólicos de tercera generación: (a) microesferas cerámicas de itrio-90, en fotomicrografía adyacente al cabello humano (flecha). (b) Microesferas de resina ytrio-90. (c) Microesferas de polímero superabsorbente cargadas con doxorubicina, (d) Microesferas de hidrogel PVA [3]

La mayoría de los estudios han demostrado una disminución significativa en la toxicidad en comparación a la quimioterapia tradicional, haciendo de la quimioterapia intraarterial con DEB la técnica de elección si las toxicidades o complicaciones relacionadas con el fármaco son preocupantes. A pesar de la considerable mejora en la tolerancia a esta terapia, actualmente sólo ha demostrado no ser inferior, en comparación con *transarterial chemoembolization* (TACE) y *selective internal radiation therapy* (SIRT), en términos de supervivencia de progresión libre del cáncer [3].

En este trabajo se realizarán esferas con biopolímeros, las que apuntan ser aptas para este tipo de tratamiento.

#### 1.4.MOTIVACIÓN

Como agentes embólicos, además del PVA mencionado anteriormente, también son utilizados materiales como cianoacrilato y acetato de celulosa, de los cuales algunos son citotóxicos en su forma líquida, o lo son sus disolventes poliméricos, lo que puede conducir a una respuesta inmune indeseada y, a la inflamación del tejido.

Para lograr la embolización, a estos polímeros se les debe agregar adhesivo, que muchas veces se adhiere a las arterias, dañando e infiltrando la pared del vaso sanguíneo, lo que aumenta la probabilidad de hemorragia. Por otro lado, algunos adhesivos poliméricos son difíciles de controlar durante la inyección, se endurecen rápidamente y bloquean el flujo a través del catéter de suministro y de vez en cuando, adhieren el catéter a la pared del vaso. Muchos procedimientos tradicionales de embolización son también inadecuados desde el punto de vista de los materiales utilizados [6].

Para evitar este problema, en este trabajo se busca como alternativa, generar microesferas en microcanales a partir de un biopolímero o de una mezcla de ellos, ya que, al ser obtenidos de la naturaleza, se espera que sean biocompatibles.

En resumen, la motivación de este proyecto es buscar un(os) biopolímero(s), que sean estables en el tiempo para ser usados en terapia de embolización tumoral.

Además, que sean de bajo costo y biocompatible, para que los pacientes que se realicen una quimioembolización intraarterial para tumores hepáticos (cáncer de hígado), sufran la menor cantidad de efectos adversos posibles.

## **1.5.ANTECEDENTES**

### **1.5.1. Alginato como agente embólico**

Como opción, para evitar el problema descrito anteriormente, nace el alginato, que es un polímero aniónico por el cual ha crecido el interés, debido a su bajo costo y baja toxicidad, además, es reconocido por la FDA (agencia de alimentos y medicamentos del gobierno de los Estados Unidos) para poder ser usada tanto en alimentos como en medicamentos en humanos y animales [7].

El ácido algínico es un gel de polisacárido natural derivado de algas pardas, es un copolímero que consiste en bloques de ácidos manurónico (M) y gulurónico (G) en diversas disposiciones a lo largo de la cadena polimérica, Ilustración 4(a). Es soluble en agua y puede ser reticulado iónicamente con una solución de catión divalente no tóxico. La afinidad de un catión divalente es más fuerte para los isómeros G debido a la disposición estérica de los átomos, dos monómeros G forman una "caja de huevos" Ilustración 4(b), en la que, por ejemplo, en una solución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) un ion de calcio se asienta y reticula dos cadenas de polímero, Ilustración 5. Cuando esto sucede al hidrogel resultante se le denomina comúnmente alginato cálcico. En consecuencia, la relación M/G afectará la capacidad de reticulación y, por tanto, las propiedades físicas del hidrogel [8]. El alginato tiene muchos usos en bioingeniería, tales como películas de polímero, encapsulación celular, vendajes de heridas y esponjas quirúrgicas.

Es sabido que el alginato presenta efectos citotóxicos mínimos y reduce la hemólisis (destrucción de glóbulos rojos) cuando está en contacto con la sangre. Estudios anteriores de encapsulación de células con alginato, atribuyeron al contenido de ácido G y la pureza, su biocompatibilidad y resistencia. Se cree que la purificación elimina contaminantes y proteínas que pueden causar una inmuno respuesta indeseable [6].

Alginato de sodio fue seleccionado para estudio por Becker et al. [6] para ser utilizado en embolización endovascular, luego de una extensa investigación en polímeros con el potencial de alta resistencia mecánica en su forma sólida, baja viscosidad en su forma líquida y alta biocompatibilidad.

Otra consideración importante es la competitividad de costos, Forster et al. [8] informa los resultados de algunos modelos *in vitro* y en vivo utilizados para evaluar atributos clave necesarios de perlas de alginato como dispositivos de embolización de la arteria uterina (EAU), comparándolos con propiedades de los agentes existentes hoy en el mercado.

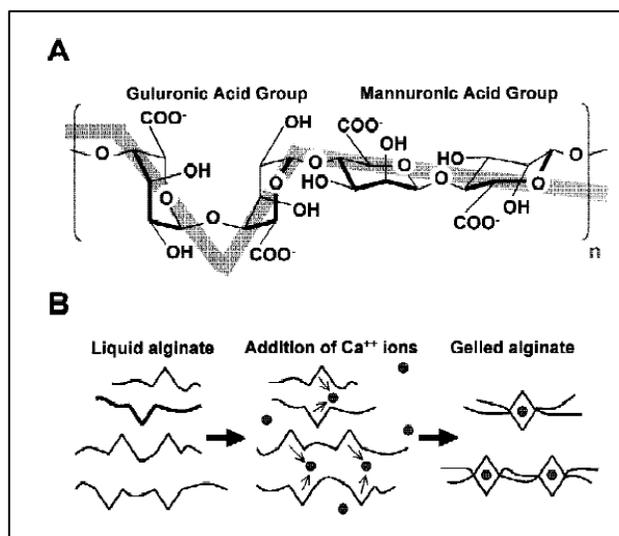


Ilustración 4: Estructura de alginato y mecanismo de reacción. (A) El alginato es un copolímero de polisacárido hecho de grupos ácido gulurónico (G) y manurónico (M). La estereoquímica del ácido G proporciona sitios reactivos de ácido carboxílico. Los ácidos M no son reactivos. (B) En presencia de iones de calcio divalentes, el calcio está sustituido iónicamente en el sitio carboxílico. Una segunda cadena de alginato también puede conectarse al ion de calcio. El resultado cadenas de alginato unidos al calcio que forman un gel sólido [6]

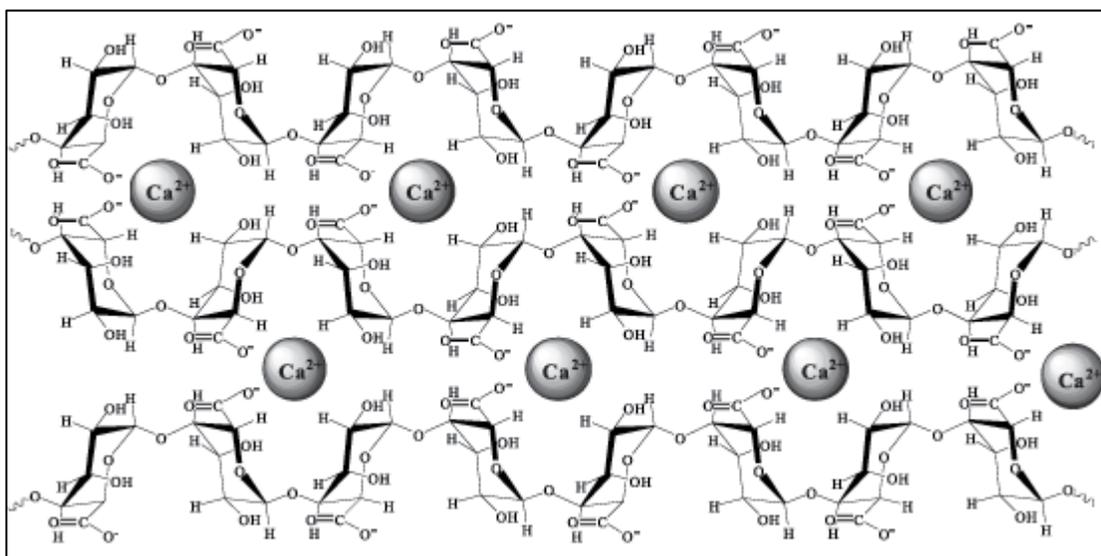


Ilustración 5: Ion de calcio se asienta y reticula dos cadenas de alginato sódico, interacción iónica [9]

Becker et al. [6] gelificó alginatos con diversos contenidos de ácidos G y pureza para ensayos de resistencia a la compresión, rendimiento y viscoelasticidad. La biocompatibilidad del alginato la ensayó mediante implante polimérico para oclusión endovascular en vasos renales de conejo.

Los resultados de su trabajo demostraron que el alginato cálcico tiene las características necesarias para convertirse en un polímero mecánico estable y biocompatible al ser utilizado para tratamiento endovascular.

El alginato no es adhesivo y, a diferencia de muchos materiales endovasculares actuales, exhibe biocompatibilidad sin daño de la pared vascular. Se podría suministrar

un volumen considerable de alginato al sistema, sin preocuparse de que el catéter esté pegado a la pared del vaso.

La técnica de oclusión o embolización ideal, es aquella que permite una orientación y entrega precisas al objetivo con bajo riesgo de lesión a estructuras sanas. Para lograr esto, radiólogos intervencionistas son de la opinión de que el agente embólico requiere de una serie de atributos [10]. Por ejemplo, que al manipular el agente, debe ser radiopaco o tener la capacidad de ser mezclado en una suspensión radiopaca para permitir la visualización durante el suministro. También se prefiere la sencillez (el pegamento es notoriamente difícil de manejar, por ejemplo). Por otro lado, la adaptabilidad es clave para permitir una oclusión selectiva y rápida de diversos tamaños y tipos de vasos sanguíneos.

Desde otra perspectiva, Forster et al. [8] ensayó la compresibilidad en comparación con otras esferas embólicas en el mercado, la capacidad de entrega del microcatéter y la degradación de las esferas. Se utilizó un modelo de EUA de oveja, diseñado para imitar las condiciones a las que serían sometidas las esferas.

Como resultado, tanto los datos *in vitro* como en vivo mostraron un buen suministro, sin tendencia a bloquear catéteres o fragmentos debido a propiedades de compresibilidad comparables a las actuales esferas embolicas comercialmente disponibles, Ilustración 6. Las perlas embólicas ensayadas fueron alginato de alto contenido de ácido G, alginato de alto contenido de ácido M, DC Bead®, BeadBlock®, Contour SE® y Embosphere®. Se utilizó una sonda cilíndrica plana de 5 [mm] unida a un Sistema de Ensayos de Materiales Instron (Instron High Wycombe, Reino Unido) montado con una de carga de 50 [N] y se registraron los datos de compresión. El módulo se calculó a partir del gradiente de compresión inicial de una gráfica tensión/deformación de la fuerza de compresión.

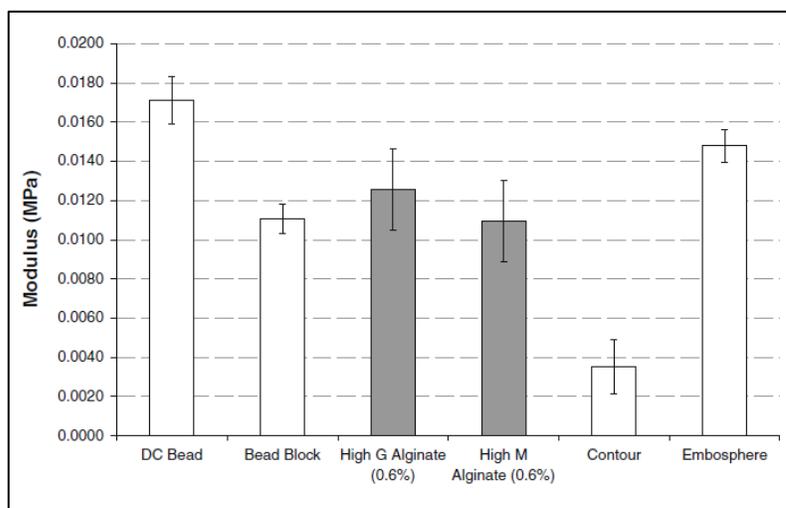


Ilustración 6: Módulo de perlas de alginato junto con las esferas embólicas comercialmente disponibles, las esferas de alginato son parecidas en módulo de compresión a las Bead Block® [8]

*In vitro*, al inyectar las esferas, se observó hinchazón casi inmediatamente y después de 12 semanas se observaron los primeros signos de degradación, casi no hubo diferencia en comparación con las pruebas en vivo. Este estudio demostró que las esferas de gel de alginato de alto peso molecular son bien toleradas por el cuerpo, que son fáciles de manejar y que después de 12 semanas en vivo, las de alto contenido de ácido G todavía eran observables, con el potencial de reabsorción en el tiempo.

Como se mencionó anteriormente, el alginato es un polímero biodegradable. El hidrogel puede degradarse mediante la hidrólisis de los enlaces glucosídicos o puede disolverse debido a la elución del catión de calcio reticulante. Se ha demostrado que el peso molecular afecta este proceso [8], lo que genera una limitada estabilidad a largo plazo en condiciones fisiológicas, por ello este trabajo estudiará la posibilidad de mezclar el alginato con otro biopolímero para generar esferas estables en el tiempo.

### **1.5.2. Esferas de alginato-quitosano**

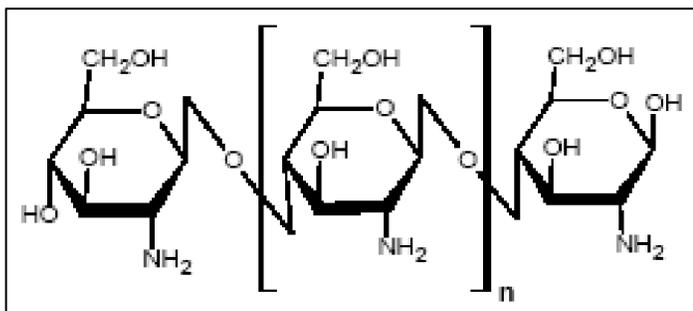
Esferas de alginato cálcico recubiertas con un polielectrolito han sido ampliamente investigadas para aplicaciones como contenedores inmunoprotectores en el trasplante de células, la inmovilización de enzimas y los sistemas de liberación de fármacos. Idealmente, un sistema de entrega de droga libera el fármaco en el cuerpo adecuándose a la velocidad necesaria para el tratamiento específico. Considerables esfuerzos se gastan en sistemas de administración oral sostenida de medicamentos, la mayoría de estos sistemas son formas de dosificación sólida, lo que permite distribuir su carga de droga más uniformemente en el tracto gastrointestinal con el fin de reducir la irritación local.

Esferas con antibióticos podrían ser útiles para administración oral en el tratamiento de enfermedades gástricas como la úlcera péptica y colitis ulcerosa, carcinomas e infecciones en el intestino. Además, la absorción sostenida específicamente en la región intestinal ofrece interesantes posibilidades para el tratamiento de enfermedades sensibles al ritmo diurno, como el asma, la artritis o inflamación [11].

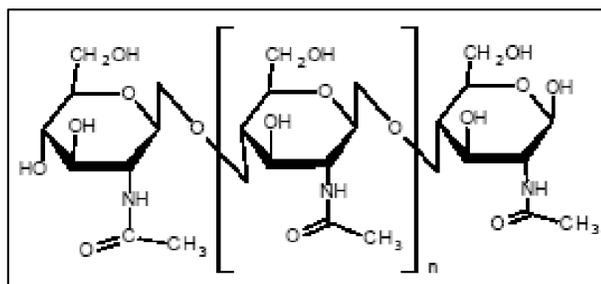
Quitosano se ha propuesto como un excipiente útil para cualquier liberación sostenida de drogas solubles en agua y para mejorar la biodisponibilidad de compuestos mal solubles en agua. Microesferas de quitosano se han estudiado para liberación controlada de fármacos, con el fin de lograr una estabilidad suficiente, las que a menudo son reticuladas químicamente con glutaraldehído y etilenglicol diglicidil éter. Sin embargo, residuos de estos compuestos en las esferas de quitosano pueden causar daño o irritación de las mucosas y provocar efectos secundarios indeseables.

El quitosano, Ilustración 7, proviene de las “cáscaras” de los crustáceos y es el producto parcialmente desacetilado de la quitina, Ilustración 8. Es un polisacárido catiónico lineal compuesto por unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina; presenta una configuración helicoidal tridimensional estabilizada mediante de enlaces de hidrógeno entre los monómeros que lo forman, es insoluble en disolventes orgánicos puros, pero es soluble en medio ácido acuoso. La solubilidad se produce por la protonación del grupo amino, Ilustración 9, entonces, este polisacárido se convierte en un polielectrolito en

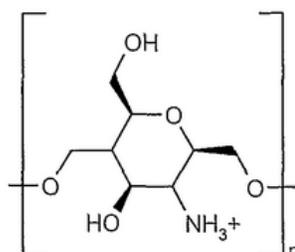
condiciones ácidas, lo que favorece su solubilidad debido a repulsiones electrostáticas [12].



*Ilustración 7: Estructura molecular del quitosano [12]*



*Ilustración 8: Estructura molecular de la quitina [12]*



*Ilustración 9: Protonación del grupo amino del quitosano*

El quitosano presenta un potencial e interesante valor económico, debido a sus versátiles actividades biológicas y aplicaciones químicas. Es biodegradable, biocompatible, pues no se produce respuesta del sistema inmune y no tóxico, características que unidas a la naturaleza policatiónica antes descrita, han estimulado su empleo en diversas aplicaciones biomédicas [12].

Recientemente, complejos polielectrolitos se han propuesto para el diseño de sistemas de suministro de medicamentos. El quitosano puede formar geles con contra iones aniónicos multivalentes no tóxicos tales como polifosfato y alginato sódico mediante reticulación iónica [11].

Por otro lado, las perlas de gel de alginato cálcico no recubiertas se desestabilizan cuando están presentes quelantes tales como fosfato, lactato, citrato o cationes no gelificantes como iones sodio o magnesio. Estos iones interactúan con los iones de

calcio unidos no cooperantes, dando lugar a la degradación del gel. Para geles de alginatos con altos contenidos de ácido G, comienzan a degradarse cuando la relación de sodio a iones de calcio se incrementa por encima de 40. En tales ambientes, como el cuerpo humano, existe la necesidad de un agente estabilizante, por ejemplo, una membrana formada por un polímero unida al gel de alginato por interacciones electrostáticas con los grupos de ácido del alginato cargados negativamente. Numerosos trabajos describen la permeabilidad de esferas de alginato-polímero y/o la resistencia mecánica, pero la estabilidad de la esfera cuando se expone a ambientes con bajas concentraciones de iones de calcio rara vez se informa. Se ha demostrado que la unión y la estabilidad de las esferas de alginato-polímero depende tanto de la composición del gel de alginato y del peso molecular, como de la flexibilidad y densidad de carga del polímero [13].

En la producción de esferas con una membrana de quitosano y un núcleo sólido de gel de alginato, las variaciones en los procedimientos y los materiales aplicados son amplias. Sin embargo, existen dos procedimientos principalmente diferentes [13]: un procedimiento de una etapa, en el que se forma una membrana de quitosano, que rodea un núcleo de alginato líquido, cuando el alginato acuoso se deja caer directamente en una solución de quitosano. El núcleo se gelifica a continuación ya sea mediante la adición de  $\text{CaCl}_2$  a la solución de quitosano o por el tratamiento de las esferas de núcleo líquido de alginato con  $\text{CaCl}_2$  después de que la membrana se ha formado.

El otro método es un procedimiento de dos etapas que comprende la formación de esferas de alginato cálcico, a continuación, se lavan a menudo con una solución libre de calcio, y son transferidas a una solución de quitosano donde las esferas quedan suspendidas formando una membrana.

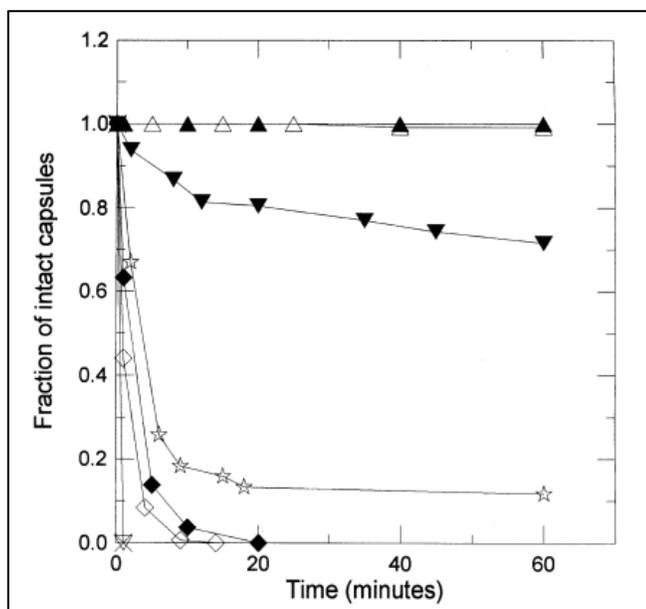
Gaserod et al. [13] estudió la estabilidad de esferas obtenidas con los métodos anteriormente descritos, a corto y a largo plazo, además de la permeabilidad en función del contenido de quitosano y su distribución en las esferas.

Anil y Willem [11] prepararon esferas multicapas de quitosano-alginato y de quitosano-alginato reticulados con tripolifosfato iónico-cruz-ligado (TPP). Esto, mediante el método de una etapa para luego traspasar las esferas gelificadas a soluciones que contienen quitosano, alginato sódico y  $\text{CaCl}_2$ , que les permitió unir los métodos de una y dos etapas, para desarrollar un complejo estable y no tóxico, con propiedades mejoradas de liberación de drogas.

El trabajo de Gaserod et al [13], menciona que, para la estabilidad a corto plazo, la resistencia mecánica de las esferas de alginato-quitosano se controló en un "ensayo de explosión". Se equilibraron unas 100 perlas durante 15 minutos en tampón fosfato salino (PBS) y luego se transfirieron a agua desionizada conduciendo a una alta presión osmótica dentro de las esferas. Después de 60 minutos en el agua, se determinó el número de esferas intactas en un microscopio óptico.

Para la estabilidad a largo plazo, el artículo señala que las perlas se incubaron en un entorno con concentración de sal fisiológica (NaCl) durante 198 días. El número exacto de esferas intactas se monitorizó en un microscopio óptico mientras que las soluciones salinas se cambiaban cada dos días durante las primeras dos semanas y luego cada mes.

Como resultado, la fuerza de las esferas, medida por el ensayo de explosión, determinó que, de las esferas de una etapa que se gelificaron después de que se había formado la membrana, sólo el 15% permanecieron intactas al final del período de prueba. Todas las esferas de una etapa que se formaron en presencia de CaCl<sub>2</sub> en la solución de quitosano, se rompieron durante el primer minuto del ensayo, Ilustración 10.



*Ilustración 10: Estabilidad a corto plazo monitorizada por el ensayo de explosión luego de 60 [min] en agua desionizada. Esferas generadas por una etapa, gelificadas al caer en solución (x) y gelificadas luego de la formación de la membrana de quitosano (☆). Esferas de dos etapas hechas con (Δ) y sin (∇) CaCl<sub>2</sub> en la solución de quitosano, y las que se lavaron con PBS previo al trasvaso a la solución de quitosano (◊). Las cápsulas homogéneas están representadas por los símbolos rellenos mientras que las no homogéneas son las vacías [13]*

Cuando se ensayaron esferas homogéneas producidas a partir del procedimiento de dos etapas (la homogeneidad en este artículo se refiere al gradiente de concentración de alginato a través de la sección transversal de la esfera. En una esfera no homogénea, la concentración de alginato en la superficie de ella puede ser 10 veces mayor que el centro), sólo el 28% de las cápsulas se rompieron durante la prueba. Se concluye entonces, que la resistencia de las esferas hechas con el procedimiento en dos etapas aumentó fuertemente con la concentración de CaCl<sub>2</sub> en la solución de quitosano. Cabe destacar, que las esferas de dos etapas no homogéneas, con un peso molecular medio (MM) de 16.000 y sin CaCl<sub>2</sub>, eran tan débiles como las esferas de una etapa.

Al añadir 0,3 [M] de CaCl<sub>2</sub> a la solución de quitosano, prácticamente todas las cápsulas, tanto homogéneas como no homogéneas de dos etapas, permanecieron

intactas durante el período de prueba. Sin embargo, se requirió un tiempo de reacción más largo en la solución de quitosano en las perlas no homogéneas para producir la misma resistencia que las homogéneas (Ilustración 11 a y b). Los tiempos de reacción de 5 horas y 30 minutos dieron aproximadamente la misma resistencia para ambos tipos de perlas, con el 90% de esferas intactas al final del período de prueba.

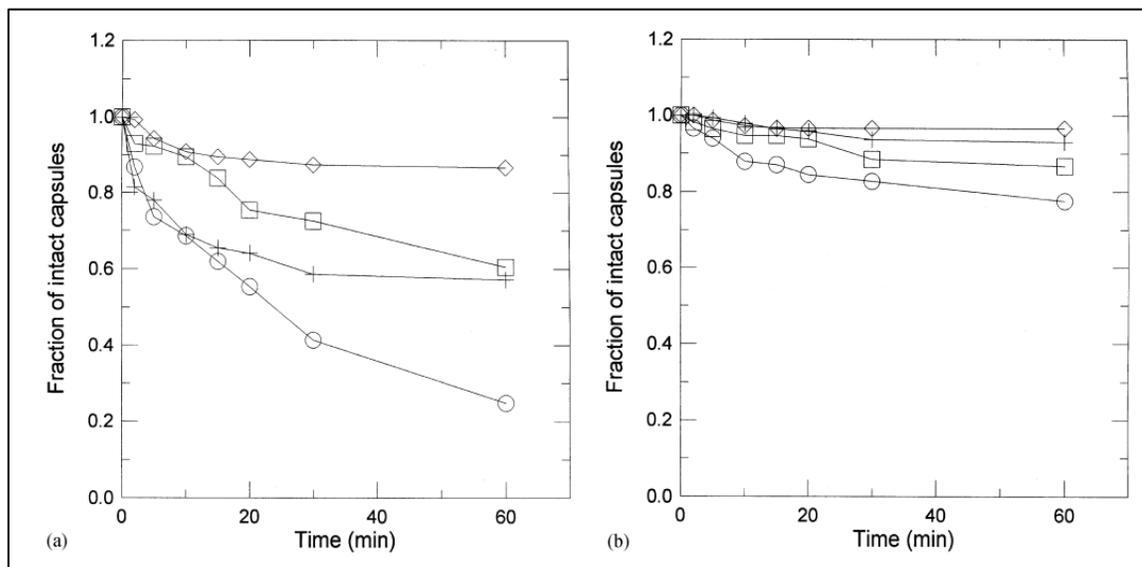


Ilustración 11: Estabilidad a corto plazo monitorizada por el ensayo de explosión en agua desionizada para (a): cápsulas homogéneas y (b) no homogéneas, con el procedimiento de dos etapas y tiempos de reacción en la solución de quitosano con  $\text{CaCl}_2$  de 15 (+), 30 minutos ( $\diamond$ ), 2 (o) y 5 horas ( $\Delta$ ) [13]

La influencia de la concentración de quitosano sobre la resistencia de la cápsula también se ensayó cuando se incrementó por encima de 1,5 [mg/ml] hasta 3 [mg/ml] y no se observó un aumento significativo en la resistencia.

Además, en el artículo se estudiaron los resultados para esferas de dos etapas recubiertas con quitosano de cuatro pesos moleculares medios (MM) distintos que van desde 15.000 hasta 62.000, a distintos tiempos de reacción de las esferas en la solución de quitosano, Ilustración 12. Las esferas hechas a partir del quitosano con el mayor MM tuvieron la fracción más baja de esferas intactas a tiempos de reacción de hasta 2 horas. Para los tiempos de reacción de 5 y 24 horas, el ensayo no pudo detectar ninguna diferencia en la resistencia de las esferas, puesto que esencialmente el 100% de las esferas permanecieron intactas después de la exposición al estrés osmótico.

Los mismos patrones encontrados en los estudios de estabilidad a corto plazo, fueron también evidentes en los experimentos a largo plazo, Ilustración 13. Todas las esferas de una etapa se rompieron durante el primer cambio de la solución salina. De las esferas homogéneas de dos etapas en contacto por 5 horas en la solución de quitosano sin  $\text{CaCl}_2$ , las cápsulas con quitosano de MM de 62.000 se rompieron durante la primera semana. Como en los estudios de estabilidad a corto plazo, las esferas hechas con quitosano de MM de 15.000 fueron más estables, pero sólo con

presencia de  $\text{CaCl}_2$  en la solución, estuvieron relativamente intactas durante los 198 días del experimento.

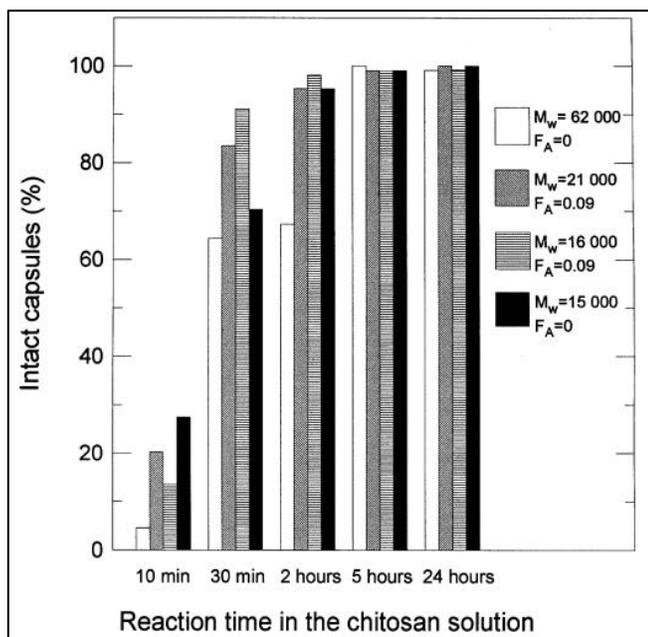


Ilustración 12: Estabilidad a corto plazo monitorizada por el ensayo de explosión en esferas no homogéneas de dos etapas, reacciones en la solución de quitosano de 10 [min.] a 24 [h] con MM que oscilan entre 15.000 y 62.000 [13]

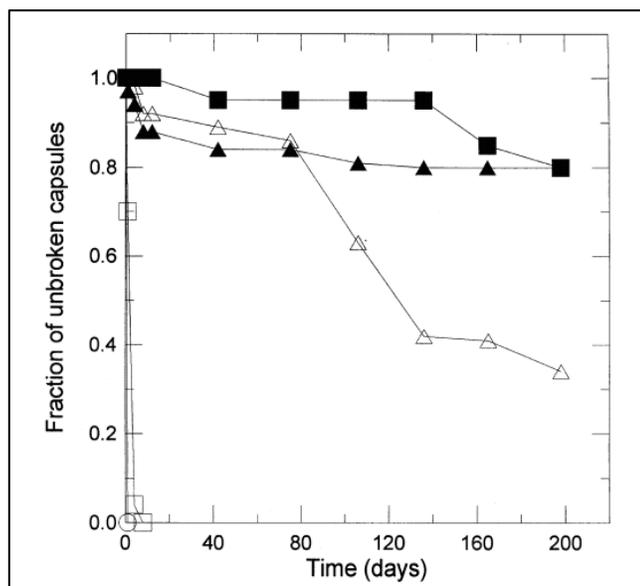


Ilustración 13: Estabilidad a largo plazo en una solución salina de esferas de una etapa (o) (gelificado después de la formación de la membrana) y cápsulas homogéneas de dos etapas reaccionadas en 5 [h] con diferentes MM de quitosano: 17.000 ( $\Delta$ ) y 62.000 ( $\square$ ). Los símbolos rellenos representan cápsulas reaccionadas con  $\text{CaCl}_2$  y los símbolos vacíos sin  $\text{CaCl}_2$  [13]

El procedimiento en una etapa, que es utilizado por varios grupos, es un método rápido para producir esferas de alginato-quitosano. Sin embargo, la baja estabilidad de estas esferas en ambientes con bajas concentraciones de iones de calcio hace que sus aplicaciones sean muy limitadas. La alta estabilidad de las esferas de dos etapas

hechas con iones de calcio presentes en la solución de quitosano abre una gama más amplia de aplicaciones. El aumento de la fuerza de la esfera está estrechamente correlacionado con la cantidad de quitosano unido a la red de gel interior [13].

En el trabajo de Anil y Willem [11], se describe el TPP como un compuesto aniónico no tóxico y multivalente. Puede formar un gel por interacción iónica con los grupos aminos cargados positivamente de quitosano. El artículo muestra esferas reforzadas con estos compuestos y la posterior captura del fármaco para liberación sostenida en el sistema gastro intestinal, mostrando esferas simples y multicapas, tanto de alginato-quitosano, como de alginato-quitosano-TPP. Sin embargo, para efectos de este trabajo solo se mostrarán las concentraciones utilizadas para las primeras.

Tabla 1: Composiciones de esferas de una y varias capas de quitosano (CTS) y alginato sódico (SA) [11]

Formulation	Coagulation fluid		Post coagulation treatment subsequently in the following solutions		
	CTS (%)	CaCl <sub>2</sub> (%)	CTS (%)	SA (%)	CaCl <sub>2</sub> (%)
A0	–	3.0	–	–	–
A1	0.2	3.0	–	–	–
A2	0.4	3.0	–	–	–
A3	0.8	3.0	–	–	–
A4	–	3.0	0.08	–	–
A5	0.8	3.0	0.08	–	–
A6	0.8	3.0	0.08	0.08	0.5

Las esferas son producidas mediante una unión de los métodos de gelificación usados por Gaserod et al. [13]. La composición de las soluciones de gelificación y de las soluciones donde son traspasadas las esferas luego de ser gelificadas, se enumeran en la Tabla 1. Son denominadas esferas simples desde A0 a A3 (método de una etapa) y esferas multicapas desde A4 a A6 (unión de los métodos de una etapa y de dos etapas).

La liberación de la ampicilina parece ocurrir por difusión y por la erosión de las esferas, la degradación de ellas fue dependiente del pH. Las esferas multicapas mostraron más demora en la liberación de la ampicilina. Basándose en los resultados, el artículo concluye que las esferas multicapas, especialmente las reticuladas con TPP son adecuadas para la liberación sostenida oral y son compuestos altamente hidrofílicos. Estos sistemas biocompatibles pueden eludir la acidez del líquido gástrico sin liberar grandes cantidades del compuesto cargado [11].

### 1.5.3. Mezcla de alginato-quitosano

Bajo la necesidad de generar esferas de alginato-quitosano en una etapa de manera más simple para su posterior uso en microfluídica, se decidió buscar la posibilidad de generar una mezcla de los biopolímeros, para su posterior entrecruzamiento con CaCl<sub>2</sub>.

Los polisacáridos naturales alginato de sodio y quitosano han recibido mucha atención en el sistema de administración de fármacos por su excelente biocompatibilidad. La interacción entre alginato y quitosano ha sido sistemáticamente investigada. Su complejo

de polielectrólitos ha sido ampliamente utilizado para obtener dispositivos para la liberación controlada de fármacos, como ya ha sido mencionado.

Los métodos de preparación de esferas de quitosano-alginato se centran principalmente en reticulación con calcio, tal como perlas de alginato cálcico revestidas de quitosano [13], descritas previamente. Por otra parte, las perlas de alginato cálcico contenidas en quitosano en polvo también se han investigado [14] [15]. Pero las propiedades controladas de la sensibilidad al pH no han sido suficientemente investigadas. Esferas de hidrogel de mezcla de alginato-quitosano preparadas basándose en reticulación dual con  $\text{CaCl}_2$  y glutaraldehído mostraron una rápida adsorción de iones de metales pesados en la corriente de aguas residuales [16].

Yongmei et al. [17] preparó esferas de gel de mezcla de alginato-quitosano estables, basadas en reticulación iónica dual de  $\text{CaCl}_2$  y sulfato de sodio  $\text{SO}_4^{2-}$  convenientes para liberación sostenida de una droga específica en fluido gástrico simulado (SGF) y en fluido intestinal simulado (SIF). También investigó la influencia de la proporción de masa de alginato/quitosano y la comparó con esferas de alginato cálcico reticuladas de manera simple, es decir solo con  $\text{CaCl}_2$ , para observar cómo afecta en el suministro.

Las esferas se prepararon mediante goteo, soluciones de mezcla alginato-quitosano se realizaron con proporciones de masa de 5:5, 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 y 10:0 en agua destilada y ácido acético, para su posterior gelificación con  $\text{CaCl}_2$ , Ilustración 14.

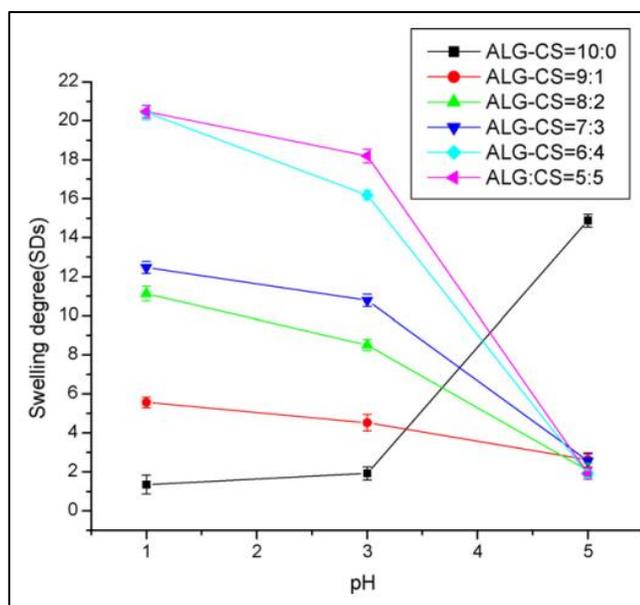


Ilustración 14: Comportamiento de hinchazón de esferas de hidrogel, de diferentes proporciones de mezcla de alginato-quitosano reticuladas con  $\text{Ca}^{2+}$  [17]

Estudios de liberación *in vitro* demostraron que la droga es liberada de todas las esferas en SGF. La liberación total del fármaco en las esferas de proporción 9:1, es superior en SIF que para las de proporción 7:3 y 5:5. La liberación de la droga de todas las esferas es mucho más rápida en SGF que en SIF.

Las esferas indicaron que, hidrogeles de mezcla de alginato-quitosano doblemente reticuladas son posibles portadores de drogas para el sistema de entrega de medicamento específico intestinal o de colon [17].

#### **1.5.4. Propiedades químicas y físicas de los hidrogeles de alginato-quitosano.**

Una vez que se decidió hacer esferas de alginato-quitosano, es importante saber cómo se caracterizan para ser utilizadas con el fin del trabajo.

La estructura de la red de los hidrogeles de alginato cálcico, permite la captura de una amplia gama de sustancias bioactivas, células, moléculas y medicamento en su interior, con menores interacciones entre ellos y el biopolímero. Además, las propiedades físicas y químicas de los alginatos (porosidad, degradación) pueden ser modificadas fácilmente [18].

Quitosano se utiliza para recubrir las esferas de alginato y modificar la tasa de difusión de las sustancias encapsuladas [11] o como aditivo para la modificación de la mayor parte de la estructura de las esferas [16]. El comportamiento de perlas de alginato cálcico, tratadas con quitosano en medios que imitan los fluidos gastrointestinales ha sido estudiado por varios científicos [19] [20] [21], además de los ya citados.

La mejora de los sistemas de entrega controlada de medicamentos depende de las propiedades de los materiales utilizados. Por lo tanto, una mejor comprensión de las propiedades de los biopolímeros es esencial para mejorar la eficiencia de los sistemas de lanzamiento. El objetivo del estudio de Pasparakis y Bouropoulos [18] fue primero la investigación del comportamiento de la hinchazón de tres tipos diferentes de esferas, unas de alginato cálcico, otras mezcladas con quitosano y finalmente unas cubiertas de quitosano, en diferentes medios acuosos. Luego, se realizaron estudios de liberación *in vitro* de clorhidrato de verapamilo antihipertensivo contenido en las esferas, en fluidos gástricos simulados y los perfiles de liberación se analizaron utilizando una ecuación semiempírica para caracterizar cualitativamente el mecanismo de liberación de drogas.

Las esferas de alginato cálcico fueron preparadas por adición gota a gota a través de una aguja a una solución de  $\text{CaCl}_2$ . Las de mezcla de alginato-quitosano son preparadas de la misma manera a excepción de que el medio gelificante fue una solución de quitosano de 0,1% (p/v) con 1% de ácido acético, que también contiene  $\text{CaCl}_2$ . Finalmente, las cubiertas se prepararon de la misma manera que las de alginato cálcico, pero luego se transfirieron a una solución de quitosano y permanecen durante 15 minutos en suave agitación magnética.

El artículo muestra estudios de hinchazón, debido a su característica hidrofílica, usando esferas húmedas y secas. El término mojado se refiere al estado de las esferas inmediatamente después de la preparación y el término seco a las esferas que se dejaron secar durante 24 horas a 30 [°C] en aire. Ilustración 15 muestra el comportamiento de

hinchazón de las esferas, en agua, tampón fosfato salino (PBS) y fluido gástrico simulado (SGF).

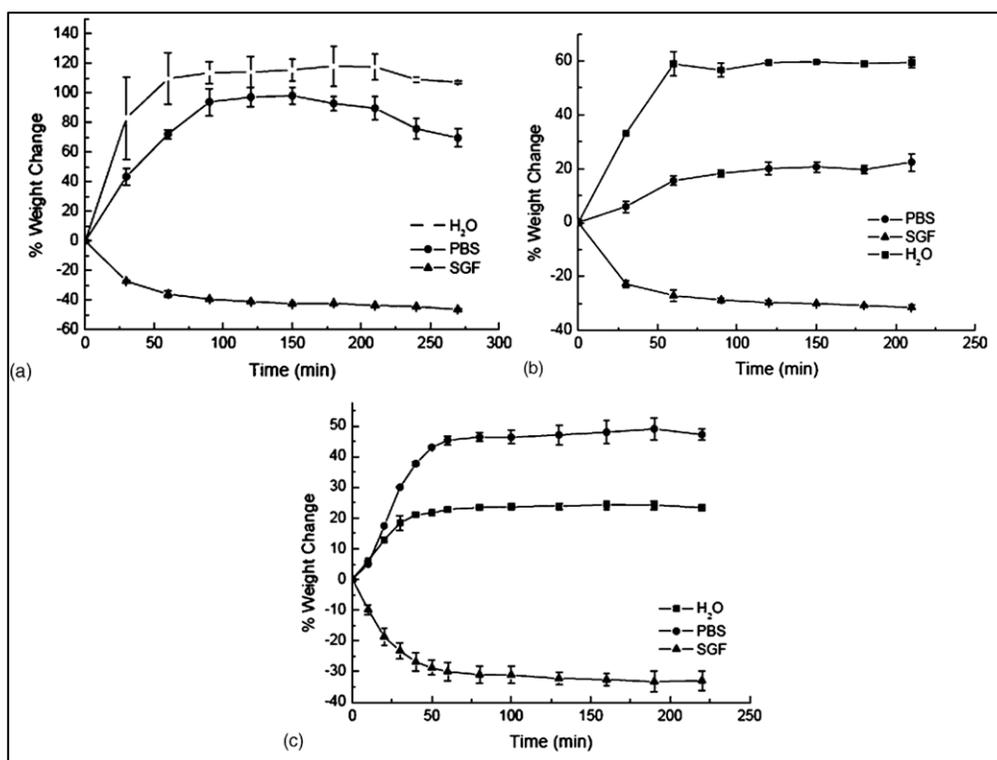


Ilustración 15: Perfiles de hinchamiento de perlas húmedas en H<sub>2</sub>O, PBS y SGF (a) perlas de alginato cálcico, (b) perlas de alginato recubiertas con quitosano y (c) perlas mixtas de alginato-quitosano. Los valores son media  $\pm$  desviación estándar (S.D.) de tres experimentos [18]

Para obtener información sobre la estructura molecular de las esferas hinchadas, se obtuvieron los espectros FTIR después de la hinchazón en los diferentes medios acuosos utilizados en el estudio. Los espectros se muestran en la Ilustración 16. En PBS y agua, los picos en 1.614 y 1.410 [cm<sup>-1</sup>] se asignan a las vibraciones simétricas y asimétricas carboxilato (COO<sup>-</sup>), respectivamente. En SGF el grupo carboxilato es protonado (COOH) y está presente en 1.737 [cm<sup>-1</sup>]. El pico en 1.614 [cm<sup>-1</sup>] disminuyó y cambio de puesto a 1.633 [cm<sup>-1</sup>]. En el caso el espectro obtenido de esferas hinchadas en PBS se observan dos picos nuevos en 602 y 563 [cm<sup>-1</sup>]. El resto pueden asignarse a la unión P-O del grupo PO<sub>4</sub>. Lo anterior indica que se produjo la formación de sales de fosfato de calcio y posiblemente de hidroxiapatita Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>, cuya formación se ve favorecida a pH neutro y básico. Además, la separación de los picos de arriba es un indicador de una fase cristalina. El pico principal asociado a la P-O alrededor de 1.030 [cm<sup>-1</sup>] es difícil de distinguir debido a la superposición con otras bandas de alginatos en la misma región.

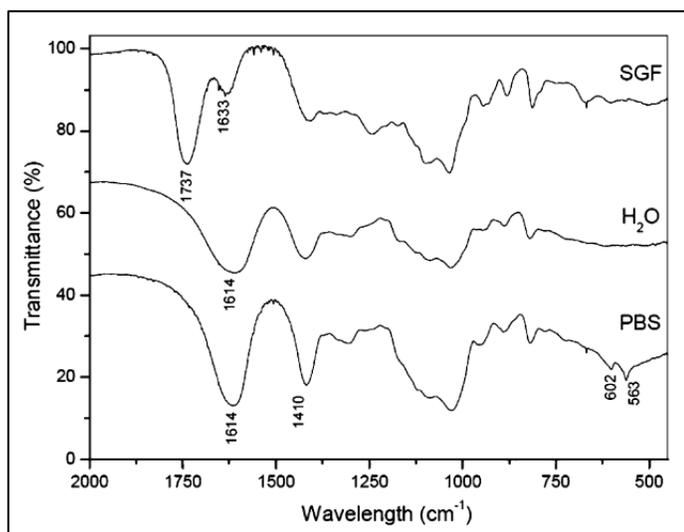


Ilustración 16: FTIR espectros de perlas de calcio-alginato después de hincharse en SGF, H<sub>2</sub>O y PBS. Los espectros se han desplazado verticalmente para mayor claridad [18]

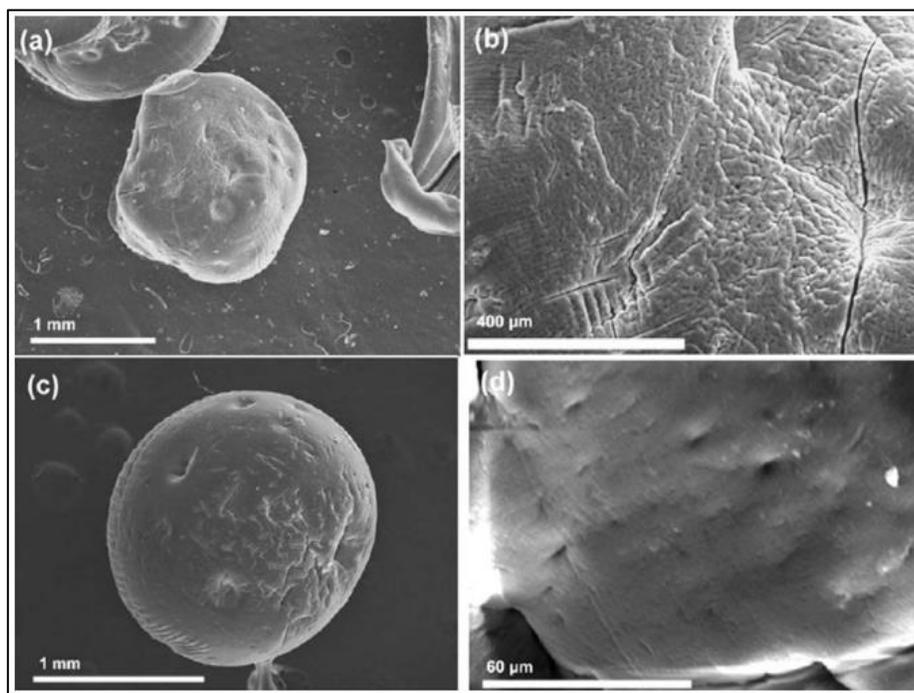


Ilustración 17: Micrografías SEM de esferas de alginato cálcico secadas con dos métodos diferentes; aire (a y b) y etanol (c y d); (a y c) muestran esferas individuales mientras que (b y d) muestran las respectivas microestructuras superficiales [18]

El trabajo también muestra análisis micrográficos de esferas secas tanto en aire como con etanol, de alginato cálcico y de recubiertas de quitosano, Ilustraciones 17 y 18 respectivamente. En el caso de perlas de alginato cálcico, secadas al aire, dieron lugar a una forma esférica aceptable como se muestra en la Ilustración 17(a). Examen detallado de la estructura superficial, Ilustración 17(b) revela grietas causadas por el colapso parcial de la red del polímero durante la deshidratación. Además, poros con diámetro de pocos micrómetros y arrugas están presentes. En cambio, el secado con etanol causó una mejoría

significativa en el mantenimiento de la forma esférica y condujo a la disminución de las grietas en la superficie, Ilustración 17(c) y (d).

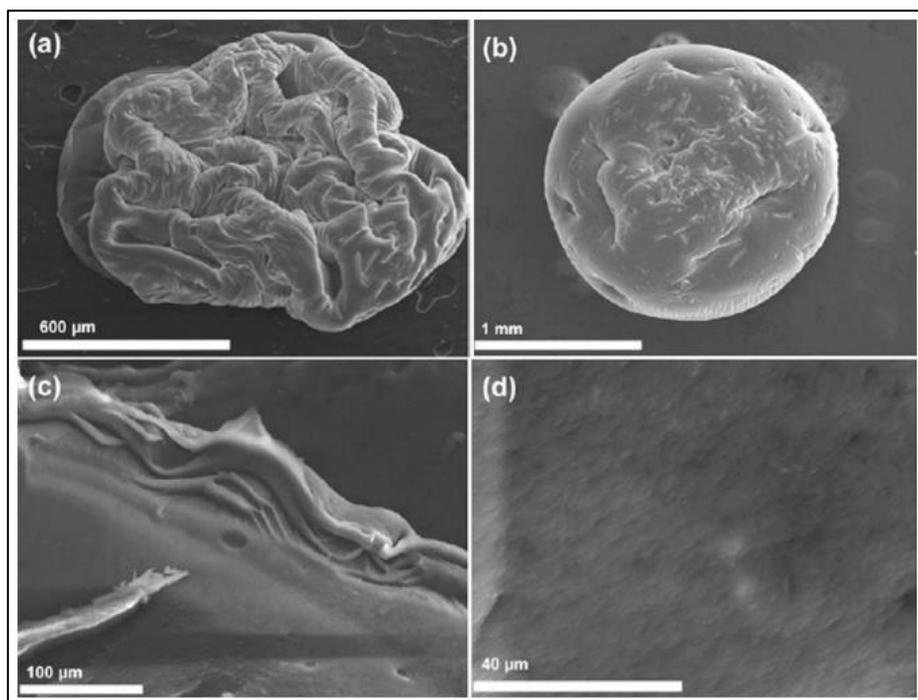


Ilustración 18: Imágenes SEM de perlas de alginato recubiertas con quitosano secadas en aire (a) y con etanol (b y d); (c) muestra una sección transversal, mientras que (d) muestra la microestructura de la superficie externa [18]

Ilustración 18(a) muestra la deshidratación prolongada de la membrana de quitosano que rodea las esferas. Se observan corrugaciones y la pérdida de la forma esférica. Por otra parte, el secado con etanol contribuyó substancialmente a la reducción de la rugosidad de la membrana de quitosano y a la eliminación de las grietas en la superficie, Ilustración 18(b). También, mantuvo la adherencia de la membrana de quitosano con la base de alginato Ilustración 18(c) y dio como resultado una superficie exterior suave, Ilustración 18(d).

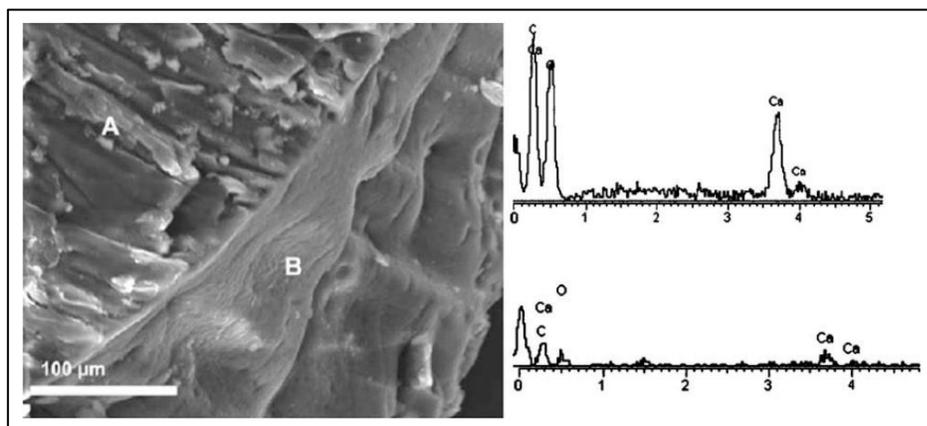


Ilustración 19: SEM de una sección transversal de una esfera de alginato revestido con quitosano y el correspondiente análisis EDS de la parte interna (A) y externa (B) [18]

La presencia de quitosano fue confirmada por microanálisis de SEM/EDS, Ilustración 19. Los espectros EDS muestran cambios en los componentes del elemento de la muestra en la parte interna y externa. La presencia de picos de calcio de alta intensidad en el interior del grano revela los vínculos cruzados entre los iones de calcio y grupos carboxilato de alginato. En contraste, la baja cantidad de calcio en la superficie externa se identificó demostrando la presencia del quitosano, que no interactúa con los iones del calcio. La pequeña fracción encontrada en la membrana puede atribuirse a la posible difusión de los iones de calcio a la superficie externa durante el proceso de síntesis.

Por otro lado, Bajpai y Tankhiwale [22] realizaron un estudio de esferas estables de alginato-quitosano para encapsulación de antibióticos, y de esta manera ser utilizadas para tratamiento oral de enfermedades como la úlcera péptica, la colitis ulcerosa, los carcinomas y otras infecciones intestinales locales.

Ilustración 20 muestra la espectrometría infrarroja mencionada en el artículo, de una esfera alginato-quitosano(a), alginato de sodio(b) y quitosano(c), respectivamente. Los espectros IR confirman la presencia de OH y N-H en el pico 3.440 [ $\text{cm}^{-1}$ ] donde el OH se superpone al N-H debido a la presencia del quitosano. La absorción del estiramiento de C-H del grupo metilo o metileno de quitosano y alginato de sodio está en el pico 2.935 [ $\text{cm}^{-1}$ ].

La absorción del grupo C=O de quitosano y alginato de sodio es de aproximadamente 1.642 [ $\text{cm}^{-1}$ ] (es decir, banda de amida I). La banda de amida II debido a N-H aparece en 1.640 [ $\text{cm}^{-1}$ ] que está superpuesta por la banda de amida I. La formación de anión carboxilato de alginato de sodio muestra la otra absorción de C-O a 1.428 [ $\text{cm}^{-1}$ ]. La vibración de flexión N-H aparece a 832 [ $\text{cm}^{-1}$ ]. De este modo, la presencia de quitosano y alginato en el espectro IR confirma la formación de esferas bi-poliméricas.

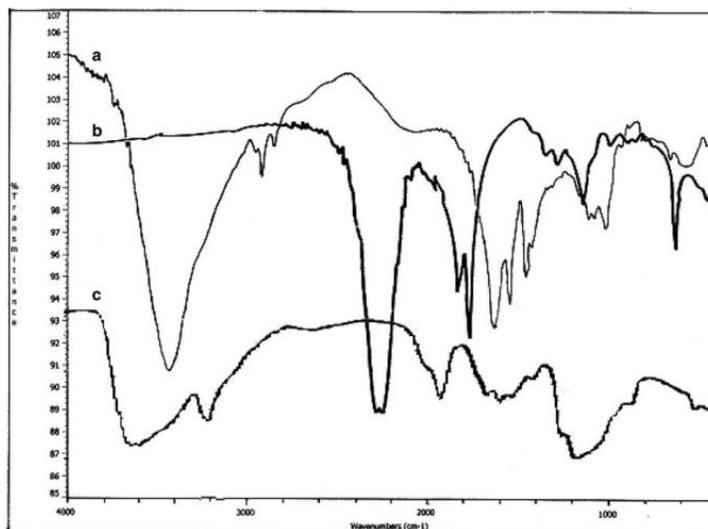
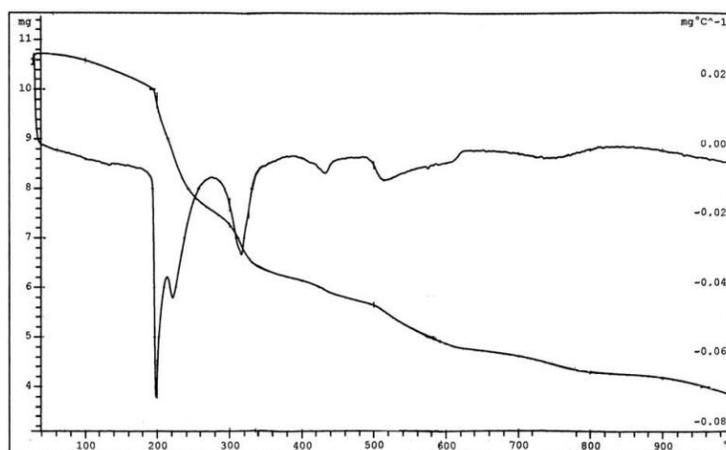


Ilustración 20: FT-IR de (a) esfera alginato-quitosano, (b) alginato de sodio y (c) quitosano, eje de las ordenadas: % transmitancia y eje de las abscisas: longitud de onda  $\text{cm}^{-1}$  [22]



*Ilustración 21: Termograma de esferas alginato-quitosano, eje de las ordenadas: mg y eje de las abscisas: °C [22]*

El termograma de las esferas, representado en la Ilustración 21, indica claramente que muestran suficiente estabilidad térmica. La temperatura en que la pérdida de peso se produce al máximo es 200 [°C] y las esferas son totalmente estables hasta los 50 [°C]. Como el estudio se centra en el desarrollo de esferas para su posible uso en el suministro de medicamentos orales, se puede concluir que demuestran estabilidad justo en las proximidades de la temperatura del cuerpo (es decir, 37 [°C]).

Para resumir, las esferas multicapas, compuestas de quitosano y alginato de sodio tienen suficiente estabilidad en ambientes de pH variable y pueden llegar a ser buenos candidatos para la entrega de droga (es decir, antibacterianos o antibióticos fármacos) a lo largo del tracto gastrointestinal.

### **1.5.5. Microfluídica**

Como se ha mencionado, en la terapia de embolización, todavía existen desafíos para su uso efectivo en aplicaciones clínicas. Esto se asocia en gran medida con la administración del agente embólico al objetivo de una manera precisa y controlable sin dañar los tejidos vecinos [8]. Por lo que, una comprensión completa de los principios que rigen el rendimiento de las micropartículas es un requisito previo necesario para mejorar la flexibilidad del proceso y diseñar protocolos de embolización específicos del paciente, además de agentes embólicos con propiedades adecuadas.

Entre una gama de agentes embólicos investigados, las micropartículas esféricas han atraído gran atención puesto que permiten un direccionamiento relativamente preciso en la arteria desde la que se alimentan los tumores. Una amplia gama de estudios en esta área está disponible en la literatura que demuestra las ventajas del uso de agentes esféricos en lugar de no esféricos [23] [24]. En la actualidad, la evaluación preclínica de la embolización se realiza ampliamente a través de una variedad de modelos animales como ratones, conejos, cabras y cerdos. Aunque pueden representar fidedignamente el entorno en el que se exponen los agentes embólicos en la circulación tumoral humana, los modelos animales están asociados con varias complicaciones, incluidas las limitaciones experimentales y económicas. En este sentido, el uso de

plataformas *in vitro* puede constituir una alternativa atractiva para caracterizar experimentalmente el comportamiento de los agentes embólicos y comparar el comportamiento funcional de diferentes productos terapéuticos. Para este propósito, tales plataformas de prueba *in vitro* deben ser diseñadas y construidas para permitir un control preciso de las condiciones de entorno, la imitación de los estados de flujo fisiopatológicos y el acceso directo a una amplia gama de parámetros físicos de interés.

En las últimas dos décadas, se ha logrado un desarrollo significativo en el campo de los sistemas miniaturizados, llamados microfluídicos o tecnologías de laboratorio sobre chip, Ilustración 22, y se ha extendido ampliamente en diversas áreas, incluyendo la química, la biología y la bioingeniería.

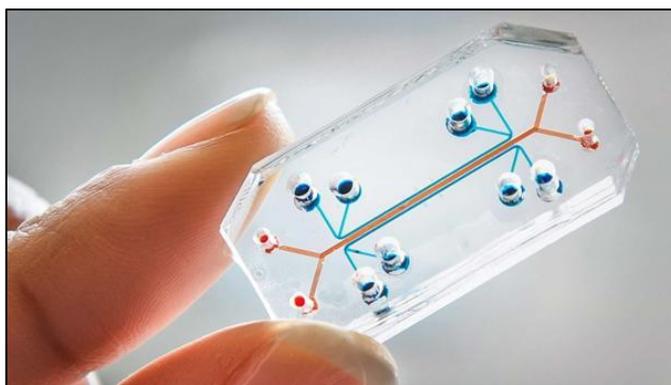


Ilustración 22: Chip microfluídico o microcanal

La característica principal de tales dispositivos miniaturizados es la red de canales de escala micro (con diámetros de canal en el intervalo de algunas decenas a unos pocos cientos de micras). Se ha demostrado que tales microsistemas representan ventajas sobre las plataformas de sistemas convencionales en términos de velocidad, rendimiento, cantidad reducida de muestra/disolvente, integración y automatización. De particular relevancia para las aplicaciones de la bioingeniería es la pequeña escala de longitud utilizada, en la que los fluidos se restringen a flujo laminar (eliminan la turbulencia) y mezcla difusiva. El control microfluídico también proporciona oportunidades únicas para suministrar y liberar fluido dentro de microdispositivos con un diseño de microgeometría apropiado, lo que permite la generación de microesferas del orden de 100  $\mu\text{m}$  [25].

Lo anterior proporciona un mayor control en la forma y tamaño de las esferas, punto muy importante, ya que para la embolización se requieren esferas uniformes y de un tamaño similar. Además, el acoplamiento con técnicas de formación de imágenes basadas en microscopio proporciona una plataforma para la detección y cuantificación del comportamiento de las microesferas *in situ* con resoluciones definidas.

#### **1.5.6. Microfluídica alginato**

La microfluídica es un campo tecnológico “micro” relacionados con el manejo de fluidos, tiene aplicaciones en diversos campos incluyendo procesos químicos,

fabricación de alimentos, productos farmacéuticos, biotecnología y cosmética. En los últimos años, los dispositivos microfluídicos se han aplicado convenientemente como nuevas herramientas para la formación de regímenes multifásicos de flujo, convertidos posteriormente en micropartículas poliméricas esféricas altamente monodispersas.

Para generar las microesferas, lo primero es determinar la naturaleza química de la fase de gotas en que ellas se transforman en micropartículas por un procedimiento de consolidación. Por un lado, las gotitas pueden ser monómeros que se solidifican por medio de polimerización discontinua iniciada térmicamente o por UV. Por otra parte, las gotitas pueden ser polímeros que se endurecen mediante procedimientos diferentes que incluyen evaporación del disolvente, reacciones químicas, gelificación térmica y reticulación fotoiniciada o iónica. Polisacáridos (como el alginato, agarosa o quitosano) representan los polímeros comúnmente utilizados para la preparación de micropartículas para el atrapamiento de células [26].

Algunos autores han descrito diferentes métodos para obtener micropartículas de polisacárido por enfoques microfluídicos. Yang et al. [27] desarrolló un dispositivo de microfluidos que utiliza una estrategia de enfoque hidrodinámico para producir micropartículas de quitosano. Demostró que estos dispositivos microfluídicos pueden controlar el tamaño de las micropartículas de quitosano de 100 a 800  $\mu\text{m}$  con una variación inferior al 5%.

Por otro lado, Amici et al. [28] describen la preparación de microesferas de alginato mediante un método de gelificación interna. Para la producción de alginato se desprenden dos corrientes acuosas, una ácida (que contiene D-Glucona-d-lactona) y otra que contiene carbonato de calcio en suspensión en una solución de alginato, se fusionan inmediatamente antes de entrar en un canal donde un flujo continuo de aceite de girasol rompe el flujo de la fase acuosa para formar microgotitas.

Huang et al. [29] reportaron el uso de dispositivos microfluídicos basados en una “fuerza enfocada” para controlar el auto ensamblado espontáneo de la emulsión de agua-aceite entre una solución de alginato de sodio y aceite de semilla de girasol. La emulsión se vierte a continuación en una solución que contiene iones de calcio, dando como resultado la formación instantánea de microesferas de alginato cálcico.

Finalmente, Liu et al. [30] describieron la preparación de perlas de alginato usando un dispositivo microfluídico que contenía dos canales de flujo individuales y un canal de síntesis. La forma (tapones, discos, microesferas, varillas o hilos) y el tamaño de las micropartículas de alginato podían ajustarse ajustando los caudales de las diversas corrientes.

A pesar de estos interesantes resultados en la literatura sobre la producción de microesferas de alginato, solamente algunas fotografías de ellas están disponibles. Este aspecto es particularmente importante puesto que el tamaño y la morfología de las microesferas son aspectos cruciales para su uso en vivo debido a que deben estar

específicamente diseñadas si se desean usar en protocolos de embolización intraarterial.

Capretto et al [26], presentaron la producción de microesferas de alginato por un sistema de microfluidos, enfocando la atención sobre todo en el proceso de gelificación, que representa el paso clave para la obtención de microesferas de alginato con forma esférica ideal, estrecha distribución de tamaño y superficie lisa. El objetivo fue producir microesferas para la encapsulación de células, un diámetro medio entre 300 y 600  $\mu\text{m}$ , es generalmente considerado como óptimo para ello.

Para la inyección en el chip microfluídico, se empleó una bomba de jeringa. El sistema microfluídico se conectó a jeringas a través de tubos de silicona. Una dispersión de alginato de sodio se utiliza como fase interna acuosa (WP), y se inyectó lentamente en una entrada del microcanal. El segundo líquido inmiscible (OP), se inyectó en la otra entrada como fase continua. La solución de alginato sódico se forzó en el OP en la unión de los canales para formar un flujo multifásico (gotitas) representado por una emulsión. Finalmente, se gelificaron las microgotas de alginato de sodio en un proceso de “gelificación externa” dejando caer la emulsión en una solución de Cloruro de Bario ( $\text{BaCl}_2$ ), Ilustración 23.

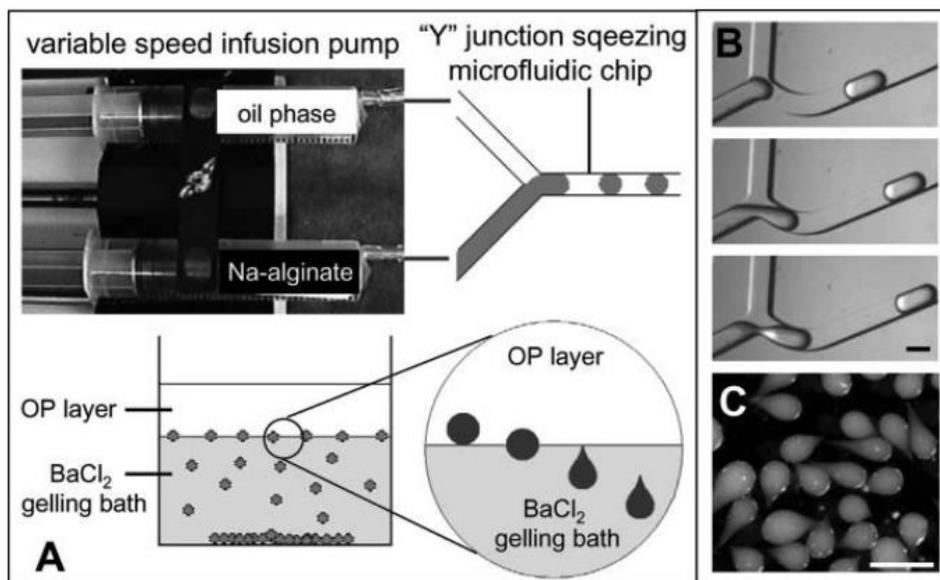


Ilustración 23: Esquema e ilustración de la configuración y mecanismo del sistema. (A, superior) dibujo esquemático del generador de flujo multifásico de alginato mediante la forma en "Y" y del tránsito de microgotitas de alginato a través de la interfaz agua/aceite que causa la formación de microesferas en forma de cola (A, inferior). (B) formación de flujo multifásico en el dispositivo. (C) fotomicrografía de microesferas de alginato producidas por el procedimiento de "gelificación externa", mostrando la típica forma de cola no deseada, escala 500  $\mu\text{m}$  [26]

Como se muestra en la Ilustración 23(c) las microesferas obtenidas se caracterizaron por una forma de cola. Esta forma particular se atribuyó a la pasada lenta de las gotitas líquidas de alginato de sodio a través de la interfase OP/baño gelificante.

Con el fin de solucionar posiblemente este inconveniente principal, en el artículo, se muestra que se llevaron a cabo experimentos adicionales añadiendo una capa de aceite fino, de baja viscosidad (OL) por encima del baño de  $\text{BaCl}_2$ , para facilitar posiblemente el paso de las gotitas de WP a través de la interfaz. Se observó que dio lugar a una reducción significativa de las colas en las microesferas, sin embargo, siguieron existiendo.

Sucesivamente, se describe un procedimiento de “gelificación interna” que se evaluó para mejorar el tamaño y forma características de las microesferas de alginato-bario finales. Los experimentos se realizaron por la dispersión de una sal de bario insoluble o parcialmente soluble ( $\text{BaCO}_3$ ) en el WP que contiene alginato de sodio. La gelificación de microgotas fue alcanzada por la acidificación suave con un aceite soluble de ácido (ácido acético) añadido a la OP. El descenso del pH provoca liberación de iones de bario y la consiguiente formación de geles de alginato-bario. Del análisis de las microfotografías registrados en la Ilustración 24, es evidente que el contenido de  $\text{BaCO}_3$  influye fuertemente en las características finales de microesferas de alginato. De hecho, microesferas preparadas con el contenido más bajo de  $\text{BaCO}_3$  Ilustración 24(A), se caracterizan por una alta polidispersidad, una forma de la cola y por la presencia de un notable número de coalescentes. Por otro lado, microesferas preparadas con el mayor contenido de  $\text{BaCO}_3$  se caracterizan por la forma esférica, pero un número importante de coalescences es claramente detectables. Sólo con un contenido preciso de  $\text{BaCO}_3$  (7,5 [mM]), las microesferas presentan características morfológicas aceptables, Ilustración 24(B).

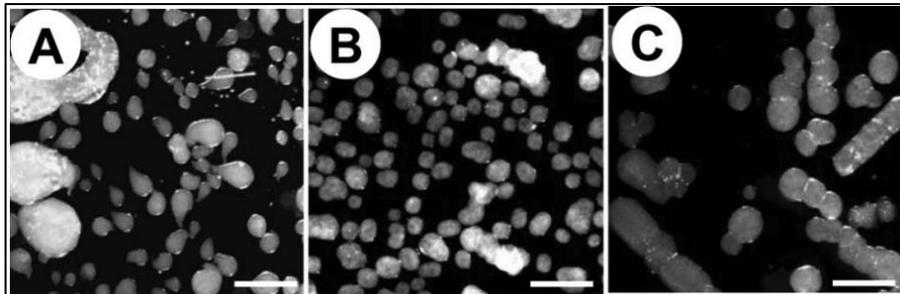


Ilustración 24: Fotomicrografías de campo oscuro de microesferas de alginato-Ba preparadas mediante el procedimiento de "gelificación interna". Las microesferas se prepararon dispersando (A) 5 [mM], (B) 7,5 [mM] y (C) 10 [mM] de  $\text{BaCO}_3$ . Las barras corresponden a 1.000 [ $\mu\text{m}$ ] [26]

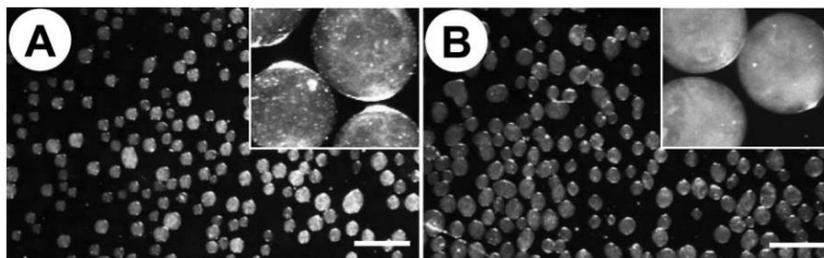


Ilustración 25: Fotomicrografías de campo oscuro de microesferas de alginato-Ba preparadas mediante el procedimiento de "gelificación interna". Las microesferas se prepararon dispersando 7,5 mM de  $\text{BaCO}_3$  en el WP en presencia de (A) 0,2% y (B) 0,4% (p/v) de span 80 como estabilizador. Las barras corresponden a 1.000 [ $\mu\text{m}$ ] [26]

La morfología de la microesfera fue mejorada mediante la adición a la OP de un estabilizador (span 80, Sigma-Aldrich) que reduce profundamente la presencia de coalescencias, dando resultado de microesferas casi esféricas, Ilustración 25.

El artículo confirma que los métodos microfluídicos parecen ser uno de los procedimientos más eficaces para la producción de microesferas de polisacáridos, a pesar del gran número de ventajas ofrecidas por este procedimiento, los datos presentados muestran que la etapa de gelificación representa un punto crucial para la producción de microesferas morfológicamente aceptables [26].

Por otro lado, hasta la fecha, la producción de esferas de gel de alginato se ha logrado principalmente usando gelificación externa. El alginato se extruye gota a gota a través de una aguja a una solución de cationes divalentes, generando el hidrogel. El mayor desafío para el método de goteo convencional es que las perlas más grandes producidas (aproximadamente en milímetros de diámetro) no son adecuadas para aplicaciones farmacéuticas.

En el artículo de Huang et al. [29] se utilizó un dispositivo microfluídico que utiliza un microcanal de unión cruzada para producir perlas de alginato cálcico del orden de 50-200  $\mu\text{m}$  con una distribución de tamaños estrecha (5%). El objetivo del estudio fue investigar y comparar el tamaño de las microesferas de alginato cálcico obtenido por una relación diferente de caudal en los canales de entrada laterales a la del canal de entrada central.

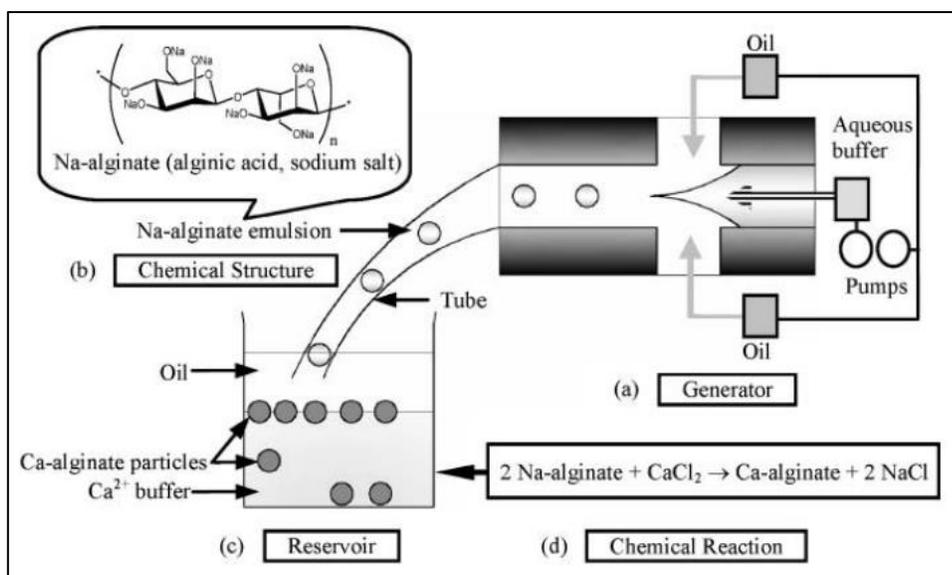


Ilustración 26: Esquema e ilustración de la configuración y mecanismo del sistema: (a) dibujo esquemático del generador de emulsión de alginato de sodio en un microcanal de sección cruzada, (b) estructura química de la emulsión de alginato de sodio, (c) un depósito y (d) gelificación de alginato [29]

Se reportó el uso de microfluídica para obtener el control de las esferas de alginato de sodio, generando una emulsión agua-aceite (w/o), Ilustración 26(a). Luego, esta emulsión es transportada a una solución de  $\text{CaCl}_2$  a través de un tubo de teflón, precipitando las microesferas espontáneamente en el fondo del aceite debido a su mayor densidad. Por lo tanto, pueden gelificar con el ion  $\text{Ca}^{+2}$  en la interfase entre la fase oleosa y la fase acuosa,

Ilustración 26(c). Resultado la generación de microesferas de alginato cálcico, Ilustración 26(d).

Variando la relación entre el aceite y las tasas de flujo de agua, se proporciona un control más fino de los tamaños de las gotas. Basándose en el excelente rendimiento de la técnica microfluídica, esta fue utilizada en el artículo para productos farmacéuticos. Como conclusión, el chip microfluídico en cruz desarrollado, es capaz de generar microesferas relativamente uniformes y tiene las ventajas de un control activo del diámetro, proceso simple, de bajo costo y alto rendimiento. El enfoque en la manipulación de las microesferas de alginato cálcico proporcionará muchos usos potenciales para aplicaciones farmacéuticas [29].

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. GENERAL**

- Producir esferas de hidrogeles de mezclas de biopolímeros que permitan su estabilidad en el tiempo, a través de técnica microfluídica, para ser utilizadas en terapia de embolización intraarterial.

### **2.2. ESPECÍFICOS**

- Implementar cambios en la técnica microfluídica utilizada comúnmente para la producción de microesferas de alginato cálcico, que permitan su unión con otro biopolímero.
- Realizar esferas de hidrogel de biopolímeros a nivel milimétrico, que permitan su reproducción a nivel micrométrico.
- Caracterizar la estabilidad en el tiempo de las esferas de biopolímeros en suero fisiológico.
- Implementar y estudiar las propiedades mecánicas de las esferas de biopolímeros.

## **3. METODOLOGÍA**

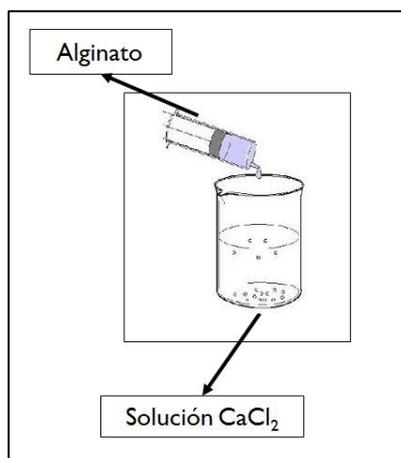
Para el cumplimiento de los objetivos de este proyecto de investigación, se aplicaron diferentes metodologías, que incluyeron variadas etapas de trabajo de laboratorio, análisis de resultados y repetición de experimentos. Según el estado del arte presentado, se generarán esferas, tanto de alginato cálcico como de alginato-quitosano, utilizando el quitosano como biopolímero que ayuda con la estabilidad de ellas.

Se trabajó primero a escala macro, para tener una primera aproximación de resultados, que permitieran tomar decisiones para el trabajo en microfluídica. En paralelo, se debió preparar el microcanal para la generación de microesferas.

### **3.1. ESCALA MILIMÉTRICA**

#### **3.1.1. Preparación de esferas de alginato cálcico**

Esferas de alginato cálcico son preparadas mediante método de una etapa.



*Ilustración 27: Representación del sistema de entrecruzamiento para esferas de alginato cálcico a nivel macro*

Alginato sódico en polvo (LobaChemie) es disuelto en agua desionizada a una concentración de 2% (p/v). Medio entrecruzante se preparó disolviendo cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) en polvo (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1,5% (p/v) en agua destilada. La solución de alginato sódico se añadió gota a gota a temperatura ambiente, en 200 [ml] de medio entrecruzante que se encuentra en agitación constante, utilizando una jeringa de 10 [ml] y una bomba de jeringa (Harvard Apparatus) a una velocidad de desplazamiento de 1 [ml/min]. Las esferas formadas son dejadas en el medio, agitándose durante 10 [min] y después retiradas y lavadas con agua destilada, ver Ilustración 27.

### **3.1.2. Preparación de esferas recubiertas**

Por otro lado, se generaron tres tipos de esferas diferentes de alginato con quitosano con los métodos de Pasparakis y Bouropoulos [18] y Gaserod et al. [13], las que se denominaron recubiertas, blendas y core shell. La metodología para las esferas recubiertas es de dos etapas y es la siguiente:

Alginato sódico en polvo (LobaChemie) es disuelto en agua desionizada a una concentración de 2% (p/v). Medio entrecruzante se preparó disolviendo  $\text{CaCl}_2$  en polvo (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1,5% (p/v) en agua destilada. Quitosano en polvo (Sigma-Aldrich) en una concentración de 0,8% (p/v) es disuelto en agua destilada con ácido acético al 1% (v/v). La solución de alginato sódico se añadió gota a gota a temperatura ambiente, en 200 [ml] de medio entrecruzante que se encuentra en agitación constante, utilizando una jeringa de 10 [ml] y una bomba de jeringa (Harvard Apparatus) a una velocidad de desplazamiento de 1 [ml/min], mismo procedimiento descrito previamente. Las esferas formadas son dejadas en el medio, agitándose durante 2 [min] y después retiradas y lavadas con agua destilada. A continuación, se vierten en 200 [ml] de la solución de quitosano, durante 3 [h] en agitación constante, ver Ilustración 28.

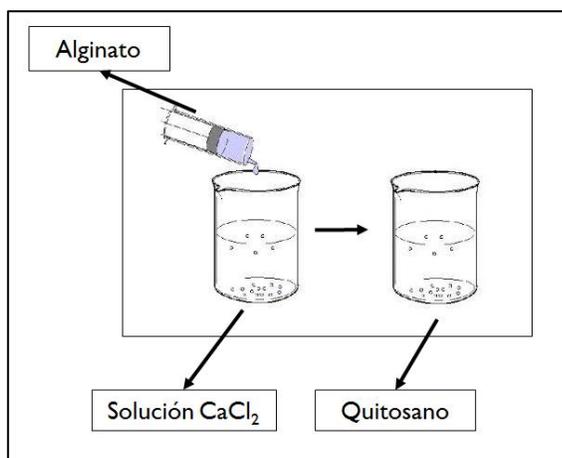


Ilustración 28: Representación del sistema de entrecruzamiento para esferas recubiertas a nivel macro

### 3.1.3. Preparación de esferas blendas

Esferas blendas son preparadas mediante el método de una etapa.

Alginato sódico en polvo (LobaChemie) se prepara de la forma descrita anteriormente. Medio entrecruzante se preparó disolviendo quitosano (Sigma-Aldrich) en una concentración de 0,8% (p/v) en agua destilada con ácido acético al 1% (v/v) y se le añade CaCl<sub>2</sub> en polvo (Sigma-Aldrich) a una concentración de 3% (p/v). La solución de alginato sódico se añadió gota a gota a temperatura ambiente, en 200 [ml] de solución entrecruzante que se encuentra en agitación constante, utilizando una jeringa de 10 [ml] y una bomba de jeringa (Harvard Apparatus) a una velocidad de desplazamiento de 1 [ml/min], de la misma forma descrita previamente. Las perlas formadas son dejadas en el medio, agitándose durante 10 [min] y después retiradas y lavadas con agua destilada, ver Ilustración 29.

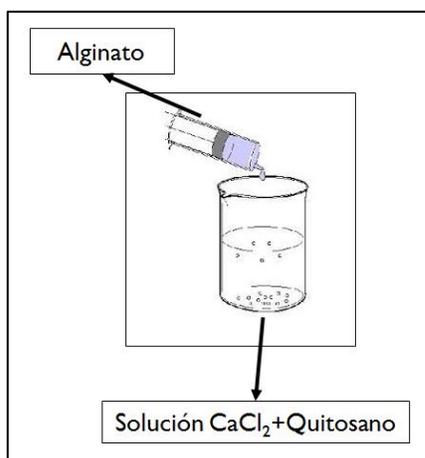


Ilustración 29: Representación del sistema de entrecruzamiento para esferas blendas a nivel macro

### 3.1.4. Preparación de esferas core shell

Esferas core shell son preparadas mediante el método de multicapas que une el método de una y dos etapas.

Alginato sódico en polvo (LobaChemie) es disuelto en agua desionizada a una concentración de 2% (p/v). Medio entrecruzante se preparó disolviendo  $\text{CaCl}_2$  en polvo (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,5% (p/v) en agua destilada. Quitosano en polvo (Sigma-Aldrich) en una concentración de 0,8% (p/v) es disuelto en agua destilada con ácido acético al 1% (v/v) y se le añade  $\text{CaCl}_2$  en polvo (Sigma-Aldrich) a una concentración de 3% (p/v). La solución de alginato sódico se añadió gota a gota a temperatura ambiente, en 200 [ml] de medio entrecruzante que se encuentra en agitación constante, utilizando una jeringa de 10 [ml] y una bomba de jeringa (Harvard Apparatus) a una velocidad de desplazamiento de 1 [ml/min], al igual que la metodología descrita para esferas recubiertas. Las esferas formadas son dejadas en el medio, agitándose durante 2 [min] y después retiradas y lavadas con agua destilada. A continuación, se vierten en 200 [ml] de la solución de quitosano, durante 2 [h] en agitación constante, ver Ilustración 30.

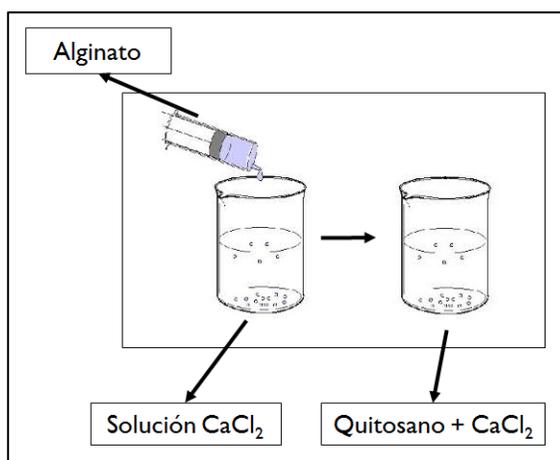


Ilustración 30: Representación del sistema de entrecruzamiento para esferas core shell a nivel macro

### 3.1.5. Análisis termogravimétrico (TGA) y Scanning Electron Microscope (SEM)

Las esferas (alginato cálcico, recubierta y blenda) se sometieron a análisis termogravimétrico en el equipo TG 209 F1 Iris® (Netzsch Group) [31], aumentando 10°C por minuto, hasta los 600°C.

Por otro lado, se tomaron fotografías SEM a las esferas, a través del microscopio FESEM perteneciente a la Facultad de Química de la Pontificia Universidad Católica de Chile [32], para conocer su superficie y de esta manera hacer una comparación física entre ellas.

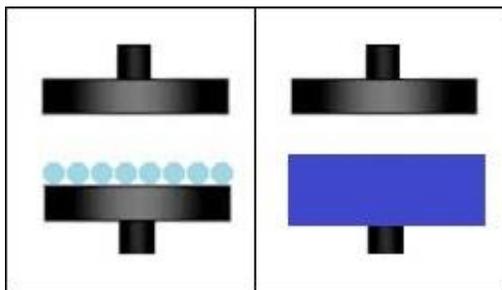
### 3.1.6. Ensayo estabilidad de las esferas en el tiempo

Para determinar que el quitosano ayuda a la estabilidad de las esferas en el tiempo, se prepararon con la metodología mencionada, esferas de alginato cálcico, recubiertas y blendas. Estas se dejaron en agua destilada en tubos tipo falcon por 60 días, para observar cómo cambia su forma en el tiempo.

Para complementar el ensayo, las esferas se dejaron por 30 días en suero fisiológico (PBS, Dulbecco, Sigma-Aldrich), también en tubos tipo falcon, tomando dos o tres esferas en intervalos de días, para medir su diámetro y observar el cambio en el tamaño.

### 3.1.7. Ensayo propiedades mecánicas

Para determinar las propiedades mecánicas de las esferas, se decidió hacer un ensayo de compresión con una máquina de prueba universal (Jinan Testing Equipment IE Corp.). Para ello fue necesario implementar un ensayo que permitiera obtener datos para su posterior tratamiento. Así fue que, se decidió trabajar con una monocapa de esferas, debido a que no era posible realizar el ensayo con una sola esfera. Las piezas de compresión de la máquina se rodearon con una copla de PVC, Ilustración 31, para evitar que las esferas se escaparan por los lados al comprimirse. A continuación, fue necesario idear un método capaz de cuantificar y comparar los resultados, ya que los datos entregados de compresión/deformación fueron confusos, lo que dificultó la obtención de conclusiones adecuadas.



*Ilustración 31: Esquema del ensayo de compresión, a la izquierda una monocapa de esferas y a la derecha, las esferas rodeadas por una copla de PVC.*

Luego de considerar diferentes cargas máximas y velocidades de compresión, se decidió utilizar 500[N] a una velocidad de 0,5 [mm/min]. Las esferas fueron contadas antes de comenzar la prueba y, al término de esta, para obtener el número de las que permanecieron intactas, permitiendo hacer una comparación entre ellas.

## 3.2. ESCALA MICROMÉTRICA

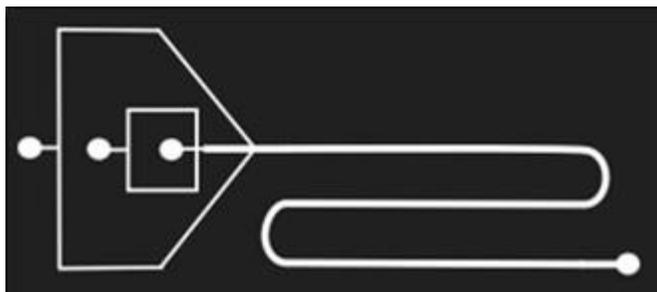
Para la preparación de las microesferas primero se debió elaborar el microcanal de la forma que se describe a continuación:

### 3.2.1. Preparación microcanal

Los dispositivos microfluídicos se fabrican mediante litografía óptica. La fotorresistencia negativa SU-8 (Micro Chem) se deposita sobre obleas de silicio limpiadas con plasma, luego, la oblea de silicio se endurece durante 15 [min] a 65 [°C] y 30 [min] a 95 [°C] denominado horneado suave. A continuación, se modela por la exposición a la luz UV a través de una fotomáscara de transparencia, que contiene un modelo de microcanal a utilizar, Ilustración 32, durante 7 [min]. La oblea de silicio se vuelve a endurecer durante 5 [min] a 65 [°C] y 15 [min] a 95 °C denominado horneado fuerte. El revestimiento fotográfico se enjuaga por revelador SU-8 (propilenglicol monometilo). Finalmente, la

oblea de silicio se hornea durante 2 [h] a 135 [°C], obteniéndose el patrón del modelo a utilizar.

A continuación, se mezcla Sylgard 184 poli dimetilsiloxano (PDMS) (Dow Corning Co.) con reticulante (razón 10: 1), se desgasifica completamente y se vierte sobre el patrón de fotorresistencia. Esto se endurece durante al menos 30 [min] a 65 [°C]. Las réplicas PDMS se pelan de la oblea y se hacen agujeros para conectar los tubos. Paralelamente, se vierte PDMS a una placa de microscopio, para unirlo a la réplica mediante activación de oxígeno-plasma de ambas superficies. Los dispositivos microfluídicos se tratan con aquapel (PPG Industries) llenando los dispositivos con la solución y secándose antes de los experimentos para mejorar la humectación del dispositivo.



*Ilustración 32: Fotomáscara de transparencia, modelo de microcanal utilizado en este trabajo*

### **3.2.2. Preparación microesferas de alginato cálcico**

Microesferas son formadas a través del microcanal obtenido, tubos de silicona y jeringas. Los tubos de silicona conectan las jeringas al microcanal. Las jeringas se utilizan para cargar los fluidos en los dispositivos.

El microcanal tiene tres entradas, una para solución de alginato sódico al 2% (p/v) en agua desionizada (fase dispersa), otra para alcohol isoamílico (fase continua) que es el encargado de formar la gota y finalmente, una para el medio entrecruzante compuesto por  $\text{CaCl}_2$  disuelto en alcohol isoamílico a una concentración de 1,5% (p/v). Las jeringas utilizadas son de 10 [ml]. Los caudales se controlan mediante bombas de jeringa, a una la velocidad de 5 [ $\mu\text{l}/\text{min}$ ] para la fase dispersa y 50 [ $\mu\text{l}/\text{min}$ ] para la fase continua y el medio entrecruzante. Un esquema del proceso se puede ver en la Ilustración 33.

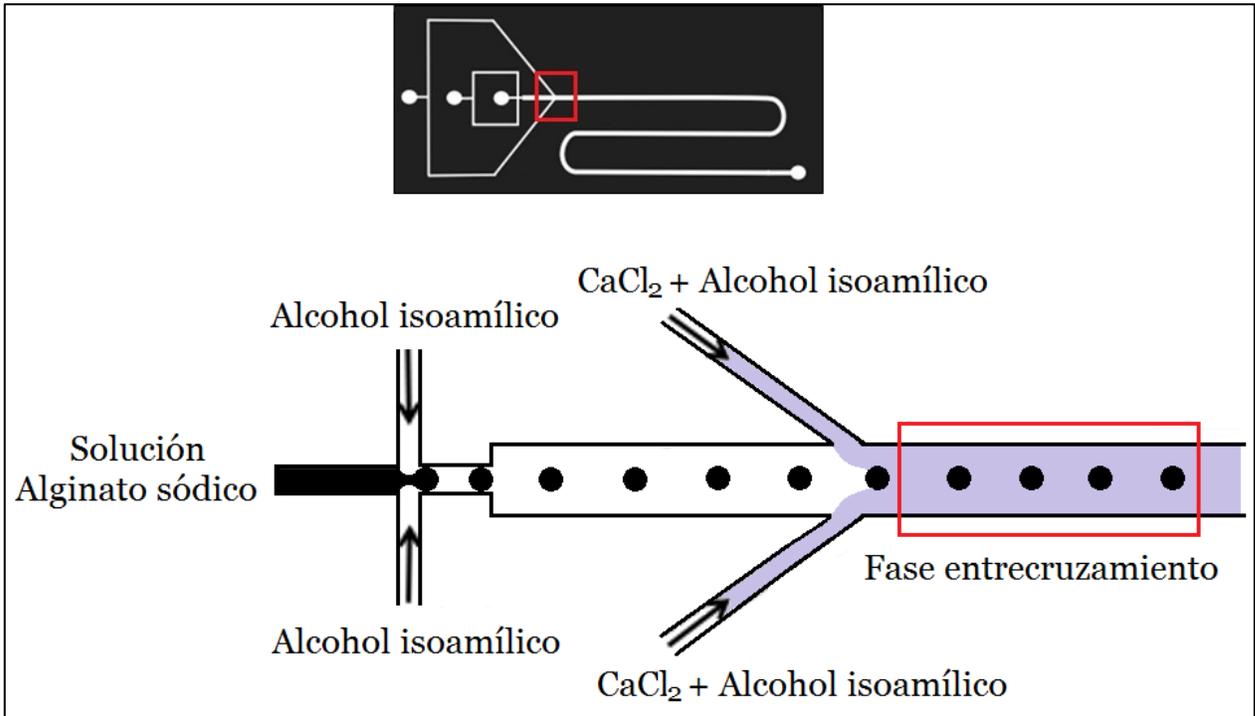


Ilustración 33: Arriba se muestra la sección del canal que se representa, abajo representación del sistema de entrecruzamiento para esferas de alginato cálcico

### 3.2.3. Preparación microesferas recubiertas

Microesferas de alginato–quitosano fueron formadas, del tipo recubierta, blanda y core shell mediante el mismo procedimiento mencionado en el punto anterior, sin embargo, las esferas, se dejan caer a la salida del microcanal en las soluciones de quitosano respectivas. Para el caso de las esferas del tipo recubierta, el sistema continúa de la misma forma que para las esferas de alginato cálcico, ver Ilustración 34.

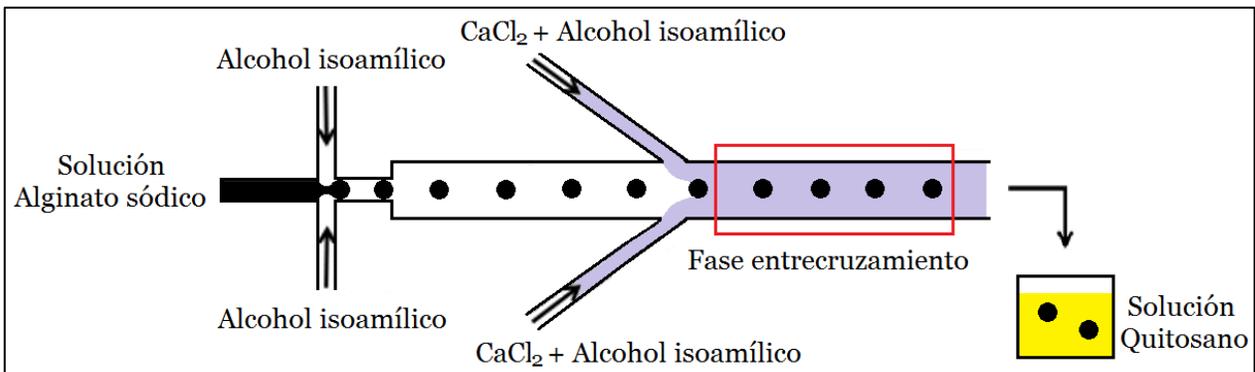


Ilustración 34: Representación del sistema de entrecruzamiento para esferas recubiertas

### 3.2.4. Preparación microesferas blandas

Para microesferas del tipo blanda, se cambiará en el canal que transporta el medio entrecruzante, a una jeringa que contenga solo alcohol isoamílico, para que las esferas solo sean conducidas y no gelificadas. Luego, las microesferas se vierten en un petri y se espera

que se evapore el alcohol para sumergirlas en 20 [ml] de solución entrecruzante compuesta de quitosano 0,8% (p/v), agua destilada, ácido acético al 1% (v/v) y  $\text{CaCl}_2$  a una concentración de 3% (p/v) ver Ilustración 35.

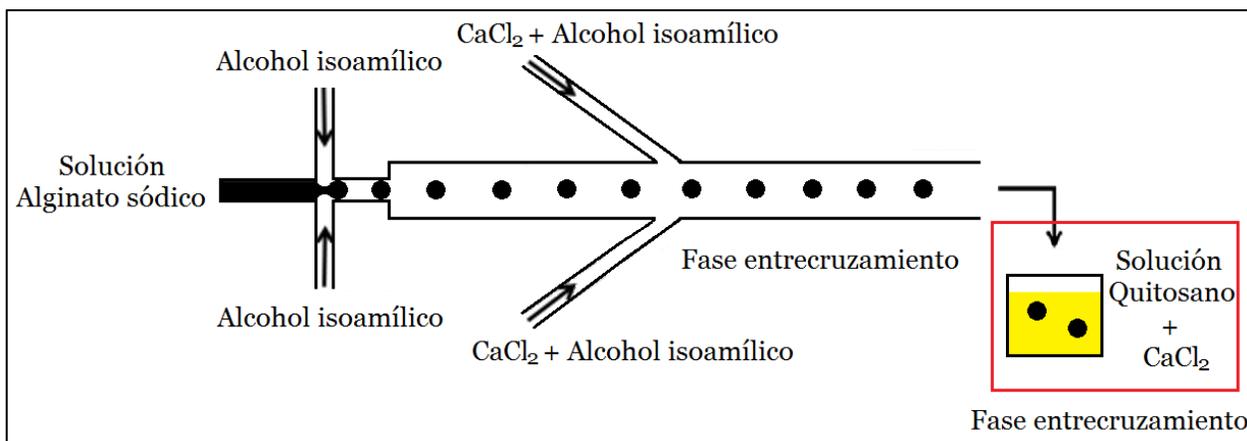


Ilustración 35: Representación del sistema de entrecruzamiento para esferas blendas

### 3.2.5. Preparación microesferas core shell

Para microesferas del tipo coreshell, el sistema continúa de la misma forma que para las esferas de alginato cálcico, pero la concentración de  $\text{CaCl}_2$  disuelto en alcohol isoamílico cambia a 0,5% (p/v). Luego, las microesferas se vierten en un petri y se espera que se evapore el alcohol para sumergirlas en 20 [ml] de solución entrecruzante compuesta de quitosano 0,8% (p/v), agua destilada, ácido acético al 1% (v/v) y  $\text{CaCl}_2$  a una concentración de 3% (p/v) ver Ilustración 36.

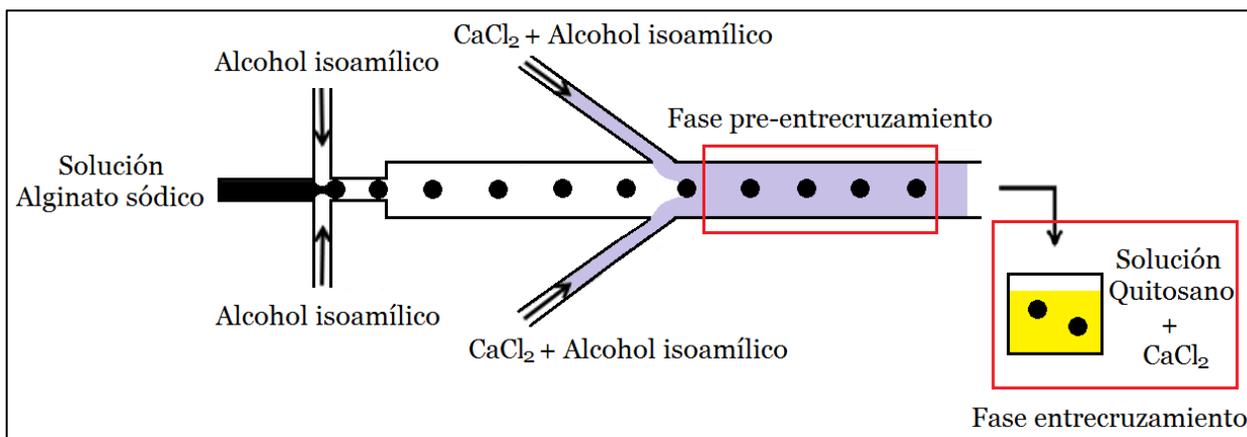


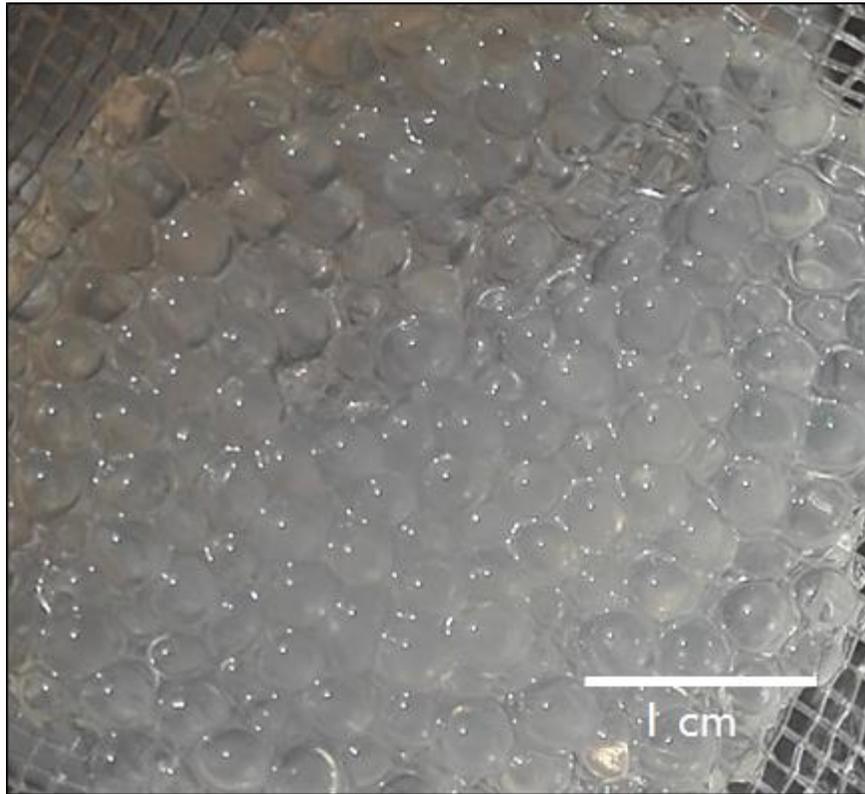
Ilustración 36: Representación del sistema de entrecruzamiento para esferas core shell

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

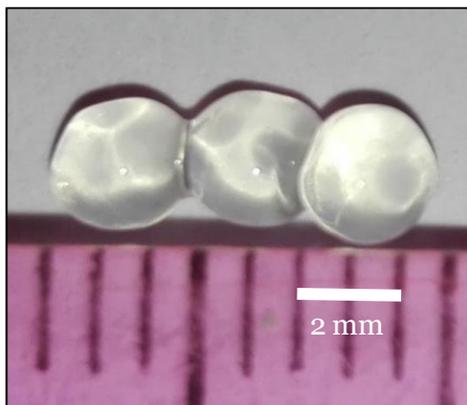
### 4.1. ESCALA MILIMÉTRICA

#### 4.1.1. Esferas de alginato cálcico

Las esferas obtenidas tenían una buena forma esférica con superficie lisa, ver Ilustración 37. La media del diámetro se determinó que fue 3 [mm] por fotografía óptica, ver Ilustración 38.



*Ilustración 37: Esferas de alginato obtenidas*



*Ilustración 38: Diámetro esferas de alginato obtenidas*

#### 4.1.2. Esferas recubiertas

Primero se decidió hacer una mezcla de alginato-quitosano, basándose en los antecedentes mencionados por Yongmei et al [17], en dos proporciones másicas de alginato y quitosano, 1:1 y 9:1 en agua destilada y ácido acético, para luego usar una jeringa y generar esferas reticuladas con  $\text{CaCl}_2$ , por el método de un paso mencionado por Gaserod [13]

Primero se trabajó con la proporción 1:1 en 30 [ml] de agua destilada y a continuación se le agregaron 0,3 [ml] de ácido acético, este es necesario para disolver el quitosano, debido a que es soluble solo en medios ácidos [12], como ya fue mencionado.

La idea de hacer la mezcla previa a la gelificación con  $\text{CaCl}_2$  fue tener la posibilidad de un trabajo más expedito al realizar las microsferas en el microcanal. Los resultados se pueden observar en la Ilustración 39.



Ilustración 39: Mezcla obtenida de alginato/quitosano en razón 1:1 en agua destilada y ácido acético

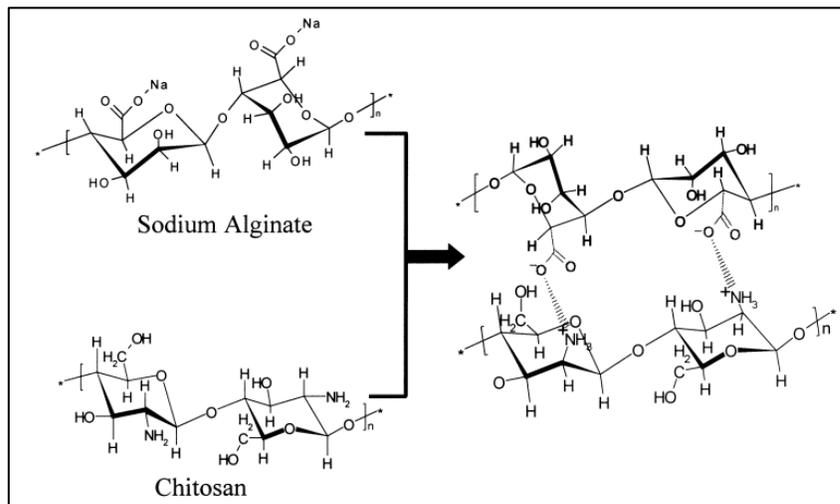


Ilustración 40: Representación esquemática de la reacción de formación de complejos iónicos entre el grupo aniónico ( $\text{COO}^-$ ) de alginato sódico y el grupo catiónico protonado ( $\text{NH}_3^+$ ) de quitosano

Se percibe que se obtuvo una mezcla densa, la cual no permite su paso a través de la aguja de una jeringa. De esta prueba, se puede confirmar que los biopolímeros alginato y quitosano tienen una fuerte afinidad, debido a que, al entrar en contacto, se genera inmediatamente un gel. Esto se debe a una reacción iónica. Ilustración 40 muestra el

esquema de reacción entre el grupo catiónico ( $\text{NH}_3^+$ ) del quitosano que se produce al protonar el grupo amino en condiciones ácidas, solubilizándolo y el grupo aniónico ( $\text{COO}^-$ ) del alginato de sodio que se produce en medios básicos. De esta manera se multiplica el peso molecular de la mezcla provocando una alta densidad [33].

A continuación, se decidió disminuir la cantidad de quitosano y hacer una mezcla en proporción 9:1 de la forma antes mencionada. La mezcla obtenida era más líquida que la de la razón 1:1, ver Ilustración 41, sin embargo, siguió siendo difícil la generación de las esferas, ver Ilustración 42, ya que la mezcla tenía una densidad que no permitía el paso por la jeringa.



*Ilustración 41: Mezcla obtenida de alginato/quitosano en razón 9:1 en agua destilada y ácido acético*



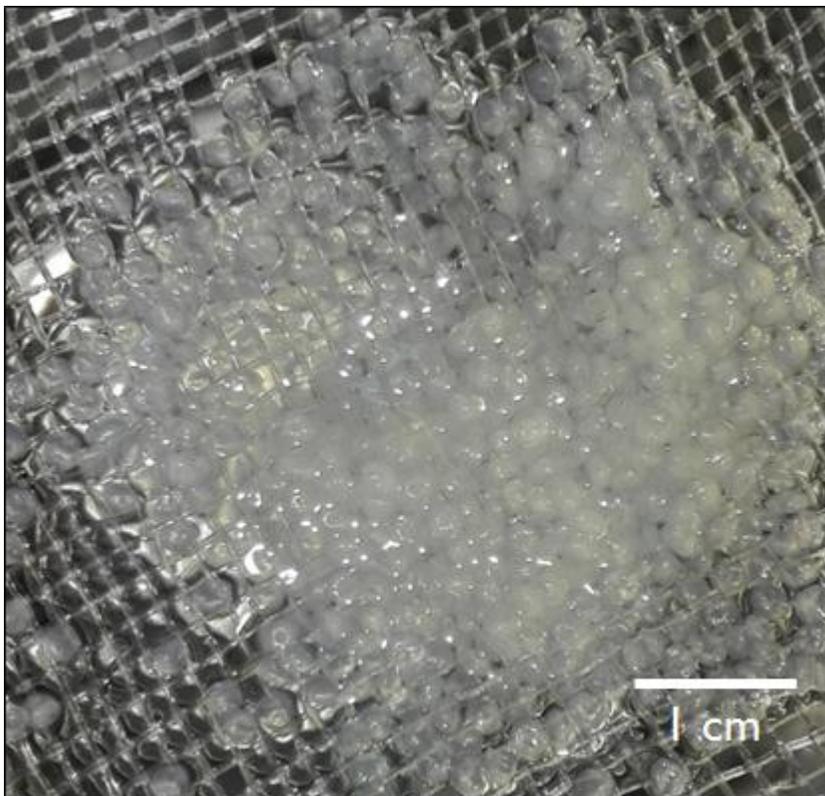
*Ilustración 42: Generación de esferas, con la mezcla de alginato/quitosano en razón 1:1*

Esto vuelve a confirmarnos la fuerte atracción electrostática que tienen ambos biopolímeros, pues a pesar de disminuir la cantidad de quitosano en la mezcla, siguió generándose un gel.

Después de esta mezcla fallida, se decidió generar esferas de alginato-quitosano mediante las metodologías de una etapa y dos etapas, basándose en los antecedentes mencionados por los estudios de Anil y Willem [11] y Pasparakis y Bouropoulos [18], las que se denominaron recubiertas, blendas y core shell.

Debido a que se corroboró que la unión del alginato al quitosano se produce al contacto es que se utilizó la metodología mostrada en la Ilustración 28, para la obtención de esferas

recubiertas. La cantidad de quitosano de la solución a la que son transferidas las esferas fue reportado por Anil y Willem [11] y el tiempo en el que se dejan las esferas en la solución por Gaserod et al. [13]. Las perlas obtenidas tenían una buena forma esférica con superficie levemente rugosa, Ilustración 43. La media del diámetro se determinó que era 2 [mm] por fotografía óptica, ver Ilustración 44.



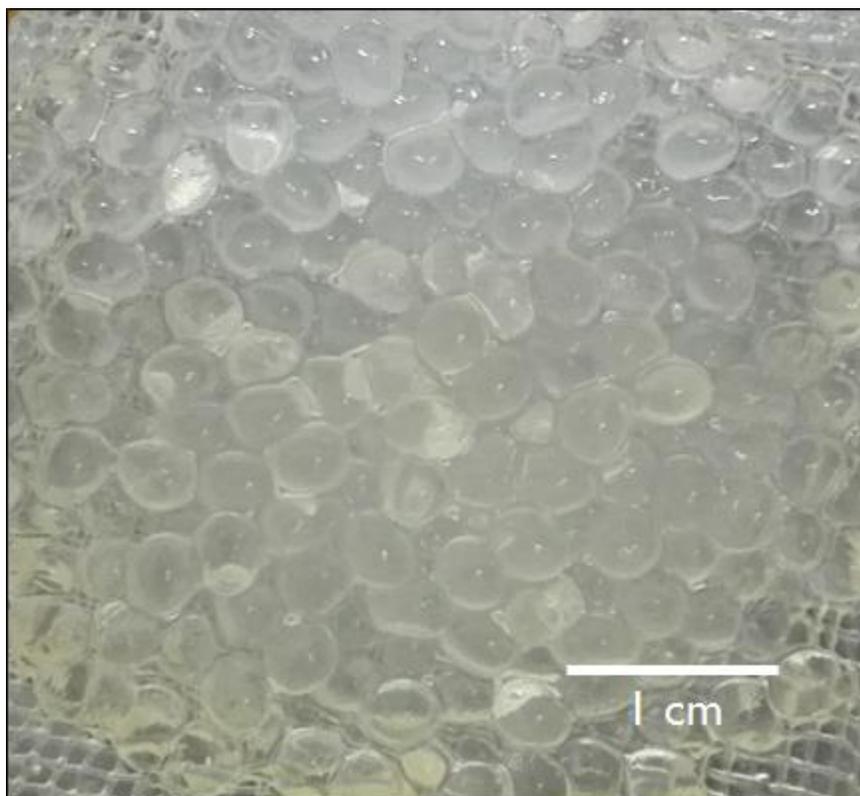
*Ilustración 43: Esferas recubiertas obtenidas*



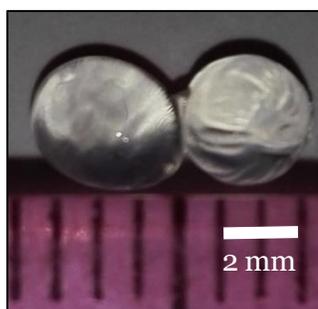
*Ilustración 44: Diámetro esferas recubiertas obtenidas*

#### **4.1.3. Esferas blendas**

Se probó con otro tipo de metodología, ver Ilustración 29, que permitió hacer una comparación de cuál es la más adecuada para obtener esferas de alginato-quitosano estables en el tiempo, la cual fue reportada por Anil y Willem [11]. Las esferas blendas obtenidas tenían una buena forma esférica con superficie lisa, Ilustración 45. La media del diámetro se determinó que era 3,5 [mm] por fotografía óptica, ver Ilustración 46.



*Ilustración 45: Esferas blendas obtenidas*



*Ilustración 46: Diámetro esferas blendas obtenidas*

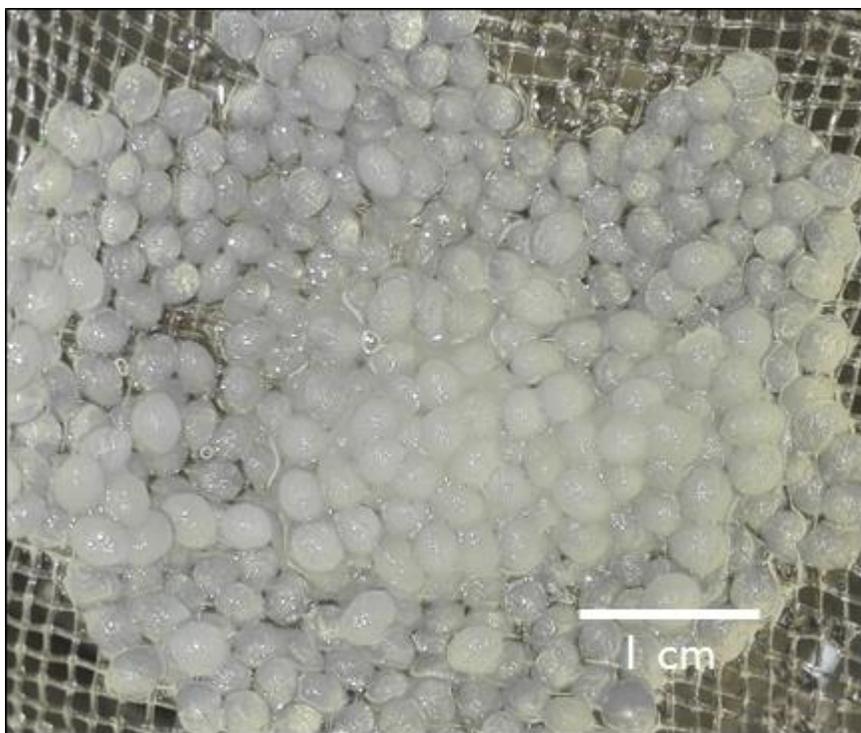
Se puede observar una diferencia notable entre los diámetros de las esferas recubiertas y blendas, al igual que en la rugosidad superficial. Esto nos permite deducir que la cantidad de quitosano que se une a las esferas, y la estructura polimérica resultante, dependen del método con el que se producen.

Gaserod [13] reportó que, si esferas de alginato cálcico se preparan mediante un procedimiento en que se dejan caer en una solución de quitosano, lo que se denomina en este trabajo como esferas recubiertas, sólo se unen contenidos bajos de quitosano. Esto es probablemente debido a que sólo se une a la superficie de las esferas, creando una membrana con pequeños poros que dificultan la difusión adicional de quitosano en el interior y por lo tanto, la unión a la red de gel está restringida. Lo anterior también explicaría la superficie rugosa que se observa en las esferas obtenidas.

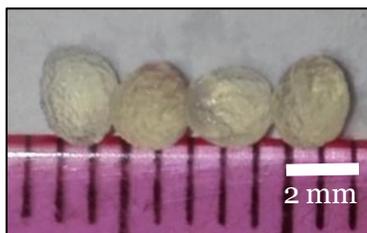
Cuando se suspenden esferas de alginato cálcico que aún no han sido reticuladas, en una solución de quitosano con  $\text{CaCl}_2$ , denominadas en este trabajo como esferas blendas, más quitosano puede unirse tanto a la superficie de la perla como a la red interior de gel. Esto puede resultar en la unión de 100 veces más quitosano que el procedimiento anterior [13], permitiendo obtener una red más flexible con una superficie suave y lisa. Esto también clarifica el hecho de que ambas esferas producidas bajo las mismas condiciones, tienen diámetros diferentes.

#### 4.1.4. Esferas core shell

Debido a que las esferas recubiertas y blendas fueron difíciles de reproducir en microfluídica, como se discutirá más adelante, es que se decidió utilizar esta metodología, Ilustración 30, la cual fue descrita por Bajpai y Tankhiwale [22] para generar esferas denominadas core shell.



*Ilustración 47: Esferas core shell obtenidas*



*Ilustración 48: Diámetro esferas core shell obtenidas*

Las esferas obtenidas tenían una buena forma esférica con superficie rugosa, al igual que las esferas recubiertas debido a la membrana de quitosano que las cubre,

Ilustración 47. La media del diámetro se determinó que era 3 [mm] por fotografía óptica, ver Ilustración 48.

#### 4.1.5. Análisis termogravimétrico (TGA) y Scanning Electron Microscope (SEM)

Los resultados del análisis termogravimétrico de las esferas, se muestran en el anexo 7.1. Indican que las esferas muestran estabilidad térmica hasta aproximadamente los 100°C para los tres tipos de esferas, alginato cálcico, recubiertas y blendas. El equipo indicó que las esferas de alginato cálcico tienen su punto de inflexión a los 87,6°C, las recubiertas a los 94,3°C y las blendas a los 75,6°C, ver Ilustraciones 72, 73 y 74.

Para observar mejor la temperatura en que la pérdida de peso se produce a velocidad máxima se graficaron los datos obtenidos [mg/°C] en función del porcentaje de masa como se puede observar en la línea azul, de las Ilustraciones 49,50 y 51, lo cual aproximadamente coincide con los puntos de inflexión.

Las esferas se dejaron secar con aire a temperatura ambiente durante 3 horas previas al ensayo, sin embargo, los resultados indicarían que la masa que se perdió corresponde al agua que las esferas aún mantenían en su interior, puesto que los puntos de inflexión están próximos a los 100°C. Es por ello que se decidió graficar los datos después de este valor, para obtener de manera más precisa la pérdida de masa de las esferas, una vez que se ha eliminado el agua.

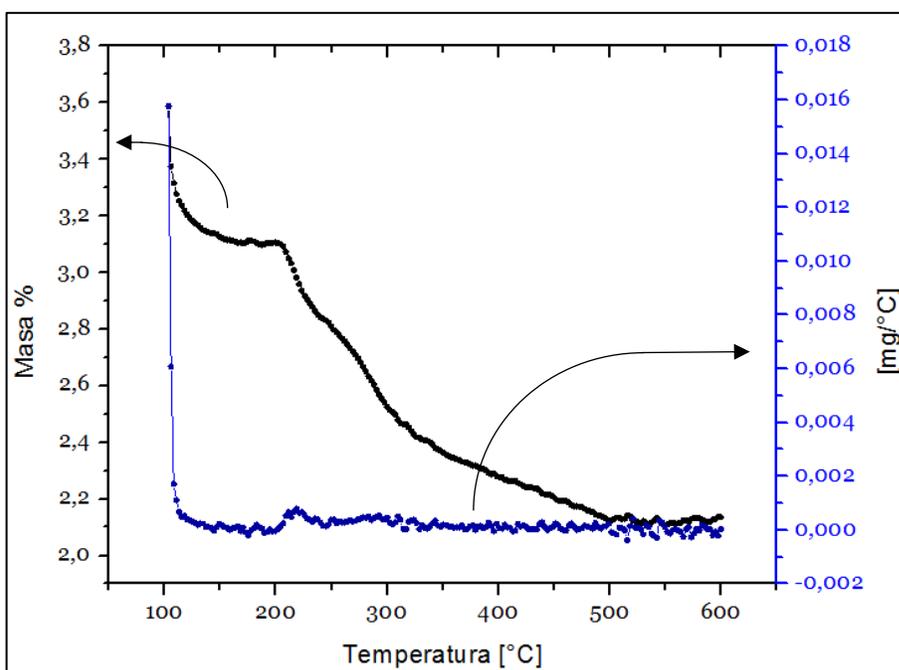


Ilustración 49: Datos obtenidos en análisis TG desde los 100°C para esferas de alginato cálcico

Se puede observar que la velocidad a la que se degradan (eje de las ordenadas del lado derecho) ocurre de manera aproximadamente constante para todas. Las esferas de alginato cálcico, son totalmente estables hasta los 200°C y se observa que a partir de los

500°C ya se ha perdido el 97,8% de la masa, manteniéndose en 0,15 [mg] hasta los 600°C, Ilustración 49.

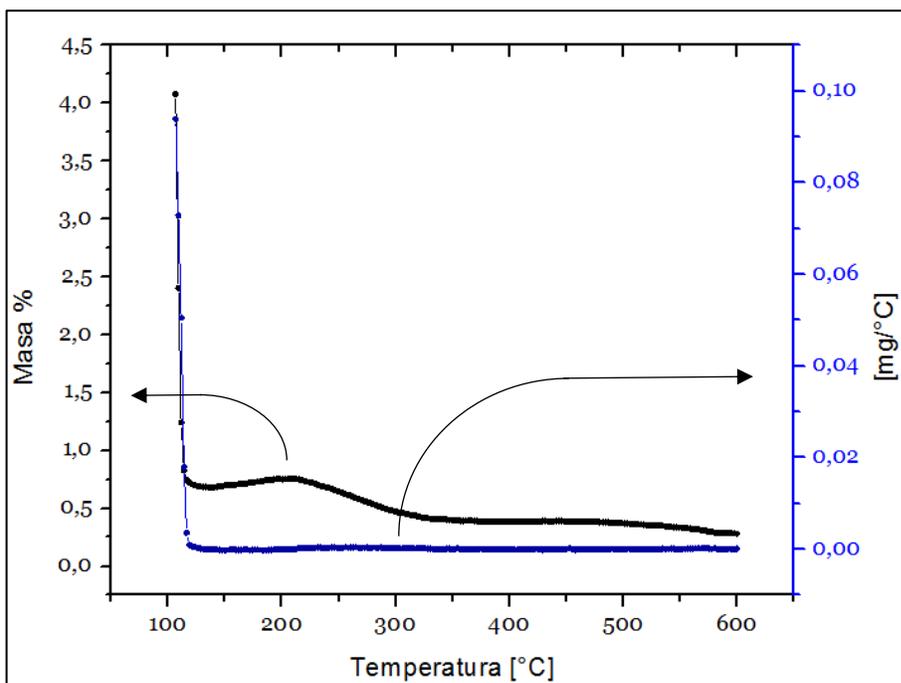


Ilustración 50: Datos obtenidos en análisis TG desde los 100°C para esferas recubiertas

Las esferas recubiertas, se mantienen estables hasta los 200°C, no obstante, cabe destacar que la cantidad de masa que se perdió a los 100°C fue considerable. Luego comienza a disminuir hasta perder el 99,75% a los 300°C manteniéndose en 0,15 [mg] hasta los 600°C, Ilustración 50.

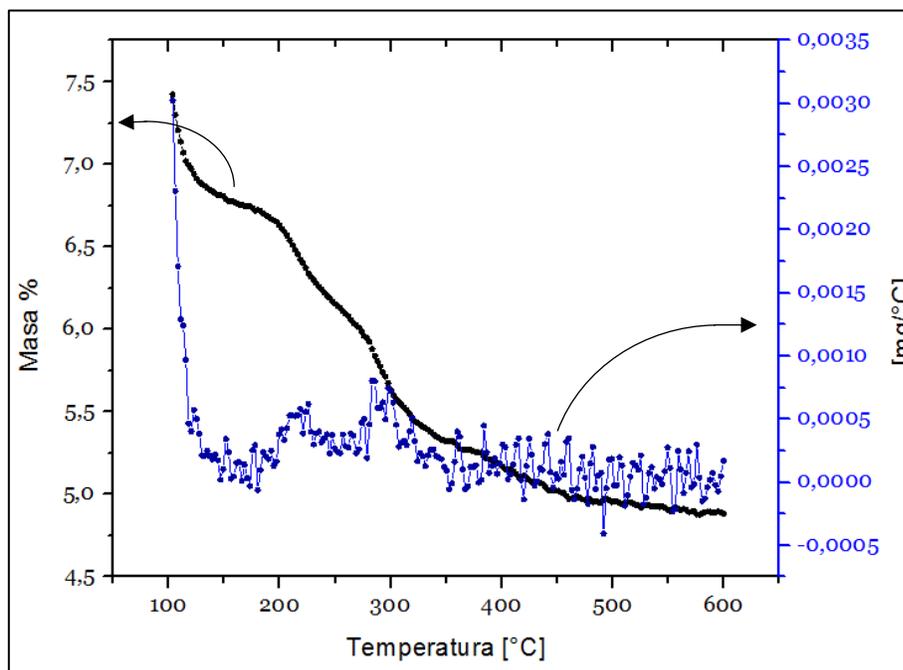


Ilustración 51: Datos obtenidos en análisis TG desde los 100°C para esferas blendas

Las esferas blendas se mantienen completamente estables hasta los 200°C, luego pareciera que vuelven a estabilizarse hasta los 280°C y entonces comienzan a descender hasta los 0,22 [mg] que equivale al 5% de masa, a los 600°C, Ilustración 51.

Del ensayo se obtiene que las esferas recubiertas tienen una temperatura de degradación menor que las de alginato cálcico y las blendas, esto puede ser debido a que ellas están cubiertas por una capa de quitosano, y éste tiene una temperatura de degradación de 300°C según reportan Neto et al. [34], mucho menos si se compara con la obtenida para esferas de alginato cálcico (500°C).

Por otro lado, las esferas blendas son estables hasta los 200°C, lo cual coincide con lo reportado por Bajpai y Tankhiwale [22]. Se concluye que estas esferas son las que mejor resisten la temperatura debido a que mantienen mayor masa al final del experimento (aproximadamente 5%), en comparación con las otras esferas. Esto puede ser debido a que la red gelificada formada por la unión iónica de los biopolímeros genere una temperatura de degradación mayor que las de los biopolímeros por si solos, lo que explicaría la curva de degradación de las esferas blendas donde pareciese volver a lograr una estabilidad hasta los 280°C.

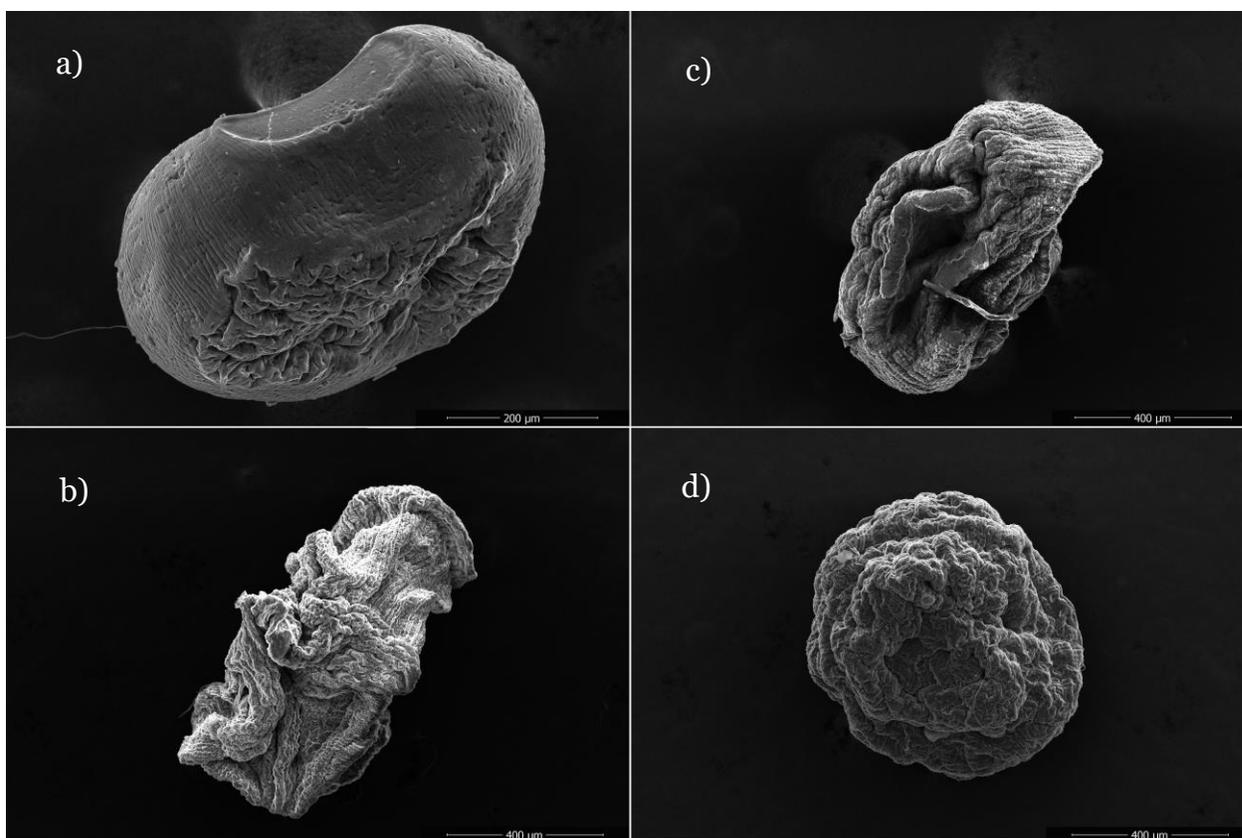
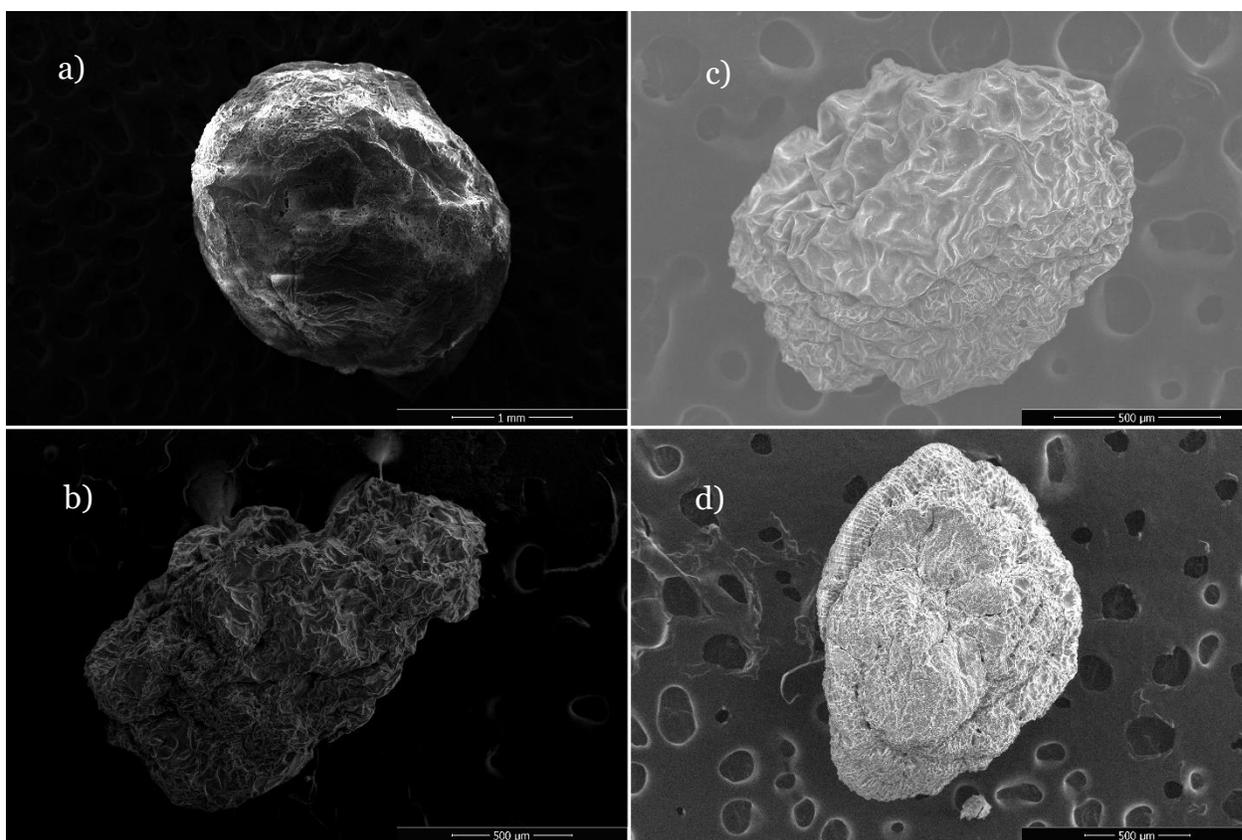


Ilustración 52: SEM de las esferas secadas con etanol. a) Esferas de alginato cálcico, b) Esferas recubiertas, c) Esferas blendas y d) Esferas core shell.

Las fotografías SEM obtenidas de las esferas se muestran en las Ilustraciones 52 y 53, En la Ilustración 52 las esferas fueron secadas con etanol y a continuación con aire a

200°C, debido a que en el análisis termogravimétrico realizado las esferas no se degradaban a esa temperatura. Se puede observar que las esferas de alginato cálcico mantienen su forma mientras que las recubiertas y blendas tienden a contraerse generando rugosidades. Las esferas core shell, a pesar de presentar rugosidad, mantienen su forma esférica, esto podría deberse a su centro de alginato cálcico.

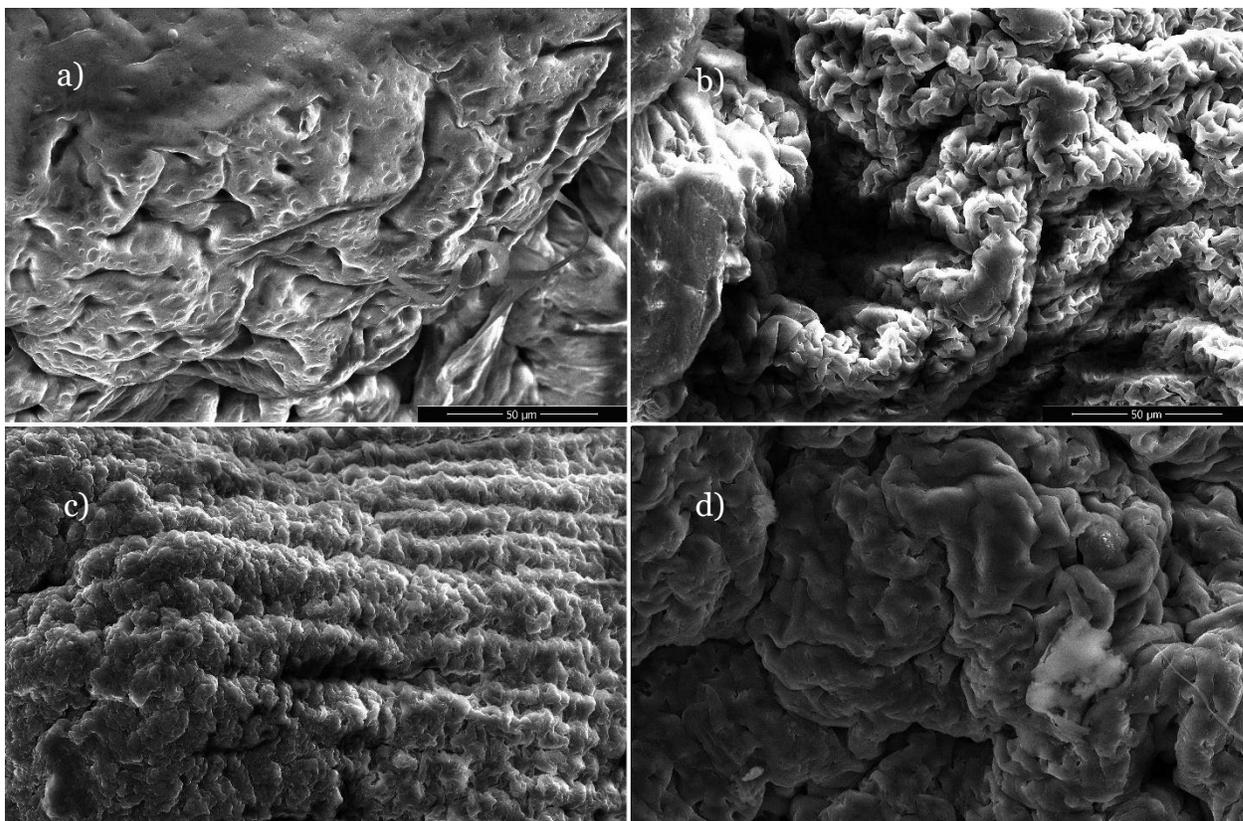
Si se comparan las fotografías obtenidas en la Ilustración 52, con las mostradas en el artículo de Pasparakis y Bouropoulos [18] Ilustración 18, se observa que las esferas recubiertas secadas con etanol en el artículo, presentan similitudes con las obtenidas respecto a la forma arrugada y contraída, además, en dicho artículo se hace un análisis EDS a las esferas confirmando la presencia de quitosano. Es por ello que, se podría concluir que las esferas recubiertas producidas, efectivamente tienen una capa de quitosano que las cubre.



*Ilustración 53: SEM de las esferas liofilizadas. a) Esferas de alginato cálcico, b) Esferas recubiertas, c) Esferas blendas y d) Esferas core shell.*

Por otro lado, para evitar el colapso en la estructura de las esferas al secarlas, se decidió liofilizarlas a  $-50[^\circ\text{C}]$  por 48 horas y luego sacar las fotografías, Ilustración 53. Se pueden observar mejores resultados en comparación con las secadas con etanol, sin embargo, las esferas recubiertas vuelven a contraerse y mostrar una superficie rugosa. Hay una similitud en cuanto a rugosidad en la superficie de las esferas recubiertas y core shell, debido a que ambas tienen una capa de quitosano que las cubre, sin embargo, las esferas core shell no colapsan, esto puede ser por la presencia de  $\text{CaCl}_2$  en la solución de

quitosano, que permite interactuar a los iones de calcio en la red formada entre el quitosano y el alginato. Lo mismo se podría discutir para las esferas blendas, presentan rugosidad por la presencia del quitosano, sin embargo, se observa que es menor, debido a la flexibilidad de la estructura en presencia de  $\text{CaCl}_2$  y quitosano tanto en el interior como la superficie de la esfera.



*Ilustración 54: SEM de la superficie de las esferas. a) Esfera de alginato cálcico, b) Esferas recubierta, c) Esfera blenda y d) Esfera core shell*

Finalmente, si se observa las fotografías SEM sacadas a la superficie de las esferas, Ilustración 54, se aprecia que en las esferas de alginato cálcico la superficie es suave con pequeños cráteres, mientras que en las recubiertas hay especies de “cadenas” enroscadas que también se internan hacia el centro de la esfera. En las del tipo blenda se observa un punto intermedio, debido a que existen las “cadenas”, pero de forma ordenada y suavizadas, lo cual se podría explicar debido a que estas esferas están gelificadas con calcio y quitosano. De esta forma también se podría afirmar el contenido de quitosano en ellas. En las esferas core shell se nota la existencia de “cadenas”, pero suavizadas y menos ordenadas que en las blendas, esto puede ser porque en la síntesis, la cantidad de  $\text{CaCl}_2$  es menor en comparación con las blendas.

Las esferas core shell, con ambos métodos de secado, mantienen su forma, por lo que se infiere que serían una buena alternativa a utilizar.

#### 4.1.6. Ensayo estabilidad de las esferas en el tiempo

Se obtiene del ensayo que a los 88 días las esferas siguen intactas, ver Ilustración 55, sin embargo, en las recubiertas y blendas se observan manchas negras, estas pueden ser microorganismos, lo cual se hubiese evitado inyectando a los tubos soluciones que eviten la proliferación de ellos o, cambiando el agua destilada cada cierta cantidad de días. Para observar el cambio de las esferas en el tiempo, ir al anexo 7.2, Ilustraciones 75 y 76.

Este ensayo, permitió de manera preliminar afirmar la teoría de que tanto el alginato por sí solo, como las esferas de alginato-quitosano son estables en el tiempo, cuando se mantienen en una solución neutra. Sin embargo, los resultados son solo visuales, debido a que las esferas no fueron sacadas de los tubos, lo que puede significar que, a pesar de mantener su forma, baste una pequeña diferencia de presión para degradarlas.



*Ilustración 55: 88 días desde la preparación. A la izquierda esferas de alginato puro, en medio esferas recubiertas y a la derecha esferas blendas en agua destilada*

Por otro lado, se decidió realizar un ensayo en suero fisiológico PBS, para simular las condiciones a las cuales se podrían someter las esferas al inyectarse en la arteria hepática. Para ello, las esferas también fueron dejadas en tubos tipo falcon y algunas fueron retiradas cada 2 o 3 días para medir su diámetro, fotos representativas del cambio se pueden observar en el anexo 7.2, Ilustraciones 77, 78 y 79.

Se repara que las esferas de alginato cálcico y recubiertas están completamente degradadas a los 27 días, aunque mantienen su forma, pero de manera visual, ya que con solo tocarlas se desarmen, mientras que las esferas blendas siguen manteniendo su forma aún al tacto, es decir, no están degradadas.

El cambio en los diámetros se graficó en la Ilustración 56, donde la medida cero para las esferas de alginato puro y las recubiertas significa que están degradadas.

La primera explicación a este fenómeno se debe a que la solución tampón fosfato salino (DPBS) (Dulbecco, Sigma-Aldrich) utilizada, no tiene cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) ni cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) [35], ambas sales permitirían que las esferas de alginato cálcico y blendas siguieran reaccionando con los iones de calcio que obtendrían de estas sales, evitando su degradación. Sin embargo, se observa que las esferas tipo blenda a pesar de esto, siguen sin degradarse a los 27 días.

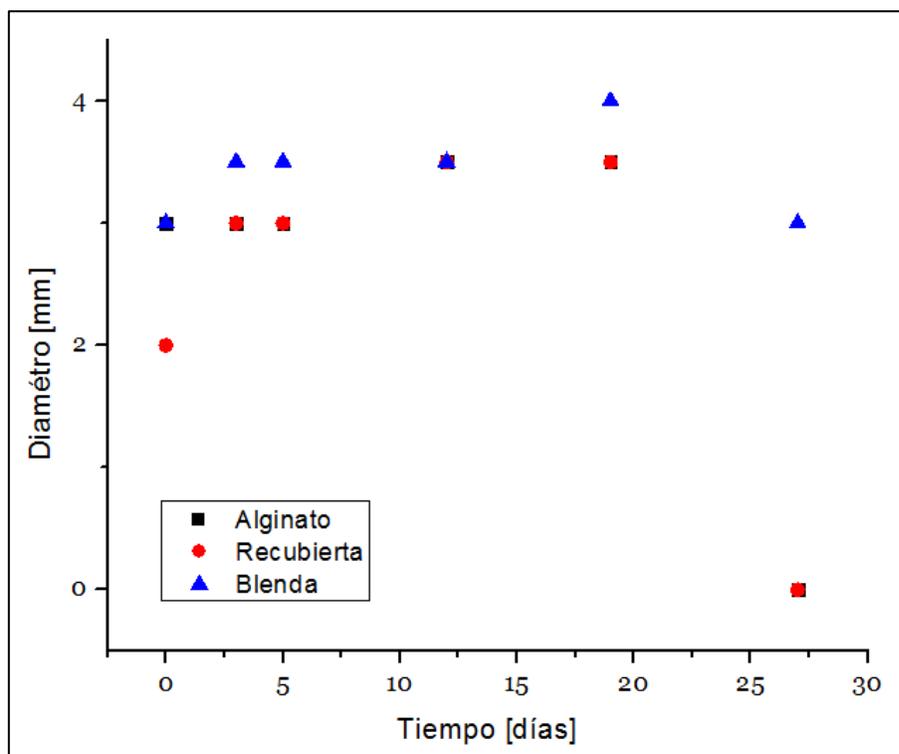


Ilustración 56: Variación del diámetro para los diferentes tipos de esferas en PBS hasta los 27 días.

Por otro lado, la solución DPBS contiene cloruro de potasio (KCl) y cloruro de sodio (NaCl), anteriormente se mencionó que las esferas de alginato cálcico son capaces de degradarse liberando los iones  $\text{Ca}^{+2}$  que contienen, este fenómeno lo pueden inducir las sales mencionadas a través de sus iones de cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), como lo menciona Gaserod et al. [13]. Para el caso de las esferas recubiertas, es posible que los iones  $\text{Cl}^-$  difundan a través de la membrana de quitosano, interactuando con los iones  $\text{Ca}^{+2}$  del núcleo, degradando las esferas y también generando que el enlace iónico entre el quitosano y el alginato que existe en la superficie, se termine.

Sin embargo, las esferas blendas al estar tanto en el interior como en la superficie el alginato entrecruzadas tanto con  $\text{Ca}^{+2}$  como con quitosano, es posible que dificulte la liberación de los iones  $\text{Ca}^{+2}$ , y esto a su vez dificulte la desintegración. Esto fue reportado por Anil y Willem [11], el artículo muestra que esferas que contienen quitosano refuerzan la estructura de la esfera y su impermeabilidad, evitando que el fármaco que contienen (producto de la investigación) y los iones se escapen. Simultáneamente, hace a la esfera más flexible y permite que la pared amplíe su superficie y se hinche para compensar las diferencias osmóticas entre el interior y exterior.

El hinchamiento mencionado, es posible porque las redes entrecruzadas de las esferas tienen espacios que permiten el ingreso de soluciones hasta llegar a un equilibrio. Esta es la definición por excelencia de hidrogel. La Ilustración 56 muestra el comportamiento, si se observa el día cero, las esferas tienen distintos diámetros, sin embargo, a los 12 días todas tienen el mismo diámetro.

Al comparar los resultados con el trabajo de Pasparakis y Bouropoulos [18], en la Ilustración 15 se muestra la variación del peso de los tres tipos de esferas al dejarlas en PBS por 300 minutos, para el alginato cálcico, la curva de hinchamiento en el ambiente ligeramente básico de PBS comienza a disminuir indicando disolución o degradación, que es lo se obtuvo. Las esferas recubiertas con quitosano también muestran menor grado de hinchazón cuando está expuestas en PBS, aproximadamente cuatro veces menos que las esferas de alginato cálcico, ya que la red de polímero es más densa y presenta mayor resistencia a la presión osmótica. Sin embargo, en este trabajo se obtuvo que las perlas se hinchan por igual, ver Ilustración 56. Aunque el grado de la protonización de los grupos aminos libres del quitosano en este ambiente ligeramente básico es bajo y puede influir en la interacción con el alginato, la membrana de quitosano aún inhibe el hinchamiento del núcleo de alginato cálcico. El ambiente básico entonces explicaría por qué las esferas recubiertas, se degradan a los 27 días [18].

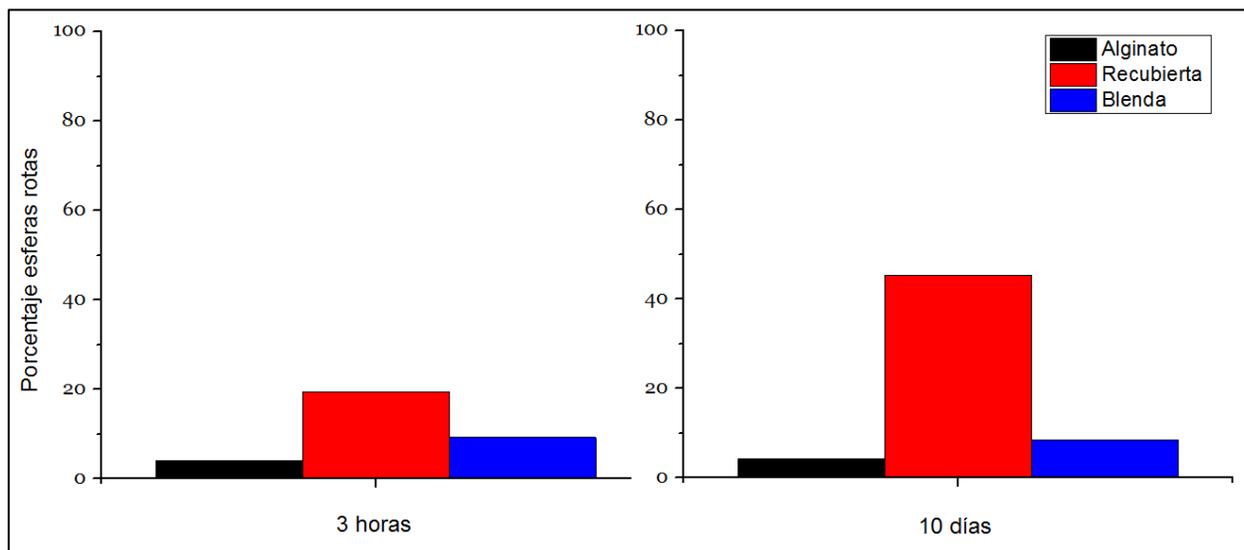
#### **4.1.7. Ensayo propiedades mecánicas**

Cuando se trabaja con ensayos para determinar las propiedades mecánicas de los materiales, se debe generar una probeta con formas y medidas precisas. En este caso se decidió utilizar la compresión. Como no es posible obtener una probeta de los hidrogeles, debido a que no se cuenta con moldes que permitan la gelificación de una forma específica, es que se decidió generar una monocapa con las esferas. Sin embargo, existía el problema de que, al aplicar compresión a las esferas, estas se podrían escapar por los lados, para evitarlo, se utilizó una copla de PVC del diámetro de la prensa, que la rodeara y permitiera realizar el ensayo.

En un comienzo se hizo una prueba para los tres tipos de esferas, las cuales se mantuvieron durante 2 días en agua destilada. Con esto, se obtuvo resultados preliminares y se determinó la carga a la que debían someterse las esferas. Primero se ensayó a 3000[N] donde todas las esferas se rompieron, lo que no tenía sentido para el experimento. A continuación, se probó a 100[N] donde todas las esferas permanecieron intactas y a 1000 [N] se observaron resultados, pero con altos porcentajes de esferas rotas. Es por ello que se decidió trabajar a 500 [N]. Las piezas de compresión se ponen a una distancia de 1 [mm] mayor al diámetro de las esferas que se quieren estudiar y se considera el comienzo del ensayo cuando el equipo deja de registrar una medida constante de fuerza y comienza a aumentar, a priori la medida constante debiese ser 0[N] hasta que ambas piezas toquen las esferas, sin embargo, no sucede debido a la copla de PVC que roza con la pieza superior mientras avanza, generando que el equipo aplique una fuerza. Finalmente, cuando se llega a los 500 [N] se detiene el equipo manualmente.

Ya que, en el capítulo previo, el ensayo de estabilidad en el tiempo en agua destilada de las esferas solo entregó resultados preliminares, se decidió dejar las esferas en tres soluciones diferentes: agua destilada,  $\text{CaCl}_2$  y PBS. A continuación, se realizó el ensayo de compresión a las esferas dejadas 3 horas y 10 días en las soluciones, para complementar los resultados anteriores.

Esto permitiría observar cómo influyen las soluciones a través del tiempo en las propiedades mecánicas de las esferas. Se realizaron dos ensayos para cada tipo de esferas y se calculó el promedio, además, los ensayos para cada tipo de esfera a las 3 horas se realizaron el mismo día al igual que para las de los 10 días, esto para evitar que variables como humedad y temperatura, a las cuales los hidrogeles son sensibles, variaran considerablemente entre un ensayo y otro, ver anexo 7.3.



*Ilustración 57: Esferas en agua destilada, a la izquierda luego de 3 horas desde su preparación, a la derecha luego de 10 días.*

El primer ensayo se hizo en agua destilada, donde se puede observar que ni las esferas de alginato cálcico ni las blendas tienen un porcentaje significativo, sin embargo, en las esferas recubiertas se aprecia un aumento considerable, ver Ilustración 57.

Para entender mejor este fenómeno, el trabajo de Pasparakis y Bouropoulos [18], muestra la diferencia de peso de los tres tipos de esferas al dejarlas en agua por 300 minutos y define que esferas de alginato cálcico puro exhiben un grado de hinchazón en agua del 115%, ver Ilustración 15(a). El comportamiento puede justificarse bien debido a que las esferas húmedas tienden a absorber agua para llenar las regiones vacías de la red de polímero están deshidratados en el interior, hasta alcanzar el estado de equilibrio. El fenómeno es provocado por la relajación de la red de polímero en la presencia de presión osmótica, la hinchazón de las esferas húmedas de alginato de calcio en agua dura unos 60 minutos hasta que la presión osmótica es igual a las fuerzas de la unión de los iones reticulados que mantienen estable la estructura de la red. Ilustración 15(b) muestra los perfiles de hinchazón de esferas de alginato recubiertas de quitosano. Se aprecia que se hinchan en agua unas tres veces menos en comparación con las esferas de alginato cálcico. Las esferas mixtas de alginato-quitosano, denominadas en este trabajo esferas blendas, se hinchan aún menos en agua que las esferas de alginato recubiertas de quitosano, ver Ilustración 15(c) debido a dos factores: la formación de una red compleja desarrollada por la mezcla de alginato y quitosano. Y la presencia del complejo polielectrolito entre los

grupos amino de quitosano y los grupos carboxilato de alginato. Estos dos parámetros mejoran significativamente la estabilidad de las esferas blendas. La red de polímero es más densa y presenta mayor resistencia a la presión osmótica.

Se puede concluir a través del mismo trabajo de Pasparakis y Bouropoulos [18] que a medida que pasa el tiempo inevitablemente las esferas comienzan a degradarse, sin embargo esto puede suceder de forma más rápida para las esferas recubiertas debido a la distinta gelificación que tienen con respecto a las otras esferas, sumado a que el grado de la protonización de los grupos aminos libres del quitosano en este ambiente ligeramente básico es bajo, como fue mencionado anteriormente, y como solo existe en la superficie de las esferas, esto ayudaría a acelerar su degradación.

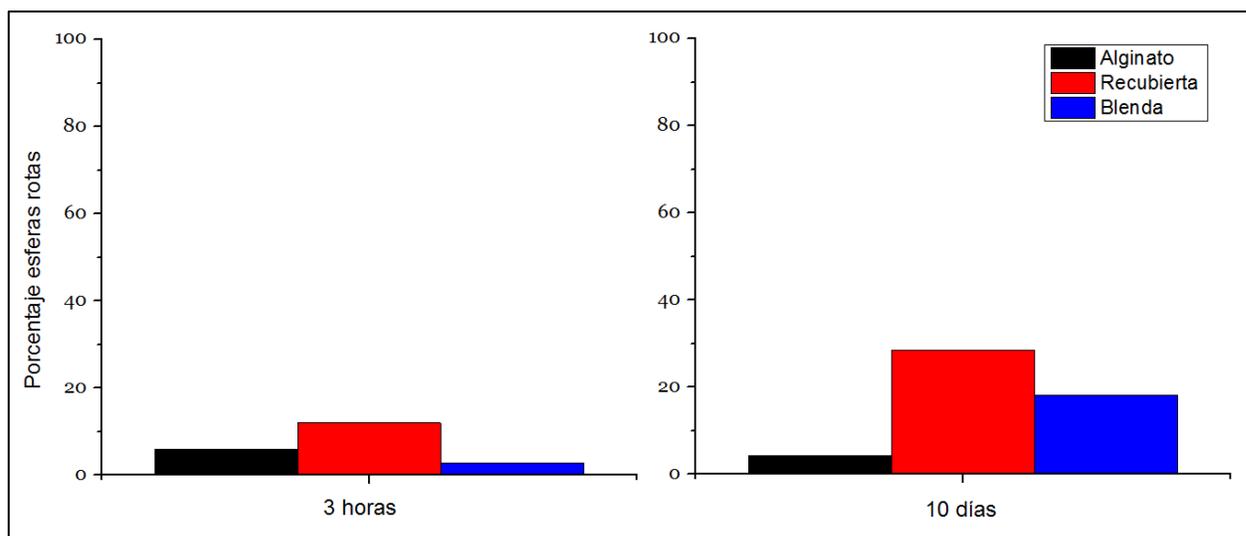


Ilustración 58: Esferas en CaCl<sub>2</sub>, a la izquierda luego de 3 horas desde su preparación, a la derecha luego de 10 días.

El segundo ensayo se hizo en CaCl<sub>2</sub>, donde se puede observar que las esferas recubiertas y las blendas sufren un cambio significativo, sin embargo, en las esferas recubiertas se aprecia un aumento de esferas rotas, ver Ilustración 58.

Como se mencionó anteriormente las esferas comienzan a degradarse a medida que pasa el tiempo de manera inevitable, sin embargo, las esferas de alginato cálcico se libran de esto si se dejan en una solución de CaCl<sub>2</sub> ya que la sal permite que los iones de calcio Ca<sup>+2</sup> sigan interactuando con las esferas, reforzando la red, mientras que para el caso de las recubiertas a los iones les cuesta difundir al núcleo por la capa de quitosano que las cubre. Finalmente, para las esferas blendas la explicación sería que llegan a un equilibrio en el que los iones dejan de interactuar con la red polimérica, por la presencia de quitosano que ayuda a fortalecer la red y ocupa espacios de interacción iónica con el alginato.

El tercer ensayo se hizo en PBS, donde se puede observar que las esferas de alginato cálcico y recubiertas se degradan completamente en comparación con las blendas y core shell, ver Ilustración 59.

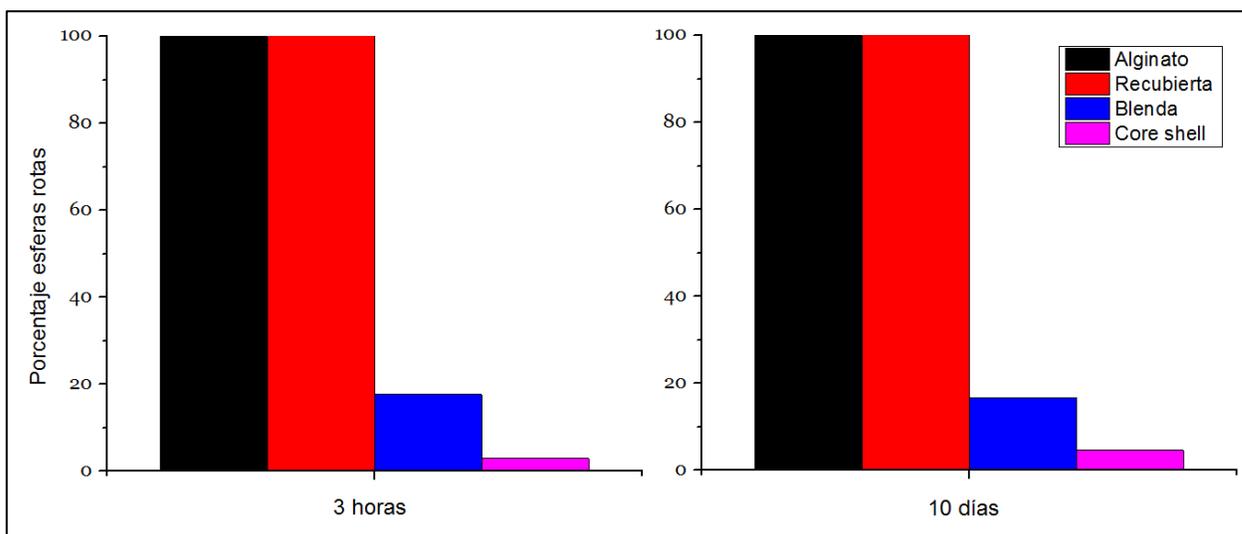


Ilustración 59: Esferas en PBS, a la izquierda luego de 3 horas desde su preparación, a la derecha luego de 10 días.

Como fue discutido anteriormente las esferas en PBS aumentan su degradación, debido a las sales que contiene (KCl y NaCl), mientras que las esferas blendas al estar reticuladas con quitosano y  $\text{Ca}^{+2}$  refuerzan la estructura. Es importante destacar que a las 3 horas las esferas de alginato cálcico y recubiertas ya se habían degradado mientras que a los 10 días las esferas blendas y core shell siguen manteniendo sus propiedades mecánicas.

Lo anterior, tiene sentido si lo comparamos con el ensayo de estabilidad en el tiempo en PBS realizado en el capítulo anterior para los distintos tipos de esferas, debido a que a los 27 días las esferas de alginato cálcico y recubiertas a pesar de mantener su forma, se describe una diferencia de presión pequeña puede degradarlas, con los resultados obtenidos en este ensayo se demostró que a las 3 horas, estas esferas perderían la resistencia a la compresión a pesar de visualmente mantener su forma.

En conclusión, los resultados obtenidos por el ensayo de propiedades mecánicas, sumado a los ensayos de estabilidad en el tiempo en PBS que muestran que a los 27 días las esferas blendas siguen manteniendo su forma y estructura, lo que permite rescatar que estas tienen mejores propiedades mecánicas en comparación con las de alginato cálcico y recubiertas por lo que serían potencialmente adecuadas para una terapia de embolización intraarterial.

La reproducción de esferas blendas a escala micrométrica a través de microfluídica no fue posible, como se discutirá más adelante, es por ello que, al ser el ensayo en PBS el más relevante porque permite complementar los resultados obtenidos de estabilidad de las esferas, se repitió en esta solución para esferas core shell. Además, la solución PBS simula el ambiente biológico humano al que serían sometidas las esferas.

Se observa en la Ilustración 59 que las esferas core shell continúan teniendo buenas propiedades al igual que las blendas, esto puede ser debido a que a pesar de tener una capa de quitosano recubriéndolas, en la síntesis este también tenía  $\text{CaCl}_2$ , por lo que la capa

igualmente tendría iones de calcio, permitiendo que estos sigan interactuando con el núcleo, reforzando la red interna de alginato. Finalmente, las esferas core shell, en vista de la similitud en propiedades mecánicas con las blenda, de igual forma serían potencialmente adecuadas para una terapia de embolización intraarterial.

## **4.2. ESCALA MICROMÉTRICA**

### **4.2.1. Preparación microcanal**

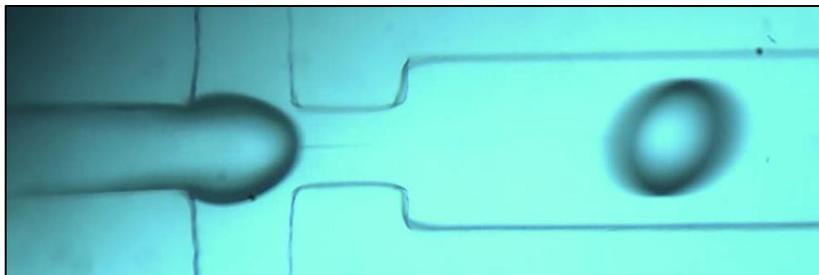
Se obtuvo mediante litografía óptica como se mencionó en el punto 3.2.1, la placa de silicio con el modelo a utilizar, ver anexo 7.4, Ilustración 80. A continuación, se obtuvo el microcanal, y se unió a una placa de microscopio, Ilustración 60. El modelo no es el mismo de la placa de silicio, pues esta fue creada solo para aprender la metodología utilizada. La profundidad y el ancho de la boquilla y el dispositivo principal fue diseñados para ser de 250 [μm] y 500 [μm], respectivamente.



*Ilustración 60: Microcanal unido a placa de microscopio*

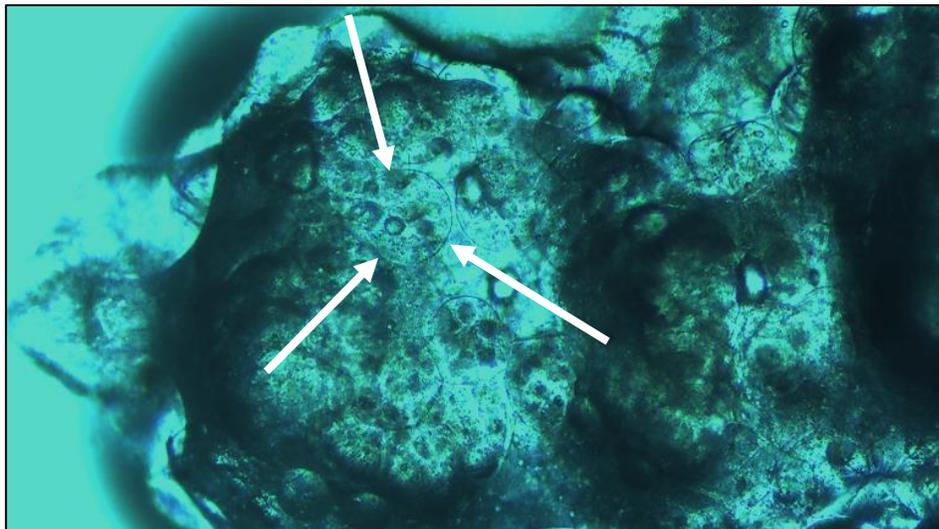
### **4.2.2. Preparación microesferas de alginato cálcico**

Las primeras esferas de alginato cálcico se generaron en el microcanal Ilustración 61, mediante la metodología descrita anteriormente, Ilustración 33. Sin embargo, el problema



*Ilustración 61: Formación de esferas en microcanal*

radicó en que al salir del microcanal, estas formaban una masa y es por eso que no se pueden apreciar de manera nítida en la Ilustración 62. Cabe señalar que, a la salida del canal se unió una manguera de silicona que dejaba caer las microesferas a un petri.



*Ilustración 62: Primeras esferas obtenidas de alginato cálcico a través de microfluídica*

La primera conclusión fue que el problema radicó en el propio microcanal, debido a que su forma no permite un tiempo de residencia suficiente para que las esferas gelifiquen de manera adecuada, es por ello que se cambió a otro microcanal, Ilustración 63, con la forma de la placa de silicio grabada que había sido obtenida.

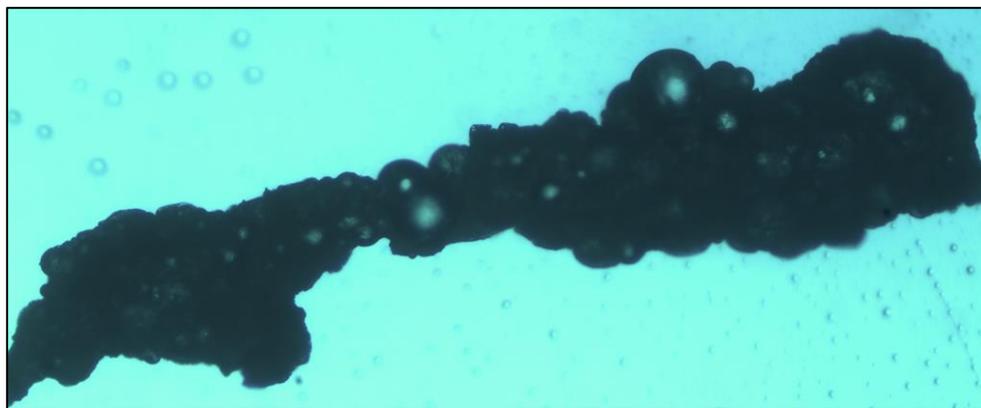


*Ilustración 63: Microcanal unido a placa de microscopio con un modelo que permite un tiempo de residencia mayor de las microesferas*

Con este cambio no se notó diferencia, sin embargo, se siguió utilizando puesto que tener un mayor tiempo de entrecruzamiento no era contraproducente para los fines del trabajo.

A continuación, se decidió utilizar una nueva metodología, que consiste en dejar caer las esferas por gravedad, sin entrecruzar en el canal, a una solución entrecruzante de  $\text{CaCl}_2$  que está en agitación constante. Lo primero se resolvió al observar que a las microesferas les costaba trabajo salir a través de la manguera de silicona unida al final del canal y, lo segundo, tratando de reproducir lo realizado en escala macro para evitar que las esferas formaran una masa.

Esto generó un problema mayor, debido a que las esferas no presentaron una forma esférica definida y su tamaño disminuyó considerablemente, además de generar unas especies de cadenas de varias microesferas unidas, ver Ilustración 64.

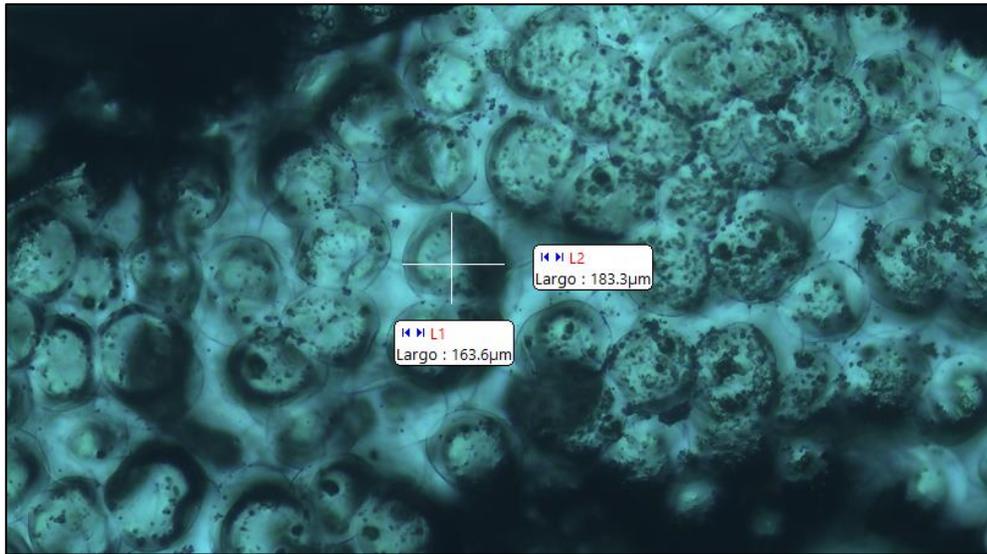


*Ilustración 64: Microesferas de alginato cálcico formadas al dejar caer en una solución de  $\text{CaCl}_2$  en agitación constante*

Lo anterior se produjo porque en la metodología de escala milimétrica las esferas caen una por una en la solución entrecruzante debido a que la gravedad produce la gota, y al tratar de imitar esta metodología a escala micrométrica, las microesferas se comienzan a aglutinar a la salida del microcanal hasta que el alcohol isoamílico que es la solución que las transporta, forma una gota por gravedad, que contiene varias microgotitas en su interior, y cae a la solución entrecruzante, por otro lado, la agitación produce que se pierda la forma esférica.

Otra solución fue aumentar la cantidad de cloruro de calcio, la mayoría de los artículos mencionados es en este trabajo cuando requerían crear una gota con mejor forma esférica recurrían a este método, por lo que se decidió aumentar la concentración de  $\text{CaCl}_2$  de 1,5% a 3% y se siguió con la metodología de dejar caer las microesferas por gravedad. El resultado se puede observar en el anexo 83, Ilustración 81, donde a pesar de verse esferas con una forma esférica, pareciera que el aumento de  $\text{CaCl}_2$  incremento su capacidad para aglutinarse, persistiendo el problema.

Finalmente, después de todas las pruebas, se decidió continuar con la metodología inicial, Ilustración 33, pero dejando caer las microesferas ya gelificadas por gravedad, eliminando la manguera a la salida del microcanal. Se obtuvieron microesferas del orden de 170  $[\mu\text{m}]$  aproximadamente, Ilustración 65.



*Ilustración 65: Esferas de alginato cálcico dejadas caer por gravedad con una solución entrecruzante de concentración 1,5% CaCl<sub>2</sub> (p/v)*

#### **4.2.3. Preparación de microesferas recubiertas**

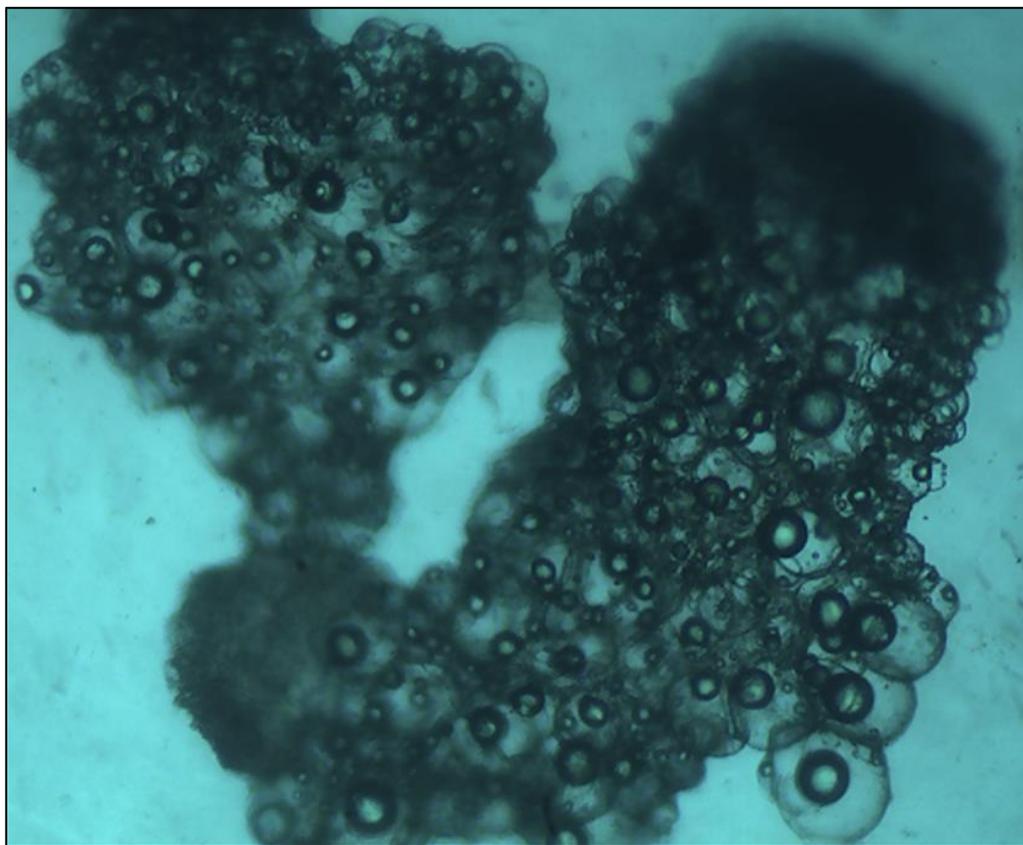
Microesferas recubiertas deben ser obtenidas con la metodología mencionada anteriormente, Ilustración 34, sin embargo, se genera un problema de fases, debido a que el alcohol isoamílico utilizado para formar la gota, es decir, inmisible en agua, genera fases al caer en la solución de quitosano que está disuelto en agua destilada y ácido acético. Por esta razón las microgotas no caen a la solución de quitosano como se puede observar en la Ilustración 66.



*Ilustración 66: Dos fases generadas cuando caen las gotas desde el microcanal a una solución de quitosano*

Como la mayoría de los resultados de los ensayos para las esferas a nivel milimétrico demostraron que las esferas recubiertas no tienen buenas propiedades, se decidió trabajar en un modelo que permitiera obtener esferas del tipo blendas.

El problema de fases, se podría evitar si se esperaba el tiempo suficiente a que la microesfera caiga por gravedad a través del alcohol isoamílico hasta la solución de quitosano, como es reportado por Capretto et al. [26], los resultados se observan en la Ilustración 67.



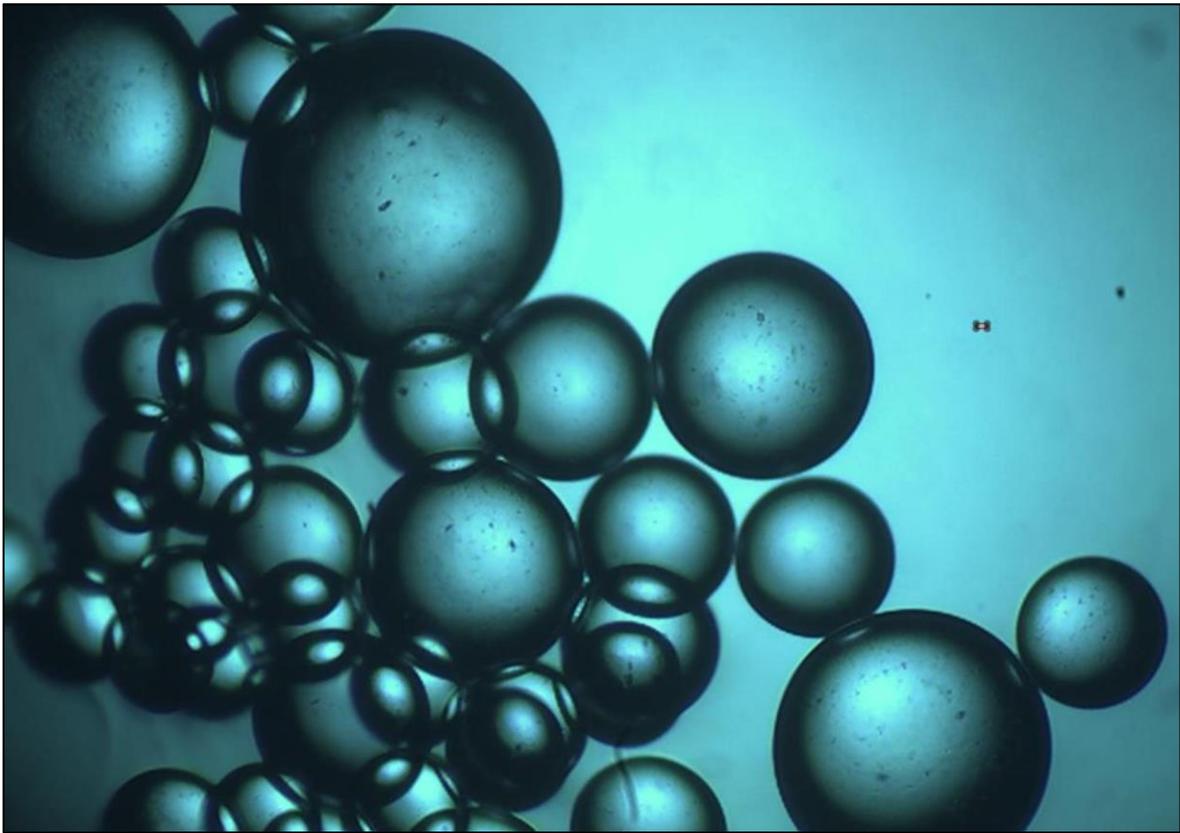
*Ilustración 67: Microesferas obtenidas dejándolas caer a un petri. Las microesferas traspasan la fase oleosa por gravedad y pasan a una fase de quitosano con  $\text{CaCl}_2$ , que las gelifica*

Se observan pequeñas gotitas que corresponden al alcohol isoamílico que no se separó de las microesferas al formarlas. Para evitar el problema producido por las fases, se trató de disolver el quitosano en alcohol isoamílico, obteniéndose los resultados en el anexo 84, Ilustración 82, donde se aprecia que el quitosano no se disuelve y precipita.

#### **4.2.4. Preparación de microesferas blendas**

Se decidió entonces que las esferas se generarían previamente, pero sin entrecruzar, para luego traspasarlas a un petri, esperar que el alcohol isoamílico se evaporara y verterlas en una solución entrecruzante que tuviera quitosano y  $\text{CaCl}_2$ , metodología esquematizada en la Ilustración 35.

Al realizar este procedimiento, las esferas coalescían antes de caer en el petri como se puede observar en la Ilustración 68.



*Ilustración 68: Esferas de alginato cálcico sin entrecruzar coalesciendo antes de caer a la solución entrecruzante*

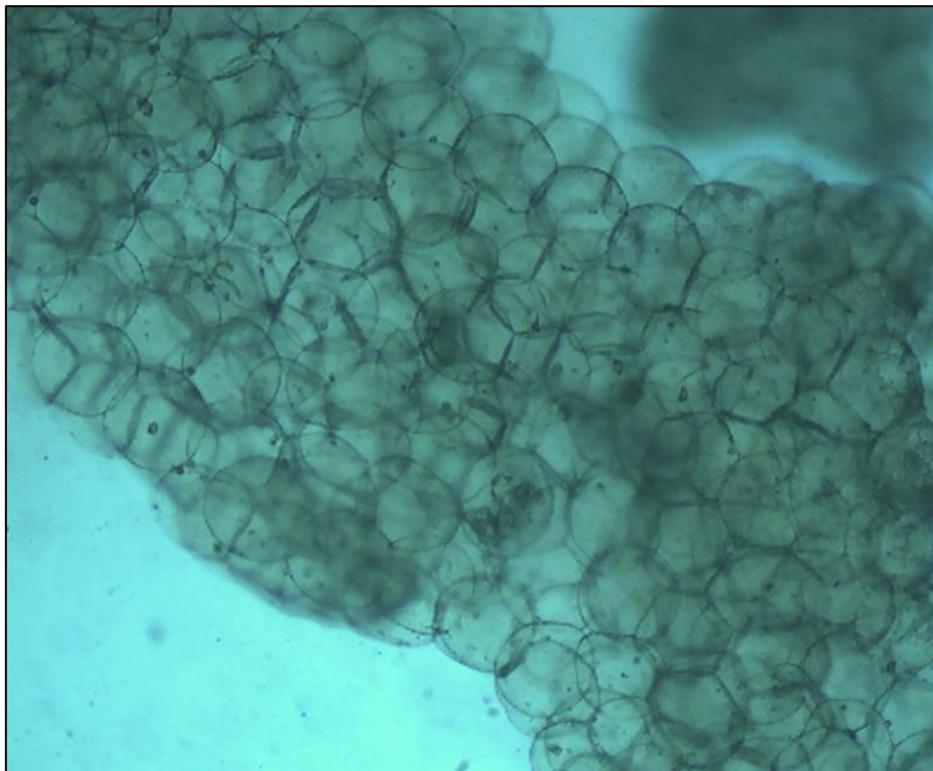
Además, esperar a que el alcohol isoamílico se evaporara no era práctico, a pesar de sacar el exceso con una pipeta. Así nació la idea de lavar las esferas con acetona esperar a que el excedente se evaporara (el tiempo de evaporación para la acetona es menor en comparación con el del alcohol isoamílico) para evitar posibles problemas al ponerse en contacto con el quitosano, y traspasarlas a la solución de quitosano entrecruzante, esto porque la acetona vuelve soluble al alcohol isoamílico.

Por otro lado, para evitar la coalescencia, se decidió hacer un entrecruzamiento previo de las microesferas pero con menos concentración de  $\text{CaCl}_2$  que la metodología original, bajando a 0,5% de 1,5 %. En el artículo de Bajpai y Tankhiwale [22], se generan esferas multicapas, donde señalan que al entrecruzar previamente esferas de alginato y luego dejarlas en una solución de quitosano con  $\text{CaCl}_2$ , permite la creación de un núcleo gelificado de quitosano alginato y iones  $\text{Ca}^{+2}$  además de obtener un recubrimiento de quitosano. Esto permitiría obtener esferas con buena forma esférica.

Para saber si la acetona produce algún efecto a las esferas de alginato, se hizo una prueba a nivel macro, dejando esferas de alginato cálcico agitando en acetona durante 30 minutos, se puede observar en el anexo 7.7, Ilustración 83, que no sucede nada.

#### 4.2.5. Preparación de microesferas core shell

Al no poder reproducir en escala micrométrica las esferas del tipo blenda, es que se decide utilizar esta metodología, Ilustración 36, para obtener esferas que tengan propiedades parecidas a las blendas, pero capaces de producirse en microcanales.



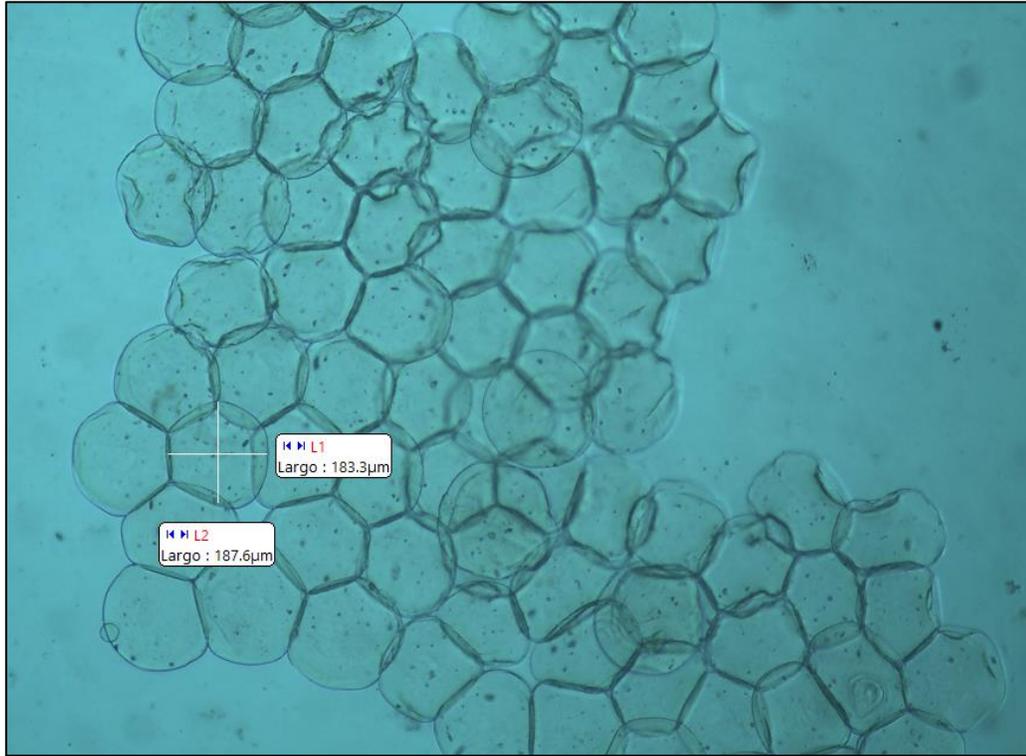
*Ilustración 69: Esferas core shell en solución de quitosano con CaCl<sub>2</sub>*

A pesar de obtener un buen resultado, ver Ilustración 69, las esferas continuaron estando unidas.

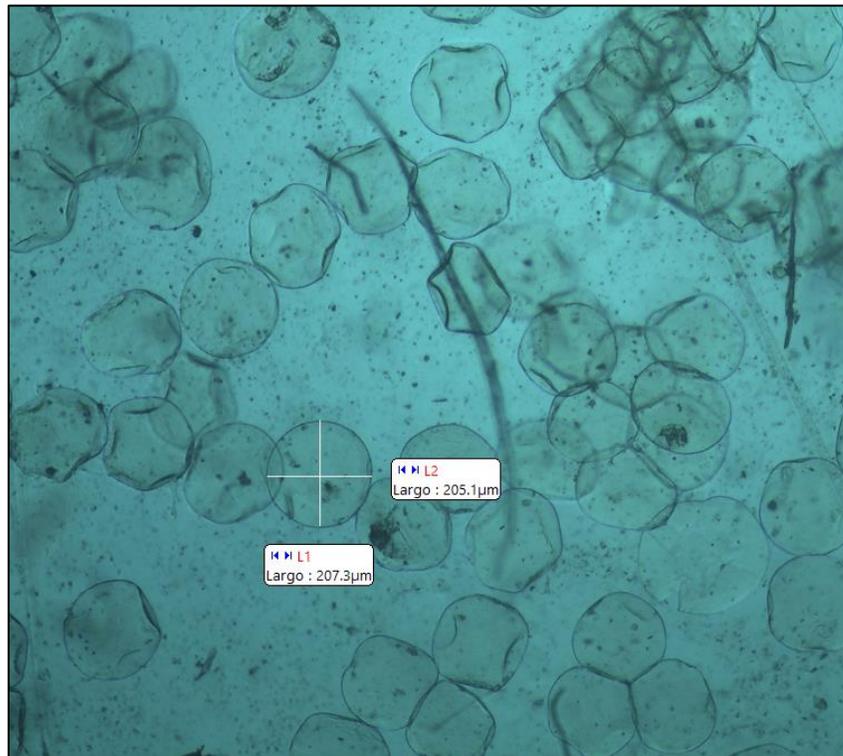
Se consideró que el problema podría solucionarse utilizando surfactante, en trabajos previos en el laboratorio de microfluídica, se utilizó surfactante span 80 (Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,05% en la solución de alginato, al igual que en el artículo de Capretto et al. [26], los resultados se pueden observar en la Ilustración 70. Las microesferas resultantes tienen un diámetro aproximado de 180 [μm] y se ven parecidas a las obtenidas sin surfactante.

Finalmente, se decidió esperar 7 días para agitar las esferas core shell que se mantuvieron en la solución de quitosano con CaCl<sub>2</sub>, y así observar si estas se separaban. Las figuras muestran que las esferas se lograron separar casi en su totalidad, salvo por pequeños grupos, ver anexo 7.8, Ilustración 84. El diámetro aproximado de las microesferas obtenido finalmente fue del orden de los 200 [μm], Ilustración 71.

Una vez que se obtuvieron estos resultados, fue necesario producir esferas core shell a escala milimétrica para obtener resultados comparables con los otros tipos de esferas y de esta manera obtener conclusiones.



*Ilustración 70: Microesferas core shell con surfactante a una concentración de 0,05%*



*Ilustración 71: Diámetro de las microesferas core shell luego de agitación*

## 5. CONCLUSIONES

Se logra obtener tres metodologías para la generación de hidrogeles de mezclas de biopolímeros, en este caso de alginato y quitosano. Una para esferas denominadas recubiertas, otra para esferas denominadas blendas y otra para esferas denominadas core shell. Las esferas recubiertas tienen un núcleo de alginato reticulado con iones  $\text{Ca}^{+2}$  y están cubiertas por una capa de quitosano. Mientras que las blendas son esferas de alginato gelificadas con quitosano y iones  $\text{Ca}^{+2}$  y las core shell son esferas blendas con una membrana de quitosano que las recubre.

Los ensayos con PBS, donde se midió el cambio en el diámetro de las esferas en el tiempo permiten concluir que las esferas del tipo blenda son capaces de mantenerse estables por más de 27 días, mientras que las de alginato puro y las recubiertas no.

Por otro lado, el análisis termogravimétrico (TGA) realizado a las esferas permite concluir que las más estables a altas temperaturas son las esferas del tipo blenda, las cuales permanecieron con la mayor cantidad de masa, 0,22 [mg] (5% de su masa inicial) a los 600°C, además de ir degradándose de manera mucho más lenta que las esferas de alginato cálcico y recubiertas, las cuales llegan a 2,2% y 0,25% de su masa inicial respectivamente.

Se implementa un ensayo para obtener las propiedades mecánicas de las esferas, que permitió inferir que, al dejar las esferas en tres medios diferentes: agua destilada,  $\text{CaCl}_2$  y PBS, las esferas blendas son siendo las que tienen las mejores propiedades, pues en todos los ensayos se obtiene más del 80% de las esferas intactas. Esto es debido a que los polímeros alginato de sodio y quitosano tienen una fuerte afinidad, al entrar en contacto se produce una reacción iónica entre el grupo catiónico ( $-\text{NH}_3^+$ ) del quitosano y el grupo aniónico ( $-\text{COO}^-$ ) del alginato de sodio. Por otro lado, el quitosano entorpece la liberación de los iones  $\text{Ca}^{+2}$  que tienen las esferas del tipo blenda, lo que dificulta su degradación y simultáneamente, hace a la esfera más flexible

Se concluye que las esferas tipo blenda son potencialmente las más adecuadas para su uso en terapia de embolización hepática para tumores de hígado ya que, presentan estabilidad térmica hasta los 280°C y además sus propiedades mecánicas le permiten soportar una carga de 500 [N] incluso luego de 10 días, sumado a su red flexible que permitiría soportar una diferencia de presión sin degradarse.

Se logra producir esferas de hidrogeles de mezcla de polímeros estables a escala milimétrica, sin embargo, los resultados obtenidos no son posibles de reproducir en microfluídica, a pesar de los cambios implementados que permiten solucionar los problemas de fases. Es por ello que se resuelve generar esferas core shell, las cuales también se obtienen a partir de los polímeros alginato y quitosano.

Las propiedades mecánicas de las esferas core shell en PBS, indican similitud con las esferas del tipo blenda, esto confirma el hecho de que a pesar de que las esferas tienen una capa de quitosano que las cubre, su centro de alginato está gelificado con quitosano y iones

Ca<sup>+2</sup>. Esto permitiría concluir que las propiedades tanto de estabilidad en el tiempo, degradación por temperatura y propiedades mecánicas, también serían similares a las obtenidas para las esferas blanda.

Por lo anterior, las microesferas core shell realizadas en este trabajo, son potencialmente aptas para la terapia de embolización hepática.

# GLOSARIO

---

## **C**

capilar

Los capilares sanguíneos son los vasos sanguíneos de menor diámetro. · 12

carcinoma

Tumor maligno que se forma a partir del tejido epitelial de los órganos. · 11

---

## **E**

endotelial

endotelio es un tejido que recubre la zona interna de todos los vasos sanguíneos. · 12

excipiente

Sustancia que se mezcla con los medicamentos para darles consistencia, forma, sabor u otras cualidades que faciliten su uso.  
· 19

---

## **F**

fístulas arteriovenosas

este término se utiliza en medicina para designar una conexión anormal entre una arteria y una vena. · 12

---

## **H**

hepatocarcinoma

es el tumor primario del hígado más frecuente, que deriva en cáncer de hígado · 11

hepatólogos

La hepatología es una rama de la gastroenterología que se ocupa del estudio del hígado y sus enfermedades. · 11

histológicos

Histología, Parte de la biología que estudia la composición, la estructura y las características de los tejidos orgánicos de los seres vivos. · 13

---

## **I**

intrincado plexo

red formada por nervios o vasos sanguíneos que se cruzan entre sí. · 12

---

## **M**

metastásico

Reproducción o extensión de una enfermedad o de un tumor a otra parte del cuerpo. · 11

---

## **N**

neoplasias

Formación anormal en alguna parte del cuerpo de un tejido nuevo de carácter tumoral, benigno o maligno. · 11

neuroendocrinos

Relacionado al sistema nervioso y las glándulas endocrinas. · 11

---

## **O**

oncólogos

La oncología es la especialidad médica que estudia y trata las neoplasias · 11

---

## **P**

parénquima hepático

componente funcional del hígado compuesto por los hepatocitos que filtran la sangre para eliminar las toxinas. · 11

---

## **Q**

quelantes

Que tiene la propiedad de combinarse con iones positivos bivalentes y trivalentes, formando complejos estables · 20

quimioterapia

La quimioterapia es el uso de fármacos para destruir las células cancerosas · 10

---

## **R**

radiología intervencionista

subespecialidad de la radiología en la que se utilizan técnicas de imagen para ejecutar procedimientos mínimamente invasivos. · 10

radiopaco

Todo cuerpo que ofrece resistencia a ser atravesado por los rayos X y es visible en la radiografía como una zona blanca · 17

---

## **V**

vascular

Relativo a los vasos o los conductos por los que circula la sangre. · 12

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] OMS, «International Agency for Research for Cancer, Global Cáncer Report,» 2014. [En línea]. [Último acceso: 02 Agosto 2016].
- [2] A. C. Society, «Quimioterapia para el cáncer de hígado,» 24 Mayo 2016. [En línea]. Available: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-higado/tratamiento/quimioterapia.html>. [Último acceso: 19 Febrero 2017].
- [3] J. Kritzinger, D. Klass, S. Hoa, H. Lim, A. Buczkowski, E. Yoshida, D. Liu, «Review: Hepatic embolotherapy in interventional oncology.,» *Clinical Radiology*, vol. 68, pp. 1-15, 2013.
- [4] Lien W, Ackerman N., «The blood supply of experimental liver metastases. II. A microcirculatory study of the normal and tumor vessels of the liver with the use of perfused silicone rubber.,» *Surgery*, vol. 68, pp. 334-40, 1970.
- [5] Mary A. Maluccio, Anne M. Covey, Leah Ben Porat, Joanna Schubert, Lynn A. Brody, Constantinos T. Sofocleous, George I. Getrajdman, William Jarnagin, Ronald DeMatteo, Leslie H. Blumgart, Yuman Fong, Karen T. Brown., «Transcatheter Arterial Embolization with Only Particles for the Treatment of Unresectable Hepatocellular Carcinoma,» *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 19, pp. 862-869, 2008.
- [6] Timothy A. Becker, Daryl R. Kipke, Tedd Brandon, «Calcium alginate gel: A biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization,» *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 54, pp. 76-86, 2001.
- [7] U. D. o. H. a. H. Services., «U.S Food and Drug Administration, Alginate.,» [En línea]. Available: <https://www.fda.gov/>. [Último acceso: 02 Agosto 2016].
- [8] Richard E. J. Forster, Frank Thurmer, Christine Wallrapp, Andrew W. Lloyd, Wendy Macfarlane, Gary J. Phillips, Jean-Pierre Boutrand, Andrew L. Lewis., «Characterisation of physico-mechanical properties and degradation potential of calcium alginate beads for use in embolisation.,» *Mater Med.*, vol. 21, pp. 2243-2251, 2010.
- [9] Haroldo Yukio Kawaguti, Hélia Harumi Sato, «Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana,» *Química Nova*, vol. 31, n° 1, pp. 134-143, 2008.
- [10] Golzarian J, Sun S, Sharafuddin MJ., *Vascular embolotherapy: a comprehensive approach. Medical radiology, Diagnostic imaging*, Berlin: Springer, 2006.

- [11] Anil K. Anal, Willem F. Stevens, «Chitosan–alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 290, pp. 45-54, 2005.
- [12] Andrés Sánchez B, María Sibaja B, José Vega-Baudrit, Sergio Madrigal C, «SINTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HIDROGELES DE QUITOSANO OBTENIDO A PARTIR DEL CAMARÓN LANGOSTINO (Pleuroncodes planipes) CON POTENCIALES APLICACIONES BIOMEDICAS,» *Revista iberoamericana de Polímeros*, vol. 8, n° 4, pp. 241-267, 2007.
- [13] Olav Gaserod, Andrea Sannes, Gudmund Skjak-Bræk, «Microcapsules of alginate–chitosan. II. A study of capsule stability and permeability,» *Biomaterials*, vol. 20, p. 773–783, 1999.
- [14] Y. Murata, S. Toniwa, E. Miyamoto, S. Kawashima, «Preparation of alginate gel beads containing chitosan salt and their function,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 176, n° 2, pp. 265-268, 1999.
- [15] Yoshifumi Murata, Yukari Kontani, Hiroko Ohmae, Susumu Kawashima, «Behavior of alginate gel beads containing chitosan salt prepared with water-soluble vitamins,» *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 53, n° 2, pp. 249-251, 2002.
- [16] Takeshi Gotoh, Keiei Matsushima, Ken-Ichi Kikuchi, «Preparation of alginate–chitosan hybrid gel beads and adsorption of divalent metal ions,» *Chemosphere*, vol. 55, n° 1, pp. 135-140, 2004.
- [17] Yongmei Xu, Changyou Zhan, Lihong Fan, Le Wang, Hua Zheng, «Preparation of dual crosslinked alginate–chitosan blend gel beads and in vitro controlled release in oral site-specific drug delivery system,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 336, pp. 329-337, 2007.
- [18] George Pasparakis, Nikolaos Bouropoulos, «Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 323, pp. 34-42, 2006.
- [19] Hari P.R., Chandy Thomas, Sharma Chandra P., «Chitosan/calcium–alginate beads for oral delivery of insulin,» *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 59, n° 11, pp. 1795-1801, 1996.
- [20] Sezer A.D., Akbuga J., «Release characteristics of chitosan treated alginate beads II. Sustained release of a low molecular drug from chitosan treated alginate beads,» *Journal of Microencapsulation*, vol. 16, pp. 687-969, 1999.
- [21] M.L González-Rodríguez, M.A Holgado, C Sánchez-Lafuente, A.M Rabasco, A Fini, «Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 232, pp. 225-234, 2002.

- [22] S.K. Bajpai, Rasika Tankhiwale, «Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads: Part-1,» *Reactive & Functional Polymers*, vol. 66, pp. 645-658, 2006.
- [23] R.T. Andrews, C.A. Binkert., «Relative Rates of Blood Flow Reduction During Transcatheter Arterial Embolization with Tris-acryl Gelatin Microspheres or Polyvinyl Alcohol: Quantitative Comparison in a Swine Model.,» *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 14, pp. 1311-1316, 2003.
- [24] J.P. Pelage, A. Laurent, M. Wassef, M. Bonneau, D. Germain, R. Rymer, P. Flaud, J. Martal, J.J. Merland., «Uterine Artery Embolization in Shee: Comparison of Acute Effects with Polyvinyl Alcohol Particles and Calibrated Microspheres,» *Radiology*, vol. 224, pp. 436-445, 2002.
- [25] Dario Carugo, Lorenzo Capretto, Sean Willis, Andrew L. Lewis, David Grey, Martyn Hill, Xunli Zhang., «A microfluidic device for the characterisation of embolisation with polyvinyl alcohol beads through biomimetic bifurcations.,» *Biomed Microdevices*, vol. 14, p. 153-163, 2012.
- [26] Lorenzo Capretto, Stefania Mazzitelli, Cosimo Balestra, Azzura Tosi and Claudio Nastruzzi, «Effect of the gelation process on the production of alginate microbeads by microfluidic chip technology,» *Lab on a Chip*, vol. 8, pp. 617-621, 2008.
- [27] Chih-Hui Yang, Keng-Shiang Huang, Jia-Yaw Chang, «Manufacturing monodisperse chitosan microparticles containing ampicillin using a microchannel chip,» *Biomedical Microdevices*, vol. 9, n° 2, pp. 253-259, 2007.
- [28] E. Amici, G. Tetradis-Meris, C. Pulido de Torres, F. Jousse, «Alginate gelation in microfluidic channels,» *Food Hydrocolloids*, vol. 22, n° 1, pp. 97-104, 2008.
- [29] K. S. Huang, T. H. Lai and Y. C. Lin, «Manipulating the generation of Ca-alginate microspheres using microfluidic channels as a carrier of gold nanoparticles,» *Lab on a Chip*, vol. 6, pp. 954-957, 2006.
- [30] K. Liu, H. J. Ding, J. Liu, Y. Chen and X. Z. Zhao, «Shape-Controlled Production of Biodegradable Calcium Alginate Gel Microparticles Using a Novel Microfluidic Device,» *Langmuir*, vol. 22, n° 22, pp. 9453-9457, 2006.
- [31] Netzsch, «Termogravimetría, TG 209 F1 Libra®,» [En línea]. Available: <https://www.netzsch-thermal-analysis.com/es/productos-soluciones/termogravimetria/tg-209-f1-libra/>. [Último acceso: 27 Marzo 2017].
- [32] P. U. C. d. Chile, «CIEN-UC inaugura moderno microscopio de barrido,» [En línea]. Available: <http://quimica.uc.cl/es/noticias/975-cien-uc-inaugura-moderno-microscopio-de-barrido>. [Último acceso: 10 05 2017].
- [33] Sang-Gyun Kim, Gyun-Taek Lim, Jonggeon Jegal, Kew-Ho Lee., «Pervaporation separation of MTBE (methyl tert-butyl ether) and methanol mixtures through

- polyion complex composite membranes consisting of sodium alginate/chitosan.,» *Journal of Membrane Science*, vol. 174, pp. 1-15, 2000.
- [34] C.G.T. Neto, J.A. Giacometti, A.E. Job, F.C. Ferreira, J.L.C. Fonseca, M.R. Pereira, «Thermal Analysis of Chitosan Based Networks,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 62, pp. 97-103, 2005.
- [35] Sigma-Aldrich, «Dulbecco's Phosphate Buffered Saline. Modified, without calcium chloride and magnesium chloride, powder, suitable for cell culture,» [En línea]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Formulation/d8537for.pdf>. [Último acceso: 28 Enero 2017].
- [36] A.R. Kulkarni, K.S. Soppimath, T.M. Amminabhavi, A.M. Dave, «Polymeric sodium alginate interpenetrating network beads for the controlled release of chlorpyrifos,» *Applied Polymer*, vol. 85, pp. 911-918, 2002.
- [37] Michael R. Rasmussen, Torben Snabeb, Lars H. Pedersen, «Numerical modelling of insulin and amyloglucosidase release from swelling Ca–alginate beads,» *Journal of Controlled Release*, vol. 91, n° 3, pp. 395-405, 2003.
- [38] Cohen S., Lobel E., Trevgoda A., Peled Y., «Cohen, S., Lobel, E., Trevgoda, A., Peled, Y., 1997. A novel in-situ forming drug,» *Journal of Controlled Release delivery system from alginates undergoing gelation in the eye*, vol. 44, pp. 201-208, 1997.
- [39] Ouwerx C., Velings N., Mestdagh M.M., Axelos M.A.V, «Physicochemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations,» *Polymer Gels and Networks*, vol. 6, n° 5, pp. 393-408, 1998.

## 7. ANEXOS

### 7.1. RESULTADOS OBTENIDOS EN ANÁLISIS TG

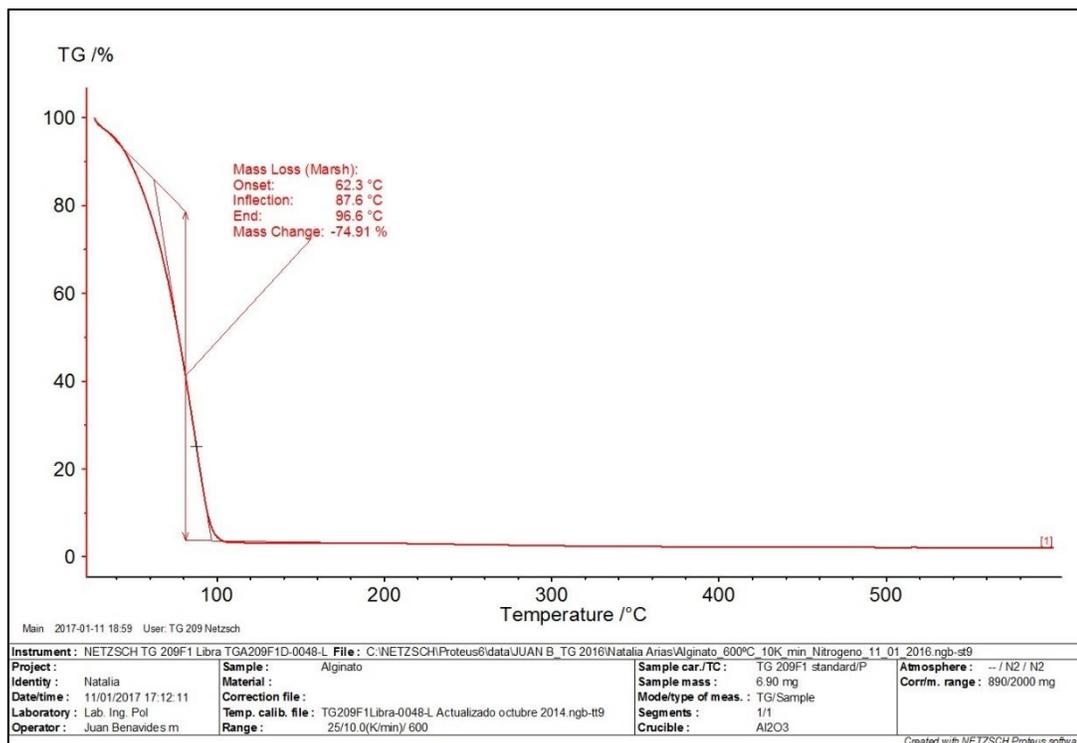


Ilustración 72: Resultados TGA obtenidos para esferas de alginato cálcico

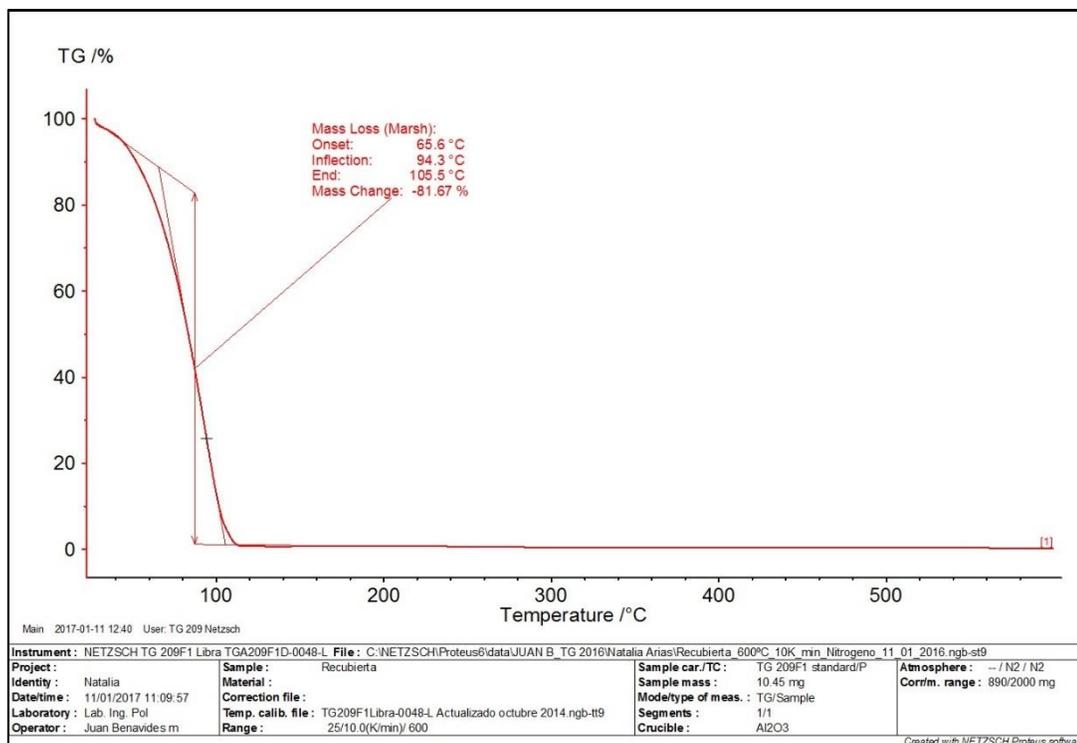


Ilustración 73: Resultados TGA obtenidos para esferas recubiertas

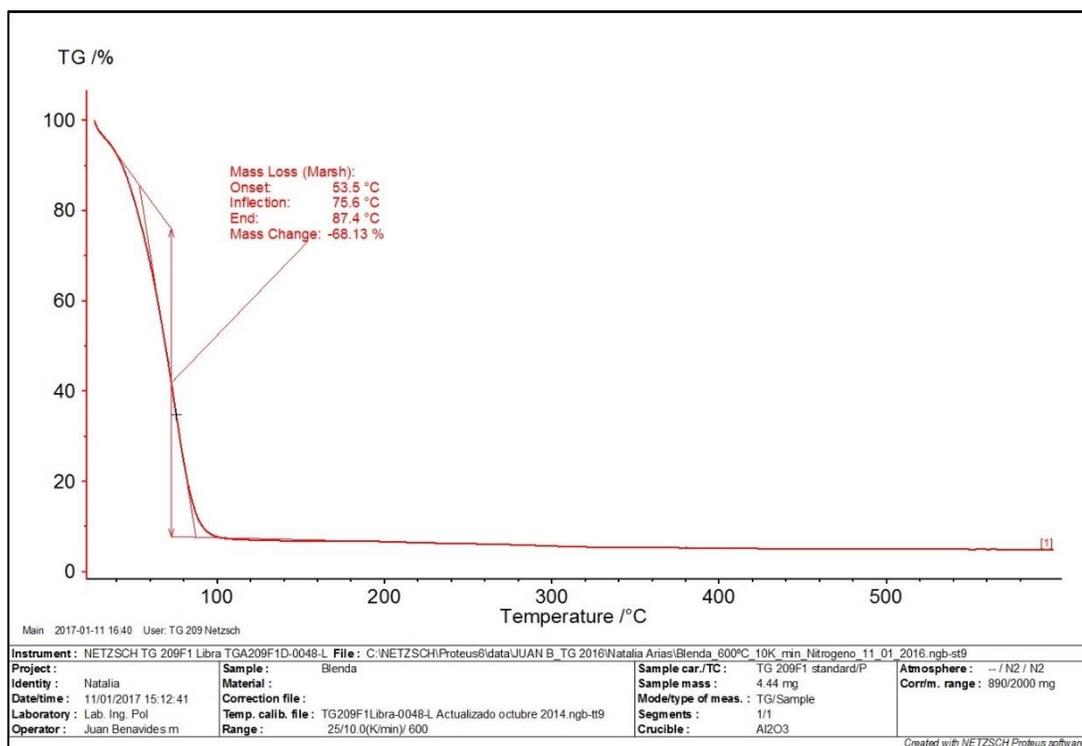


Ilustración 74: Resultados TGA obtenidos para esferas blendas

## 7.2. ENSAYO ESTABILIDAD ESFERAS EN EL TIEMPO



Ilustración 75: 3 días desde la preparación. A la izquierda esferas de alginato puro, en medio esferas recubiertas y a la derecha esferas blendas en agua destilada.



Ilustración 76: 26 días desde la preparación. A la izquierda esferas de alginato puro, en medio esferas recubiertas y a la derecha esferas blendas en agua destilada

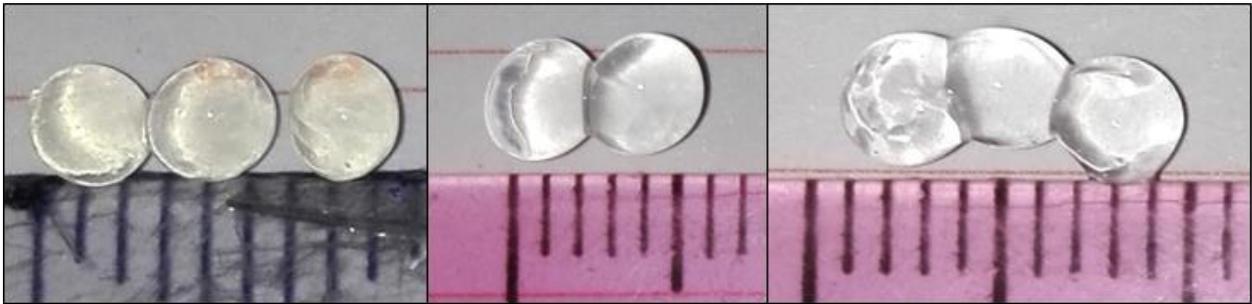


Ilustración 77: Esferas de alginato cálcico en PBS, a la izquierda a 1 día, en medio a 5 días, a la derecha a 27 días desde su preparación

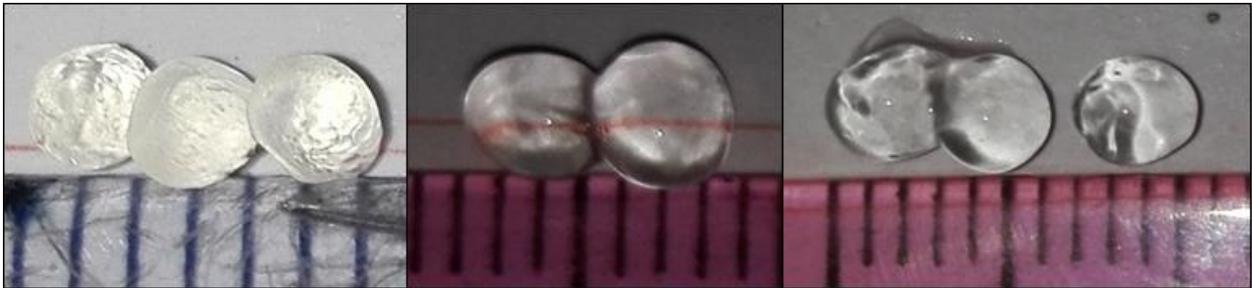


Ilustración 78: Esferas recubiertas en PBS, a la izquierda a 1 día, en medio a 5 días, a la derecha a 27 días desde su preparación

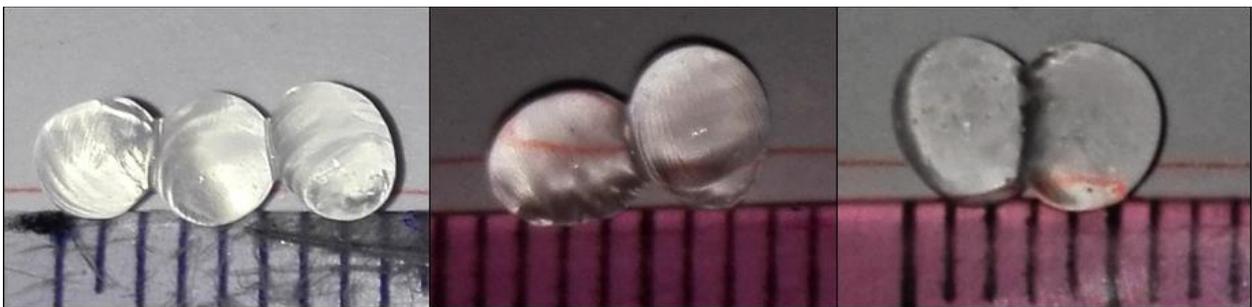


Ilustración 79: Esferas blandas en PBS, a la izquierda a 1 día, en medio a 5 días, a la derecha a 27 días desde su preparación

### 7.3. DATOS OBTENIDOS EN ENSAYO PROPIEDADES MECÁNICAS

Tabla 2: Datos obtenidos para las esferas en agua destilada luego de 3 horas

	Alginato			Recubierta			Blenda		
	A	B	Promedio	A	B	Promedio	A	B	Promedio
Esferas iniciales	291	271	281	280	216	248	239	181	210
Esferas sin romper	275	264	269,5	222	178	200	211	170	190,5
Esferas rotas	16	7	11,5	58	38	48	28	11	19,5
Porcentaje esferas rotas			4,09			19,35			9,29

Tabla 3: Datos obtenidos para las esferas en agua destilada luego de 10 días

	Alginato			Recubierta			Blenda		
	A	B	Promedio	A	B	Promedio	A	B	Promedio
Esferas iniciales	348	352	350	212	211	211,5	283	287	285
Esferas sin romper	333	338	335,5	165	66	115,5	270	251	260,5
Esferas rotas	15	14	14,5	47	145	96	13	36	24,5
Porcentaje esferas rotas			4,1			45,39			8,60

Tabla 4: Datos obtenidos para las esferas en CaCl<sub>2</sub> luego de 3 horas

	Alginato			Recubierta			Blenda		
	A	B	Promedio	A	B	Promedio	A	B	Promedio
Esferas iniciales	365	328	346,5	290	343	316,5	247	196	221,5
Esferas sin romper	326	326	326	255	302	278,5	241	189	215
Esferas rotas	39	2	20,5	35	41	38	6	7	6,5
Porcentaje esferas rotas			5,92			12,01			2,93

Tabla 5: Datos obtenidos para las esferas en CaCl<sub>2</sub> luego de 10 días

	Alginato			Recubierta			Blenda		
	A	B	Promedio	A	B	Promedio	A	B	Promedio
Esferas iniciales	270	394	332	240	247	243,5	271	281	276
Esferas sin romper	253	383	318	207	172	189,5	203	264	233,5
Esferas rotas	17	11	14	33	75	54	68	17	42,5
Porcentaje esferas rotas			4,40			28,50			18,20

Tabla 6: Datos obtenidos para las esferas en PBS luego de 3 horas

	Blenda			Core shell		
	A	B	Promedio	A	B	Promedio
Esferas iniciales	246	171	208,5	191	208	199,5
Esferas sin romper	235	108	171,5	184	203	193,5
Esferas rotas	11	63	37	7	5	6
Porcentaje esferas rotas			17,75			3,01

Tabla 7: Datos obtenidos para las esferas en PBS luego de 10 días

	Blenda			Core shell		
	A	B	Promedio	A	B	Promedio
Esferas iniciales	306	261	283,5	190	230	210
Esferas sin romper	284	188	236	181	219	200
Esferas rotas	22	73	47,5	9		10
Porcentaje esferas rotas			16,75			4,76

#### 7.4. OBTENCIÓN DEL MODELO DE MICROCANAL



Ilustración 80: Modelo grabado en placa de silicio

#### 7.5. MICROESFERAS DE ALGINATO CÁLCICO CON MAYOR CONCENTRACIÓN DE $\text{CaCl}_2$ EN SOLUCIÓN ENTRECruzANTE

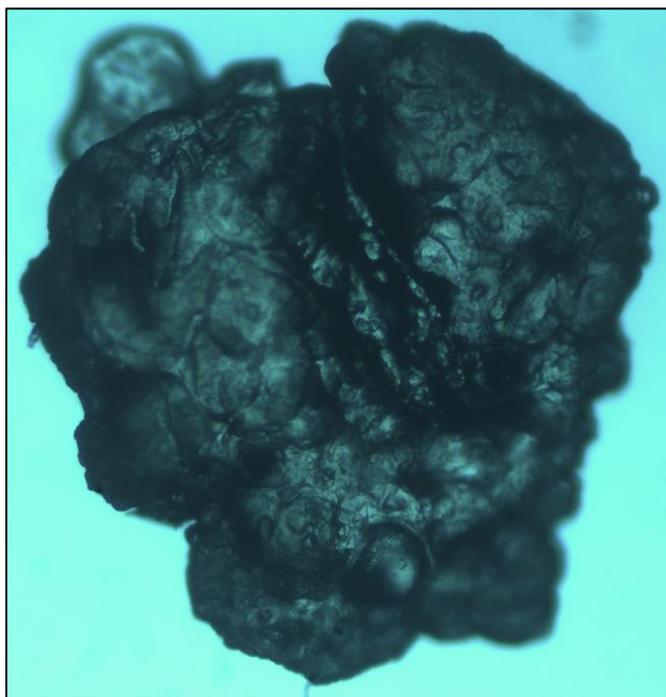


Ilustración 81: Microesferas de alginato cálcico dejadas caer por gravedad en una solución entrecruzante al 3% de  $\text{CaCl}_2$  (p/v)

## 7.6. QUITOSANO EN ALCOHOL ISOAMÍLICO



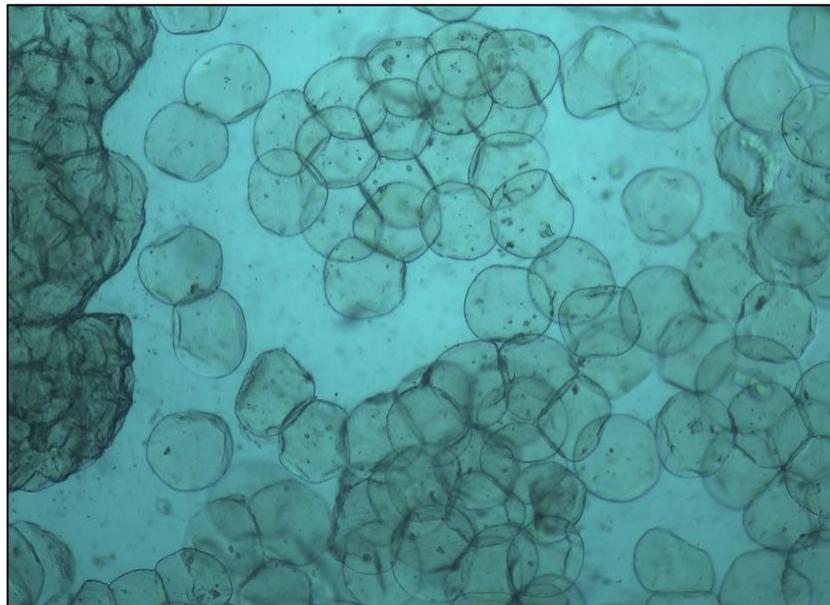
*Ilustración 82: Prueba disolución de quitosano en alcohol isoamílico*

## 7.7. ESFERAS DE ALGINATO CÁLCICO EN ACETONA



*Ilustración 83: Esferas milimétricas de alginato cálcico en acetona*

## 7.8. MICROESFERAS CORE SHELL



*Ilustración 84: Microesferas core shell, luego de 7 días en solución de quitosano con  $\text{CaCl}_2$  y posteriormente agitadas*