



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Microencapsulación de células mediante tecnología de
microfluídos para su aplicación en biomedicina

*Cells microencapsulation using microfluidic technology for
application in biomedicine*

Autor

Leyre Pueyo Borbón

Director/es

Víctor Sebastián Cabeza

Manuel Arruebo Gordo

Escuela de Ingeniería y Arquitectura / Universidad de Zaragoza

2018-2019

TÍTULO: Microencapsulación de células mediante tecnología de microfluídos para su aplicación en biomedicina.

RESUMEN

La encapsulación celular permite crear vectores terapéuticos para tratar diferentes patologías, como la diabetes, el Alzheimer o múltiples tipos de cáncer mediante la liberación controlada de materiales terapéuticos. Estos vectores se basan en unas microcápsulas que permiten almacenar células, favorecer el intercambio de nutrientes y evitar ser reconocidas y eliminadas por el sistema inmune. El uso de hidrogeles en aplicaciones biomédicas ha supuesto un avance ya que estos polímeros otorgan muy buenas propiedades en cuanto a biocompatibilidad y son capaces de absorber, retener y liberar materiales de forma muy controlada. Uno de los materiales más usados es el alginato de sodio, el cual, al entrar en contacto con un catión divalente, como el calcio, produce un fenómeno físico llamado reticulación encapsulando moléculas/células de interés en su interior. Por otro lado, la tecnología de microfluídos permite la formación de microcápsulas con un mayor control del tamaño y morfología y de manera rápida y simple comparada con la síntesis tradicional. El uso de sistemas de flujo en continuo para la encapsulación celular mediante tecnología microfluídica favorece que la carga a encapsular sea más controlada, obtener mayor reproducibilidad en los ensayos y la utilización de pequeñas cantidades de materiales, así como de un menor número de etapas de purificación. La investigación llevada a cabo en este trabajo se basa en tres fases: realizar una síntesis controlada mediante tecnología de microfluídos en continuo con los parámetros óptimos considerados, realizar un estudio de permeabilidad de las microcápsulas para analizar qué tamaños de metabolitos se pueden encapsular en su interior y llevar a cabo un experimento de citotoxicidad inicial para una posterior encapsulación celular.

Palabras clave: células; microfluídica; biomedicina; hidrogel; alginato; microcápsulas; permeabilidad; síntesis; encapsulación.

ABREVIACIONES

-OH: ión hidróxido

-COOH: ácido carboxílico

-CONH₂: grupo amida

-CONH: grupo amida

-SO₃H: ácido sulfónico

Ca²⁺: ión Calcio

Ba²⁺: ión Bario

Cl⁻: ión Cloruro

Pt: platino

CaCl₂: cloruro cálcico

AuNP: nanopartículas de oro

PVP: polivinilpirrolidona

FITC-Dextrano: Isotiocianato de fluoresceína - dextrano

DMEM: *Dulbecco modified Eagles minimal essential medium* (medio de cultivo celular)

Alg: alginato

PTFE: politetrafluoroetileno

PEEK: polieteretercetona

ANOVA: Analysis of variance

Rpm: revoluciones por minuto

kDa: kiloDaltons

g/mol: gramos por mol (peso molecular)

% w/w: concentración tanto por ciento en peso

% v/v: concentración tanto por ciento en volumen

[...]: concentración

M: molar

mM: milimolar

Cryo-SEM: criogenización-microscopía electrónica de barrido

UV-Vis: Ultravioleta visible

EDS: espectroscopia de rayos X

A-: agitación

PLGA: ácido poliláctico-glicólico

PLA: ácido poliláctico

PGA: ácido poliglicólico

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABREVIACIONES	2
ÍNDICE.....	3
OBJETIVOS	5
INTRODUCCIÓN	6
PARTE EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS	10
1. Materiales	10
2. Síntesis de microcápsulas.....	10
2.1. Sistemas de flujo para la formación de microcápsulas en continuo.....	11
2.2. Estudio de los parámetros de síntesis que permiten la producción controlada de microcápsulas.....	14
2.2.1. Efecto de las dimensiones de los capilares en el tamaño de las microcápsulas	14
2.2.2. Efecto del surfactante en el tamaño de las microcápsulas.....	15
2.2.3. Efecto de la agitación en el tamaño de las microcápsulas.....	15
2.2.4. Efecto de la altura entre la salida de la gota y la superficie de gelificación en el tamaño de las microcápsulas	15
3. Estudio de la permeabilidad de las microcápsulas	16
4. Ensayo de citotoxicidad celular en las microcápsulas.....	19
5. Técnicas de caracterización.....	20
RESULTADOS	22
1. Resultados de los sistemas de flujo para la formación de microcápsulas en continuo..	22
2. Resultados de los parámetros de síntesis que permiten la producción controlada de microcápsulas.....	26
2.1. Parámetros influyentes en la síntesis controlada de microcápsulas	26
2.2. Parámetros optimizados para la síntesis controlada de microcápsulas	28
3. Resultados del estudio de permeabilidad de las microcápsulas.....	29
4. Imágenes del Cryo-SEM para el análisis de la estructura interna y permeabilidad de las microcápsulas.....	35
5. Resultados del ensayo de citotoxicidad celular de las microcápsulas	38
DISCUSIÓN.....	40
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXOS	47

SECCIÓN 1. Características de los sistemas de flujo empleados en cada prueba.....	47
SECCIÓN 2. Composición de las corrientes de los sistemas de flujo.....	49
SECCIÓN 3. Cálculos ratio alginato-CaCl ₂ para el sistema 2_2.....	53
SECCIÓN 4. Tamaños de las microcápsulas obtenidos de los posibles parámetros influyentes	54
SECCIÓN 5. Resultados del test ANOVA.....	57
SECCIÓN 6. Ejemplos de rectas de calibrado para el cálculo de la concentración de FITC- Dextrano y FITC-Albúmina liberada al medio	59
SECCIÓN 7. Tabla de tamaños de las moléculas dependiendo del peso molecular	60

OBJETIVOS

Desde hace varias décadas, se han producido numerosos avances científicos en técnicas terapéuticas basadas en la utilización de diferentes metabolitos y fármacos que pueden aplicarse en un amplio rango de enfermedades.

Una de las aplicaciones con gran interés terapéutico es la de sintetizar microcápsulas que actúen como vehículos en el interior del cuerpo y liberen su contenido terapéutico en el foco de la patología [1], [2]. Si el material terapéutico encapsulado es un fármaco, se necesita una membrana en muchos casos no porosa, pero en el caso de las células, se necesita una membrana porosa que permita el intercambio de O_2/CO_2 y nutrientes, y al mismo tiempo que evite que las inmunoglobulinas del sistema inmune entren, las reconozcan y puedan ser eliminadas.

Para ello se utilizan materiales poliméricos llamados hidrogeles, los cuales tienen muy buena biocompatibilidad y excelentes propiedades para absorber, retener y liberar el material encapsulado. Comparado con la síntesis tradicional en reactores discontinuos, un método para garantizar un control más preciso del tamaño, morfología, carga a encapsular y que se sintetice de forma rápida y simple, es por tecnología de microfluidos [3], la cual se usa para la encapsulación celular.

La actual investigación se ha realizado en el Instituto de Nanociencia de Aragón (INA) y en el Centro de Investigación Biomédica y Aragón (CIBA), y se ha enmarcado dentro del proyecto de investigación UZCUD2018-TEC-10: Diseño y desarrollo de microsistemas avanzados para la optimización del proceso de microencapsulación de células. El trabajo fin de Máster se fundamenta en tres fases principales, cuyos objetivos son:

- Sintetizar microcápsulas de alginato por medio de tecnología de microfluidos en continuo. Para ello se analizará la composición de las microcápsulas, diferentes sistemas de flujo para realizar la síntesis, técnicas de caracterización por microscopía para estudiar la estructura interna y optimización de los parámetros más influyentes para obtener unas características óptimas de las microcápsulas, es decir, menor tamaño posible y morfología homogénea y uniforme durante toda la síntesis.
- Estudio de la permeabilidad de las microcápsulas. Debido a la necesidad de las células de intercambiar nutrientes con el exterior, así como de llevar a cabo las funciones terapéuticas, se necesita analizar la estructura interna de estas microcápsulas, así como la porosidad que presentan.
- Realizar un ensayo de encapsulación celular, que es la aplicación final. Previamente se realizará un ensayo de citotoxicidad del material utilizado para la síntesis para comprobar el grado de toxicidad de sus materiales constituyentes una vez que se ponen en contacto con las células.

INTRODUCCIÓN

El uso de hidrogeles en medicina ha supuesto un potente impulso en diversas aplicaciones: ingeniería de tejidos [4], regeneración de órganos [5] o liberación controlada de fármacos [6], las cuales permiten llevar a cabo procesos terapéuticos más efectivos y con menos efectos secundarios que algunas terapias convencionales, como la quimioterapia. También han destacado en otras aplicaciones como en la industria alimentaria con las esferificaciones, o en sectores medioambientales y de agricultura, en la que los hidrogeles se usan para mejorar la humedad de los cultivos o controlar escapes y vertidos tóxicos [7]. Los hidrogeles son materiales poliméricos con forma tridimensional que presentan la capacidad de absorber grandes cantidades de agua. Entre sus principales características químicas destacan su insolubilidad en agua y su carácter hidrófilo, debido a la presencia de grupos solubles en agua (-OH, -COOH, -CONH₂, -CONH, SO₃H) [8]. Algunos de los hidrogeles son materiales muy apropiados en medicina dada su buena interacción con tejidos vivos, ya que constan de buenas propiedades de biocompatibilidad, son materiales inertes y permiten absorber, retener y liberar diferentes moléculas contenidas en su interior de manera muy controlada [9].

Uno de los materiales más utilizados es el alginato sódico, un biopolímero biodegradable, biocompatible y con bajo coste de producción. El alginato es un polímero glicosídico formado por monosacáridos D-manurónico y L-gulurónico, el cual lo producen algas marinas y algunas bacterias. Las algas producen el ácido manurónico, que finalmente se transforma en ácido gulurónico, dando lugar a cadenas que contienen tramos de ácido gulurónico, otras con tramos de ácido manurónico, o bien tramos intercalados con ambos monosacáridos [10], [11], como se muestra en la ilustración 1. Los hidrogeles que tienen mayor contenido en ácido gulurónico, presentan mejores propiedades en cuanto a resistencia y rigidez que los que tienen mayor contenido en ácido manurónico [12].

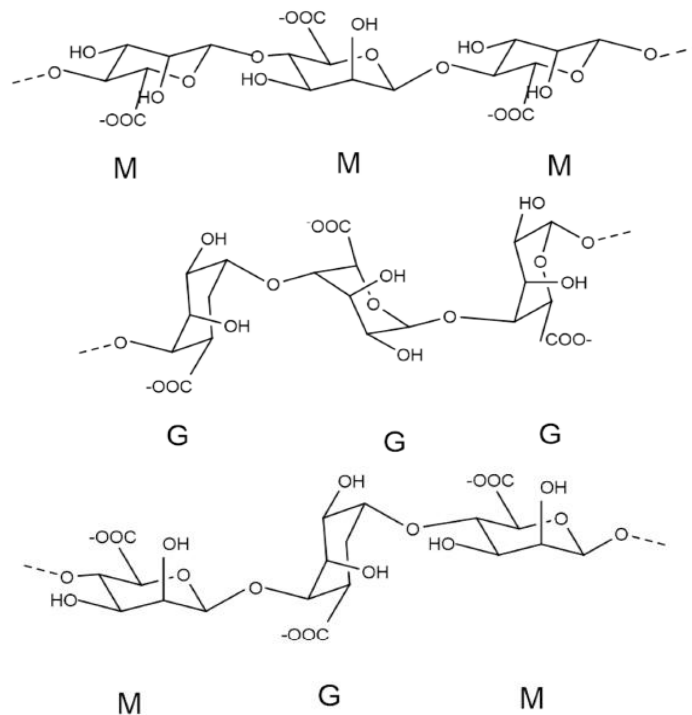


Ilustración 1. Estructura de los bloques de alginato [13]. M = monosacárido manurónico; G = monosacárido gulurónico.

Una forma eficiente de sintetizar hidrogeles de alginato es poner en contacto la fase acuosa del alginato con una solución iónica de cationes divalentes, como el calcio, de forma que se cree una estructura reticulada en la que los iones calcio (Ca^{2+}), se sitúan entre las cadenas del polisacárido, como se muestra en la ilustración 2. Esta estructura reticulada es muy similar a la matriz extracelular de los tejidos. La reticulación o *cross-linking* (en inglés) hace referencia a un proceso físico en el que los polímeros forman cadenas tridimensionales y que, en consecuencia, las propiedades de los polímeros se modifican. Algunas de las ventajas en cuanto a la producción de hidrogeles de alginato son:

- La reticulación es relativamente rápida.
- El alginato sódico es barato y fácil de obtener.
- Los hidrogeles de alginato se eliminan fácilmente y de manera enzimática en el cuerpo humano.
- La síntesis puede realizarse a temperatura ambiente y mediante un procedimiento sencillo. Lo cual es interesante para su aplicación en el campo de la biomedicina [14].

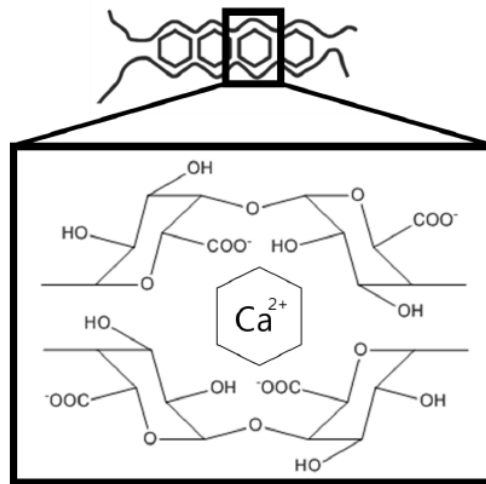


Ilustración 2. Estructura molecular de la reticulación del alginato al entrar en contacto con el Ca^{2+} [15].

La encapsulación de células tiene gran interés en cuanto a aplicaciones como terapia oncológica, ingeniería de tejidos, enfermedades con déficit de proteínas u hormonas, etc. [1]. Uno de los trabajos pioneros en la encapsulación celular fue el de Lim et al. en 1980 [16] en el que se demostró que dicha aplicación era efectiva mediante el uso de microcápsulas de alginato cálcico. En esa investigación se consiguió encapsular islotes pancreáticos en ratas que sufrían diabetes. La técnica de encapsular células en microcápsulas de alginato permite tratar el problema de forma localizada y reducir posibles efectos secundarios en el paciente. Los hidrogeles de alginato otorgan excelentes propiedades para la encapsulación:

- El método de fabricación es relativamente simple.
- Permite un mayor control de la forma y tamaño de las microcápsulas.
- La porosidad que presentan favorece tanto la encapsulación como llevar a cabo una liberación muy controlada, normalmente basada en un proceso de difusión, un proceso químico o bajo algún estímulo.
- Se evita que el sistema inmunitario reconozca las células encapsuladas en su interior como un agente extraño y pueda eliminarlas, mientras mantienen el efecto de

permeación con las biomoléculas terapéuticas o de señalización. Desde hace décadas existen diferentes investigaciones que se centran en la viabilidad de la encapsulación de células sin provocar reacciones del sistema inmune para tratar enfermedades como la anemia [17], enanismo [18] o diabetes [16].

Desde hace años, ha aumentado el interés por el desarrollo de herramientas para controlar la manipulación de los fluidos en la microescala. La microfluídica es una tecnología que utiliza dispositivos con dimensiones submilimétricas con volúmenes del orden de los microlitros (e incluso de los picolitros) y que permite obtener ventajas frente a los procesos donde los fluidos se controlan a una escala milimétrica o superior, como mayor portabilidad, mayor control de la cantidad de material o menor tiempo de residencia en los dispositivos [19]. Comparada con la síntesis tradicional discontinua, las propiedades más relevantes son: alta reproducibilidad, mayor control del flujo, alta velocidad de producción, menos cantidad de material para la síntesis y composición homogénea [3]. Esta tecnología multidisciplinar permite ser aplicada en diferentes campos biomédicos, desde chips para diagnóstico hasta liberación de fármacos [20].

La formación de gotas en continuo es una aplicación de la microfluídica la cual permite obtener un control muy preciso del tamaño de la gota y en la dosis encapsulada en su interior. Se puede clasificar gelificación externa o interna [14]:

- La gelificación externa es uno de los métodos más utilizados y se basa en el método de difusión. Consiste en favorecer la interacción entre gotas de la disolución de alginato con una disolución que contiene cationes divalentes (como el Ca^{2+} , Ba^{2+}) para que mediante un proceso de difusión se favorezca el intercambio de los cationes monovalentes por los divalentes. Con este método, la reticulación se produce desde la superficie de las gotas hacia el interior.
- En la gelificación interna, este efecto se produce de forma inversa, desde el centro de la gota de alginato hasta la superficie. El proceso consiste en liberar de forma controlada el ion divalente desde una disolución de sal de Ca^{2+} o Ba^{2+} dispersa en una disolución de alginato de sodio [15].

También existen otros métodos de gelificación, aunque son menos usados: gelificación por frío [21], inversa [22] y multicapa [23]. Cada uno de los mecanismos aporta propiedades específicas al hidrogel como diferentes densidades, morfología o difusividad.

- La gelificación por frío consiste en que los polímeros forman un gel al disminuir la temperatura. Este método se basa en la hipótesis de que la gelificación no se produce a altas temperaturas sino cuando la solución se enfría. A altas temperaturas el alginato está distribuido libremente, por lo que al bajar la temperatura se produce la reticulación.
- La gelificación inversa consiste en agregar gota a gota una solución que contiene los cationes divalentes (Ca^{2+}) en una disolución de alginato. Al precipitar se produce la reticulación. En el caso de la gelificación externa, lo que se agrega gota a gota es el alginato, que precipita en la disolución con iones divalentes, siendo lo contrario a lo que se realiza en la gelificación inversa.
- Gelificación por multicapa, que consiste en la repetición del proceso de gelificación externa hasta conseguir un número deseado de capas en el producto final [15].

En el presente proyecto se realiza un estudio de las propiedades de los materiales empleados para la fabricación de las microcápsulas (morfología, tamaño, biocompatibilidad), así como de diferentes sistemas de flujo basados en tecnología de microfluidos con el fin de alcanzar las mejores características para la síntesis. La formación de microgotas en continuo con sistemas de microfluidos permite obtener un mayor control del flujo, de homogeneidad en el material y del tamaño y morfología de las microcápsulas [24]. Por otro lado, se realizará un estudio de permeabilidad para analizar la estructura interna de las microcápsulas y su porosidad. Finalmente se llevará a cabo un ensayo de citotoxicidad con células cancerígenas para comprobar la viabilidad de las microcápsulas, para posteriormente realizar la encapsulación de células modelo.

PARTE EXPERIMENTAL: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

Material	Fórmula química	Marca comercial
Alginato de sodio	$(C_6H_7O_6Na)_n$	Sigma-Aldrich®
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	CaCl ₂	Sigma-Aldrich®
Tween 20	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	Sigma-Aldrich®
Tween 80	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₂₆	Sigma-Aldrich®
Polivinilpirrolidona (10.000 g/mol)	$(C_6H_9NO)_n$	Sigma-Aldrich®
L-Lisina	H ₂ N(CH ₂) ₄ CH(NH ₂)CO ₂ H	Sigma-Aldrich®
Isotiocianato de fluoresceína – dextrano (4.000 kDa)	-	Sigma-Aldrich®
Isotiocianato de fluoresceína – dextrano (150.000 kDa)	-	Sigma-Aldrich®
Isotiocianato de fluoresceína – dextrano (500.000 kDa)	-	Sigma-Aldrich®
Isotiocianato de fluoresceína – Albúmina (69.894 kDa)	-	Sigma-Aldrich®
Nanopartículas de oro (AuNP)	-	-
Ácido poliláctico-glicólico (PLGA)	$[C_3H_4O_2]_x[C_2H_2O_2]_y$	Sigma-Aldrich®
DMEM (Dulbecco modified Eagles medium)	-	Lonza®
Perfluorodecalina	C ₁₀ F ₁₈	Sigma-Aldrich®
Azul de metileno hidratado	C ₁₆ H ₁₈ ClN ₃ S · xH ₂ O	Sigma-Aldrich®

Tabla 1. Resumen de los materiales utilizados en la investigación junto con su fórmula química y marca del producto.

2. Síntesis de microcápsulas

La elección del método de producción de microcápsulas depende de las características que se quieran reproducir como tamaño, propiedades físicas o químicas, aplicación final, mecanismos de liberación o coste de producción [25]. Los métodos más utilizados para la síntesis de hidrogeles son los siguientes:

- Gelificación: consiste en la asociación de un polímero disuelto en un medio disperso en el que se produce la reticulación [26]. La gelificación se ve influenciada por la difusión, en la que los iones penetran en la disolución polimérica, o por temperatura, cuyo valor dependerá en función del tipo de polímero.
- Emulsión: es la mezcla de dos líquidos inmiscibles de los cuales uno está dispersado en pequeñas gotas en el otro líquido que forma la fase continua. Cuando son gotas de un aceite en una fase acuosa, se denomina emulsión *oil-in-water (O/W)*, mientras que cuando un sistema presenta gotas de agua en una fase oleosa, se denomina *water-in-oil (W/O)* [25].
- Extrusión: este método consiste en inyectar un fluido para formar microgotas que se recogerán en una disolución en la que se produzca la gelificación [27].
- *Spray* en seco: consiste en la transformación de un fluido en partículas mediante un medio seco o caliente. Presenta la ventaja de que el disolvente se evapora de las gotas muy rápido, por lo que es un método muy empleado en encapsulación celular [28].

En esta sección se presentan, por una parte, los diferentes sistemas de flujo de microfluídica que se han diseñado con el objetivo de sintetizar hidrogeles de alginato cálcico con forma esférica mediante una técnica de flujo en continuo, por goteo y gelificación externa, y, por otra parte, la mejora de la síntesis de estas microcápsulas para reproducir las mejores características: menor tamaño posible, morfología esférica, uniforme y homogénea durante toda la síntesis.

2.1. Sistemas de flujo para la formación de microcápsulas en continuo

Los sistemas de flujo de microfluídica se basan en el ensamblado de capilares de diferentes dimensiones por los que se inyectan fluidos con diferente caudal mediante el uso de bombas de inyección no pulsada, correspondientes al modelo *PHD Ultra Pump – Harvard Apparatus*[®]. La utilización de capilares con diferentes dimensiones permite obtener un control más preciso del tiempo de residencia de los fluidos en cada tramo del sistema. Los materiales de los capilares utilizados son el politetrafluoroetileno (PTFE) y el polietereetercetona (PEEK).

El flujo segmentado consiste en poner en contacto fluidos inmiscibles para generar segmentos a lo largo de los capilares y que finalmente al gelificar estos segmentos se generen las microcápsulas. Este parámetro, permite un control más preciso en la síntesis de microcápsulas, ya que en función del volumen de cada uno de los segmentos, se obtendrá un tamaño u otro de microcápsulas [29].

En la investigación llevada a cabo, se analizan dos categorías de sistemas: de fase líquido-líquido y de fase líquido-gas. Estos se subdividen en diferentes tipos, en los que se van variando diferentes parámetros como los materiales, concentraciones o flujos de las bombas de inyección a los sistemas microfluídicos. En los esquemas de las ilustraciones 3 y 4 se resumen los sistemas de flujo considerados para la producción controlada en continuo de microcápsulas de alginato.

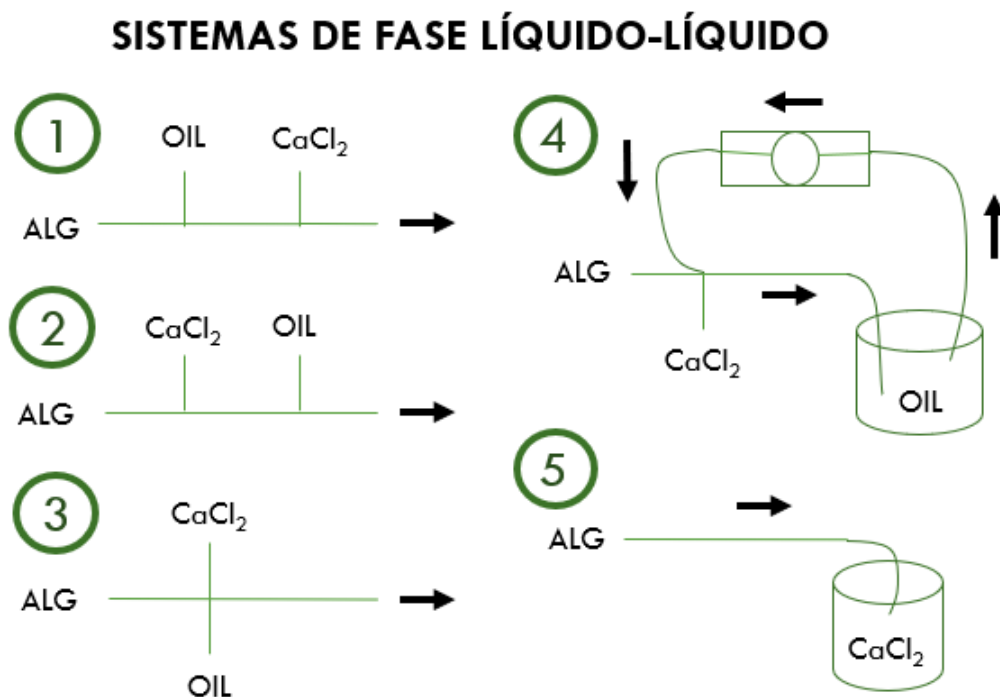


Ilustración 3. Esquema de los sistemas de flujo para la formación de microcápsulas en continuo con fase líquido-líquido usados en este trabajo.

SISTEMAS DE FASE LÍQUIDO-GAS

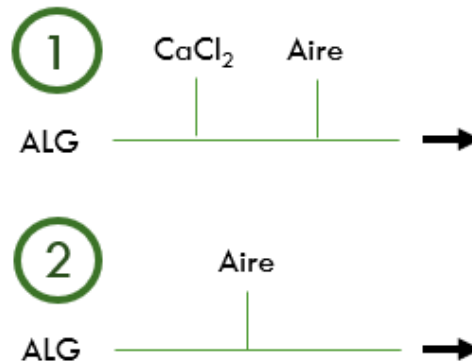


Ilustración 4. Esquema de los sistemas de flujo para la formación de microcápsulas en continuo con fase líquido-gas usados en este trabajo.

Estos sistemas consisten en la inyección de alginato, cloruro cálcico (CaCl_2) y en algunos casos de aire o surfactantes que mejoran la separación de los segmentos [30] y reducen la tensión superficial entre las fases, por lo que se homogeneizan los materiales y se consiguen gotas más pequeñas [31]. Para el caso de los surfactantes, se utilizan aceites, ya que son inertes e inmiscibles con la fase acuosa, por lo que se genera un flujo segmentado y que además pueden ser reutilizados, mientras que, para el caso del aire, se produce una separación normal mediante la inyección de un flujo de aire. En el caso de los sistemas de flujo en los que se inyecte tanto el alginato como el CaCl_2 , la gelificación se producirá en el reactor, por el contrario, si solo se inyecta el alginato, las gotas o segmentos de flujo precipitarán en el vial en el que se recoge CaCl_2 y por tanto la gelificación se produce fuera del reactor. Cada uno de los diferentes tipos de sistemas presenta diferentes características, las cuales se recogen en las secciones 1 y 2 del anexo.

El sistema de flujo para llevar a cabo la encapsulación se basa en el sistema de flujo 5 con fase líquido-líquido, pero con ciertas variaciones: la utilización de dos capilares concéntricos de diferentes dimensiones, los cuales inyectarán uno el alginato y otro el material a encapsular, y que finalmente se formará en el orificio final una gota que precipitará en una disolución de CaCl_2 . En este sistema de flujo se producirá la gelificación fuera del reactor, ya que es cuando se ponen en contacto los reactivos. Los materiales que se han encapsulado han sido nanopartículas de oro (AuNP), unas moléculas fluorescentes conjugadas o bien con dextranos, o bien con una proteína, para estudiar la permeabilidad de las microcápsulas, y DMEM (Dulbecco modified Eagles Medium) para analizar la viabilidad celular. Las concentraciones de cada uno de los materiales encapsulados se encuentran en la tabla 3 del siguiente apartado.

En la ilustración 5 se muestra una fotografía del sistema de flujo y en la ilustración 6 un esquema de este. Los caudales utilizados son de $50 \mu\text{l}/\text{min}$ para el material que se encapsula y $100 \mu\text{l}/\text{min}$ para el alginato con Tween 20. Para la encapsulación se utiliza una concentración de 1 % en peso (w/w) de alginato, a la que se añade una concentración de 20 % w/w de Tween 20, y 1.5 % w/w de CaCl_2 . Una vez se han creado las microcápsulas, se retira la disolución de CaCl_2 y se purifica con agua varias veces para eliminar los restos.

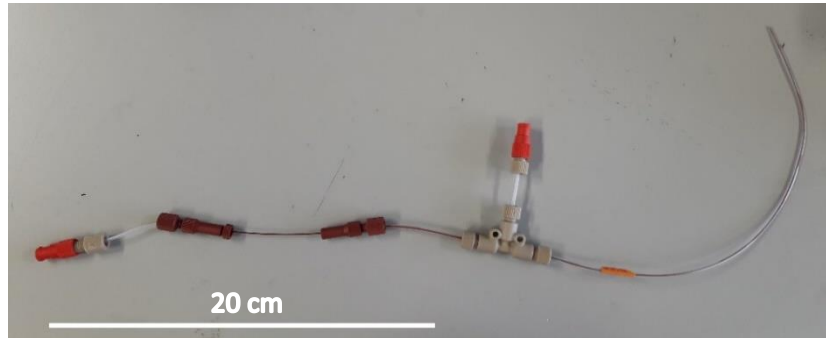


Ilustración 5. Fotografía del sistema de flujo para encapsular el material y sintetizar las microcápsulas.

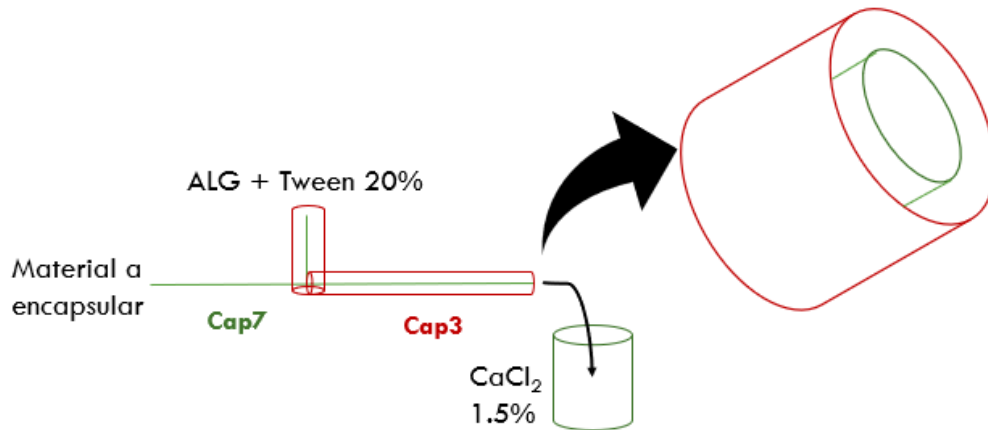


Ilustración 6. Esquema representativo del sistema de flujo para encapsular el material y sintetizar las microcápsulas.

Para el experimento de fabricación de un recubrimiento que ayude a impedir la liberación de AuNP, se añaden a la síntesis dos nuevos materiales: el PLGA y acetona. Se utilizan disoluciones de 1% w/w de alginato, 20% w/w de Tween 20 (añadido a la disolución de alginato), 1.5 % w/w de CaCl_2 , y 18.7 mg PLGA en 2 ml de acetona. El sistema de flujo para este experimento será el esquematizado en la ilustración 7, el cual se basa en el sistema de flujo anterior (para encapsulación) y que solamente varían los materiales utilizados. Los caudales utilizados son de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ para el PLGA y acetona y de 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ para el alginato con Tween 20 y las AuNP. Estas microcápsulas serán analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión y así poder observar la encapsulación de las nanopartículas en su interior.

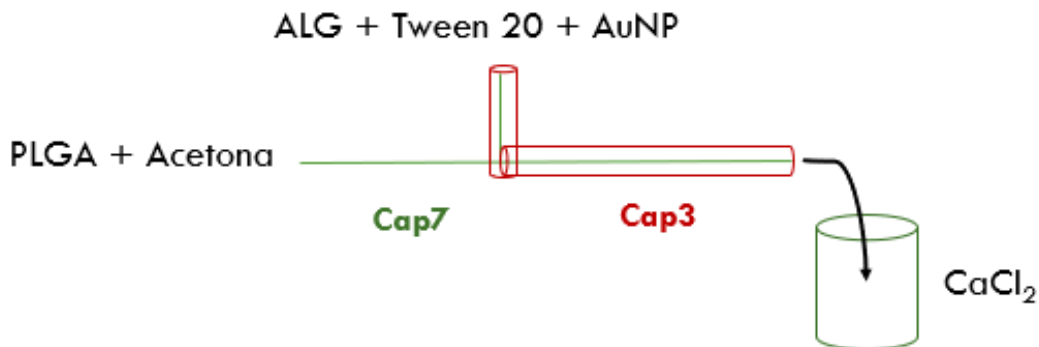


Ilustración 7. Esquema del sistema de flujo para la formación de microcápsulas en continuo con recubrimiento de PLGA.

2.2. Estudio de los parámetros de síntesis que permiten la producción controlada de microcápsulas

La estructura y tamaño son esenciales para la aplicación biomédica de este tipo de vectores, de forma que la encapsulación final sea la más adecuada posible y sin que cause ningún problema en el entorno celular [11]. Por tanto, una vez elegido el sistema de flujo en continuo que permite la mejor producción de las microcápsulas, se deben modificar diferentes parámetros para que la síntesis sea la más adecuada para controlar la permeabilidad y geometría del hidrogel.

En el siguiente apartado se analizan diferentes variables del proceso de síntesis que pueden tener un efecto en el control del tamaño de las microcápsulas generadas y por ello en sus propiedades finales: dimensiones de los capilares, la adición y elección de un surfactante, la velocidad de agitación o la altura desde la salida del capilar hasta la superficie de gelificación. El efecto de todos estos parámetros en el tamaño de las microcápsulas ha sido evaluado mediante un software de acceso libre *ImageJ* que permite cuantificar el tamaño de las microcápsulas y por tanto se buscará que estas tengan unas dimensiones relativamente homogéneas. Las tablas resumen de estos parámetros con sus características se encuentran en la sección 4 del anexo.

2.2.1. Efecto de las dimensiones de los capilares en el tamaño de las microcápsulas

Para la evaluación de la influencia de las dimensiones de los capilares, se analizan varios tamaños de capilares con diferentes diámetros interiores y exteriores. En el estudio de Herranz-Blanco et al. [32] se estudian diferentes tamaños de capilares y se concluye que es una variable influyente en el tamaño de las nanopartículas fabricadas por tecnología de microfluidos: dependiendo del diámetro de los capilares, las microcápsulas sintetizadas tendrán mayor o menor tamaño, siendo estas más grandes cuanto mayor sea el diámetro interior de los capilares. También destaca otros parámetros influyentes como el número de Reynolds (Re) que caracteriza los movimientos de los fluidos.

Para analizar el efecto de las dimensiones de los capilares, se realiza un estudio de reproducibilidad por triplicado. En cada estudio, se toman entre 10 y 15 medidas de tamaño de microcápsulas obtenidas con cada uno de los capilares (ver características en la tabla 2). Con los datos obtenidos se realiza un análisis estadístico, llamada prueba ANOVA (Análisis de Varianzas), para ver si los tamaños obtenidos son estadísticamente significativos, mediante el software *Minitab*. También se incluye en el análisis la influencia de la agitación para cada uno de los capilares.

Nombre	Material	Diámetro exterior (mm)	Diámetro interior (mm)
Cap1	PTFE	3,18	1,59
Cap2	PTFE	1,59	1,47
Cap3	PTFE	1,59	1,02
Cap4	PTFE	1,59	0,76
Cap5	PTFE	1,59	0,51
Cap6	PTFE	1,59	0,25
Cap7	PEEK	0,80	0,13
Cap8	PEEK	0,36	0,03
Cap9	PEEK	1,59	0,03

Tabla 2. Resumen de las características de los capilares utilizados para la síntesis de las microcápsulas.

2.2.2. Efecto del surfactante en el tamaño de las microcápsulas

Los surfactantes son unos agentes químicos que permiten reducir la tensión superficial en un fluido. El estudio de Bouchemal et al. [33] determina que la adición de surfactantes afecta en el tamaño final de las micro-gotas, viéndose reducido su diámetro a medida que aumenta la concentración de surfactante. Para analizarlo, se realiza de nuevo un ensayo de reproducibilidad por triplicado, en el que se evaluará si el efecto sobre su tamaño es significativo. Se toman diferentes surfactantes los cuales se añaden a la fase acuosa: lisina, Tween 20, Tween 80 y polivinilpirrolidona (PVP) de bajo peso molecular (10.000 g/mol). Para cada uno de los surfactantes, se estudia el efecto que producen a diferentes concentraciones: 5% y 20% w/w. A su vez, se analiza la influencia de la agitación para la concentración de 20% w/w de surfactante. Para realizar el experimento, se utiliza el “capilar 3” con dimensiones 1.59 mm de diámetro exterior y 1.02 mm de diámetro interior.

2.2.3. Efecto de la agitación en el tamaño de las microcápsulas

El uso de agitación en el vial de CaCl_2 donde precipitan las micro-gotas permite que la morfología de las microcápsulas sea más homogénea [34]. Esto es debido a que, puesto que hay una rotación constante, no precipitan con cierta forma de gota, sino que la morfología es más esférica y por tanto más homogénea por toda la superficie, frente a las que se producen sin agitación. En algunos casos en que no hay agitación incluso se llegan a acumular unas encima de otras quedando unidas y con forma amorfa. Este efecto ha sido evaluado junto a otros parámetros como las dimensiones de los capilares o la adición de surfactante, corroborando que se producen microcápsulas más homogéneas. En este apartado, se evalúan diferentes velocidades de agitación (100, 350, 700 y 1000 rpm) de las que se espera que a mayor agitación se produzcan microcápsulas de menor tamaño, pero sin que se desintegren. También se utiliza el “capilar Cap3” para realizar el ensayo (1.59 mm de diámetro exterior y 1.02 mm de diámetro interior).

2.2.4. Efecto de la altura entre la salida de la gota y la superficie de gelificación en el tamaño de las microcápsulas

En la investigación llevada a cabo por Fundueanu et al. en 1999 [35] se cita que, para realizar este tipo de experimentos, la distancia idónea entre el orificio de la salida de la gota hasta la superficie de gelificación es de 6 cm. La distancia a la que se hace referencia se encuentra esquematizada en la ilustración 8. Por tanto, partiendo de este supuesto, se analizan diferentes alturas: 1, 3, 6 y 9 cm. Cuanta más altura haya, la gota que precipita en la superficie de gelificación se deforma más.

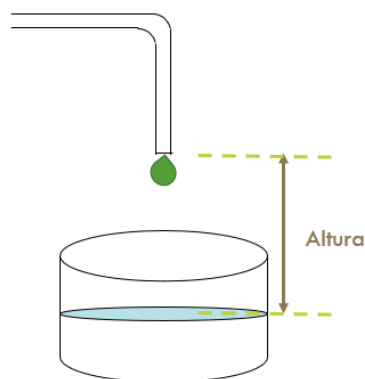


Ilustración 8. Esquema que representa el parámetro de la altura entre la salida de la gota por el capilar y la superficie de gelificación.

3. Estudio de la permeabilidad de las microcápsulas

Tras la encapsulación celular se tiene que permitir el intercambio de nutrientes y oxígeno para que las células puedan vivir en el interior de la cápsula sin que entren las inmunoglobulinas y las reconozca como agentes extraños [36], [37]. Por tanto, se necesita que cada una de las microcápsulas favorezcan la permeabilidad para realizar tanto las funciones vitales, como para realizar la liberación de células en la zona que se aplique la terapia (esquema en ilustración 9). Las microcápsulas están compuestas por diferentes capas en la que cada una de estas es una membrana que hace de filtro y por el que pasan los diferentes nutrientes o partículas terapéuticas.

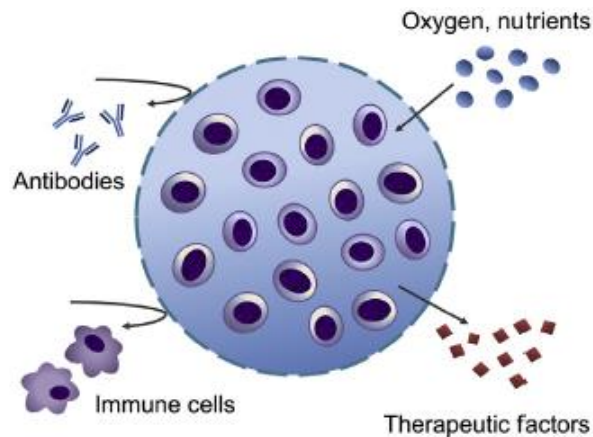


Ilustración 9. Imagen de una microcápsula en referencia a la permeabilidad [38].

Para estudiar el efecto de permeabilidad, se realizan unos ensayos de encapsulación en los que se utilizan moléculas de diferentes pesos moleculares, llamadas Isotiocianato de fluoresceína-conjugadas o bien con dextrano (FITC-Dextrano), o bien con una proteína llamada albúmina (FITC-Albúmina), que permitirán saber cuál es el tamaño de los poros dependiendo de su permeación a través de los poros de las microcápsulas. Por otro lado, se realizan otros ensayos de encapsulación de AuNP muy empleadas para terapias para el cáncer, como el estudio de Huang et al. en 2006 [39], en el que se analiza el tamaño de las cápsulas de alginato de calcio creadas con un chip de microfluídica y la viabilidad de encapsular en su interior AuNP. También se realizan pruebas de encapsulación de DMEM, un medio de cultivo en el que se disponen las células, con la finalidad de mimetizar el comportamiento de las microcápsulas tras la encapsulación celular y estudiar su viabilidad.

La molécula FITC es un fluorocromo derivado de la fluoresceína que permite emitir fluorescencia al excitarla a cierta longitud de onda. El dextrano es un polisacárido complejo y ramificado formado por cadenas de glucosa de longitud variable (ver ilustración 10). La albúmina es una de las proteínas más abundantes en el plasma sanguíneo y la cual se produce en el hígado. Ambas moléculas se unen a la molécula FITC para dar lugar a un compuesto que permite realizar el estudio de permeabilidad en función del tamaño de la molécula de Dextrano o de la Albúmina. En estas pruebas se utilizan FITC-Dextrano de diferentes pesos moleculares, desde 4.000 kDa a 500.000 kDa, que serán encapsulados dentro de las microcápsulas, así como el FITC-Albúmina. De esta forma se irá midiendo la fluorescencia durante varios días para que se pueda extrapolar a la concentración de molécula que liberan (con rectas de calibrado) y finalmente obtener las gráficas de su cinética de liberación.

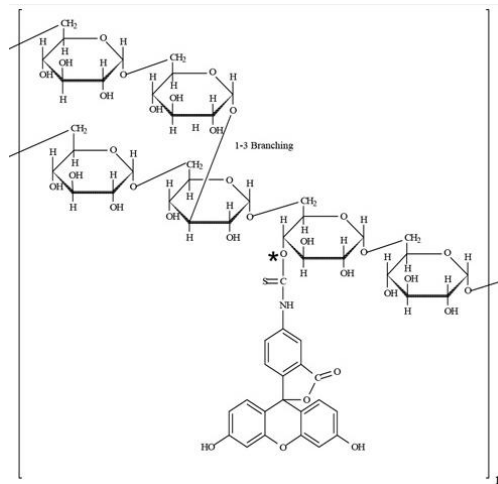


Ilustración 10. Estructura molecular de la molécula Isotiocianato de fluoresceína - dextrano [40].

Las AuNP son unas partículas metálicas de decenas de nanómetros (15 nm de diámetro en este caso) que presentan unas propiedades que difieren a las de la escala macro (*bulk gold* en inglés). Una de las más destacadas es su propiedad fototérmica, que consisten en que ante la presencia de luz de una determinada longitud de onda, desprenden calor. Esto hace que tenga gran interés en el campo de la biomedicina, sobre todo en aplicaciones como tratamiento del cáncer[2], vectorización de fármacos [41] o terapia génica [42]. Algunas de sus ventajas son que la síntesis de estas partículas es fácil o que su tamaño puede controlarse de forma muy precisa. Además, poseen gran área superficial, por lo que pueden ser fácilmente funcionalizadas y bioconjugadas [43].

Mediante la encapsulación de las AuNP, se consigue crear unos vectores que actúan como vehículos y que al funcionalizar la superficie, pueden llegar hasta las células diana y atacarlas, por ejemplo, células cancerígenas, o también pueden transportar fármaco en su interior o en su superficie y liberarlo. También la encapsulación de AuNP en microcápsulas puede utilizarse para testar la toxicidad al introducir células y poder prevenir efectos adversos a posteriori.

Debido a sus propiedades ópticas, se forma un efecto conocido como plasmón de resonancia, es decir, oscilaciones de los electrones en la banda de conducción de los átomos de oro al ser excitados a una cierta longitud de onda. Aunque depende de la forma, tamaño, síntesis o de la agregación, este efecto se da alrededor de 520 nm para nanopartículas esféricas y con un diámetro menor a 50 nm [44].

Para el seguimiento de la liberación de las AuNP encapsuladas de 15 nm de diámetro se realizan 3 experimentos en los que se emplea el espectrofotómetro UV-Vis V780 - Jasco (ultravioleta visible):

- Influencia del tiempo de gelificación: unas microcápsulas con AuNP se dejan gelificando durante 20 minutos ("T2") y otras durante 1 hora ("T1"). Como se fabrican por gelificación externa, cuanto más tiempo se deje gelificando, más rígida será la estructura de las microcápsulas en comparación con una que lleve menos tiempo, ya que no se habrá conseguido que gelifique hasta el núcleo de estas. Según dice un estudio publicado por Blandino et al. en 1999 [45] en los primeros 10 minutos del tiempo de gelificación, se alcanza alrededor del 50% del espesor que finalmente gelificará.

- Cinética de la liberación de las AuNP durante 14 días.
- Experimento en el que se añade un recubrimiento de ácido poliláctico-glicólico (PLGA) como barrera para modificar la permeabilidad con el tiempo ya que este polímero es biodegradable. El PLGA en el cuerpo humano se degrada en sus dos monómeros originales: el PLA (ácido poliláctico) y el PGA (ácido glicólico), los cuales pueden ser excretados por la orina [46]. En este experimento, solamente se observarán las imágenes al microscopio para ver si contienen las AuNP. El esquema del sistema de flujo para llevar a cabo la síntesis de este experimento se muestra en la ilustración 7.

En el caso de la encapsulación de DMEM, consiste en analizar si la síntesis de las microcápsulas es viable para la encapsulación y mimetizar su comportamiento en un ambiente celular. El DMEM es un medio de cultivo celular en el que se incorporan las células para evitar la contaminación y que contiene nutrientes que aportará a las células. Este medio de cultivo tiene sodio en su composición (0.11 g/L de piruvato de sodio), puede suceder que se vuelva reversible el efecto de gelificación si hay una cantidad elevada de iones sodio (Na^+) [46].

Para llevar a cabo la encapsulación del FITC-Dextrano, FITC-Dextrano con Albúmina y de las AuNP se tomarán diferentes concentraciones de estos materiales. Las concentraciones de estos materiales serán inyectadas con el sistema de flujo presentado anteriormente en el esquema de la ilustración 6, a la vez que una disolución de alginato y Tween 20, de forma que en el centro queden las moléculas de FITC o AuNP. Las concentraciones empleadas para la encapsulación se presentan en la siguiente tabla:

Nombre	Concentración (mM)
FITC-Dextrano bajo peso molecular	$2.75 \cdot 10^{-3}$
FITC-Albúmina	$8.00 \cdot 10^{-4}$
FITC-Dextrano medio peso molecular	$1.00 \cdot 10^{-4}$
FITC-Dextrano alto peso molecular	$5.00 \cdot 10^{-5}$

Tabla 3. Concentraciones del isotiocianato de fluoresceína a encapsular.

Dependiendo del peso molecular, se puede estimar el diámetro de las moléculas [47], cuyos datos se presentan en la siguiente tabla:

Nombre	Peso molecular (kDa)	Diámetro (nm)
FITC-Dextrano bajo peso molecular	4.000	2,0
FITC-Albúmina	69.894	5,5
FITC-Dextrano medio peso molecular	150.000	7,0
FITC-Dextrano alto peso molecular	500.000	10,5
Nanopartículas de oro (AuNP)	-	15,0

Tabla 4. Resumen de las características de los diferentes materiales a encapsular [47].

Para llevar a cabo el seguimiento de la liberación de las moléculas de FITC-Dextrano y FITC-Albúmina, se utiliza el equipo de fluorescencia LS-55 – PerkinElmer® que permite detectar la concentración que permean estas hacia el medio. Previamente se debe realizar una recta de calibrado de cada uno de los materiales a encapsular, de forma que se obtiene una recta cuya ecuación relaciona la intensidad de fluorescencia con la concentración de la muestra. Algunos de los ejemplos de las rectas de calibrado se encuentran en la sección 6 del anexo.

En el caso de la encapsulación de las AuNP, no se tiene el dato de la concentración, ya que se toma una muestra de una disolución que se encontraba en el laboratorio, por lo que simplemente la liberación de estas nanopartículas se sigue mediante el aumento de intensidad de absorbancia a los 520 nm. Para el seguimiento de la liberación de las AuNP se emplea el espectrofotómetro UV-Vis V780 – Jasco®.

Las microcápsulas que contienen tanto AuNP como las moléculas de FITC-Dextrano y FITC-Albúmina, se encuentran suspendidas en un medio purificado con agua mili-q, por tanto, las medidas de la concentración que expulsan a ese medio se realizan tomando un volumen de 3 ml del medio, el cual se medirá en el espectrofotómetro en el caso de las AuNP o en el fluorímetro en el caso de las FITC-Dextrano y FITC-Albúmina.

4. Ensayo de citotoxicidad celular en las microcápsulas

La aplicación final de este proyecto es encapsular células dentro de las microcápsulas que se han sintetizado con los parámetros óptimos. La encapsulación celular en 3D permite tener un control más preciso de las células que en los cultivos 2D, ya que cada una interactúa con las células vecinas y con el ambiente, por lo que se consigue simular mejor las funciones celulares, así como el intercambio de nutrientes [48]. En este caso se han elegido dos tipos de líneas celulares: HeLa, y CaCo2 TC7, las cuales pertenecen a células de cáncer de cérvix y de colon, respectivamente, y tienen alto poder de reproducción.

Para llevar a cabo la encapsulación, previamente se debe realizar un experimento de toxicidad, es decir, analizar qué cantidad de alginato en presencia de las células puede ser tóxico y por tanto provocar la muerte celular. En la ilustración 11 se muestra un esquema de los pasos que se realizan para llevar a cabo el ensayo de citotoxicidad.



Ilustración 11. Esquema resumen de los pasos a seguir para el estudio de la viabilidad celular.

Ambas líneas celulares se pusieron en el medio de cultivo DMEM a 37 °C y en presencia de 5 % de CO₂. El DMEM con alto volumen de glucosa, contiene L-glutamina de concentración 2 mM con 10 % v/v de suero fetal bovino y 1 % de penicilina-estreptomicina-anfotericina B para un mayor control de la contaminación del cultivo celular.

Las microcápsulas de alginato se añadieron al DMEM y se incubaron durante una noche. A continuación, se recogió el sobrenadante para obtener una solución de parte del material liberado de las microcápsulas debido a la imposibilidad de añadirlos al cultivo celular por su gran tamaño. Esas soluciones se añadieron a las células a diferentes concentraciones, desde 1 mg/ml hasta 100 mg/ml. La solución de alginato se añadió a los cultivos a concentraciones entre 0.05

mg/ml y 4 mg/ml. Las soluciones se incubaron con las células durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂.

La citotoxicidad se evaluó con “*Blue Cell Viability Assay*”. Se añadió el agente (10 %) a las células y se incubó de nuevo durante 4h a 37 °C y con 5 % de CO₂. Finalmente se analizó su fluorescencia cuya excitación es a 535 nm y la emisión a 590 nm, así como las pruebas control, las cuales no contenían células y así comprobar si se produjo alguna interferencia durante el ensayo.

5. Técnicas de caracterización

Técnica de caracterización	Descripción
Captura de imágenes desde Smartphone	Las imágenes para llevar a cabo las mediciones de las dimensiones microcápsulas se toman con un smartphone de alta definición. Se realiza una comparación entre las imágenes tomadas directamente del smartphone y las que se tomaron desde la lente de un microscopio óptico para comprobar que la calidad de las imágenes era buena. El resultado fue positivo, ya que no hubo apenas diferencias (tabla de resultados en la sección 4 del anexo).
Software <i>ImageJ</i> ®	Las imágenes obtenidas con el smartphone se analizan con este software libre, el cual permite procesar imágenes de nivel científico. Se obtienen las medidas de las áreas y diámetros de las microcápsulas.
Software <i>Minitab</i> ®	Programa que permite ejecutar gran variedad de estudios estadísticos. Se realiza una prueba ANOVA para comprobar si las medias obtenidas de los diámetros de las microcápsulas son estadísticamente diferentes. También se obtienen histogramas.
Fluorímetro (LS-55 – PerkinElmer®)	Dispositivo que permite medir parámetros de fluorescencia, es decir, la intensidad y distribuciones de longitudes de onda del espectro de emisión tras haber sido excitada la muestra a una determinada longitud de onda. Esta técnica se utiliza para medir las concentraciones de FITC-Dextrano y FITC-Albúmina que se van liberando al medio. Permite medir concentraciones de disoluciones muy bajas.
Espectrofotómetro UV-Vis (V-780 – Jasco®)	Dispositivo que permite cuantificar la energía absorbida por diferentes moléculas al excitarla mediante energía electromagnética (luz UV-Vis). Se utiliza para medir la concentración de AuNP que se libera al medio desde las microcápsulas.
Cryo-SEM	La microscopía electrónica de barrido es una técnica que permite obtener imágenes de la superficie de una muestra. Utiliza un haz de electrones que barre toda la superficie. Esto junto con la criogenización previa de la muestra, permite realizar imágenes de materiales sensibles a los electrones o “blandos”. La criogenización es una técnica que consiste en poner la muestra en nitrógeno líquido para que alcance temperaturas muy bajas y conseguir que se congele y se preserve mejor sin modificar su estructura original en el medio

	acuoso. Para aquellos materiales que no sean conductores a los electrones, se debe añadir un recubrimiento de una película metálica para que sea conductor.
EDS/EDX	Técnica que permite la caracterización química y estructural de una muestra que ha sido excitada con haces de rayos X. Se realiza un corte en las microcápsulas y se analiza el núcleo, obteniendo un espectro que muestra los componentes químicos de la muestra.
Corte por ultramicrotomo	Técnica que permite realizar cortes para obtener secciones ultrafinas de nanómetros de espesor de una determinada muestra para que sean observados por microscopía electrónica de transmisión. En este caso, se embute la microcápsula a analizar en una resina para ganar dureza y se realizan cortes de 60 nm.
TEM	La microscopía electrónica de transmisión consiste en obtener imágenes debido a que se incide un haz de electrones que chocan con la muestra. Los electrones, tras producirse el choque, se desvían o quedan dispersados en la muestra, que finalmente se reconducen a una lente que produce una imagen a diferentes escalas de grises. Esta técnica se utiliza para observar las AuNP encapsuladas en las microcápsulas.
Citotoxicidad de las microcápsulas	Se evaluó con “Blue Cell Viability Assay”, cuya prueba se basa en la evaluación del metabolismo celular. Se añade un tinte el cual permite detectar si en esa disolución hay actividad celular puesto que el substrato resazurina (no fluorescente) cambia a resorufina (fluorescente).

Tabla 5. Listado de las técnicas de caracterización empleadas en la investigación junto con una breve descripción.

RESULTADOS

1. Resultados de los sistemas de flujo para la formación de microcápsulas en continuo.

Los resultados obtenidos de los diferentes sistemas de flujo presentan ciertos efectos negativos en la síntesis de microcápsulas, como una mala separación entre segmentos de flujo, diferencias de presiones en los capilares, coalescencia de los segmentos, obturaciones en los capilares y conectores, etc. Esto hace que se busquen diferentes alternativas de los sistemas de flujo para solventar los problemas que van apareciendo en la síntesis. Las características de las composiciones de corrientes y los datos técnicos de cada uno de los sistemas utilizados que modifican el tiempo de residencia en cada uno de los tramos se encuentran en la sección del anexo 2.

El sistema de flujo 1 (ilustración 3 e ilustración 42 del anexo) se diseñó para producir un flujo segmentado de alginato gracias a la presencia de aceite de parafina que es inmisible con la fase acuosa. En el caso que no se segmentase el flujo del fluido, se obtendría un hilo continuo de alginato. A continuación, al ponerse en contacto estos segmentos de fluido de alginato con el CaCl_2 , se produciría la gelificación debido al intercambio de los iones divalentes. Finalmente se recogen los segmentos gelificados en una disolución de CaCl_2 . Cuanto menor es el ratio entre los flujos de la fase acuosa y la parafina, los segmentos son más pequeños y por tanto, se consigue menor tamaño de las microcápsulas. El ratio molar entre la concentración de CaCl_2 y la de alginato utilizado es de aproximadamente 7.2 [11]. Los resultados mostraron falta de comunicación entre las fases, debido a la dificultad de poner en contacto la fase acuosa del CaCl_2 con los segmentos de alginato, por lo que no se produjo la gelificación. El problema residía en que la fase acuosa generaba segmentos inmiscibles con los de alginato.

Con el sistema de flujo 2 (ver ilustración 3 e ilustraciones 43, 44, 45 y 46 del anexo) se intentó solventar el problema de comunicación entre fases, por lo que se puso en contacto directamente el alginato y el CaCl_2 para que gelifique en el primer tramo y producir el flujo segmentado en el segundo tramo a través de la inyección de aceite de parafina. Para el análisis de este sistema de flujo, se fueron variando diferentes parámetros como las concentraciones del CaCl_2 , longitudes y diámetros de los capilares (para conseguir menor tiempo de residencia y aumentar la separación entre fases). Según el estudio Ji Xiaobo et al., de 2015 [30] se estableció que el ratio molar que debía haber entre la concentración de alginato y CaCl_2 era de 22.5 aproximadamente, por lo que se modificó la concentración de CaCl_2 añadiendo 3 veces más, pasando de 0.18 M a 0.55 M aproximadamente. Los cálculos se encuentran en la sección 3 del anexo. Sin embargo, se produjeron varios problemas de inestabilidad del flujo, que provocaban obturaciones temporales en los capilares y variaciones de presiones. Además, la cinética de gelificación en el primer tramo era relativamente alta, por lo que no se consiguió producir un flujo segmentado y, por tanto, se obtuvieron fibras. Para solventar este problema, se buscó disminuir el tiempo de residencia en el primer tramo donde se producía la gelificación, por lo que se acortó la longitud del capilar. Como consecuencia, al llegar al segundo tramo los fragmentos perdían homogeneidad y en algunos casos se producían uniones entre ellos (coalescencia), por lo que cuando precipitaban en el vial se formaban fibras de diferentes tamaños (ver ilustración 12), sin tener de nuevo resultados positivos.

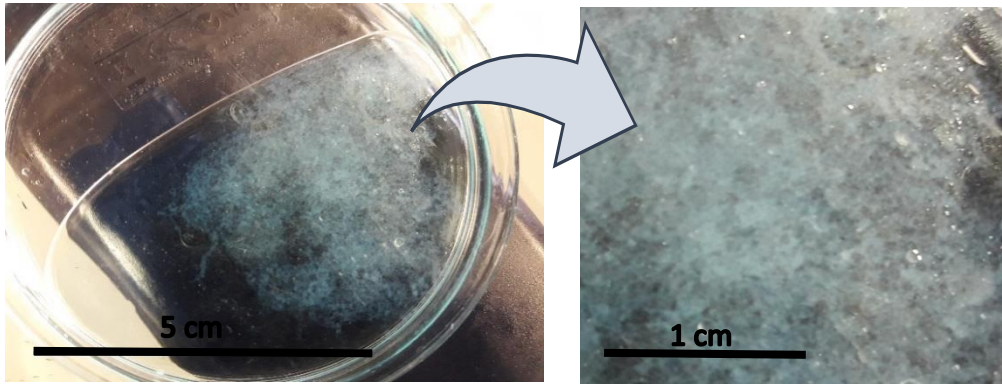


Ilustración 12. Fotografía de las fibras obtenidas del sistema de flujo 2 (fase líquido-líquido).

También se realizó una pequeña variación en el que se sustituyó el aceite de parafina por un flujo de aire (sistema de flujo 1 con fase líquido-gas) para producir una separación más fácil de los segmentos. Este sistema se esquematiza en la ilustración 4 e ilustración 50 del anexo. Sin embargo, el flujo era inestable y no había una homogénea separación entre segmentos, por lo que era difícil obtener un control del tamaño constante durante toda la síntesis. Los resultados se muestran en la ilustración 13.



Ilustración 13. Fotografías de los resultados obtenidos del sistema de flujo 1 (fases líquido-gas). Flujo segmentado y no homogéneo.

El sistema de flujo 3 (ilustración 3 e ilustración 47 del anexo) consiste en poner en contacto los tres componentes para la síntesis (alginato, CaCl_2 y el aceite de parafina) utilizando un conector en forma de cruz. Este sistema se diseña para intentar reducir la cinética de gelificación tan elevada que presentaba el sistema de flujo 2, gracias a que de forma instantánea se pretende producir la gelificación entre el alginato y el CaCl_2 y la segmentación del flujo con el aceite de parafina. También se reduce la longitud del reactor para evitar los problemas de coalescencia que se producían anteriormente, así como problemas de obturación (caudales inferiores a $40 \mu\text{l}/\text{min}$ en la bomba 1) debido a la velocidad de gelificación tan elevada. Sin embargo, los resultados que se obtuvieron eran segmentos inestables los cuales seguían provocando coalescencia entre ellos y por tanto se generaban fibras (ilustración 14), debido a que no se producía una buena separación con el aceite de parafina.

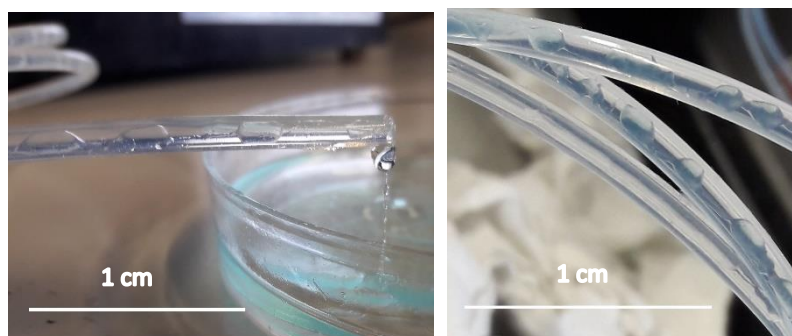


Ilustración 14. Fotografías de los resultados obtenidos del sistema de flujo 3 (fase líquido-líquido)

También se analizó una pequeña variación de este sistema: sustituir el aceite de silicona (parafina) por la perfluorodecalina, un fluido altamente hidrófobo en comparación con la parafina. La silicona no es del todo hidrófoba, por lo que, al quedar restos de agua en la pared del reactor, los segmentos se unen a estos restos, provocando variaciones de tamaño. Al utilizar un material más hidrófobo, se reducen los restos de agua en la pared del reactor, por lo que la síntesis es mucho más homogénea. Los resultados obtenidos fueron los que se muestran en la ilustración 15, en los que se observa separación entre fases, pero no se consiguen cápsulas, sino fibras, debido a que tampoco se produjo una buena separación entre los segmentos de fluido al utilizar la perfluorodecalina.

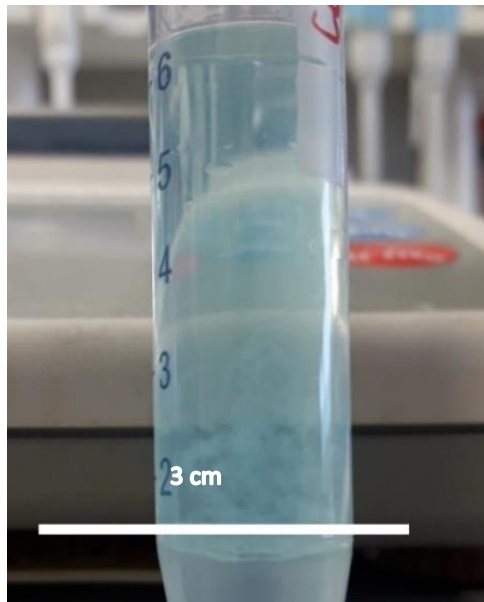


Ilustración 15. Fotografías de los resultados obtenidos tras la adición de perfluorodecalina.

Estos resultados del sistema de flujo 3 se llevaron al microscopio Cryo-SEM para analizar a escala micrométrica la superficie de las fibras. Los resultados (ver ilustración 16) muestran que es una estructura no homogénea y poco uniforme, por lo que se descarta también como sistema de síntesis.

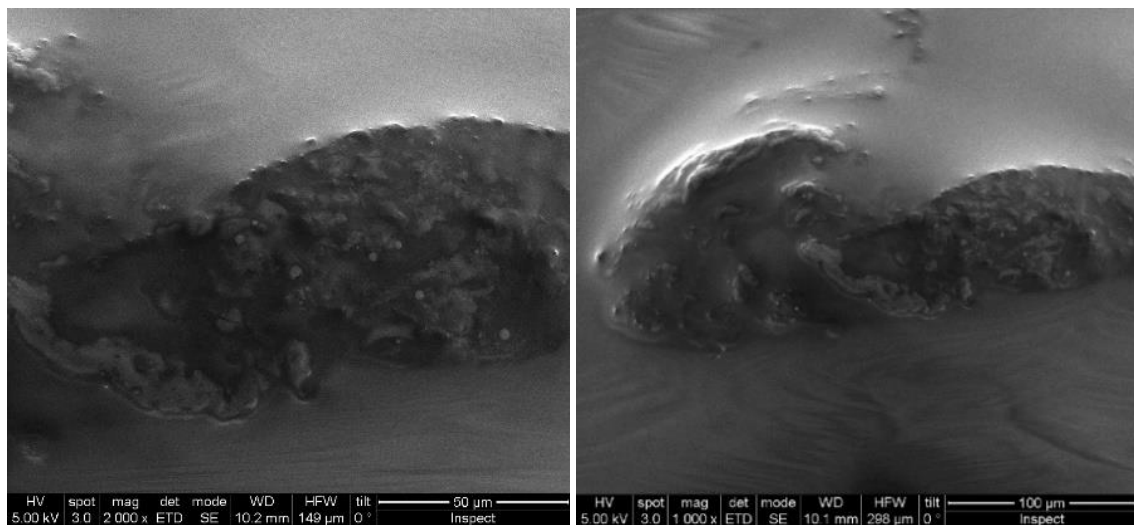


Ilustración 16. Imágenes del Cryo-SEM de las fibras obtenidas del sistema de flujo 3 con la adición de perfluorodecalina.

El sistema de flujo 4 (ilustración 3 e ilustración 48 del anexo) tenía como objetivo trabajar a más velocidad y poder reutilizar el aceite de parafina constantemente. Este sistema de flujo consistía en una bomba que llevaba acoplado un capilar. Por un extremo se recogía el aceite (parafina) de un vial el cual fluía hasta el otro extremo del capilar en el que se le acoplaba un conector con forma de cruz que inyectaba el alginato y CaCl_2 . Por tanto, se obtenía de nuevo la gelificación y la segmentación de forma simultánea. El resultado de la gelificación precipitaba en el mismo vial de aceite, así como el aceite que separaba los segmentos. Sin embargo, surgieron de nuevo problemas de inestabilidad y homogeneidad del flujo, debido a las diferencias de presiones a través de los capilares, provocando incluso obturaciones en el sistema.

Dado que los problemas que surgen de los sistemas de flujo 1, 2, 3 y 4 son difíciles de solventar, se busca otra alternativa de sistema de flujo con el que se pueda llevar a cabo la síntesis de microcápsulas, así como implementar el proceso de encapsulación celular posterior. El sistema de flujo 5 (ilustración 3 e ilustración 49 del anexo) se basa en la separación del proceso de formación de la gota (la cual se genera en un proceso en continuo) del proceso de reticulación (que se produce fuera del reactor y en discontinuo). El sistema consiste en un capilar por el que fluye el alginato (proceso continuo) y que al alcanzar al extremo se produce una gota por diferencias de tensión superficial que finalmente precipita en el vial de CaCl_2 (proceso discontinuo) y se produce la reticulación. Con este sistema se obtienen los resultados esperados, es decir, la formación de microcápsulas, tal y como se muestran en la ilustración 17:

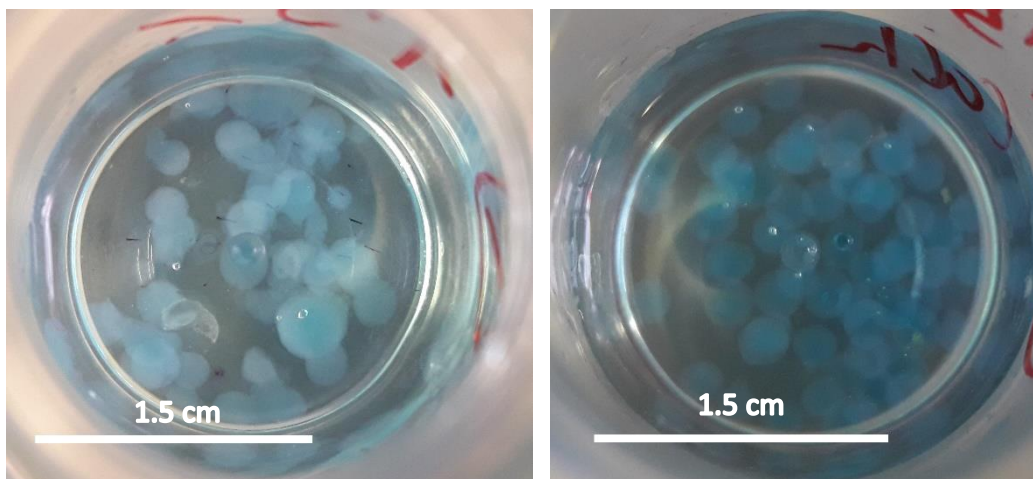


Ilustración 17. Fotografías de los resultados obtenidos del sistema de flujo 5. Obtención de microcápsulas.

Se analiza de nuevo una variación de este sistema, en la que se añade una corriente de aire (sistema de flujo líquido-gas) el cual es inmiscible con el fluido y genera el flujo segmentado. Este sistema de flujo se encuentra resumido en la ilustración 4 e ilustración 51 del anexo. Este experimento se realizó también con la adición de Tween 20 en la fase acuosa (alginato). Finalmente se produjo de nuevo la fusión entre segmentos, debido a que no era buena la separación de estos mediante la utilización de aire, provocando variaciones de tamaños de los segmentos y por tanto no se obtenía un buen control en la síntesis de microcápsulas. Cabe destacar que en el caso de la adición de Tween 20, se producían burbujas en el orificio final (ver ilustración 18) y al precipitar, la gelificación tampoco era estable.

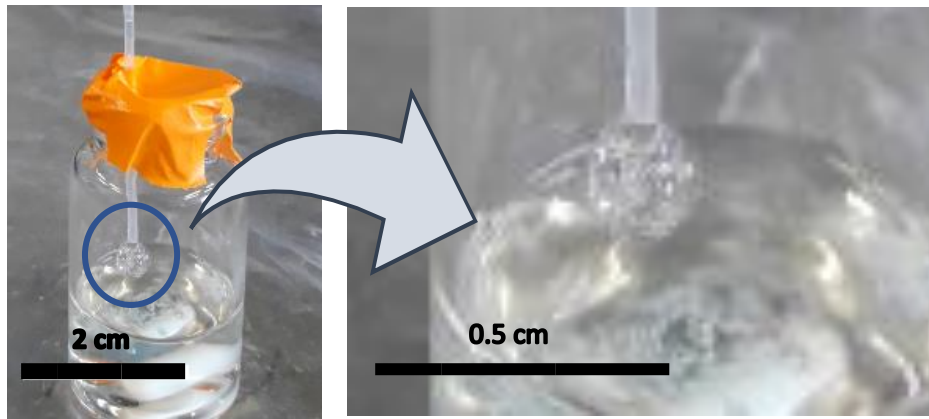


Ilustración 18. Fotografía de los resultados obtenidos del sistema de flujo 2 (sistema líquido-gas).

Tras realizar alrededor de 40 experimentos, los resultados obtenidos de los diferentes sistemas de flujo muestran que solamente es favorable el sistema de flujo 5 con fase líquido-líquido para sintetizar las microcápsulas. Cabe destacar, que los demás son considerados como no válidos porque en este caso se busca fabricar esferas, pero la fabricación de fibras también es válida para otras aplicaciones como en injertos o cultivos celulares en 3D [37]. El apartado del estudio de los efectos de algunos parámetros sobre el tamaño de las microcápsulas se realiza con el sistema de flujo 5 ya que es con el que se obtienen resultados positivos.

2. Resultados de los parámetros de síntesis que permiten la producción controlada de microcápsulas

En este apartado se explican los resultados obtenidos de los posibles parámetros influyentes en la síntesis. También se realiza un resumen de la selección de los parámetros óptimos para producir una síntesis controlada de microcápsulas. Las tablas con los resultados de los diámetros calculados tras analizar el efecto de cada uno de los parámetros se encuentran en la sección 4 del anexo.

2.1. Parámetros influyentes en la síntesis controlada de microcápsulas

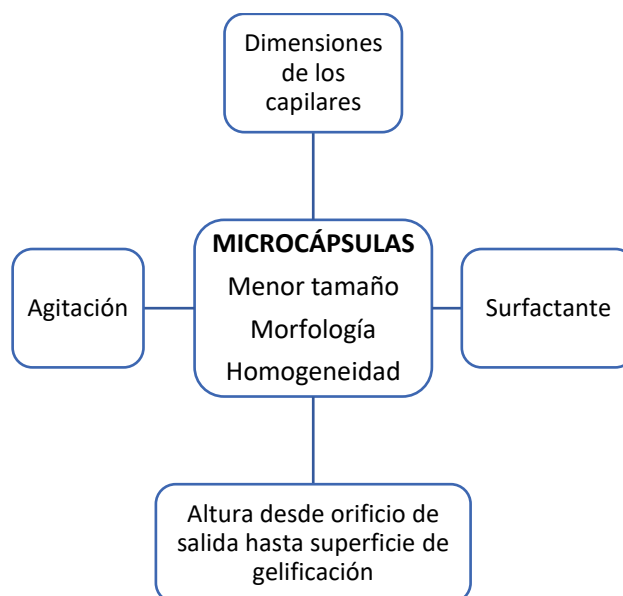


Ilustración 19. Esquema resumen de los parámetros influyentes en la síntesis controlada de microcápsulas.

Uno de los parámetros analizados es el diámetro de los capilares. Para estudiar si el tamaño era significativo junto con la agitación, el test ANOVA (resultados en el anexo 5) concluye que las microcápsulas sintetizadas con el capilar 1 (diámetro más grande) son las de mayor tamaño y que hay una serie de capilares que no presentan diferencias significativas como el capilar 3, 4 o 5. Los capilares 6, 7 y 8 son los que menor tamaño de microcápsulas reproducen (ver tablas de la sección 4 del anexo), sin embargo la síntesis es más problemática debido a obturaciones en los capilares, por lo que se descartan estos. Para el caso del capilar 9, no se obtuvo ningún resultado debido a obturaciones y diferencias de presiones en el capilar, por lo que también se descarta. En la ilustración 20 se muestran los histogramas de todas las medidas obtenidas de las microcápsulas de cada una de las tres pruebas sobre el efecto de las dimensiones de los capilares.

Puesto que apenas hay diferencias entre tamaño de las microcápsulas que han sido sintetizadas con los capilares “Cap3”, “Cap4” y “Cap5”, se elige al capilar 3 para llevar a cabo los demás experimentos ya que es uno que se puede reproducir fácilmente y es el que posee la desviación estándar en tamaños más reducida.

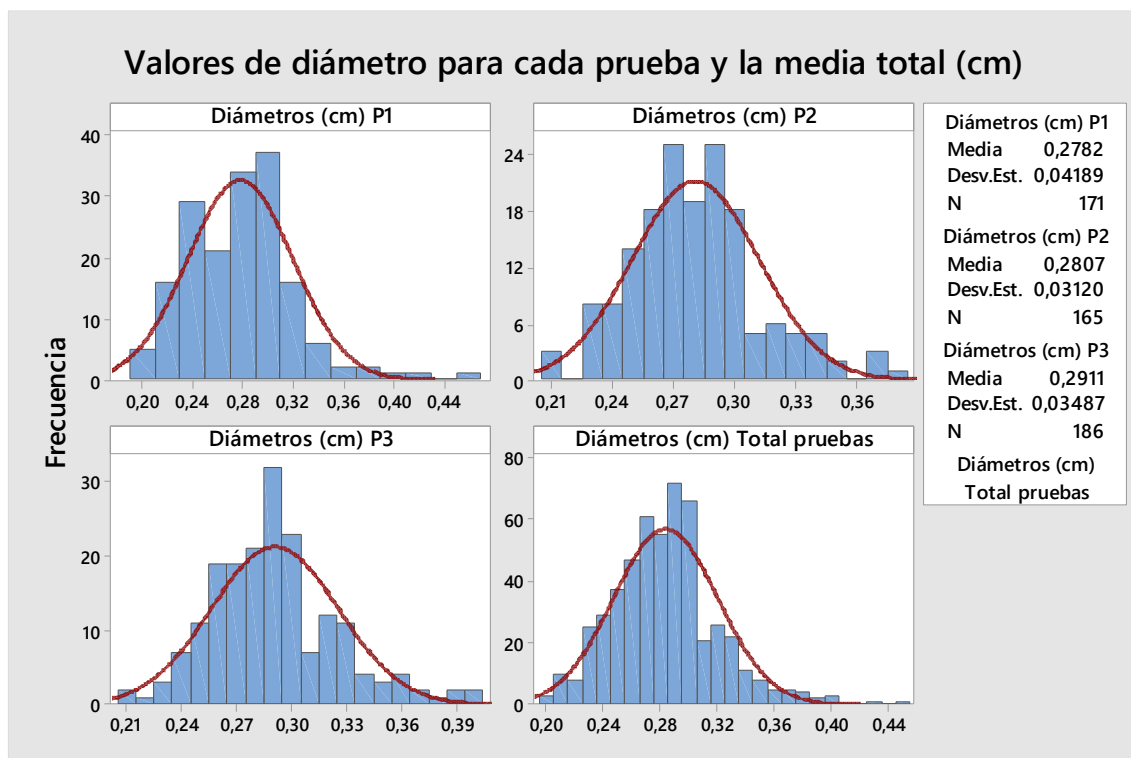


Ilustración 20. Histograma de los tamaños de diámetro (cm) obtenidos para cada una de las pruebas (P1, P2 y P3) y la media total.

En el caso de la adición y elección del surfactante, se observa que la lisina tanto con 5 % como con 20 % w/w, no aporta una buena síntesis ya que no se consiguen resultados con forma redondeada. Esto puede ser debido a que no se produce una buena mezcla en la síntesis con el alginato y se forman burbujas. El surfactante PVP reproduce las microcápsulas sin problemas, sin embargo, al compararlo con el Tween 20 o Tween 80, éstas son de mayor tamaño. Por tanto, se concluye que tras la adición de Tween 20, las microcápsulas obtenidas son las que mejor tamaño, homogeneidad y morfología reproducen con una concentración del 20 % w/w y bajo agitación.

En los dos experimentos anteriores se estudia el efecto de la agitación y resulta provocar un efecto positivo en cuanto a la morfología de las microcápsulas. Se analizan diferentes velocidades de agitación y se concluye que una agitación entre 100 y 350 rpm sería la correcta para que la morfología de las microcápsulas sea homogénea. Esto se debe a que, gracias a la rotación, en el momento que precipita la gota, tiende a que no se una con otra precipitada anteriormente y que no se deforme. Por otro lado, para velocidades cercanas a 1000 rpm, no se obtienen resultados, ya que se acaban desintegramiento debido a una alta agitación.

Finalmente, al analizar el efecto de la altura entre la salida de la gota por el capilar hasta la superficie de gelificación, se concluye que el mejor valor es alrededor de 1 y 3 cm. Por tanto, se rechaza la hipótesis de Fundueanu et al. de 1999 [35]. A mayor altura, las microcápsulas se deforman más cuando caen y esto provoca que no se consiga una forma esférica y homogénea.

De todas las configuraciones que se han analizado, se corrobora que la variable más influyente es la del diámetro de los capilares, la cual es la que permite más variación del tamaño de las microcápsulas. También está la variable de la elección del surfactante y la concentración que se debe añadir, que se ha visto que, a mayor concentración, más reducción del diámetro, pero sólo en el caso de los Tween. Por otro lado, están las variables de la agitación, y la altura entre la salida de la gota hasta la superficie de gelificación, las cuales influyen de manera más directa en conseguir una morfología esférica y homogénea de las microcápsulas. Cabe destacar que en algunos experimentos (en los capilares más pequeños, como los de PEEK) se producen obturaciones, así como cambios en la dirección del flujo, lo cual es debido a que se forman grandes diferencias de presiones entre los capilares, ya que se produce una reducción de la sección por la que pasa el fluido.

2.2. Parámetros optimizados para la síntesis controlada de microcápsulas

Tras obtener los resultados de los tamaños de microcápsulas que se obtienen bajo el efecto de diferentes parámetros, se concluye que las mejores características para realizar la síntesis son las siguientes:

- Sistema de flujo 5 (fase líquido-líquido), el cual es el único que ha dado una aproximación de los resultados que se buscaban.
- Las concentraciones de los compuestos químicos son de 1% w/w de alginato y 1.5% w/w de CaCl_2 .
- El capilar 3, cuyas dimensiones son 1.59 mm de diámetro exterior y 1.02 mm de diámetro interior.
- La adición de agitación alrededor de 200 rpm.
- El surfactante que más ha favorecido la síntesis es el Tween 20 con 20% w/w, el cual se añadirá al alginato.
- La mejor altura entre el orificio y la superficie de gelificación del CaCl_2 es en torno a 2 cm.
- El caudal elegido para poner en las bombas es de 100 – 150 $\mu\text{l}/\text{min}$, siendo suficiente para la separación entre gotas.

Por tanto, estos serán los parámetros que se utilicen en los posteriores experimentos para la encapsulación celular, ya que reproducen unas microcápsulas con el menor tamaño posible, una morfología esférica y una reproducibilidad sin problemas (ver ilustración 21). En la ilustración

22 se muestra el histograma de los valores del diámetro de las microcápsulas de las tres pruebas de reproducibilidad con las características óptimas.

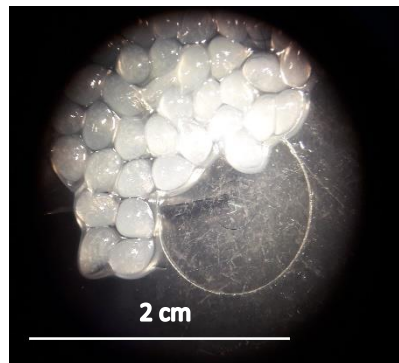


Ilustración 21. Fotografía de las microcápsulas tomada desde un microscopio óptico.

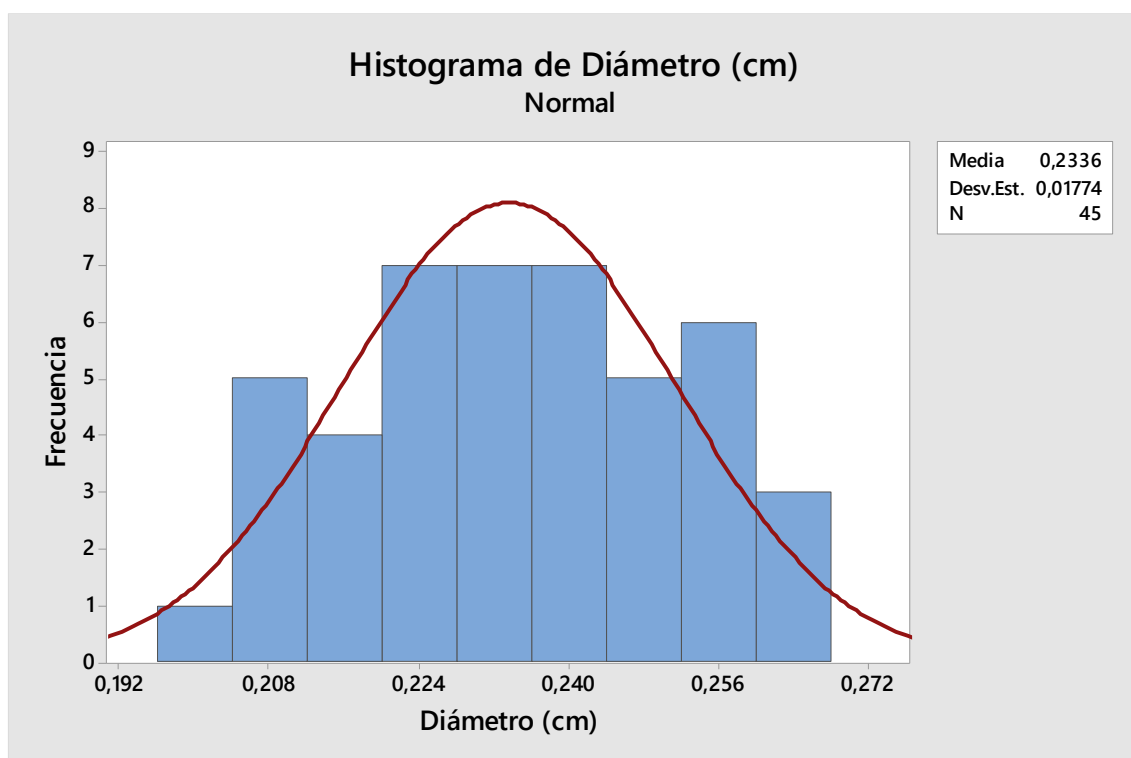


Ilustración 22. Histograma de las medidas del diámetro (cm) de cada una de las tres pruebas con los parámetros óptimos.

3. Resultados del estudio de permeabilidad de las microcápsulas

Para el estudio de la permeabilidad de las microcápsulas, se han llevado a cabo diferentes experimentos que se basan en la cinética de liberación de cada uno de los materiales a encapsular (FITC-Dextrano, FITC-Albúmina y AuNP) a través de los poros que deja la reticulación de alginato en su pared a lo largo de toda su estructura interna. Como se sabe cuál es el tamaño de las moléculas y nanopartículas, se obtendrá un valor aproximado del valor de los poros internos de las microcápsulas.

En el caso de las moléculas de FITC-Dextrano y FITC-Albúmina, estas emiten fluorescencia, por lo que se utilizará el fluorímetro para hacer un seguimiento de su liberación. Se observa que

tienen un espectro máximo de emisión alrededor de los 520 nm, tal y como se muestra en la siguiente ilustración:

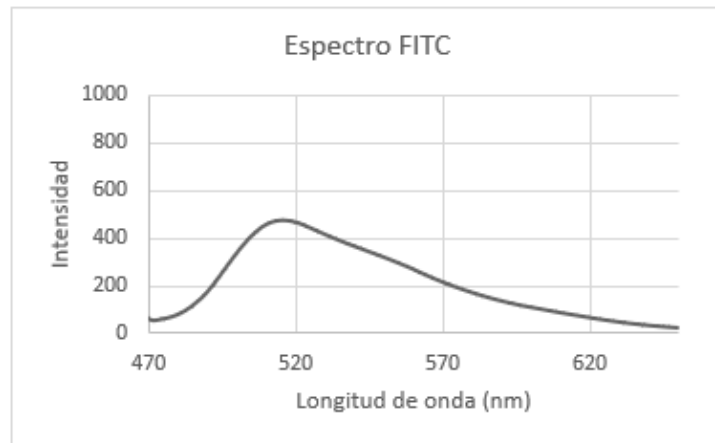


Ilustración 23. Espectro de emisión de la molécula isotiocianato de fluoresceína.

A continuación, se presenta la cinética de liberación de las moléculas de FITC-Dextrano y FITC-Albúmina para tiempos inferiores a 5 horas, cuya gráfica corresponde a la ilustración 24. Los resultados que se obtienen son que las moléculas de bajo peso molecular son las que más se liberan al medio, debido a que los poros de las microcápsulas son más grandes. Por el contrario, las de alto y medio peso molecular se quedan atrapadas y apenas muestran concentración en el medio. El FITC conjugado con albúmina presenta una liberación más controlada y lenta, puesto que sigue aumentando a medida que el tiempo pasa. Por tanto, se concluye que el tamaño de poros de las microcápsulas estará alrededor de los 6 nm de diámetro (ver tabla de la sección 7 del anexo). Cabe destacar la barra de error tan grande del FITC-Dextrano de 4.000 kDa, lo cual puede ser debido a que se utilizan concentraciones muy bajas (del orden de mM) y al repetir el experimento para hacer varios ensayos de reproducibilidad, puede haber pequeñas desviaciones al intentar realizar las mismas mediciones de concentraciones o al preparar las mismas concentraciones.

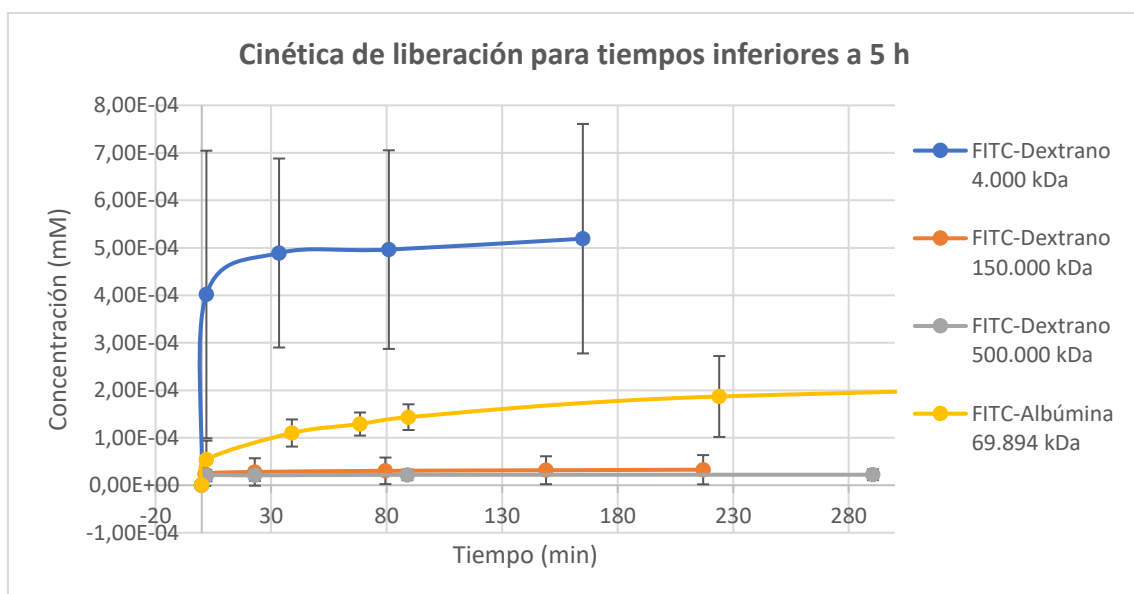


Ilustración 24. Gráfica de la cinética de liberación para tiempos inferiores a 5 horas.

También se realiza un estudio de la cinética de liberación para periodos de tiempos largos, de casi un mes. En este caso, se descarta el FITC-Dextrano de peso molecular 150.000 kDa, ya que el resultado es semejante al de mayor peso molecular de 500.000 kDa. Los resultados se muestran en la ilustración 25, en cuya gráfica de cinética de liberación se vuelve a observar el mismo efecto que para tiempos cortos, es decir, las moléculas de bajo peso molecular se liberan rápidamente al medio, mientras que las de alto peso molecular, se quedan atrapadas en el interior, ya que los poros son más pequeños que las moléculas. El efecto más destacable es el del FITC-Albúmina, que sigue liberando lentamente durante 20 días aproximadamente hasta que se llega a saturar. También se observa una caída de concentración durante los últimos 10 días, lo cual es debido probablemente a que la molécula fluorescente se está empezando a degradar y por tanto el contenido disminuye.

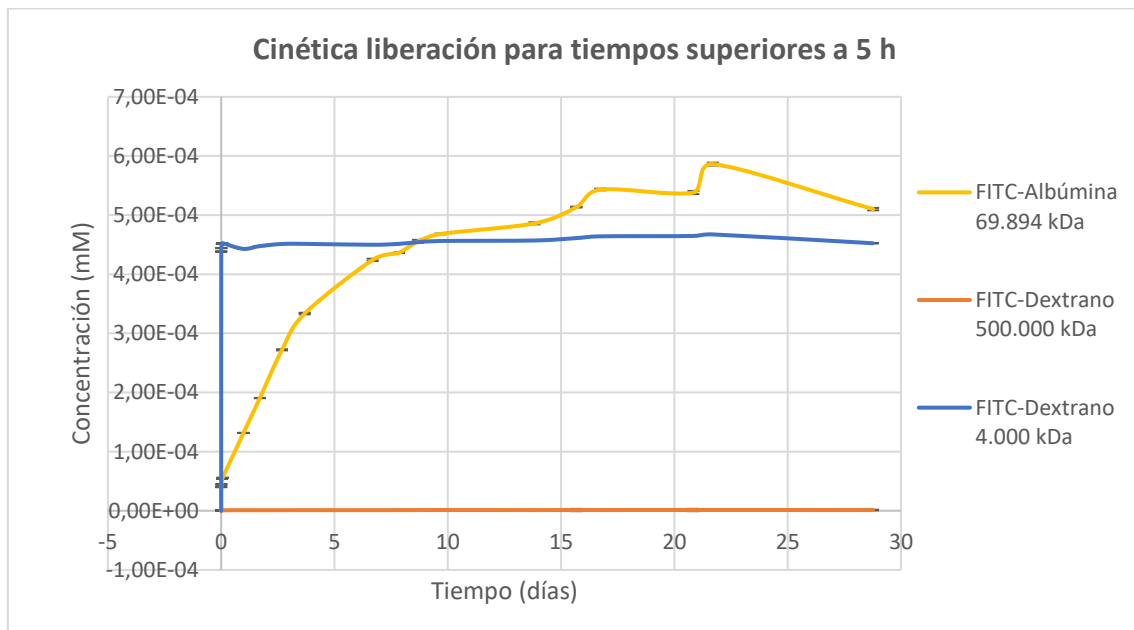


Ilustración 25. Gráfica de la cinética de liberación para tiempos superiores a 5 horas.

Por otro lado, se analizan los resultados de los experimentos de liberación de las AuNP, en cuyo caso se hace el seguimiento con el UV-VIS que mide la radiación absorbida. El espectro de estas nanopartículas de nuevo tiene un máximo de absorbancia característico a 520 nm, tal y como se muestra en la ilustración 26.

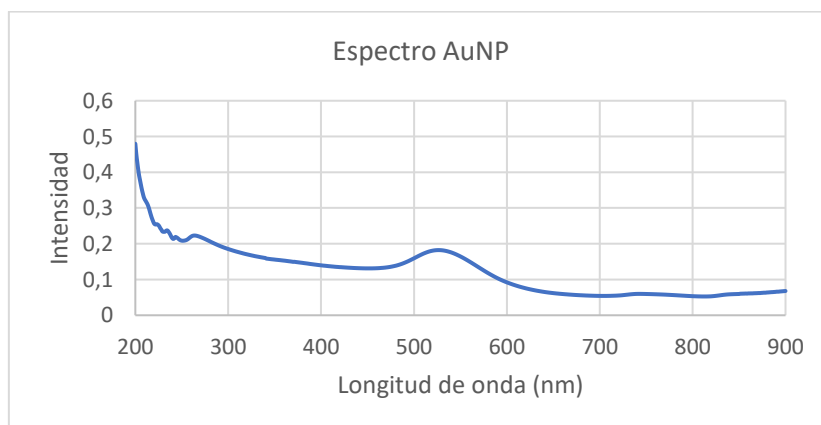


Ilustración 26. Espectro de las AuNP en el UV-Vis.

Para el estudio de la influencia del tiempo de gelificación, se crean diferentes muestras de microcápsulas: unas que han estado gelificando 1 hora (T1) y otras durante 20 minutos (T2). Los resultados de la síntesis se muestran en la ilustración 27.

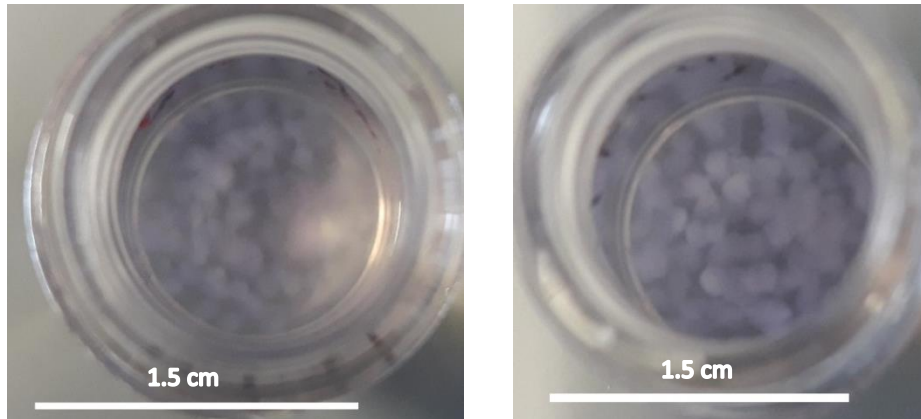


Ilustración 27. Fotografías de los resultados obtenidos tras el experimento de tiempo de encapsulación. La primera imagen representa a las microcápsulas que han estado gelificando durante 1 hora y la segunda imagen las que han estado gelificando durante 20 minutos.

A continuación, se muestra el espectro de ambos experimentos para la medida inicial y final:

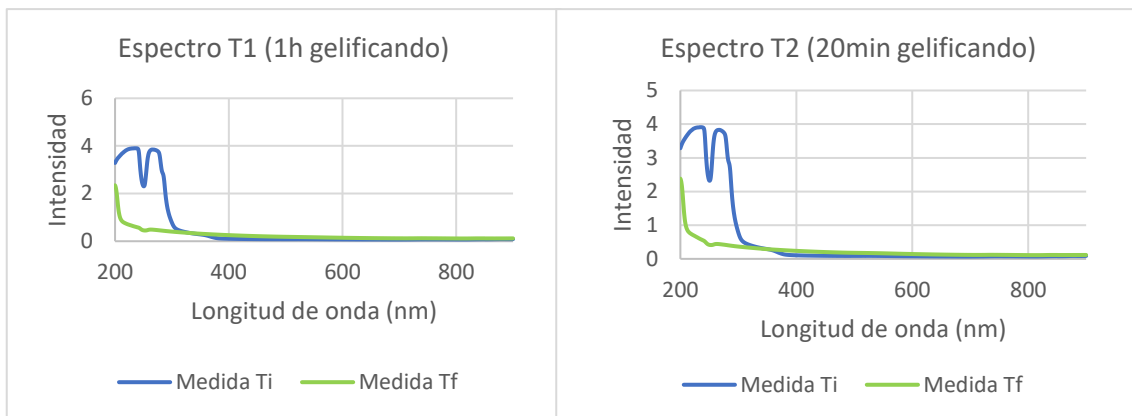


Ilustración 28. Espectros de las microcápsulas al inicio y al final del experimento.

En la ilustración 29 se muestran los resultados y se observa que no hay presencia de absorbancia a 520 nm por lo que no hay liberación de nanopartículas y en consecuencia siguen encapsuladas en su interior durante 14 días. Además, no se observa diferencia entre microcápsulas en cuanto al tiempo de gelificación. El UV-Vis alcanza la saturación al llegar a un valor de 7 de intensidad y en el caso de las AuNP la intensidad que muestran es prácticamente despreciable.

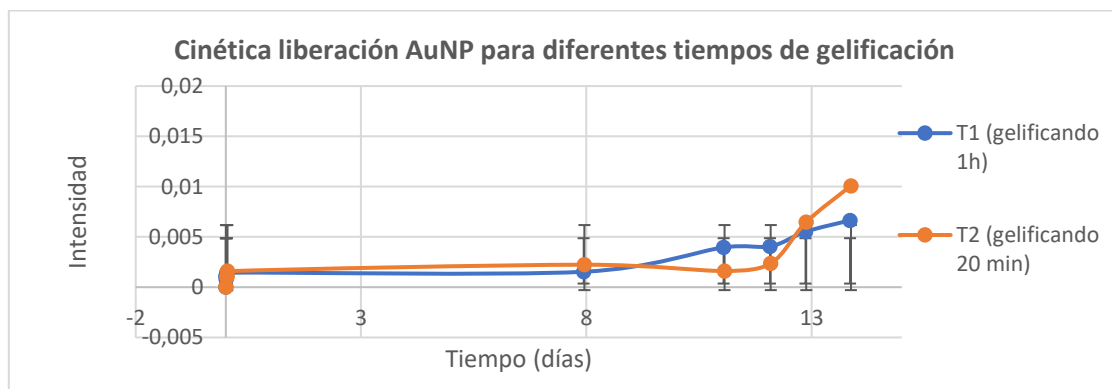


Ilustración 29. Cinética de liberación de las AuNP tras estar gelificando 1 hora y 20 minutos, respectivamente.

A continuación, se muestran los resultados del experimento de la cinética de liberación de las AuNP durante una semana. El conjunto de imágenes de la ilustración 30 corresponde a la síntesis de las microcápsulas que contienen AuNP. Se observa que a medida que van gelificando, las AuNP se van repartiendo alrededor de las microcápsulas, sin llegar a salir.

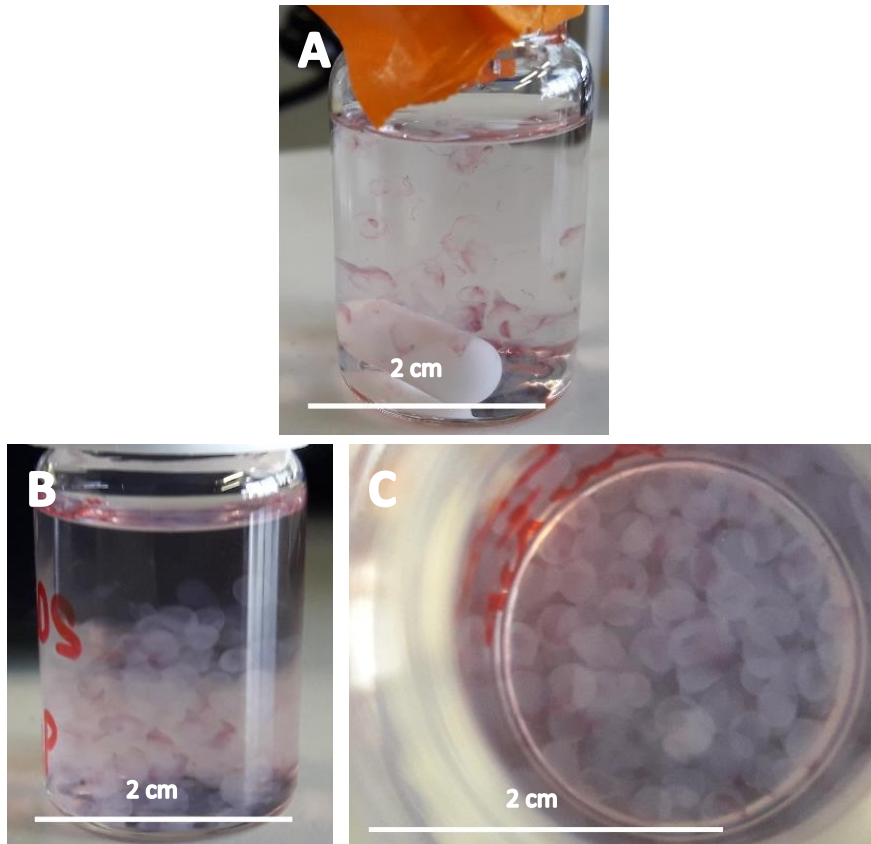


Ilustración 30. Fotografías de las microcápsulas al encapsular las AuNP (A) y tras 7 días (B)(C).

El espectro que se muestra en la ilustración 31 corrobora que no existe ningún pico de absorbancia alrededor de 520 nm, y que simplemente aumenta la línea de base, por lo que se concluye que durante una semana las AuNP permanecen dentro de las microcápsulas. En la gráfica de la cinética de liberación (Ilustración 32), se observa que la intensidad de absorbancia de las nanopartículas en el medio es prácticamente nula. Las AuNP tienen un tamaño de 15 nm de diámetro, por lo que se quedan atrapadas en el interior puesto que los poros de las microcápsulas son más pequeños.

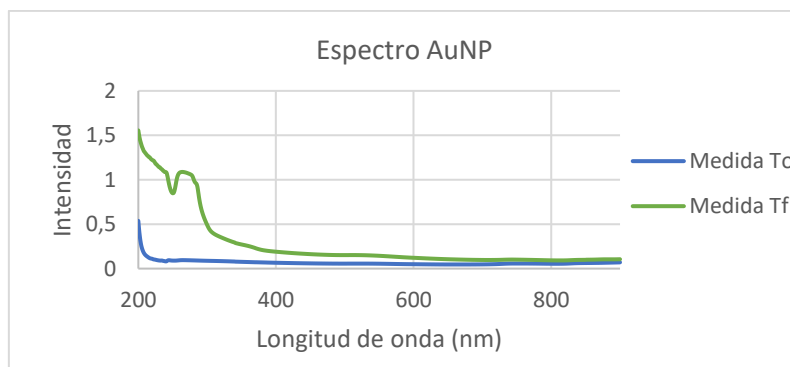


Ilustración 31. Espectros de las microcápsulas al inicio y al final del experimento.

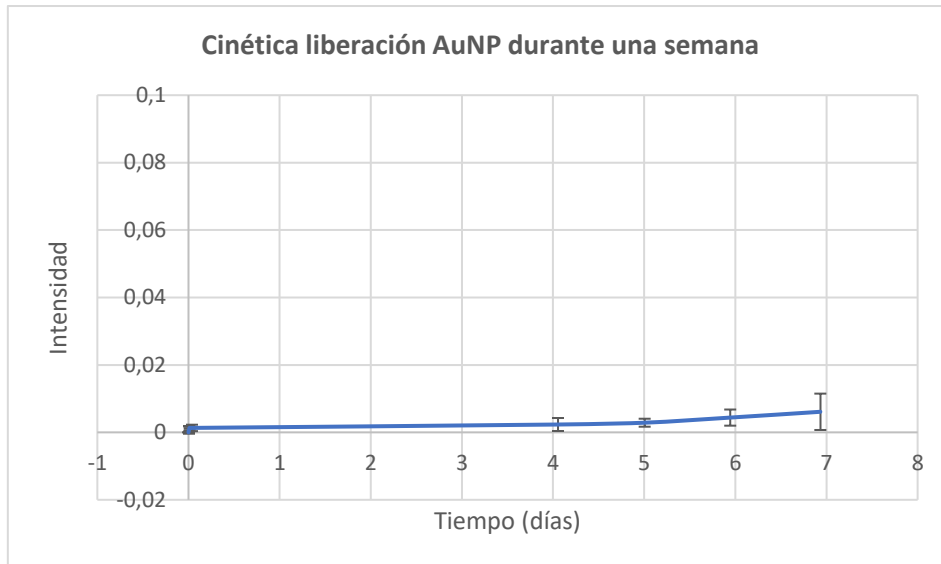


Ilustración 32. Cinética de liberación de las AuNP tras una semana.

Finalmente se analizan las microcápsulas obtenidas tras la encapsulación del medio de cultivo DMEM, cuya síntesis ha concluido ser viable, puesto que en principio no hay ningún problema de degradación. El diámetro medio obtenido de estas microcápsulas es ligeramente superior al obtenido en las pruebas de mejora de síntesis, tal y como se muestra en la tabla 6. Esto puede ser debido a que el DMEM presenta sodio en su composición y podría afectar a que no haya un buen intercambio de iones divalentes y, por tanto, una morfología no tan homogénea.

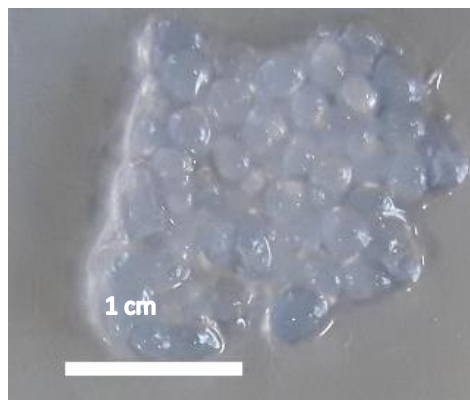


Ilustración 33. Microcápsulas tras el ensayo de viabilidad del DMEM.

Diámetro \pm sd (cm) con DMEM	Diámetro \pm sd (cm) media general
0.2549 \pm 0.0223	0.2336 \pm 0.0177

Tabla 6. Comparación de la media del diámetro (cm) obtenido de las microcápsulas con DMEM y el diámetro (cm) de las microcápsulas con los parámetros optimizados.

Otros resultados obtenidos son las imágenes generadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) de las microcápsulas que contienen AuNP y el recubrimiento de PLGA y acetona. A continuación, se observa en la ilustración 34 la presencia de estas nanopartículas encapsuladas en el interior de la muestra tras 14 días.

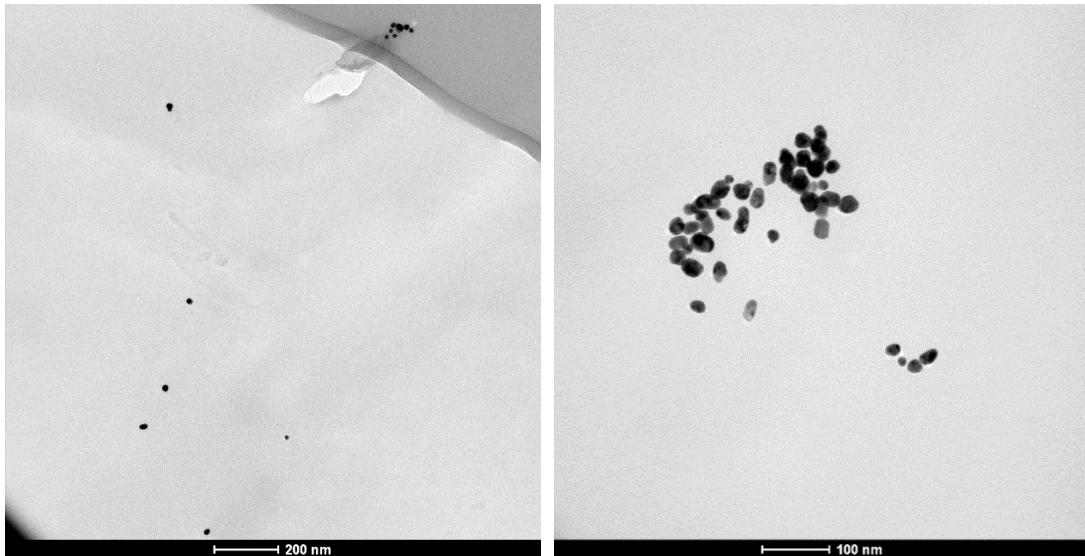


Ilustración 34. Imágenes del microscopio electrónico de transmisión (TEM) que muestra las AuNP en el interior de las microcápsulas.

4. Imágenes del Cryo-SEM para el análisis de la estructura interna y permeabilidad de las microcápsulas.

Para caracterizar la estructura interna de las microcápsulas, se realiza un cryo-corte y se analiza su superficie mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) habiendo criogenizado previamente las microcápsulas con nitrógeno líquido. El experimento se realizó con una serie de microcápsulas las cuales se sintetizaron con los parámetros óptimos establecidos.

Las imágenes muestran que las microcápsulas están formadas por una serie de capas, las cuales tienen unas celdillas entre ellas (ilustración 35). Cada una de esas capas es la que actúa como barrera para favorecer potencialmente una liberación controlada dependiendo del fármaco que se quiera encapsular. De la misma forma, estas capas son las que ayudan a evitar la entrada de las inmunoglobulinas y que las células encapsuladas en las microcápsulas fueran reconocidas como extrañas. Los poros o celdas son mayores a medida que se acerca a la superficie de la microcápsula debido a la gelificación externa [49].

También se realiza un EDS/EDX (ilustración 36) para analizar los materiales que se encuentran en la superficie del cryo-corte. El análisis se realiza en el centro de la microcápsula y se observa la presencia de Ca^{2+} y Cl, los cuales derivan de la síntesis y Pt que proviene del recubrimiento que se realiza en la superficie, ya que es un material conductor, posteriormente después de hacer el cryo-corte.

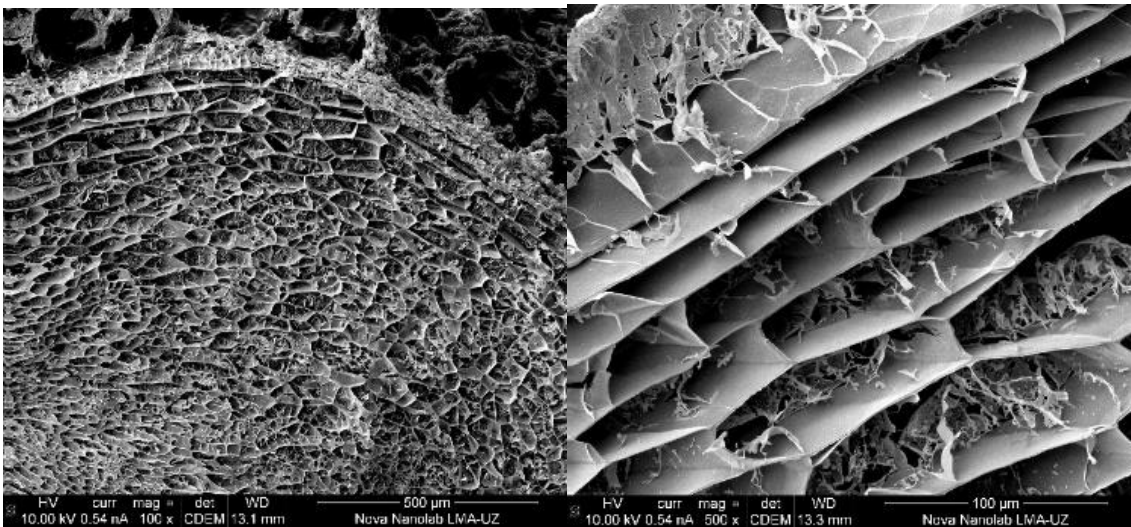
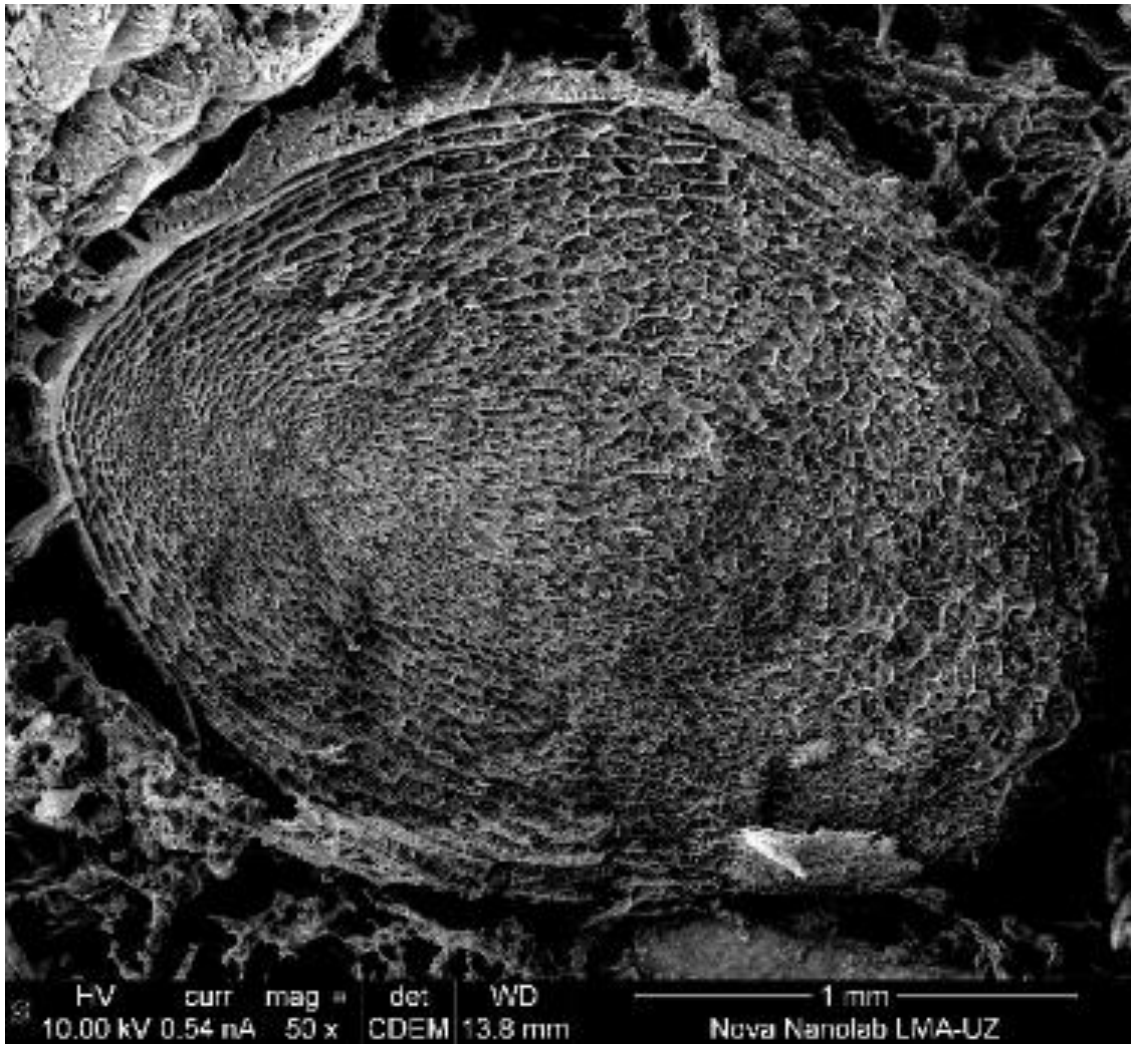


Ilustración 35. Imágenes tomadas por el cryo-SEM (criogenización - microscopía electrónica de barrido) para analizar la estructura interna.

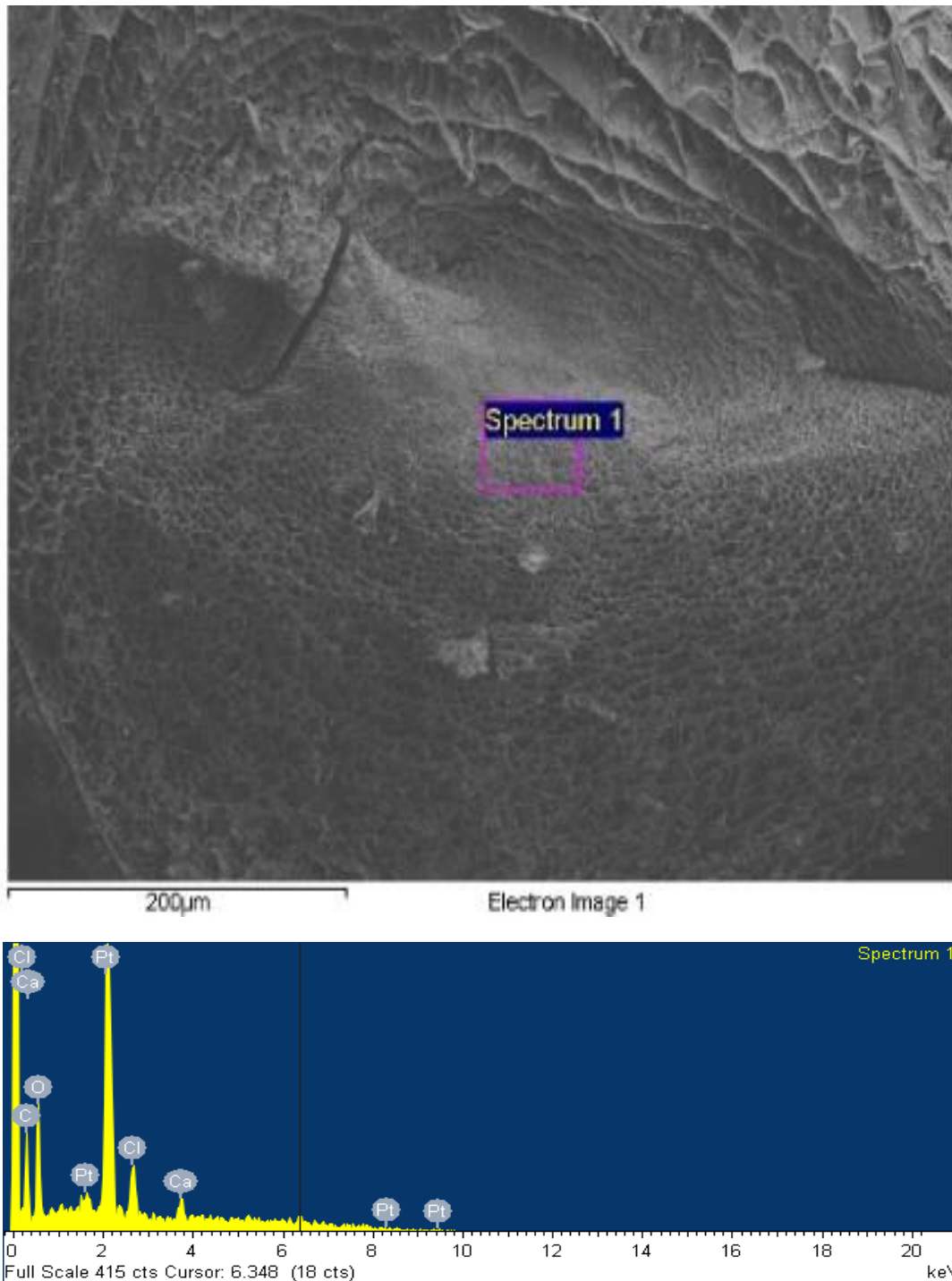


Ilustración 36. Resultados obtenidos tras el EDS.

Otra prueba que se realizó con el microscopio Cryo-SEM consistía en obtener un análisis más detallado de la estructura de las microcápsulas del experimento en el que se encapsula en el interior PLGA y que actúe como barrera para evitar la permeación de las AuNP.

La ilustración 37 nos muestra una serie de imágenes en las que la primera representa la microcápsula cortada por la mitad, en la que se observa una capa más gruesa alrededor de la microcápsula, cuya ampliación se muestra mejor en la segunda imagen. La tercera imagen muestra que se siguen creando una especie de poros en los que las capas más cercanas a la superficie presentan mayores tamaños.

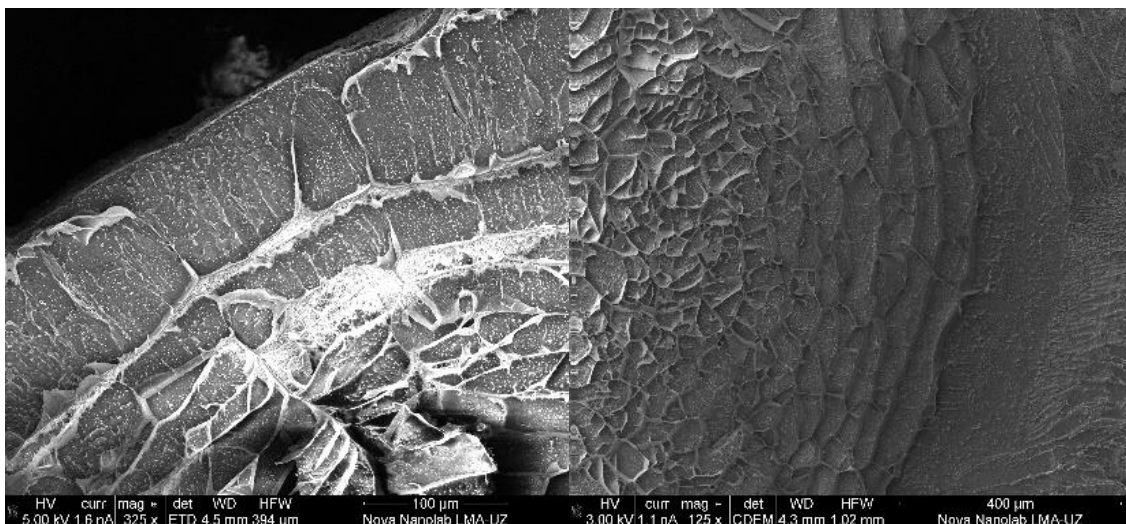
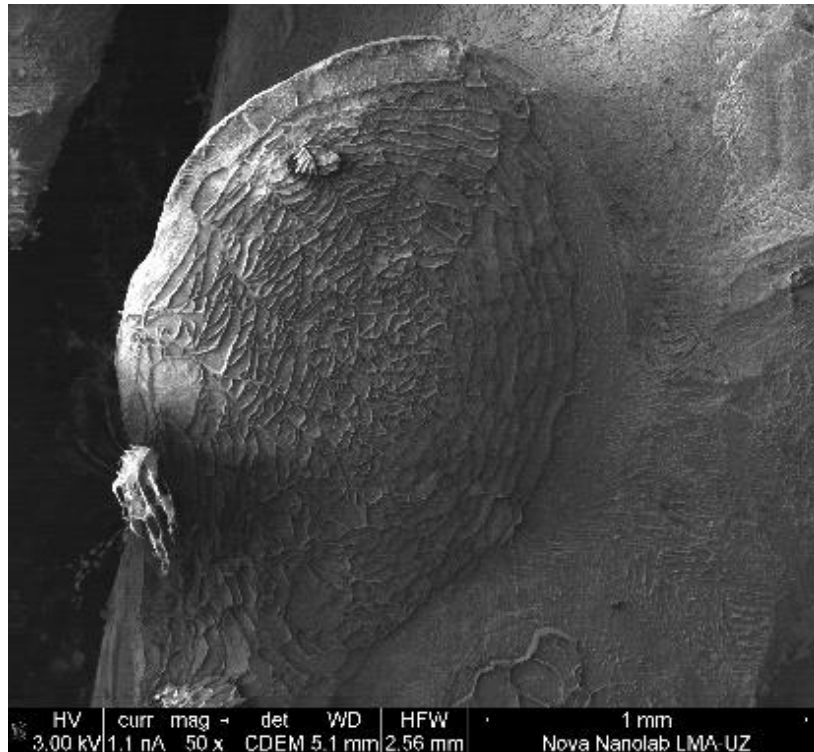


Ilustración 37. Imágenes tomadas por el cryo-SEM (criogenización - microscopía electrónica de barrido) para analizar la estructura del experimento con PLGA.

5. Resultados del ensayo de citotoxicidad celular de las microcápsulas

De acuerdo con la regulación de la *ISO standard 10.993-5 "Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity"* se considera que una viabilidad en torno al 70% es no citotóxica.

Los resultados obtenidos se encuentran en las gráficas siguientes (ilustraciones 38 y 39), en las que se observa que hasta 0.1 mg/ml de alginato es viable y que los exudados que estas liberan no son tóxicos hasta los 25 mg/ml.

Estos resultados se dan por negativos, ya que las concentraciones que se han añadido a ambas líneas celulares son bajas, por lo que se concluye que se debería modificar la composición química de las microcápsulas con el fin de obtener menos citotoxicidad.

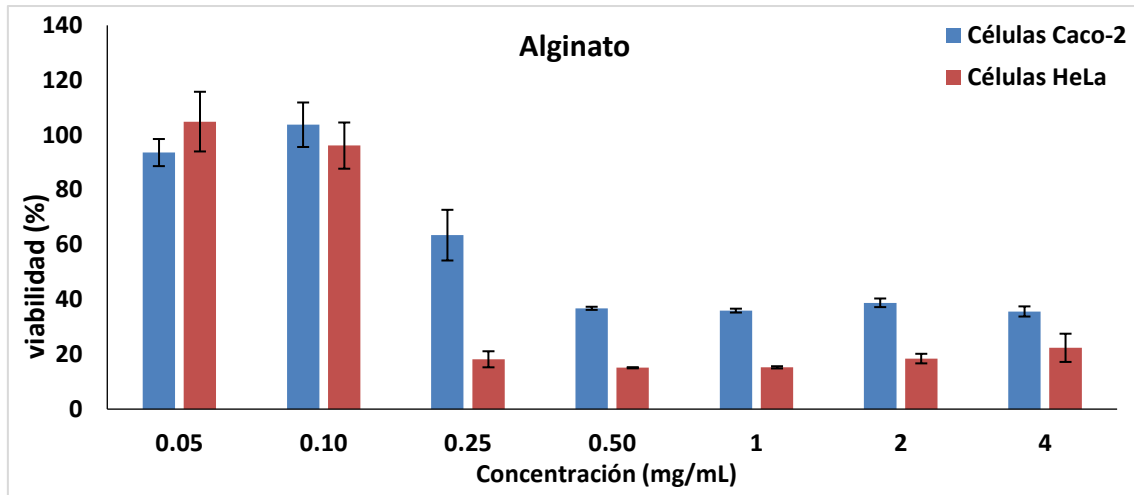


Ilustración 38. Gráfica de viabilidad celular de la disolución de alginato en un medio celular.

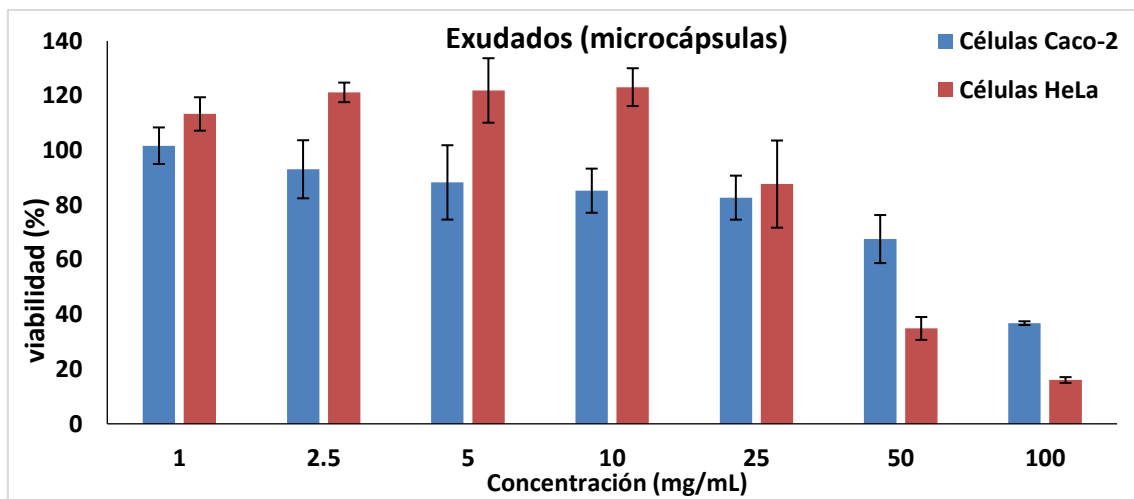


Ilustración 39. Gráfica de la viabilidad celular de los exudados de las microcápsulas en un medio celular.

Por otro lado, también se observó que al poner en las microcápsulas de alginato en DMEM, cambiaban su morfología con el tiempo llegándose a degradar. Esto se debe a que el medio de cultivo tiene alto contenido en sodio, por lo que el proceso de reticulación se vuelve reversible debido a ponerse en contacto con gran cantidad de sodio y por tanto se libera el calcio. La ilustración 40 representa las microcápsulas de alginato tras estar en DMEM tras 48h. En este proceso de degradación, también se puede ver influenciado por la presencia de alta cantidad de surfactante (Tween 20 con 20 % w/w), ya que puede producir la ruptura de la membrana celular.

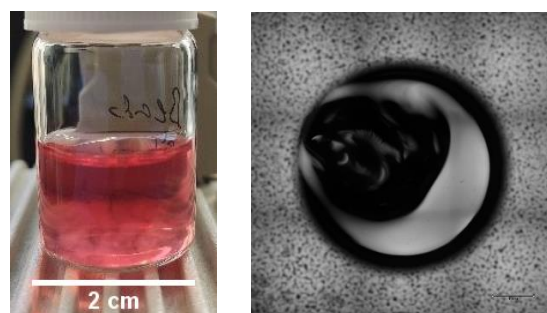


Ilustración 40. Fotografías de la degradación de las microcápsulas de alginato en DMEM.

DISCUSIÓN

Desde hace décadas, se han conseguido grandes avances en la microencapsulación de células que han permitido alcanzar un amplio rango de enfermedades a las que se puede aplicar una terapia con dicha terapia celular [50]. Estos avances se ven reforzados, entre otros, por el uso de la tecnología de microfluidos, la cual permite un mayor control y precisión en la síntesis de materiales [3].

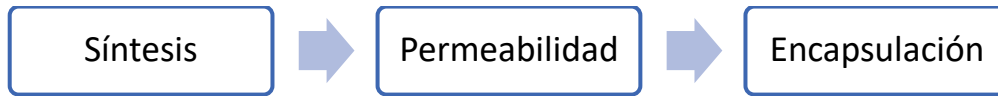


Ilustración 41. Esquema de las tres fases de la investigación.

Uno de los objetivos de este trabajo era conseguir sintetizar las microcápsulas de forma que se consiguiese una morfología esférica uniforme, de reducido tamaño, biocompatible y permeable, para poder encapsular posteriormente células como una posible aplicación en biomedicina [51]. Los parámetros considerados como influyentes en la síntesis de las microcápsulas fueron analizados de forma que se consiguieron reproducir las características más importantes: menor tamaño, forma uniforme, síntesis simple y rápida, etc. Cabe destacar que las microcápsulas sintetizadas son relativamente grandes comparadas con las que se producen en la mayoría de las investigaciones con técnicas de microfluidica, que son del orden de las decenas o centenas de nanómetros. Esto es debido porque se suelen utilizar chips de microfluidica o capilares con dimensiones más pequeñas, pero en nuestro caso, no ha sido posible.

Otro punto de gran importancia era estudiar la permeabilidad de las microcápsulas, ya que, al encapsular células, se requiere que haya comunicación con el medio exterior para intercambiar nutrientes sin que sean detectadas por el sistema inmune, además de poder liberar los compuestos terapéuticos generados por las células presentes en su interior [49]. El estudio de permeabilidad demuestra que las microcápsulas contienen poros y que su estructura interna está compuesta por diversas capas, las cuales actúan como barreras. El apartado de cinética de liberación determina que los nanoporos de las capas tienen un tamaño alrededor de 6 nm, puesto que los materiales cuyo tamaño era mayor quedaban atrapados, mientras que si eran menores se liberaban al medio. Del estudio con los dextranos y la albúmina también se deduce que los poros de las estructuras sintetizadas tienen un tamaño menor que el de la mayor parte de las inmunoglobulinas por lo que su reconocimiento sería impedido. Por otro lado, se observa que las microcápsulas permanecen estables durante al menos 10 días, que es cuando se empieza a degradar poco a poco las capas, ya que en las gráficas de liberación se observa que, a partir de ese punto, los resultados difieren dando grandes variaciones en los valores de las concentraciones.

La citotoxicidad es una prueba que se recomienda realizar previamente de la encapsulación, para analizar el comportamiento de los componentes químicos de las microcápsulas frente a líneas celulares estándar. Al llegar a este punto de experimentos *in vitro*, se comprobó que la viabilidad celular era prácticamente nula, por lo que no fue posible reproducir el ensayo de encapsulación ya que las concentraciones para las que era viable el experimento eran muy bajas.

Este resultado negativo puede que provenga del problema que podía originar el medio de cultivo DMEM debido a su gran cantidad de sodio en su composición y revertir el efecto de la

gelificación, por lo que las microcápsulas se empezarán a degradar [52]. También podría influir el origen del alginato, es decir, que de la marca *Sigma Aldrich*[®] no sea la más apropiada y que pueda contener algún compuesto tóxico, ya que las composiciones pueden variar entre marcas. La tercera hipótesis que se hace frente a este resultado es que el surfactante que se añade al alginato, el Tween 20, presenta una elevada concentración, por lo que podría ocasionar la ruptura de la membrana celular actuando como detergente.

CONCLUSIONES

El trabajo desarrollado pretende profundizar sobre la encapsulación celular, una técnica que se ha visto que tiene grandes expectativas en medicina regenerativa [53], liberación de fármacos [1], terapia contra el cáncer [2], etc., basándose en la tecnología de microfluidos, la cual aporta, respecto de la síntesis tradicional discontinua, un mayor control del tamaño, forma, utiliza pequeñas cantidades de materiales, etc. [3]. El trabajo se compone de tres fases:

- La síntesis de las microcápsulas con los parámetros óptimos que mayor control aportan. Se analizan diferentes sistemas de flujo para la formación de microcápsulas en continuo, así como los parámetros considerados como los más influyentes en la síntesis.
- El estudio de la permeabilidad de las microcápsulas para obtener un mayor control en el momento de la encapsulación celular y poder conocer otras posibles aplicaciones que se podrían realizar.
- La encapsulación celular con las microcápsulas más favorables y analizar su viabilidad.

La investigación llevada a cabo permite aprender cómo controlar una síntesis de microcápsulas de alginato mediante tecnología microfluidica, así como algunos de los parámetros para tener en cuenta para obtener una adecuada morfología y tamaño. Por otro lado, proporciona conocimientos sobre la importancia de la permeación de estas microcápsulas para la aplicación final (encapsular células) y posibilita llegar a cuantificar la porosidad de las membranas mediante la encapsulación de diferentes moléculas o nanopartículas. La parte negativa es que al llegar a la experimentación *in vitro*, no se pudo realizar el experimento de la encapsulación celular, puesto que la toxicidad de los materiales era relativamente alta.

La citotoxicidad tan elevada provoca que se tenga que volver a reformular la síntesis de estas microcápsulas. Se cree que la toxicidad puede provenir del surfactante, del ácido algínico o de la degradación de las microcápsulas al ponerlas en DMEM. Los futuros estudios posibles se centrarán en producir microcápsulas de alginato que sean compatibles con el entorno celular. También se podría investigar sobre cómo conseguir un tamaño más reducido de las microcápsulas y bajar un orden de magnitud en la escala.

Como valoración personal, destaco que el trabajo me ha permitido conocer el mundo de la nanotecnología para aplicaciones en biomedicina. Esta tecnología abarca diferentes disciplinas científicas, desde la biología celular, hasta el uso de herramientas de ingeniería, por lo que aporta gran variedad de conocimientos. También me ha permitido explorar la cantidad de avances que hay hoy en día para tratar diferentes enfermedades y, por tanto, ser optimista de que algún día estos métodos de terapia puedan estar regulados en el mercado y ayuden a combatir las enfermedades que más afectan a la población.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Sugiura, T. Oda, Y. Izumida, and Y. Aoyagi, "Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array," *Biomaterials*, no. 26, pp. 3327–3331, 2005. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.08.029
- [2] I. H. El-sayed, X. Huang, and M. A. El-sayed, "Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles," *Cancer Lett.*, vol. 239, pp. 129–135, 2006. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.07.035
- [3] S. Teh, R. Lin, L. Hung, and A. P. Lee, "Droplet microfluidics," *Lab Chip*, no. 8, pp. 198–220, 2008. DOI: 10.1039/b715524g
- [4] J. Zhu, "Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds," *Expert Rev. Ltd*, vol. 8, no. 5, pp. 607–626, 2011. DOI: 10.1586/ERD.11.27
- [5] N. E. Fedorovich, J. Alblas, J. R. D. W. Wijn, H. Wim, V. Ab, and D. Wouter JA, "Tissue Engineering : State-of-the-Art and Novel Application in Organ Printing," *Tissue Eng.*, vol. 13, no. 8, pp. 1905–1925, 2007. DOI: 10.1089/ten.2006.0175
- [6] J. Li and D. J. Mooney, "Designing hydrogels for controlled drug delivery," *Nat. Rev. Mater.*, vol. 1, pp. 1–17, 2016. DOI: 10.1038/natrevmats.2016.71
- [7] C. Demitri, F. Scalera, M. Madaghiele, A. Sannino, and A. Maffezzoli, "Potential of Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels as Water Reservoir in Agriculture," *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2013, pp. 1–6, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/435073>
- [8] I. A. Katime, "Materiales inteligentes: hidrogeles macromoleculares. Algunas aplicaciones biomédicas.," *Real Soc. Española Química*, vol. 1, no. 1, pp. 35–50, 2004.
- [9] A. Arredondo, "Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos," *Rev. Ing. Biomédica*, vol. 3, no. 5, pp. 83–94, 2009.
- [10] M. Calvo, "Alginato," *Universidad de Zaragoza*. [Online], (Accesed: September 2019). Available: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/alginato.html>.
- [11] S. Li, "Controllable Preparation of Monodispersed Calcium Alginate Microbeads in a Novel Microfluidic System," *Wiley Intersci.*, no. 8, pp. 1223–1226, 2008. DOI: 10.1002/ceat.200800027
- [12] G. Kaklamani, D. Cheneler, L. M. Grover, M. J. Adams, and J. Bowen, "Mechanical properties of alginate hydrogels manufactured using external gelation," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 36, pp. 135–142, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2014.04.013>
- [13] S. M. A. Jabur, "Design and Optimisation of a Microfluidic System for Single Cell Encapsulation," University of Manchester, 2016.
- [14] Y. Liu, N. Tottori, and T. Nisisako, "Chemical Microfluidic synthesis of highly spherical calcium alginate hydrogels based on external gelation using an emulsion reactant," *Sensors Actuators B*, vol. 283, pp. 802–809, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.12.101>
- [15] J. Shin, "Evaluation of Calcium Alginate Microparticles Prepared Using a Novel Nebulized Aerosol Mediated Interfacial Crosslinking Method," 2016.
- [16] J. Zimmerberg, F. S. Cohen, and A. Finkelstein, "Microencapsulated Islets as Bioartificial Endocrine Pancreas," *Science*, vol. 210, no. 21, pp. 3–5, 1980. DOI: 9080036-

8075/80/1121-0908

- [17] J. Koo and T. M. S. Chang, "Secretion of erythropoietin from microencapsulated rat kidney cells : preliminary results," *Int. J. Artif. Organs*, vol. 16, no. 7, pp. 557–560, 1993. DOI: 0391-3988/557-04
- [18] P. L. CHANG, N. SHEN, and A. J. WESTCOTT, "Delivery of Recombinant Gene Products with Microencapsulated Cells In Vivo," *Hum. Gene Ther.*, vol. 440, no. 4, pp. 433–440, 1993.
- [19] P. Novo and D. Janasek, "Analytica Chimica Acta Current advances and challenges in micro fluidic free- flow electrophoresis d A critical review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 991, pp. 9–29, 2017. DOI: 10.1016/j.aca.2017.08.017
- [20] A. S.- Phelps, "Modelling cancer in microfluidic," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 19, no. February, 2019. DOI: 10.1038/s41568-018-0104-6
- [21] M. Papageorgiou, S. Kasapis, and M. G. Gothard, "Structural and textural properties of calcium induced , hot-made alginate gels," *Carbohydr. Polym.*, no. 24, pp. 199–207, 1994. DOI: 0144-8617/94
- [22] S. Abang, E. Chan, and D. Poncelet, "Effects of process variables on the encapsulation of oil in ca-alginate capsules using an inverse gelation technique," *J. Microencapsul.*, vol. 29, no. 5, pp. 417–428, 2012. DOI: 10.3109/02652048.2012.655331
- [23] M. He, Y. Zhao, J. Duan, Z. Wang, Y. Chen, and L. Zhang, "Fast Contact of Solid – Liquid Interface Created High Strength Multi- Layered Cellulose Hydrogels with Controllable Size," *Appl. Mater. Interfaces*, no. 6, pp. 1872–1878, 2014. DOI: 10.1021/am404855q
- [24] M. Seo *et al.*, "Continuous Microfluidic Reactors for Polymer Particles," *Langmuir*, no. 3, pp. 11614–11622, 2005. DOI: 10.1021/la050519e
- [25] A. K. Andriola, S. Brun-graepi, C. Richard, M. Bessodes, D. Scherman, and O. Merten, "Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers," *J. Control. release*, vol. 149, no. 3, pp. 209–224, 2011. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.09.023
- [26] E. Æ. Amici, C. P. De Torres, and F. Jousse, "Alginate gelation in microfluidic channels," *Food Hydrocoll.*, no. 22, pp. 97–104, 2008. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2007.01.022
- [27] A. M. CERDEIRA, L. F. GOUVEIA, P. GOUCHA, and A. J. ALMEIDA, "Drug particle size influence on enteric beads produced by a droplet extrusion /precipitation method," *J. Microencapsul.*, vol. 17, no. 6, pp. 733–741, 2000.
- [28] M. I. Ré, "Drying Technology : An International Journal," *Dry. Technol.*, vol. 16, no. 6, pp. 1195–1236, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/07373939808917460>
- [29] V. S. Cabeza, S. Kuhn, A. A. Kulkarni, and K. F. Jensen, "Size-Controlled Flow Synthesis of Gold Nanoparticles Using a Segmented Flow Micro fluidic Platform," *Langmuir*, vol. 28, p. 7007–7013, 2012. DOI: dx.doi.org/10.1021/la205131e
- [30] X. Ji, S. Guo, C. Zeng, and L. Zhang, "RSC Advances Continuous generation of alginate micro fi bers with spindle-knots by using a simple micro fl uidic device," *R. Soc. Chem.*, no. 5, pp. 2517–2522, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA10389K>
- [31] C. Holtze, "Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions," *Lab Chip*, vol. 197, no. 207890, pp. 1632–1639, 2008. DOI: 10.1039/b806706f
- [32] B. Herranz-blanco, E. Ginestar, H. Zhang, J. Hirvonen, and H. A. Santos, "Microfluidics platform for glass capillaries and its application in droplet and nanoparticle fabrication,"

- Int. J. Pharm.*, vol. 516, no. 1–2, pp. 100–105, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.024>
- [33] K. Bouchemal, S. Briançon, E. Perrier, and H. Fessi, “Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification : solvent , oil and surfactant optimisation,” *Int. J. Pharm.*, vol. 280, pp. 241–251, 2004. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.05.016
- [34] I. Shestopalov, J. D. Tice, and R. F. Ismagilov, “Multi-step synthesis of nanoparticles performed on millisecond time scale in a microfluidic droplet-based system,” *R. Soc. Chem.*, no. 4, pp. 316–321, 2004. DOI: 10.1039/b403378g
- [35] G. Fundueanu, C. Nastruzzi, A. Carpov, J. Desbrieres, and M. Rinaudo, “Physico-chemical characterization of Ca-alginate microparticles produced with different methods,” *Biomaterials*, vol. 20, pp. 1427–1435, 1999. DOI: 0142-9612/99
- [36] F. Mano, R. L. Reis, and L. Gasperini, “Natural polymers for the microencapsulation of cells,” *R. Soc. Interface*, no. 11, pp. 2133–4379, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0817>
- [37] D. W. Scharp and P. Marchetti, “Encapsulated islets for diabetes therapy : History, current progress, and critical issues requiring solution,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 67–68, pp. 35–73, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.018>
- [38] A. Gonzalez-pujana, E. Santos, G. Orive, J. Luis, and R. Maria, “Journal of Drug Delivery Science and Technology Cell microencapsulation technology : Current vision of its therapeutic potential through the administration routes,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 42, pp. 49–62, 2017. DOI: 10.1016/j.jddst.2017.03.028
- [39] K. Huang, T. Lai, and Y. Lin, “Manipulating the generation of Ca-alginate microspheres using microfluidic channels as a carrier of gold nanoparticles,” *R. Soc. Chem.*, no. 6, pp. 954–957, 2006. DOI: 10.1039/b606424h
- [40] S. Aldrich, “Product Information FITC-Dextran.” [Online], (Accesed: September 2019). Available:<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/fluorescein-isothiocyanate-dextran.html>.
- [41] T. Delivery, “Size matters : gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery,” *Futur. Sci.*, vol. 3, no. 4, pp. 457–478, 1990. DOI: 10.4155/TDE.12.21
- [42] D. Quong, R. J. Neufeld, and D. Poncelet, “External Versus Internal Source of Calcium During the Gelation of Alginate Beads for DNA Encapsulation,” *John Wiley Sons, Inc*, vol. 57, no. 4, pp. 438–446, 1998.
- [43] S. Al-qadi and C. Remuñán-lópez, “Nanopartículas metálicas: oro.”, (Accessed: September 2019), pp.223-248.
- [44] L. Dykman and N. Khlebtsov, “Chem Soc Rev Gold nanoparticles in biomedical applications : recent advances and perspectives to biological and medical,” *R. Soc. Chem.*, no. 41, pp. 2256–2282, 2012. DOI: 10.1039/c1cs15166e
- [45] A. N. A. Blandino, M. Macias, and D. Canter, “Formation of Calcium Alginate Gel Capsules : Influence of Sodium Alginate and CaCl₂ Concentration on Gelation Kinetics,” *J. og Biosci. Bioeng.*, vol. 88, no. 6, pp. 686–689, 1999.
- [46] I. C. C. Rueda, I. Vallejo, M. Corea, E. G. Palacios, “Degradation study of PLGA in chloroform. Revista Mexicana de Ingeniería Química,” *Rev. Mex. Ing. Química*, vol. 14, no. 3, pp. 813–827, 2015.

- [47] H. P. Erickson, "Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation , Gel Filtration , and Electron Microscopy," *Biol. Proced. Online*, vol. 11, no. 1, pp. 32–51, 2009. DOI: 10.1007/s12575-009-9008
- [48] R. Lehmann, C. Gallert, T. Roddelkopf, S. Junginger, A. Wree, and K. Thurow, "3 dimensional cell cultures : a comparison between manually and automatically produced alginate beads," *Springer*, 2015. DOI: 10.1007/s10616-015-9861-1
- [49] P. Sriamornsak, N. Thirawong, and K. Cheewatanakornkool, "Cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM) as a tool for studying the ultrastructure during bead formation by ionotropic gelation of calcium pectinate," *Int. J. Pharm.*, no. 352, pp. 115–122, 2008. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.10.038
- [50] M. F. A. Goosen, G. M. Oshea, H. M. Gharapetian, and A. M. Sun, "Optimization of Microencapsulation Parameters : Semipermeable Microcapsules as a Bioartificial Pancreas Microencapsulation of Living Cells," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 27, no. 1, pp. 140–150, 1984. DOI: 0006-3592/85/020146-0
- [51] L. Capretto, S. Mazzitelli, G. Luca, and C. Nastruzzi, "Acta Biomaterialia Preparation and characterization of polysaccharidic microbeads by a microfluidic technique : Application to the encapsulation of Sertoli cells," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 2, pp. 429–435, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.08.023>
- [52] N. C. Hunt, A. M. Smith, U. Gbureck, R. M. Shelton, and L. M. Grover, "Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 9, pp. 3649–3656, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.08.023>
- [53] I. Ghidoni, Æ. T. Chlapanidas, Æ. M. Bucco, M. Luisa, and T. Æ. Massimo, "Alginate cell encapsulation : new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine," *Springer*, no. 58, pp. 49–56, 2008. DOI: 10.1007/s10616-008-9161-0

ANEXOS

SECCIÓN 1. Características de los sistemas de flujo empleados en cada prueba.

A. SISTEMAS DE FLUJO DE FASE LÍQUIDO-LÍQUIDO

Características del sistema de flujo 1	
Material capilares	PTFE
Diámetro capilares	1.016 mm
Caudales bombas 1 – 2 (B1, B2)	0.25 ml/min – 0.5 ml/min

Tabla 7. Características del sistema de flujo 1.

Características del sistema de flujo 2_1	
Material capilares	PTFE
Diámetro capilares	1.016 mm
Caudales bombas 1 – 2 (B1, B2)	0.25 ml/min – 0.5 ml/min

Tabla 8. Características del sistema de flujo 2_1.

Características del sistema de flujo 2_2	
Material capilares	PTFE
Diámetro capilares	1.016 mm – 1.6 mm
Caudales bombas 1 – 2 (B1, B2)	0.25 ml/min – 0.5 ml/min

Tabla 9. Características del sistema de flujo 2_2.

Características del sistema de flujo 2_3	
Material capilares	PTFE
Diámetro capilares	1.016 mm – 1.6 mm
Caudales bombas 1 – 2 (B1, B2)	0.25 ml/min – 0.5 ml/min

Tabla 10. Características del sistema de flujo 2_3.

Características del sistema de flujo 2_4	
Material capilares	PTFE
Diámetro capilares	1.016 mm – 1.6 mm

Tabla 11. Características del sistema de flujo 2_4.

Prueba (Sistema 2_4)	Bomba 1 (B1)	Bomba 2 (B2)
1	0,2 ml/min	0,4 ml/min
2	0,3 ml/min	0,6 ml/min
3	0,5 ml/min	1 ml/min
4	0,8 ml/min	1,6 ml/min

Tabla 12. Caudales experimentados para el sistema de flujo 2_4.

Características del sistema de flujo 3	
Material capilares	PTFE
Diámetro capilares	1.016 mm – 1.6 mm

Tabla 13. Características del sistema de flujo 3.

Prueba (Sistema 3)	Bomba 1 (B1)	Bomba 2 (B2)
1	50 $\mu\text{l}/\text{min}$	100 $\mu\text{l}/\text{min}$
2	75 $\mu\text{l}/\text{min}$	150 $\mu\text{l}/\text{min}$
3	75 $\mu\text{l}/\text{min}$	180 $\mu\text{l}/\text{min}$
4	70 $\mu\text{l}/\text{min}$	140 $\mu\text{l}/\text{min}$
5	70 $\mu\text{l}/\text{min}$	160 $\mu\text{l}/\text{min}$

Tabla 14. Caudales experimentados para el sistema de flujo 3.

Características del sistema de flujo 4	
Material capilares	PTFE
Diámetro capilares	1.6 mm
Caudales bomba	40 $\mu\text{l}/\text{min}$ - 70 $\mu\text{l}/\text{min}$

Tabla 15. Características del sistema de flujo 4.

Características del sistema de flujo 5_1	
Material capilares	PTFE
Diámetro capilares	1.6 mm
Caudales bomba	100 $\mu\text{l}/\text{min}$

Tabla 16. Características del sistema de flujo 5_1.

Características del sistema de flujo 5_2	
Material capilares	PTFE
Diámetro capilares	1.016 mm
Caudales bomba	100 $\mu\text{l}/\text{min}$

Tabla 17. Características del sistema de flujo 5_2.

B. SISTEMAS DE FLUJO LÍQUIDO-GAS

Características del sistema de flujo 1	
Material capilares	PTFE
Diámetro capilares	1.016 mm

Tabla 18. Características del sistema de flujo 1.

Prueba (Sistema 1)	Bomba 1 (B1)	Bomba 2 (B2)
1	100 $\mu\text{l}/\text{min}$	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$
2	100 $\mu\text{l}/\text{min}$	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$
3	200 $\mu\text{l}/\text{min}$	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$

Tabla 19. Caudales experimentados para el sistema de flujo 1.

Características del sistema de flujo 2	
Material capilares	PTFE
Diámetro capilares	1.016 mm

Tabla 20. Características del sistema de flujo 2.

Prueba (Sistema 2)	Bomba 1 (B1)	Bomba 2 (B2)
1 (Sin Tween)	200 $\mu\text{l}/\text{min}$	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$
2 (Sin Tween)	100 $\mu\text{l}/\text{min}$	1000 $\mu\text{l}/\text{min}$
3 (Sin Tween)	100 $\mu\text{l}/\text{min}$	2000 $\mu\text{l}/\text{min}$
4 (Sin Tween)	100 $\mu\text{l}/\text{min}$	3000 $\mu\text{l}/\text{min}$
5 (Sin Tween)	100 $\mu\text{l}/\text{min}$	800 $\mu\text{l}/\text{min}$
6 (Con tween)	100 $\mu\text{l}/\text{min}$	500 $\mu\text{l}/\text{min}$
7 (Con tween)	200 $\mu\text{l}/\text{min}$	500 $\mu\text{l}/\text{min}$
8 (Con tween)	200 $\mu\text{l}/\text{min}$	600 $\mu\text{l}/\text{min}$

Tabla 21. Caudales experimentados para el sistema de flujo 2.

SECCIÓN 2. Composición de las corrientes de los sistemas de flujo.

A. SISTEMAS DE FLUJO DE FASE LÍQUIDO-LÍQUIDO

Composición corrientes sistema de flujo 1	
[Alginato]	1% wt
[CaCl ₂]	2 % wt
Aceite	Parafina

Tabla 22. Composición de las corrientes del sistema de flujo 1.

	Tramo 1	Tramo 2
Volumen (m ³)	$3,142 \cdot 10^{-6}$	$8,168 \cdot 10^{-7}$
Caudal (ml/min)	0,5	1
Tiempo residencia (min)	6,28	0,8168

Tabla 23. Resumen de características del sistema de flujo 1.



Ilustración 42. Esquema del sistema de flujo 1.

Composición corrientes sistema de flujo 2_1	
[Alginato]	1% wt
[CaCl ₂]	1 – 1.5 – 2 % wt
Aceite	Parafina

Tabla 24. Composición de las corrientes del sistema de flujo 2_1.

	Tramo 1	Tramo 2
Volumen (m ³)	$3,142 \cdot 10^{-6}$	$8,168 \cdot 10^{-7}$
Caudal (ml/min)	0,5	1
Tiempo residencia (min)	6,28	0,8168

Tabla 25. Resumen de características del sistema de flujo 2_1.

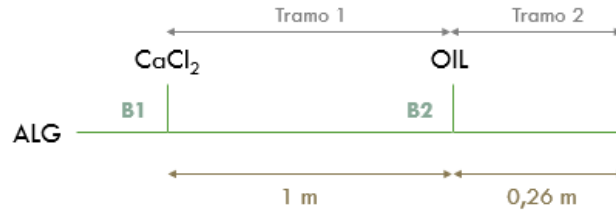


Ilustración 43. Esquema del sistema de flujo 2_1.

Composición corrientes sistema de flujo 2_2	
[Alginato]	1 % wt
[CaCl ₂]	2 % wt
Aceite	Parafina

Tabla 26. Composición de las corrientes del sistema de flujo 2_2.

	Tramo 1	Tramo 2
Volumen (m ³)	$3,142 \cdot 10^{-6}$	$8,168 \cdot 10^{-7} + 2,413 \cdot 10^{-6}$
Caudal (ml/min)	0,5	1
Tiempo residencia (min)	6,28	3,23

Tabla 27. Resumen de características del sistema de flujo 2_2.

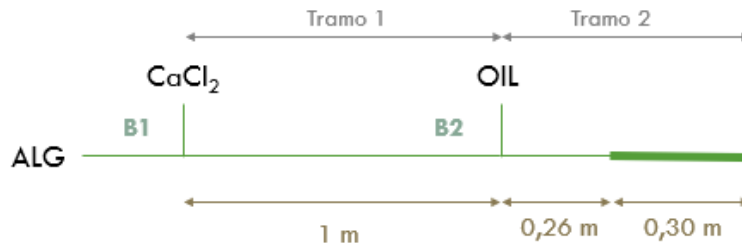


Ilustración 44. Esquema del sistema de flujo 2_2.

Composición corrientes sistema de flujo 2_3	
[Alginato]	1 % wt
[CaCl ₂]	6 % wt
Aceite	Parafina

Tabla 28. Composición de las corrientes del sistema de flujo 2_3.

	Tramo 1	Tramo 2
Volumen (m ³)	$3,142 \cdot 10^{-6}$	$8,168 \cdot 10^{-7} + 1,21 \cdot 10^{-5}$
Caudal (ml/min)	0,5	1
Tiempo residencia (min)	6,28	12,88

Tabla 29. Resumen de características del sistema de flujo 2_3.

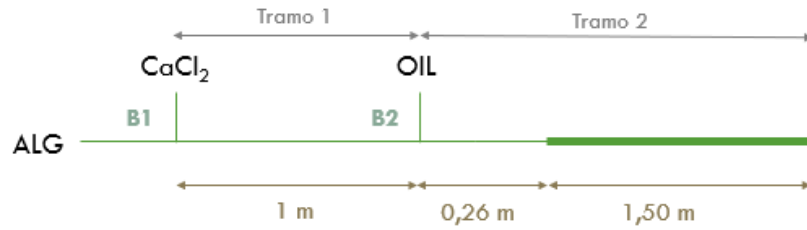


Ilustración 45. Esquema del sistema de flujo 2_3.

Composición corrientes sistema de flujo 2_4	
[Alginato]	1 % wt
[CaCl ₂]	6 % wt
Aceite	Parafina

Tabla 30. Composición de las corrientes del sistema de flujo 2_4.

	Tramo 1				Tramo 2			
	Volumen (m ³)	3,142·10 ⁻⁶				8,168·10 ⁻⁷ + 1,21·10 ⁻⁵		
Caudal (ml/min)	1	2	3	4	1	2	3	4
	0,4	0,6	0,5	0,8	0,8	1,2	2	3,2
Tiempo residencia (min)	7,85	5,24	3,14	1,96	16,1	10,73	6,44	4,025

Tabla 31. Resumen de características del sistema de flujo 2_4.

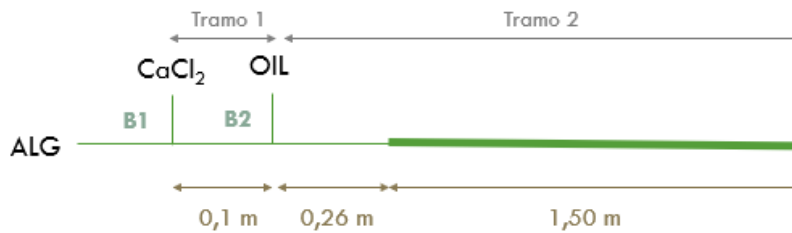


Ilustración 46. Esquema del sistema de flujo 2_4.

Composición corrientes sistema de flujo 3	
[Alginato]	1 % wt
[CaCl ₂]	6 % wt
Aceite	Parafina

Tabla 32. Composición de las corrientes del sistema de flujo 3.

	Tramo total				
	Volumen (m ³)	8,168·10 ⁻⁷ + 7,238·10 ⁻⁶			
Caudal (μl/min)	1	2	3	4	5
	200	300	330	280	300
Tiempo residencia (min)	40,3	26,85	24,41	28,8	26,85

Tabla 33. Resumen de características del sistema de flujo 3.

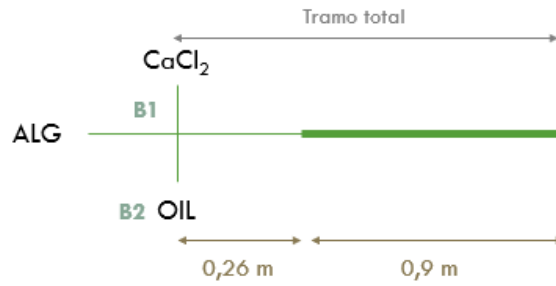


Ilustración 47. Esquema del sistema de flujo 3.

Composición corrientes sistema de flujo 4

[Alginato]	1 % wt
[CaCl ₂]	6 % wt
Aceite	Parafina

Tabla 34. Composición de las corrientes del sistema de flujo 4.

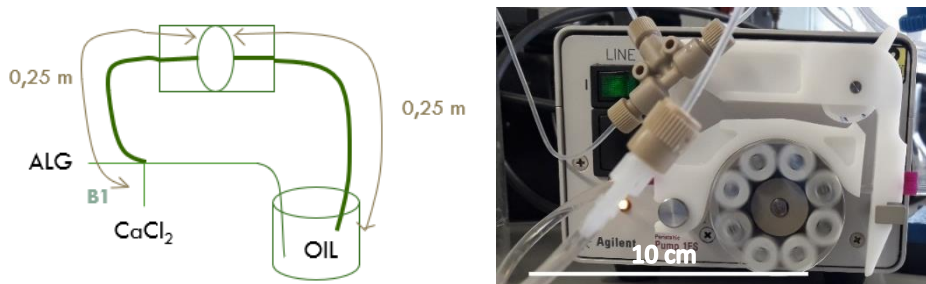


Ilustración 48. Esquema del sistema de flujo 4. Fotografía real de la bomba utilizada para el sistema.

Composición corrientes sistema de flujo 5_1

[Alginato]	1 % wt
[CaCl ₂]	1.5 % wt

Tabla 35. Composición de las corrientes del sistema de flujo 5_1.

Composición corrientes sistema de flujo 5_2

[Alginato]	1 % wt
[CaCl ₂]	1.5 % wt

Tabla 36. Composición de las corrientes del sistema de flujo 5_2.

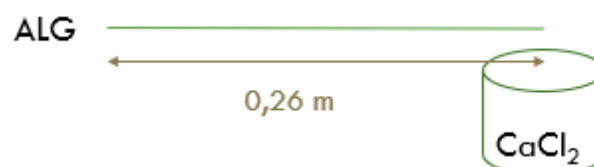


Ilustración 49. Esquema del sistema de flujo 5.

B. SISTEMAS DE FLUJO DE FASE LÍQUIDO-GAS

Composición corrientes sistema de flujo 1	
[Alginato]	1 % wt
[CaCl ₂]	1.5 % wt
[Tween 20]	20 % wt

Tabla 37. Composición de las corrientes del sistema de flujo 1.

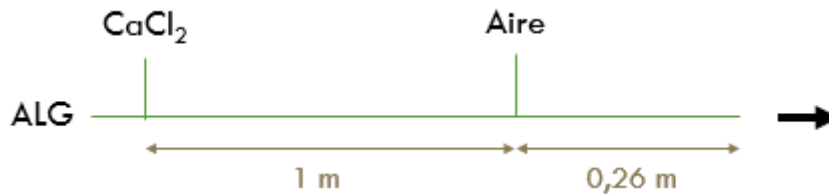


Ilustración 50. Esquema del sistema de flujo 1.

Composición corrientes sistema de flujo 2	
[Alginato]	1 % wt
[CaCl ₂]	1.5 % wt
[Tween 20] / Sin Tween 20	20 % wt

Tabla 38. Composición de las corrientes del sistema de flujo 2.

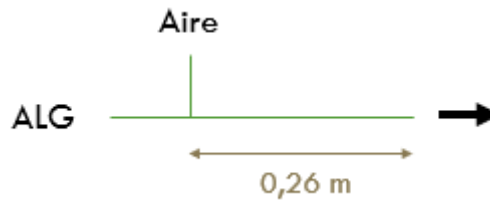


Ilustración 51. Esquema del sistema de flujo 2.

SECCIÓN 3. Cálculos ratio alginato-CaCl₂ para el sistema 2_2

(Ji Xiaobo et al, 2015):

CaCl₂ → 0,90 M - Alg → 0,04 M → ratio de 22,5 aprox

Concentraciones de este estudio:

CaCl₂ → 0,18 M - Alg → 0,025 M

Conseguir 0,6 M de CaCl₂ (aumentar 3 veces)

CaCl₂ → 0,55 M

Alginato → 0,025 M

SECCIÓN 4. Tamaños de las microcápsulas obtenidos de los posibles parámetros influyentes

*Signos en las tablas: 'A' = agitación incorporada;

'X' = no se consiguió forma redonda;

' - ' = no se consiguió ningún resultado.

Prueba 1. Influencia dimensiones capilares				
Capilares				
Nombre	Dext (mm)	Dint (mm)	Área \pm SD (cm)	Diámetro \pm SD (cm)
Cap1	3.18	1.59	0.1047 \pm 0.0284	0.3652 \pm 0.0477
Cap3	1.59	1.02	0.0562 \pm 0.0089	0.2676 \pm 0.0210
Cap4	1.59	0.76	0.0707 \pm 0.0107	0.3001 \pm 0.0225
Cap5	1.59	0.51	0.0702 \pm 0.0134	0.2989 \pm 0.0288
Cap6	1.59	0.25	0.0401 \pm 0.0058	0.2259 \pm 0.0161
A-Cap1	3.18	1.59	0.0658 \pm 0.0152	0.2894 \pm 0.0329
A-Cap2	1.59	1.47	0,0651 \pm 0,0104	0,2880 \pm 0,0229
A-Cap3	1.59	1.02	0.0649 \pm 0.0128	0.2874 \pm 0.0278
A-Cap4	1.59	0.76	0.0687 \pm 0.0108	0.2959 \pm 0.0236
A-Cap5	1.59	0.51	0.0524 \pm 0.0115	0.2584 \pm 0.0283
A-Cap6	1.59	0.25	0.0401 \pm 0.0118	0.2653 \pm 0.0283
A-Cap7	0.80	0.13	0,0500 \pm 0,0138	0,2524 \pm 0,0327
A-Cap8	0.36	0.03	0,0415 \pm 0,0075	0,2300 \pm 0,0198
A-Cap9	1.59	0.03	-	-

Tabla 39. Medidas de las microcápsulas para analizar el efecto de las dimensiones de los capilares (Prueba 1).

Prueba 2. Influencia dimensiones capilares				
Capilares				
Nombre	Dext (mm)	Dint (mm)	Área \pm SD (cm)	Diámetro \pm SD (cm)
Cap1	3.18	1.59	0.0828 \pm 0.0156	0.3246 \pm 0.0306
Cap3	1.59	1.02	0.0535 \pm 0.0054	0.2610 \pm 0.0130
Cap4	1.59	0.76	0.0681 \pm 0.0091	0.2944 \pm 0.0196
Cap5	1.59	0.51	0.0533 \pm 0.0045	0.2605 \pm 0.0109
Cap6	1.59	0.25	0.0580 \pm 0.0058	0.2717 \pm 0.0137
A-Cap1	3.18	1.59	0.0752 \pm 0.0092	0.3096 \pm 0.0183
A-Cap2	1.59	1.47	0,0872 \pm 0,0139	0,333 \pm 0,0264
A-Cap3	1.59	1.02	0.0666 \pm 0.0070	0.2912 \pm 0.0152
A-Cap4	1.59	0.76	0.0600 \pm 0.0068	0.2765 \pm 0.0154
A-Cap5	1.59	0.51	0.0592 \pm 0,0081	0.2745 \pm 0.0191
A-Cap6	1.59	0.25	0.0579 \pm 0.0056	0.2740 \pm 0.0133
A-Cap7	0.80	0.13	0,0424 \pm 0,0048	0,2322 \pm 0,0133
A-Cap8	0.36	0.03	-	-
A-Cap9	1.59	0.03	-	-

Tabla 40. Medidas de las microcápsulas para analizar el efecto de las dimensiones de los capilares (Prueba 2).

Prueba 3. Influencia dimensiones capilares				
Capilares				
Nombre	Dext (mm)	Dint (mm)	Área ± SD (cm)	Diámetro ± SD (cm)
Cap1	3.18	1.59	0.0845 ± 0.0071	0.3279 ± 0.0140
Cap3	1.59	1.02	0.0653 ± 0.0081	0.2883 ± 0.0178
Cap4	1.59	0.76	0.0591 ± 0.0056	0.2743 ± 0.0125
Cap5	1.59	0.51	0.0579 ± 0.0082	0.2714 ± 0.0200
Cap6	1.59	0.25	0.0545 ± 0.0097	0.2634 ± 0.0239
A-Cap1	3.18	1.59	0.1030 ± 0.0139	0.3622 ± 0.0246
A-Cap2	1.59	1.47	0,0677 ± 0,0088	0,2937 ± 0,0189
A-Cap3	1.59	1.02	0.0642 ± 0.0064	0.2860 ± 0.0141
A-Cap4	1.59	0.76	0.0666 ± 0.0072	0.2912 ± 0.0158
A-Cap5	1.59	0.51	0.0705 ± 0.0056	0.2997 ± 0.0118
A-Cap6	1.59	0.25	0.0628 ± 0.0098	0.2828 ± 0.0214
A-Cap7	0.80	0.13	0,0478 ± 0,0063	0,2466 ± 0,0166
A-Cap8	0.36	0.03	-	-
A-Cap9	1.59	0.03	-	-

Tabla 41. Medidas de las microcápsulas para analizar el efecto de las dimensiones de los capilares (Prueba 3).

Comparación pruebas. Influencia dimensiones capilares				
Diámetros capilares (cm)				
Nombre	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	MEDIA
Cap1	0.3652 ± 0.0477	0.3246 ± 0.0306	0.3279 ± 0.0140	0,3388 ± 0,0225
Cap3	0.2676 ± 0.0210	0.2610 ± 0.0130	0.2883 ± 0.0178	0,2721 ± 0,0143
Cap4	0.3001 ± 0.0225	0.2944 ± 0.0196	0.2743 ± 0.0125	0,2894 ± 0,0136
Cap5	0.2989 ± 0.0288	0.2605 ± 0.0109	0.2714 ± 0.0200	0,2765 ± 0,0198
Cap6	0.2259 ± 0.0161	0.2717 ± 0.0137	0.2634 ± 0.0239	0,2529 ± 0,0244
A-Cap1	0.2894 ± 0.0329	0.3096 ± 0.0183	0.3622 ± 0.0246	0,3190 ± 0,0376
A-Cap2	0,2880 ± 0,0229	0,333 ± 0,0264	0,2937 ± 0,0189	0,3043 ± 0,0246
A-Cap3	0.2874 ± 0.0278	0.2912 ± 0.0152	0.2860 ± 0.0141	0,2882 ± 0,0027
A-Cap4	0.2959 ± 0.0236	0.2765 ± 0.0154	0.2912 ± 0.0158	0,2878 ± 0,0101
A-Cap5	0.2584 ± 0.0283	0.2745 ± 0.0191	0.2997 ± 0.0118	0,2770 ± 0,0208
A-Cap6	0.2653 ± 0.0283	0.2740 ± 0.0133	0.2828 ± 0.0214	0,2740 ± 0,0088
A-Cap7	0,2524 ± 0,0327	0,2322 ± 0,0133	0,2466 ± 0,0166	0,2436 ± 0,0104
A-Cap8	0,2300 ± 0,0198	-	-	0,2300 ± *
A-Cap9	-	-	-	-

Tabla 42. Medidas de las microcápsulas para analizar el efecto de las dimensiones de los capilares (Comparación de las tres pruebas).

Surfactantes prueba 1 (con Cap3)		
Cápsulas	Área ± SD (cm)	Diámetro ± SD (cm)
Lisina 5 %	0,0633 ± 0,0124	0,2846 ± 0,0270
Lisina 20 %	X	X
Lisina 20 % A	X	X
PVP 5 %	0,0546 ± 0,0109	0,2638 ± 0,0260

PVP 20 %	0,0567 ± 0,0079	0,2687 ± 0,0182
PVP 20 % A	0,0599 ± 0,0116	0,2763 ± 0,0265
Tween 5%	0,0465 ± 0,0092	0,2433 ± 0,0248
Tween 20 %	0,0399 ± 0,0100	0,2253 ± 0,0281
Tween 20 % A	0,0437 ± 0,0058	0,2360 ± 0,0157

Tabla 43. Medidas de las microcápsulas para analizar el efecto de la adición de surfactante (Prueba 1).

Surfactantes prueba 2 (con Cap3)		
Cápsulas	Área ± SD (cm)	Diámetro ± SD (cm)
Lisina 5 %	X	X
Lisina 20 %	X	X
Lisina 20 % A	X	X
PVP 5 %	0,0634 ± 0,0061	0,2840 ± 0,0138
PVP 20 %	0,0732 ± 0,0115	0,3054 ± 0,0236
PVP 20 % A	0,0849 ± 0,0113	0,3289 ± 0,0222
Tween 5%	0,0510 ± 0,0075	0,2548 ± 0,0185
Tween 20 %	0,0501 ± 0,0053	0,2525 ± 0,0137
Tween 20 % A	0,0374 ± 0,0044	0,2182 ± 0,0128

Tabla 44. Medidas de las microcápsulas para analizar el efecto de la adición de surfactante (Prueba 2).

Surfactantes prueba 3 (con Cap3)		
Cápsulas	Área ± SD (cm)	Diámetro ± SD (cm)
Lisina 5 %	0,0822 ± 0,0182	0,3236 ± 0,0350
Lisina 20 %	X	X
Lisina 20 % A	X	X
PVP 5 %	0,0662 ± 0,0106	0,2904 ± 0,0229
PVP 20 %	0,0749 ± 0,0099	0,3088 ± 0,0202
PVP 20 % A	0,0622 ± 0,0127	0,2815 ± 0,0279
Tween 5%	0,0435 ± 0,0044	0,2353 ± 0,0118
Tween 20 %	0,0442 ± 0,0077	0,2373 ± 0,0205
Tween 20 % A	0,0461 ± 0,0064	0,2423 ± 0,0172

Tabla 45. Medidas de las microcápsulas para analizar el efecto de la adición de surfactante (Prueba 3).

Comparación diámetros surfactantes con Cap3 (cm)				
Nombre	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	MEDIA
Lisina 5 %	0,2846 ± 0,0270	X	0,3236 ± 0,0350	0,3035 ± 0,0276 *
Lisina 20 %	X	X	X	X
Lisina 20 % A	X	X	X	X
PVP 5 %	0,2638 ± 0,0260	0,2840 ± 0,0138	0,2904 ± 0,0229	0,2792 ± 0,0139
PVP 20 %	0,2687 ± 0,0182	0,3054 ± 0,0236	0,3088 ± 0,0202	0,2937 ± 0,0222
PVP 20 % A	0,2763 ± 0,0265	0,3289 ± 0,0222	0,2815 ± 0,0279	0,2946 ± 0,0290
Tween 5%	0,2433 ± 0,0248	0,2548 ± 0,0185	0,2353 ± 0,0118	0,2444 ± 0,0098
Tween 20 %	0,2253 ± 0,0281	0,2525 ± 0,0137	0,2373 ± 0,0205	0,2381 ± 0,0136
Tween 20 % A	0,2360 ± 0,0157	0,2182 ± 0,0128	0,2423 ± 0,0172	0,2319 ± 0,0125

Tabla 46. Medidas de las microcápsulas para analizar el efecto de la adición de surfactante (Comparación de las tres pruebas).

Surfactante Tween 80 (con Cap3)		
Nombre	Diámetro ± Desv. Est. (cm)	VS. Tween 20 (cm)
Tween 5%	0,2709 ± 0,0181	0,2444 ± 0,0098
Tween 20 %	0,2689 ± 0,0105	0,2319 ± 0,0125

Tabla 47. Dimensiones de las microcápsulas de otra prueba adicional de otro nuevo surfactante

Velocidad	Diámetro ± Desv. Est. (cm)
100 rpm	0,2478 ± 0,0090
350 rpm	0,2438 ± 0,0125
700 rpm	0,2710 ± 0,0146
1000 rpm	X

Tabla 48. Medidas de las microcápsulas para analizar el efecto de la velocidad de gelificación.

Altura (cm)	Diámetro ± Desv. Est. (cm)
1	0,2434 ± 0,0162
3	0,2588 ± 0,0087
6	0,3109 ± 0,2011
9	0,2654 ± 0,0473

Tabla 49. Medidas de las microcápsulas para analizar el efecto de la altura desde la salida de la gota hasta la superficie de gelificación.

Comparación Fotografía normal VS Fotografía microscopio		
Nombre	MÉTODO FOTOGRAFÍA NORMAL	MÉTODO MICROSCOPIO
	Diámetro ± Desv. Est. (cm)	Diámetro ± Desv. Est. (cm)
Tween 20 %	0,2360 ± 0,0157	0,2205 ± 0,0091
Tween 20 ' %	0,2182 ± 0,0128	0,2451 ± 0,0068
Tween 20 '' %	0,2423 ± 0,0172	0,2395 ± 0,0118
A-Cap3	0.2874 ± 0.0278	0,3074 ± 0,0221
A-Cap3 '	0.2912 ± 0.0152	0,3123 ± 0,0214
A-Cap3 ''	0.2860 ± 0.0141	0,3014 ± 0,0193

Tabla 50. Comparación de las medidas de los diámetros de las entre los dos métodos de captura de imágenes.

SECCIÓN 5. Resultados de la prueba ANOVA

*Signos en las tablas: 'A' = agitación incorporada;

PRUEBA 1 TEST ANOVA:

Capilar_P1	N	Media	Agrupación
Cap1	10	0,3679	A
Cap4	11	0,30086	B
Cap5	13	0,30021	B
A-Cap4	14	0,29676	B
A-Cap1	12	0,29110	B C
A-Cap2	12	0,28887	B C
A-Cap3	15	0,28864	B C
Cap3	18	0,26836	B C
A-Cap6	13	0,26674	B C D
A-Cap5	16	0,25986	C D E
A-Cap7	13	0,25423	C D E
A-Cap8	11	0,23073	D E
Cap6	13	0,22645	E

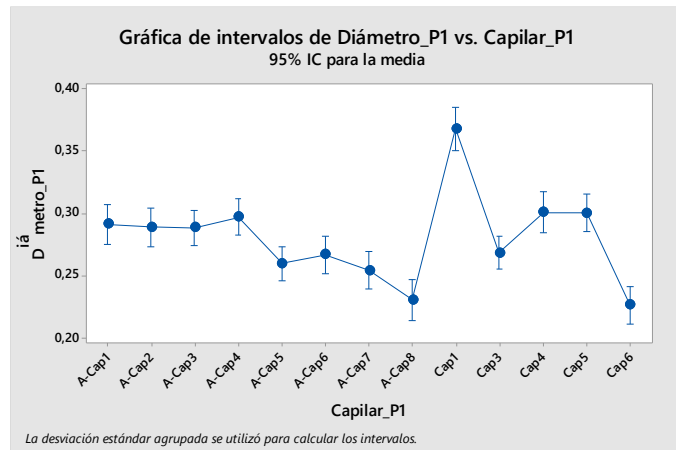


Ilustración 52. Resultados de la prueba ANOVA para analizar la influencia de las dimensiones de los capilares en las microcápsulas (Prueba 1).

PRUEBA 2 TEST ANOVA:

Capilar_P2	N	Media	Agrupación
A-Cap2	10	0,33417	A
Cap1	10	0,32594	A
A-Cap1	11	0,31002	A B
Cap4	15	0,29508	B C
A-Cap3	14	0,29155	B C D
A-Cap4	15	0,27691	C D E
A-Cap5	14	0,27512	C D E
A-Cap6	17	0,27433	D E
Cap6	16	0,27201	D E
Cap3	12	0,26131	E
Cap5	15	0,26070	E
A-Cap7	16	0,23261	F

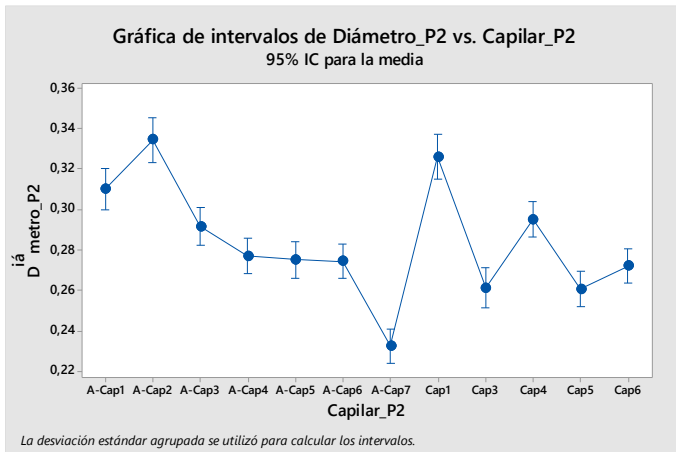


Ilustración 53. Resultados de la prueba ANOVA para analizar la influencia de las dimensiones de los capilares en las microcápsulas (Prueba 2).

PRUEBA 3 TEST ANOVA:

Capilar_P3	N	Media	Agrupación
A-Cap1	16	0,36300	A
Cap1	17	0,32824	B
A-Cap5	20	0,29992	C
A-Cap2	12	0,29423	C D
A-Cap4	16	0,29167	C D
Cap3	12	0,28883	C D
A-Cap3	13	0,28634	C D E
A-Cap6	18	0,28358	C D E
Cap4	10	0,27452	D E
Cap5	17	0,27208	D E
Cap6	14	0,26448	E F
A-Cap7	21	0,24718	F

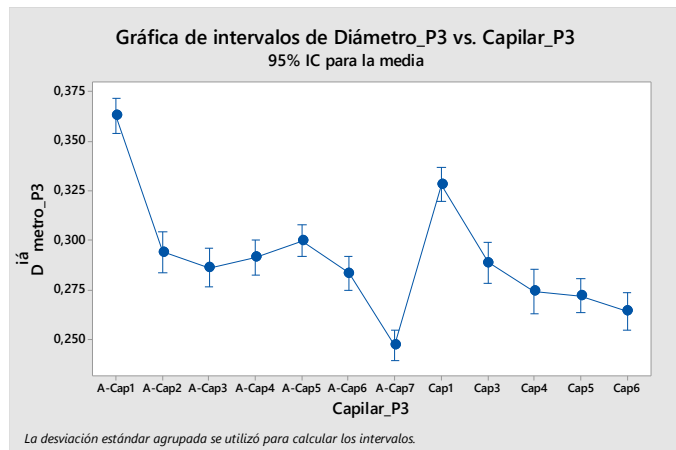


Ilustración 54. Resultados de la prueba ANOVA para analizar la influencia de las dimensiones de los capilares en las microcápsulas (Prueba 3).

COMPARACIONES PRUEBAS TEST ANOVA:

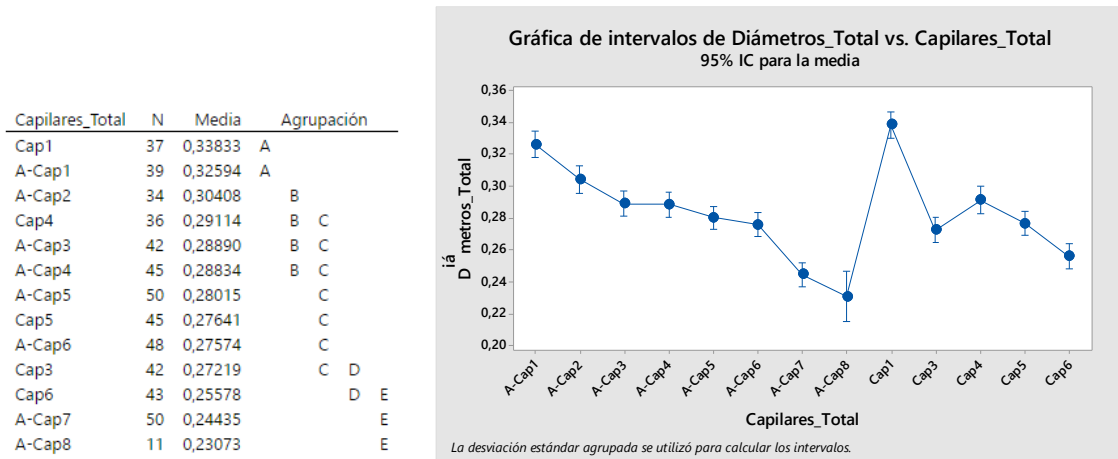


Ilustración 55. Resultados de la prueba ANOVA para analizar la influencia de las dimensiones de los capilares en las microcápsulas (Comparaciones de las tres pruebas).

SECCIÓN 6. Ejemplos de rectas de calibrado para el cálculo de la concentración de FITC-Dextrano y FITC-Albúmina liberada al medio

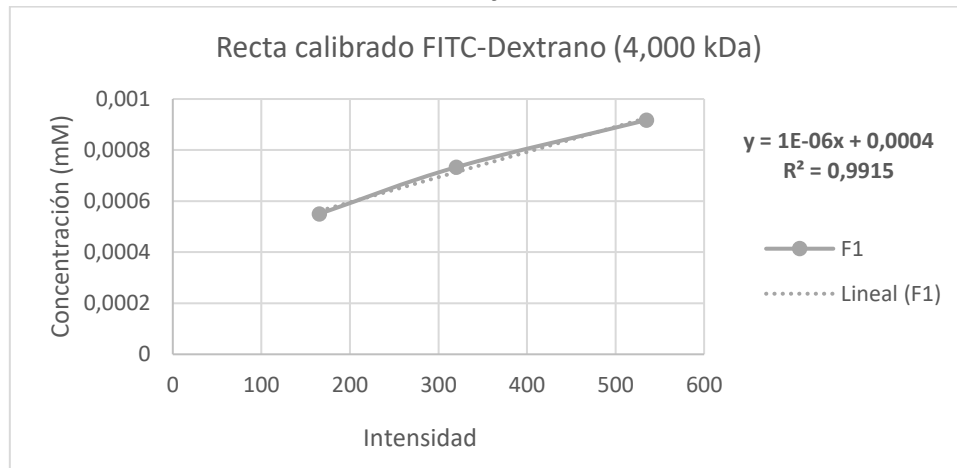


Ilustración 56. Recta de calibrado para el posterior cálculo de las concentraciones de FITC-Dextrano (4.000 kDa).

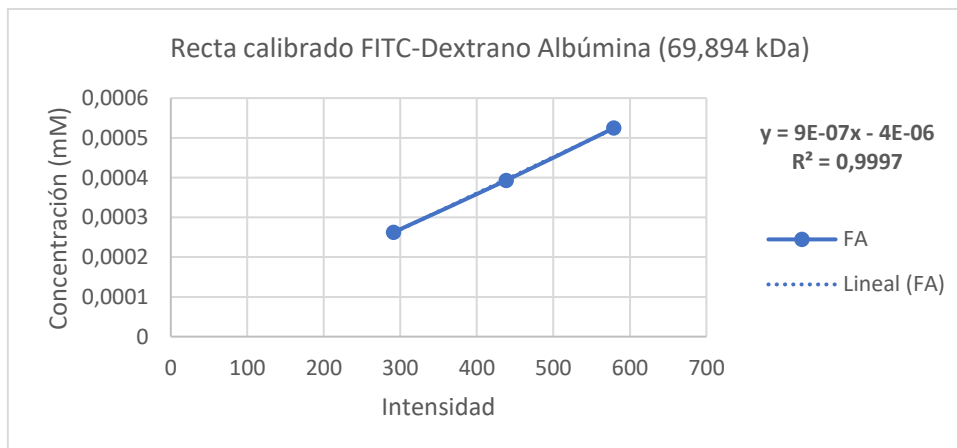


Ilustración 57. Recta de calibrado para el posterior cálculo de las concentraciones de FITC- Albúmina (69.894 kDa).

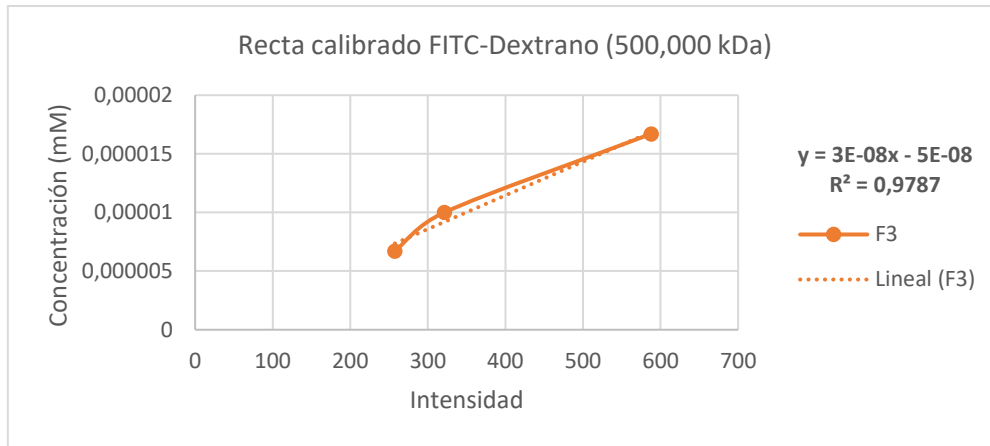


Ilustración 58. Recta de calibrado para el posterior cálculo de las concentraciones de FITC-Dextrano (500.000 kDa).

SECCIÓN 7. Tabla de tamaños de las moléculas dependiendo del peso molecular

Protein M	5 kDa	10 kDa	20 kDa	50 kDa	100 kDa	200 kDa	500 kDa
R_{\min} (minimum radius)	1.1 nm	1.42 nm	1.78 nm	2.4 nm	3.05 nm	3.84 nm	5.21 nm

Tabla 51. Tamaños de moléculas en función del peso molecular [47].