

## 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 <sub>2</sub> 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