



Cinvestav

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL

Unidad Monterrey

**Coalescencia de microburbujas
acarreadoras de fármaco**

Tesis que presenta

Berenice Yólotl Pérez Cacho

para obtener el Grado de

Doctora en Ciencias

en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de la Tesis

Dr. Gabriel Arturo Caballero Robledo

Apodaca, Nuevo León

Febrero 2024

Agradecimientos

Al Dr. Gabriel Caballero por su compartirme su experiencia y gran conocimiento. Pero aun más importante, por ayudarme a mantener el entusiasmo por mi trabajo y por la ciencia.

Al CONACYT y CINVESTAV por las becas asignadas. Gracias a estas pude iniciar y avanzar en este trabajo.

Al CINVESTAV Monterrey por las facilidades otorgadas para poder realizar mi trabajo. Además, agradezco el apoyo de su personal cada vez que lo necesité.

Resumen

Una futura aplicación de las microburbujas es para terapias dirigidas. Para este tipo de nuevas aplicaciones se requiere mejorar su respuesta a ondas de ultrasonido. Las burbujas con la misma composición generan respuestas uniformes al ultrasonido si tienen una distribución de tamaños uniforme. Una manera directa de obtenerlas es empleando dispositivos de enfoque de flujo. Sin embargo, estas burbujas pueden ser difíciles de recolectar y tienen tiempos de vida cortos. Segers *et. al.* [T. Segers et al., *Langmuir* **33** , 10329 (2017)] desarrollaron un modelo para describir la probabilidad de coalescencia de burbujas de membranas lipídicas fabricadas en dispositivos de enfoque de flujo. Ellos hallaron que la temperatura, la concentración lipídica y la cantidad de lípidos pegilados pueden modificar la probabilidad de coalescencia. En el presente trabajo estudiamos la coalescencia de burbujas cuando se agrega fármaco a la membrana. Se usó doxorubicina (DOX), un fármaco de primera línea de quimioterapia, para evaluar su efecto en la probabilidad de coalescencia. Las membranas de las burbujas son de DPPC:DPPE-PEG5000. La DOX se agregó a la mezcla de lípidos a diferentes concentraciones para evaluar el resultado. Las burbujas se produjeron empleando un dispositivo de enfoque de flujo. Al final se obtienen las distribuciones de tamaños de las burbujas que nos indican la cantidad de eventos de coalescencia para cada concentración de fármaco. Se encontró que el fármaco no tiene ningún efecto en la producción ni coalescencia de burbujas para altas concentraciones de lípidos. En cambio, a bajas concentraciones de lípidos sí hay coalescencia y su probabilidad aumenta con la concentración de fármaco. Sorprendentemente, no se encontró ninguna relación entre el tamaño de liposomas y la probabilidad de coalescencia.

Abstract

A future application of microbubbles is for targeted therapies. For this new application, it is necessary to improve its response to ultrasound waves. The bubbles with the same composition generate uniform responses to ultrasound if they have a uniform size distribution. A straightforward way to obtain them is by using flow-focusing devices. However, these bubbles can be difficult to collect and have short lifetimes. Segers et. al [T. Segers et al., *Langmuir* **33** , 10329 (2017)] developed a model to describe the probability of bubble coalescence of fabricated lipid membranes in flow-focusing devices. They found that the temperature, total lipid concentration, and the amount of pegylated lipids can modify the probability of coalescence. In the present work, we study the coalescence of bubbles when adding a drug to the membrane. Doxorubicin (DOX), a first-line drug for chemotherapy, is used to evaluate its effect on the probability of coalescence. The membranes of the bubbles are DPPC:DPPS:DPPE-PEG5000. DOX was added to the mixture of lipids at different concentrations to evaluate the result. Bubbles were produced using a flow-focusing device. In the end, the distributions of bubble sizes that indicate the number of coalescence events for each drug concentration were obtained. The drug was found not to affect the production or coalescence of bubbles for high lipid concentrations. Instead, at low lipid concentrations, the coalescence and its probability increase with the drug concentration. Surprisingly, no relationship was found between liposome size and the probability of coalescence.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Composición de las burbujas	2
1.2. Burbujas acarreadoras de fármacos para terapias dirigidas	3
1.2.1. Burbujas y doxorrubicina	5
1.3. Respuesta de las burbujas al ultrasonido	8
1.3.1. Regímenes de oscilación de las burbujas	9
1.4. Burbujas monodispersas	11
1.5. Fabricación de las burbujas	13
1.5.1. Sonicación	14
1.5.2. Agitación	14
1.5.3. Microfluídica	14
1.6. Estabilidad de burbujas generadas en dispositivos	15
1.7. Coalescencia de burbujas en dispositivos	16
1.7.1. Variaciones de composición	19
2. Métodos y materiales	25
2.1. Dispositivo microfluídico	25
2.1.1. Diseño del dispositivo	25
2.1.2. Fabricación del molde maestro	25
2.1.3. Fabricación de los microdispositivos	28
2.2. Preparación y medición de liposomas	31
2.2.1. Preparación de la mezcla de lípidos	31
2.2.2. Mediciones de tamaño de los liposomas	32
2.3. Fabricación de burbujas	32
2.4. Procesamiento de imágenes	33
2.4.1. Ajuste de radios	34
3. Resultados y discusión	37
3.1. Radio medio y coeficiente de variación	37
3.2. Distribuciones de tamaño de burbujas sin fármaco	38
3.3. Distribuciones de tamaño de las burbujas con fármaco	42
3.3.1. Concentración total de lípidos: 8 mmol/l	43
3.3.2. Concentración total de lípidos: 4mmol/l	44
3.4. Distribuciones de tamaño de los liposomas	44
4. Conclusiones	49

5. Perspectivas

51

Capítulo 1

Introducción

En 1968 se descubrió que pequeñas burbujas en el torrente sanguíneo aumentaban los ecos reflejados durante los estudios de ultrasonido [1], [2]. Desde entonces se ha trabajado en mejorar sus características permitiendo que actualmente sean empleadas en la clínica como agentes de contraste para estudios de ultrasonido. Las investigaciones realizadas para optimizar a las burbujas como agentes de contraste han mostrado prometedoras aplicaciones no sólo en imagenología también para usos terapéuticos, quirúrgicos y de diagnóstico. [3].

Las burbujas para aplicaciones biomédicas deben tener un tamaño menor a $7 \mu\text{m}$ para poder pasar los capilares de los pulmones [2]. Pero el tamaño ideal es de 2 a $5 \mu\text{m}$ pues burbujas más pequeñas tienen una pobre respuesta al ultrasonido y más grandes pueden obstruir pequeños vasos sanguíneos [4].

Las burbujas tienen un núcleo gaseoso que puede ser comprimido y extendido al aplicar ondas de ultrasonido. Tales oscilaciones de volumen generan ecos armónicos más grandes que los ecos lineales del tejido circundante. Esta característica única es el principio que permite usar a las burbujas como agentes de contraste [5], pues las burbujas permiten visualizar con mayor claridad los vasos sanguíneos por los que circulan y los flujos de sangre.

1.1. Composición de las burbujas

En la clínica, para alargar el tiempo de vida de las burbujas se emplean gases inertes de alto peso molecular y baja solubilidad en agua como hexafluoruro de azufre, octafluoropropano o perfluorobutano [5], [6]. En diferentes estudios se emplean nitrógeno o aire para caracterizar a las burbujas. Su uso no modifica las propiedades de las burbujas. Aunque para pruebas de estabilidad que implican el estudio por varias horas es mejor emplear burbujas con gases de alto peso molecular. En la Tabla 1.1 se muestran las características de los gases empleados en las burbujas para aplicaciones biomédicas.



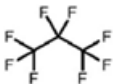

	Fórmula estructural	Peso molecular	Solubilidad en agua *
Nitrógeno		28	Leve
Hexafluoruro de azufre		146.06	Insoluble
Octafluoropropano		188.02	Insoluble
Decafluorobutano		238.03	Insoluble

Tabla 1.1: Características de gases empleados en la fabricación de burbujas para aplicaciones biomédicas. * Datos tomados de [7].

Las burbujas con membrana para aplicaciones biomédicas pueden ser de proteínas, lípidos o polímeros. Las burbujas con membranas de fosfolípidos han sido muy populares debido a que son muy flexibles manteniendo una buena barrera para evitar la difusión del gas [5]. Además, cuando los lípidos son conjugados con polietilenglicol (PEG) se reducen las respuestas adversas del sistema inmunológico [1].

En este trabajo el interés es sobre las burbujas con membranas de fosfolípidos. Estas suelen estar formadas por 2 tipos de fosfolípidos. Al fosfolípido más abundante se le llama fosfolípido primario. Al fosfolípido conjugado con la cadena de PEG se le llama fosfolípido pegilado. Y, opcionalmente se puede agregar un fosfolípido polar el cual puede ser útil

1.2. BURBUJAS ACARREADORAS DE FÁRMACOS PARA TERAPIAS DIRIGIDAS³

para unir otros componentes a la superficie de la membrana. Como ejemplo se muestran en la Figura 1.1 los fosfolípidos empleados en formulaciones basadas en la composición de *Definity*, un agente de contraste de uso clínico.

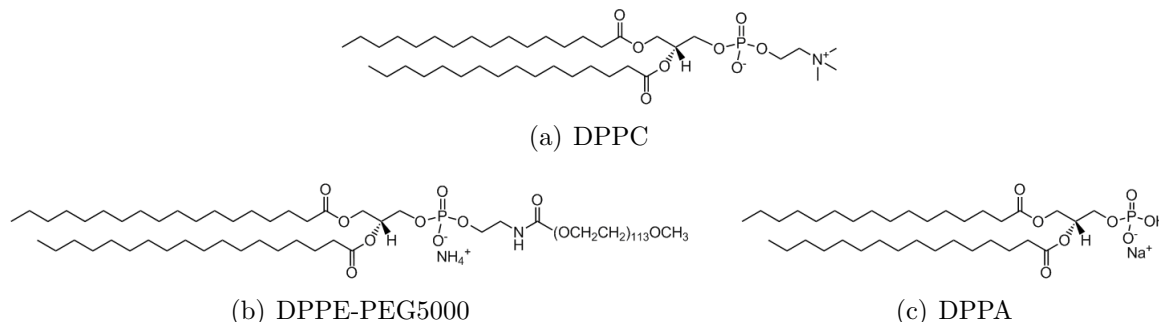


Figura 1.1: Estructura de algunos fosfolípidos empleados en formulaciones de burbujas. a) 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) corresponde al fosfolípido primario. b) 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-5000] es el fosfolípido pegilado. c) 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphate (DPPA) es el fosfolípido polar de carga negativa. Imágenes de *Avanti Polar Lipids*.

1.2. Burbujas acarreadoras de fármacos para terapias dirigidas

En el mundo de la medicina uno de los retos a superar es la entrega de fármacos específicamente en su sitio de acción y en dosis terapéuticamente útiles. En lugar de tener a las nuevas moléculas del fármaco libres se ha optado por emplear sistemas de entrega de fármacos (DDS por sus siglas en inglés). La finalidad es mejorar la accesibilidad y evitar dosis insuficientes en los objetivos biológicos o patológicos [8].

Según Pattni y Torchilin “un sistema de entrega dirigida de fármacos involucra la administración del DDS al paciente, la entrega del DDS en el sitio blanco (patológico), la liberación del ingrediente activo en o cerca del sitio de acción y evitar la toxicidad [por interacciones] no específicas en células normales”. Un DDS de una terapia dirigida debe tener un acarreador de fármaco que logre llegar a su destino sin acumulaciones no específicas, no debe inactivar la molécula de fármaco en su sitio de acción y debe protegerla de factores ambientales como la degradación enzimática [8].

Se ha realizado mucho trabajo buscando un acarreador de fármacos óptimo (para cada

patología estudiada) mejorando características como el tamaño, la química de superficie, la biocompatibilidad, la degradación, la eficiencia de encapsulación, la respuesta a estímulos, su potencial para producción a escala y la capacidad para generar respuestas inmunes [9].

Recientemente se han tenido avances con burbujas empleadas en la terapéutica, en especial, en aquellas empleadas en la entrega de fármacos cruzando la barrera hematoencefálica y en tumores sólidos [3]. Las variaciones de volumen de burbujas generadas por la aplicación de ultrasonido facilitan la administración de fármacos. Las burbujas oscilantes cerca de las células crean corrientes que ejercen un estrés en las membranas celulares. Cuando las burbujas son coadministradas con fármacos la presencia de los poros formados facilita la entrada de las moléculas a los tejidos. Otro método de acción de las burbujas se logra colocando al fármaco en su membrana. La liberación del fármaco se realiza en la región y tiempo deseado al iniciar la aplicación del ultrasonido [5]. Esta última aplicación es de gran ayuda para fármacos de alta actividad, por ejemplo, proteínas como citoquinas o factores de crecimiento, agentes de quimioterapia como paclitaxel o doxorubicina, y genes útiles en terapias génicas. Para este tipo de fármacos se pueden usar bajas dosis para obtener un efecto terapéutico [10].

Las burbujas se obtienen como una suspensión de partículas que busca el equilibrio termodinámico separándose en una fase líquida y una fase gaseosa. Los mecanismos para llegar a ello son la coalescencia y la disolución. Una manera para evadir estos procesos es haciendo burbujas con membranas. Las membranas imponen fuerzas repulsivas de superficie, disminuyen la tensión superficial y reducen la disolución gaseosa [3], [5].

Por ejemplo, una burbuja sin membrana está sujeta a una tensión interfacial muy alta entre el líquido y el gas. Por medio de la ecuación de Laplace esto puede representarse como una diferencia de presión (Δp)

$$\Delta p = \frac{2\sigma}{R}, \quad (1.1)$$

donde σ es la tensión interfacial y R el radio de la burbuja. Para una burbuja de aire con un radio del orden de las micras en agua, Δp es muy grande (~ 0.1 MPa) [11]. Es por esto que se emplean membranas que reduzcan la tensión superficial.

Existen diferentes elementos que se pueden agregar a las burbujas con finalidades

1.2. BURBUJAS ACARREADORAS DE FÁRMACOS PARA TERAPIAS DIRIGIDAS⁵

terapéuticas como se muestra en la Figura 1.2. Las moléculas de fármaco pueden ir unidas a la superficie o estar embebidas en la membrana. A su vez las moléculas de fármaco pueden estar unidas de manera no covalente, estar conjugadas con las cabezas de los fosfolípidos o unidas por medio de un ligando como el PEG [3]. Para dar especificidad a la terapia se pueden agregar ligandos celulares. Para el caso de las terapias génicas el material genético, como fragmentos de ADN, se une de manera no covalente a la superficie [10].

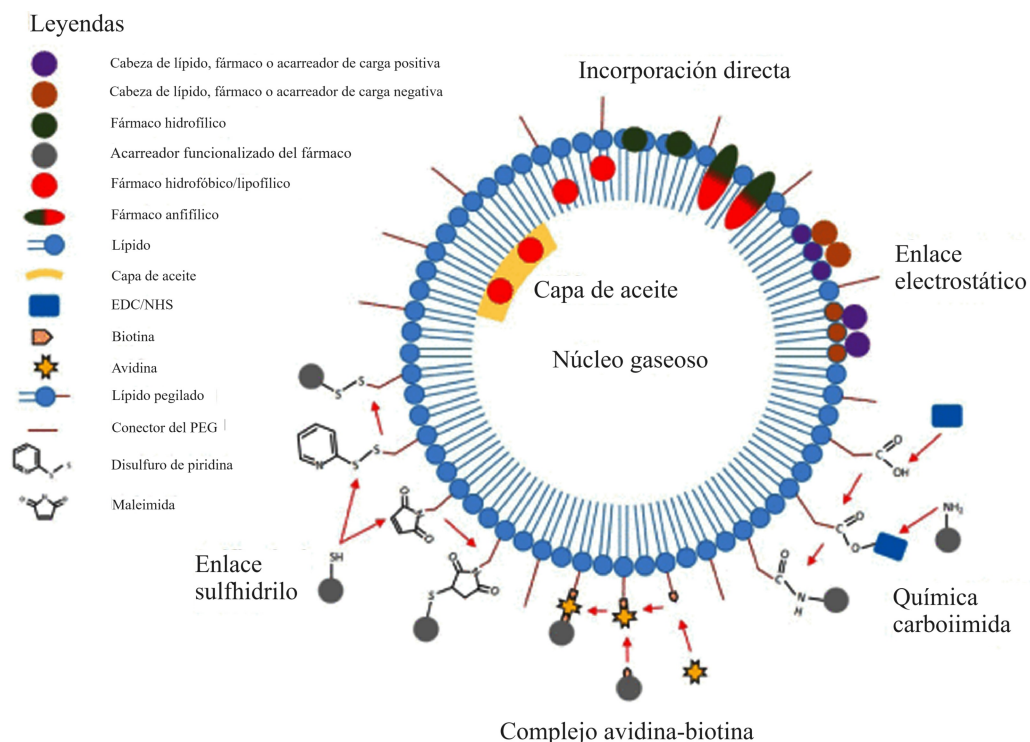


Figura 1.2: Burbuja acarreadora. Se muestran diferentes maneras para poder añadir fármacos a la composición de la burbuja. Imagen tomada de [3]

Aunque se habla de los beneficios que tienen las burbujas como acarreadoras de fármacos, existen pocas formulaciones de burbujas con fármacos [12]. Algunas limitaciones para trasladarlas al uso clínico son su baja capacidad de carga y desconocer el cambio en sus propiedades acústicas después de agregar el fármaco [13].

1.2.1. Burbujas y doxorubicina

Como se mencionó anteriormente los tratamientos con doxorubicina (DOX) pueden mejorarse empleando a las burbujas como acarreadoras. La doxorubicina (Figura 1.3)

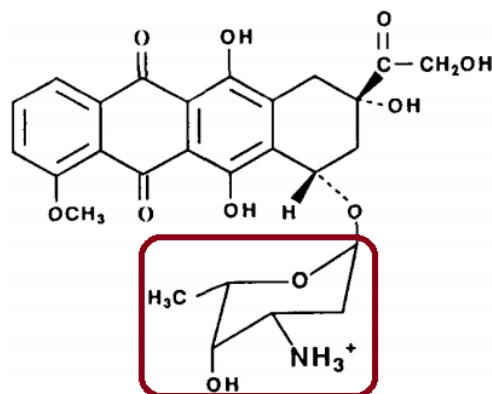


Figura 1.3: Molécula de doxorubicina. En el cuadro rojo se encierra una amina catiónica. Imagen tomada de [16]

es un antibiótico obtenido de la bacteria *Streptomyces peucetius* y ha sido usado como agente de quimioterapia desde los 1960s [14]. Como características físicas, este fármaco tiene un color entre naranja y rojo (según el pH), es soluble en agua y fotosensible [15].

DOX es un fármaco de terapia de primera línea, ya que se usa para cáncer en mama, vejiga, riñón, ovario, tiroides, estómago, pulmón, hueso, tejido nervioso, articulaciones y tejido blando, y también para casos de linfoma de Hodgkin y de no Hodgkin y algunos tipos de leucemia [17]. Se usa en el tratamiento de adultos y niños [14].

La entrada de DOX a las células puede darse por difusión o empleando un acarreador, proceso afectado por la temperatura y el pH [15]. En el citoplasma el fármaco se concentra en el núcleo [12], al cual llega ayudado por los proteosomas 26S, con los cuales tiene gran afinidad [15]. El principal mecanismo de acción de DOX es intercalándose en la cadena de ADN impidiendo su proceso de duplicación y de transcripción de ARN, y el segundo mecanismo, resulta con la DOX uniéndose a la topoisomerasa II inhibiéndola, resultando en daño al ADN [14]. Estos eventos resultan en la apoptosis de la célula. Como efectos secundarios al tratamiento, se tienen fatiga, náuseas, vómito, alopecia y úlceras orales. También puede generar toxicidad cardiaca. Esto se debe principalmente a la generación de estrés oxidativo que daña el ADN de cardiomiocitos [14], [15]. La toxicidad cardiaca aguda puede presentarse en un 11 % de los pacientes tratados con DOX [14].

Al ser un fármaco usado ampliamente y tener efectos secundarios tan frecuentes, que incluso son conocidos popularmente, hay un gran interés en mejorar la efectividad del tratamiento con DOX. Actualmente, la doxorubicina se administra usando liposomas como

1.2. BURBUJAS ACARREADORAS DE FÁRMACOS PARA TERAPIAS DIRIGIDAS⁷

acarreadores para reducir su toxicidad. Y se han hecho investigaciones coadministrando burbujas con liposomas que contienen DOX. Sin embargo, esto tiene como desventajas que se pueden requerir dos inyecciones (una para las burbujas y otra para los liposomas), y además los liposomas pueden quedarse en circulación por hasta 65 h [13], lo cual lleva a efectos secundarios.

Recordemos que podemos tener lípidos aniónicos en la membrana de la burbuja. Por interacción electrostática, la amina con carga positiva de DOX puede unirse a las moléculas aniónicas de fosfolípidos cuya molécula de alcohol puede ser serina o glicerol[16]. Según su concentración las moléculas de DOX pueden adquirir alguna de las siguientes configuraciones. A menores concentraciones la amina catiónica se une a la cabeza aniónica del lípido y el cuerpo de aglicona se introduce entre las colas acilo de los lípidos, luego, al aumentar la concentración algunas moléculas conservan esa disposición, pero también las agliconas del fármaco se apilan formando agregados que sobresalen en la superficie [12], [16]. En burbujas acarreadoras de DOX se ha observado que al incrementar la concentración molar del lípido cargado, aumenta la carga del fármaco [12], [13].

Tinkov y colaboradores, en [12] y [18] hicieron pruebas usando a las burbujas como acarreadoras de DOX (Figura 1.4). Ellos mostraron una buena capacidad de carga, caracterizaron las propiedades físicas y químicas, y evaluaron la entrada del fármaco al núcleo celular y el efecto proliferativo *in vitro* en células de carcinoma de riñón humano. Además, observaron un efecto sinérgico entre la DOX, las burbujas acarreadoras y el ultrasonido. En pruebas *in vivo* de ratas con carcinoma de páncreas, hallaron que la concentración del fármaco fue 12 veces mayor en el objetivo, aumentando la eficacia local y reduciendo la concentración sistémica. También observaron que el tratamiento de burbujas cargadas y ultrasonido redujo el crecimiento del tumor.

Lin y colaboradores en pruebas *in vitro* hallaron que DOX tiene efectos leves en las propiedades acústicas de las burbujas y son debidos a cambios en la fluidez de la membrana. También observaron que a concentraciones bajas, el fármaco se distribuía uniformemente en la membrana de las burbujas aumentando la rigidez de la membrana. Al triplicar la concentración del fármaco, aumentaba el efecto de la cavitación de las burbujas. A esta concentración el fármaco comienza a formar agregados [13].

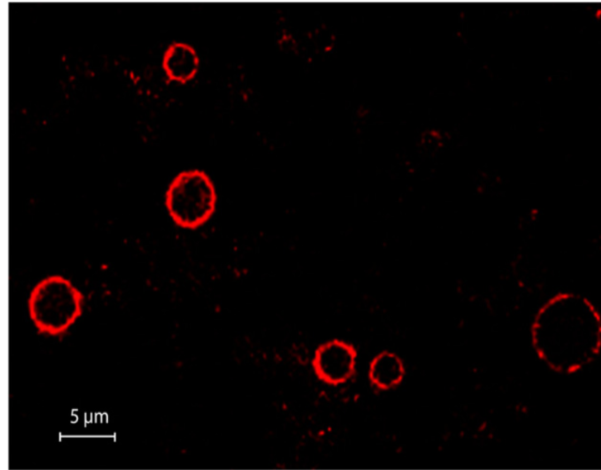


Figura 1.4: Micrografía que muestra las membranas de burbujas cargadas con DOX. Imagen tomada de [12] .

1.3. Respuesta de las burbujas al ultrasonido

Como se mencionó anteriormente las burbujas responden al ultrasonido como oscilaciones volumétricas y por tanto en el radio de la burbuja. La amplitud de tales oscilaciones dependen de la frecuencia, amplitud y duración del pulso de ultrasonido, así como de la membrana y tamaño de las burbujas. Una burbuja oscila en respuesta a una onda de ultrasonido debido a dos fenómenos que empujan al líquido y al gas en direcciones opuestas: la oposición del gas a ser comprimido y la inercia del líquido regulada por el ultrasonido. Tal competencia corresponde a un tiempo característico que a cierta frecuencia se sincroniza con la del ultrasonido logrando una respuesta radial máxima [5]. Esta frecuencia corresponde a la frecuencia de resonancia de la burbuja.

Si bien es cierto que hay un decaimiento en la oscilación. Esto debido a la fricción generada por la viscosidad del líquido circundante a la burbuja, la reradiación del sonido y por efectos térmicos. Sin embargo, este decaimiento es despreciable, ya que comúnmente sólo disminuye 1 o 2% [5]. El resultado es que si la frecuencia de la onda aplicada y la frecuencia de resonancia empatan se obtendrá una respuesta máxima, como es mostrado por Roovers y colaboradores en la Figura 1.5.

Supongamos que se aplica un pulso acústico sinusoidal que genera oscilaciones con amplitudes pequeñas del radio de las burbujas (oscilaciones respecto al radio de reposo).

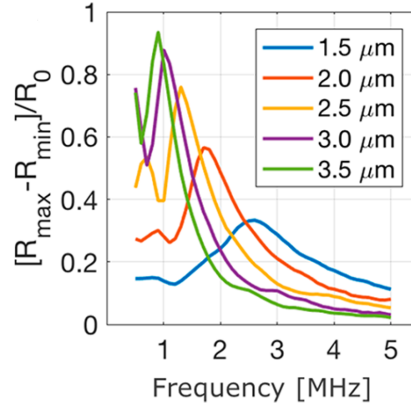


Figura 1.5: Gráfica de la amplitud relativa de oscilación variando la frecuencia de sonicado y el tamaño de la burbuja. La presión constante es de 100kPa. Para cada tamaño de burbuja (señalados en el recuadro interno) se tiene un valor diferente de amplitud máxima en un valor de frecuencia correspondiente a la frecuencia de resonancia.

A partir del estudio de Minnaert la frecuencia de resonancia f_0 está dada por [6]:

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{3\kappa P_0}{\rho R_0^2}}, \quad (1.2)$$

donde κ es el exponente politrópico del gas de la burbuja, P_0 es la presión del ambiente, ρ es la densidad del líquido circundante y R_0 es el radio de la burbuja en reposo. La ecuación (1.2) nos muestra la relación directa entre el radio de la burbuja y la frecuencia de resonancia. Para el caso de una burbuja con un interior de un gas pesado (como los mostrados en la Tabla 1.1) $\kappa=1.1$, y considerando $\rho = 1000 \text{ kg/m}^3$ y $P_0 = 100 \text{ kPa}$ se tiene

$$f_0 R_0 = 3.3 \mu\text{m MHz}. \quad (1.3)$$

1.3.1. Regímenes de oscilación de las burbujas

Cuando una burbuja es sonicada el régimen de oscilación que seguirá depende de la presión y la frecuencia aplicadas [5], [11]. Según el autor la clasificación varía el número de regímenes, pero se muestra la clasificación más sencilla. Las presiones que se mencionan son válidas cuando la frecuencia aplicada es cercana a la frecuencia de resonancia de la burbuja.

Oscilación lineal

A presiones bajas de excitación (<15 kPa) la burbuja oscila con oscilaciones pequeñas, estables y simétricas [5], [11]. Si la frecuencia aplicada es cercana a la frecuencia de resonancia, el comportamiento de la burbuja dependerá de la rigidez y grosor de la membrana [11]. El espectro de frecuencias radiado por la burbuja oscilante contiene en su mayoría la frecuencia de la onda de ultrasonido aplicado [5].

Oscilación no lineal

Conforme la presión se aumenta de los 15 kPa, la amplitud de las oscilaciones de la burbuja excitada aumenta hasta llegar a un umbral en el cual se pasa al régimen no lineal. En este régimen la expansión de la burbuja es mayor que su contracción generando oscilaciones asimétricas. La no linealidad también es favorecida por efectos de la membrana (si la presión es menor a 50 kPa, después deja de tener relevancia debido a su ruptura) como el plegamiento o estiramiento de la misma. El espectro de frecuencias radiado por la burbuja oscilante no sólo contiene la frecuencia fundamental de la onda de ultrasonido aplicada, además, contiene armónicos y subarmónicos de esta frecuencia [5]. En este régimen es cuando se generan los patrones de “microstreaming” debido a las oscilaciones asimétricas que mueven el fluido circundante a la burbuja. Estas corrientes favorecen la difusión de las moléculas de fármaco. También se genera estrés de corte en las estructuras circundantes, entonces, las moléculas transportadas por la burbujas pueden abrir uniones estrechas de las células o abrir poros en las membranas celulares [5].

Cavitación inercial

Conforme la presión aumenta (>300 kPa) las oscilaciones caóticas de la burbuja aumentan de amplitud disminuyendo la presión interna de la burbuja hasta que es superada por la inercia del fluido circundante. Esto lleva al colapso de la burbuja y posiblemente a su fragmentación [5], [11]. El eco generado por estas burbujas deja de contener armónicos y se asemeja más a ruido en todo el rango de frecuencias. En este régimen se pueden generar ondas de choque y “jets” que afecten a las células circundantes produciendo poros en la membrana celular hasta la muerte celular [5].

1.4. Burbujas monodispersas

Los métodos de fabricación estándar producen poblaciones de burbujas con distribuciones de tamaño polidispersas con tamaños entre $1 \mu\text{m}$ y $10 \mu\text{m}$ [5], [6], [19]. Y, como se mostró anteriormente, una burbuja con cierto tamaño y características de membrana resonará a una frecuencia específica. La monodispersidad en términos de tamaño y de respuesta acústica es considerada una condición importante para sacar el mayor provecho de las microburbujas para imagenología y terapia, dando la posibilidad de controlar finalmente su respuesta y usar eficientemente su resonancia [3]. Es por esto que en múltiples trabajos se habla de la necesidad de fabricar burbujas monodispersas.

La ventaja de una población de burbujas monodispersas a una de burbujas polidispersas fue mostrada por Segers y colaboradores[19]. Ellos emplearon una suspensión de un agente de contraste preclínico (llamado BR14) cuya polidispersidad fue del 60%. De esta suspensión se obtuvieron 3 muestras. Las dos primeras se obtuvieron de separar burbujas por su respuesta acústica. Obteniendo las muestra 1 y 2 como moda del radio $2.7 \mu\text{m}$ y una polidispersidad del 9%. La tercera muestra se obtuvo separando burbujas en un dispositivo microfluídico por medio de la técnica “pinched-flow fractionation”. En la Figura 1.6 muestran las distribuciones de tamaños de las muestras. A cada una de estas poblaciones se les aplicaron ondas de ultrasonido variando la frecuencia y valor mínimo de presión (parámetros de interés para las aplicaciones clínicas). Se realizaron las mediciones correspondientes para determinar los coeficientes de dispersión en la frecuencia fundamental (en la cual se obtiene la máxima respuesta) y en la frecuencia del segundo armónico (dos veces la frecuencia fundamental). A partir de estas mediciones se obtuvieron los respectivos valores de sensibilidad $\bar{\sigma}_s$ que corresponde a la relación entre el valor medio entre la concentración de burbujas. Para oscilaciones no lineales de las burbujas, hallaron que la $\bar{\sigma}_s$ fundamental de las poblaciones separadas es en promedio dos veces más grande que la de la población original. Mientras que la $\bar{\sigma}_s$ del segundo armónico es casi tres veces mayor que la de la población original. Estos resultados se muestran en la Figura 1.7.

Los resultados de Segers y colaboradores son muestran las ventajas del uso de burbujas monodispersas de 2 a 3 órdenes de magnitud a nivel *in vitro*. Hasta hace poco se ha logrado un mejor control en la fabricación de burbujas con tales características [3], por lo

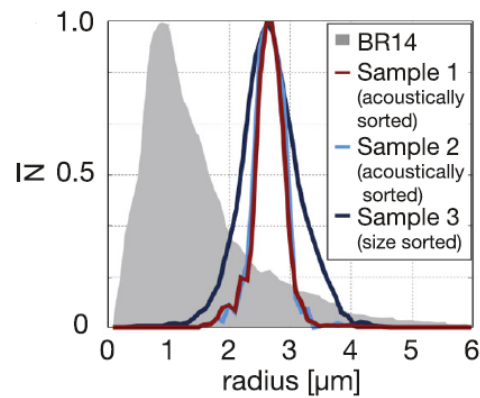


Figura 1.6: Gráfica de las las poblaciones de burbujas. La gráfica sombreada corresponde a la población original (BR14). Las demás curvas corresponden a las poblaciones separadas acústicamente (Sample 1 y 2) y por tamaños (Sample 3). Imagen tomada de [19].

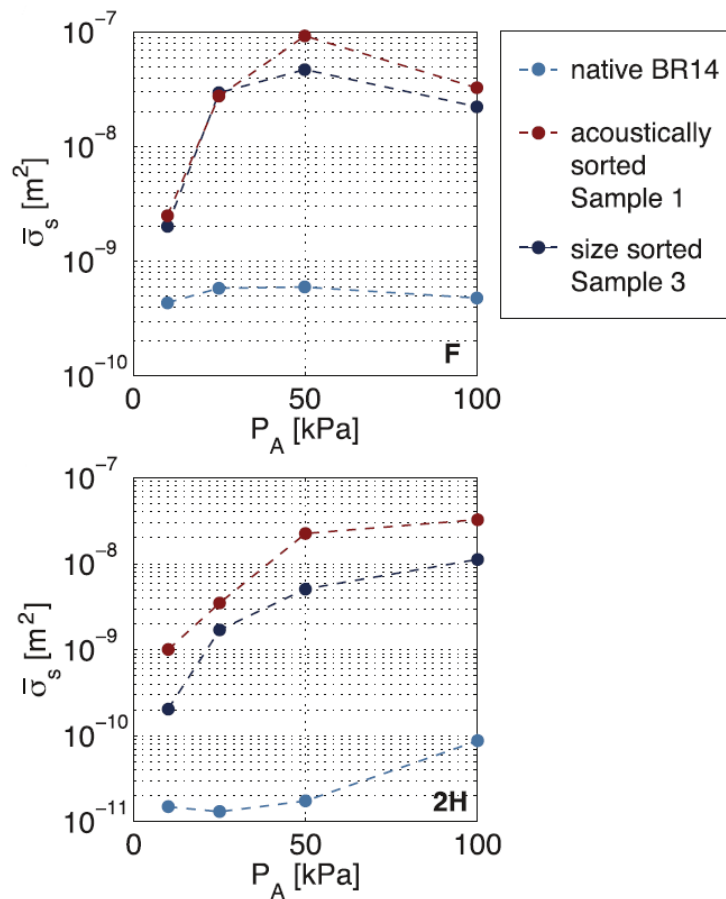


Figura 1.7: Gráfica de la sensibilidad expresada como la media de la dispersión transversal por burbuja de muestras de población original, separadas acústicamente y por tamaños. A corresponde a los valores a la frecuencia fundamental y B a los del segundo armónico. Imagen tomada de [19].

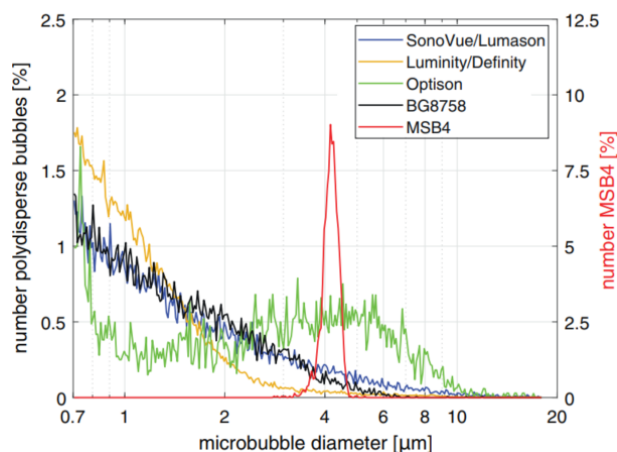


Figura 1.8: Distribuciones de tamaño de las burbujas probadas por Helbert y colaboradores en [20]

que apenas se han tenido resultados con pruebas *in vivo*.

En 2020, por primera vez Helbert y colaboradores evaluaron *in vivo* la sensibilidad acústica de burbujas monodispersas y compararon con burbujas polidispersas comerciales y en investigación [20]. De las muestras empleadas tres se comercializan para uso clínico (*SonoVue/Lumason*, *Luminity/Definity* y *Optison*), y dos eran muestras experimentales (BG8758 y MSB4) con la misma composición. BG8758 tenía una distribución polidispersa y MSB4 monodispersa. En la Figura 1.8 se muestran los histogramas para la comparación de las distribuciones de tamaños. Encontraron que las burbujas monodispersas producían eco tanto como lo hacían las burbujas polidispersas. Además, no encontraron diferencias importantes en las imágenes de ultrasonido generadas. Sin embargo, en el caso de la sensibilidad acústica hallaron que con la población monodispersa era 15 veces mayor en cerdo y 10 veces mayor en ratas. Otro dato relevante es que demostraron que las burbujas monodispersas producidas en dispositivos de enfoque de flujo son seguras *in vivo*.

1.5. Fabricación de las burbujas

Recordemos que las burbujas de nuestro interés tienen sólo dos partes: una membrana y un núcleo gaseoso. En general para obtener la membrana se parte de una suspensión de liposomas obtenida al dispersar una mezcla de lípidos en agua. A continuación se mencionan tres técnicas de fabricación de burbujas.

1.5.1. Sonicación

Fue el primer método para generar burbujas en estudios de agentes de contraste. Consiste en emplear las vibraciones (comúnmente a 20kHz) de una punta de ultrasonido para arrastrar el gas de la fase gaseosa a las rupturas en la fase líquida generadas por la cavitación. Con este método se puede obtener 1l de dispersión con 10^{12} burbujas/l en un minuto. El proceso estocástico de arrastre y ruptura provoca una población polidispersa de burbujas [3].

1.5.2. Agitación

Este es el método más sencillo para fabricar burbujas [1]. Un volumen pequeño (~ 1 ml) de suspensión de liposomas se introduce en un vial dejando el gas en la parte superior del vial, se sella y se agita en una amalgamador dental o en un aparato similar. Estos aparatos generan una vibración a lo largo del eje vertical del vial aproximadamente a 4kHz. Con este método se pueden fabricar burbujas rápidamente, 10^9 burbujas en menos de un minuto. Al igual que en el caso de la sonicación, los procesos de arrastre y ruptura son poco comprendidos, pero también se obtienen poblaciones polidispersas [3].

Casualmente, con la sonicación y la agitación se obtienen distribuciones de tamaños muy parecidas, a pesar de que las condiciones de fabricación (como la frecuencia característica) son diferentes [3].

1.5.3. Microfluídica

Existen diferentes formas para generar poblaciones monodispersas de burbujas. Algunos métodos consisten en refinar las poblaciones polidispersas por medio de centrifugación, decantación o filtración [21]-[23]. También se puede generar directamente burbujas monodispersas empleando dispositivos microfluídicos, como los de enfoque de flujo. En estos dispositivos un flujo central de gas es enfocado por dos flujos laterales iguales de la fase líquida (Figura 1.9). Los flujos avanzan hacia una pequeña constricción donde el flujo de gas experimenta una inestabilidad capilar, rompiéndose y generando pequeñas burbujas [22]. Las burbujas son más grandes que el tamaño de la constricción, por lo que se deben emplear constricciones muy pequeñas propensas a taparse con impurezas durante los

experimentos [2]. Para resolver este problema en los canales de entrada del dispositivo se colocan estructuras que funcionan como filtros [2]. Debido a la existente comprensión que se tiene de la microfluídica y a los innovativos diseños, actualmente el enfoque de flujo permite que se fabriquen millones de burbujas en segundos. Permitiendo obtener una dosis clínicamente relevante (10^9 burbujas) en minutos [3].

Hay bastante trabajo respecto a la dinámica de fluidos que gobierna la formación de burbujas en los microdispositivos como el proceso de desprendimiento de las burbujas, formación y ruptura del jet de gas y efectos de la geometría del enfoque de flujo. Sin embargo, aún hay mucho trabajo por hacer respecto a la dinámica de fluidos en la constricción para obtener un modelo predictivo o completo, así como los efectos dados por los elementos de recubrimientos o fármacos [3].

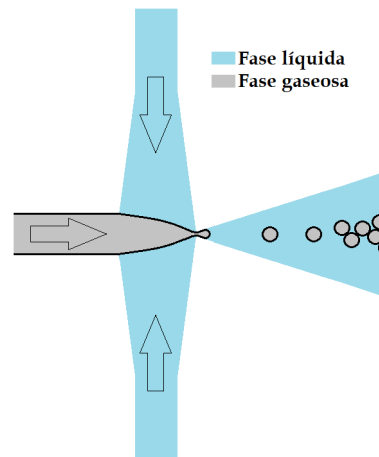


Figura 1.9: Dispositivo de enfoque de flujo .

1.6. Estabilidad de burbujas generadas en dispositivos microfluídicos

Se necesita una concentración alta (10 veces mayor que los métodos estándar de fabricación de burbujas) y mezclas específicas de fosfolípidos para producir burbujas estables que no coalescan en los dispositivos microfluídicos. [3], [21]. En una fabricación de burbujas que no coalesce y con una alta tasa de producción sólo el 0.1% de la concentración total de fosfolípidos se adsorbe en la membrana de las burbujas [21]. Existen un par de suposiciones del por qué es necesario emplear concentraciones tan altas de fosfolípidos

para fabricar burbujas en los dispositivos. Pero primero es necesario explicar un poco de la generación de burbujas con membranas.

Como se mencionó anteriormente para fabricar burbujas se parte de una suspensión de liposomas en un medio acuoso que está en contacto con el gas que formará el interior de la burbujas. Los liposomas colisionan hacia la interfase gas-líquido que en el caso de los dispositivos microfluídicos esto es favorecido por los esfuerzos de corte del flujo pero desfavorecido por la limitación de difusión en un flujo laminar. Cuando los liposomas cuentan con la inercia suficiente al golpear la interfase ambas superficies quedan en contacto permitiendo que la capa externa de la membrana del liposoma se pueda fusionar en la interfase (este proceso se mantiene teniendo colisiones burbuja-liposoma y teniendo los mismos efectos). Los gradientes de tensión superficial favorecen a que el liposoma se desensamble y los lípidos se distribuyan en la interfase y una vez libres se ordenan inmediatamente con las colas hidrofóbicas encarando el núcleo gaseoso y ensamblando una nueva monocapa. La adsorción de lípidos termina una vez que su densidad permite llegar a un valor de equilibrio de tensión superficial de aproximadamente 25 mN/m [24].

Ahora, regresemos al par de suposiciones para explicar el por qué es necesario emplear concentraciones tan altas de fosfolípidos en los microdispositivos. Primera, una alta concentración de lípidos implica una mayor cantidad de liposomas y por ende una mayor tasa de adsorción de lípidos en la interfase como consecuencia del aumento de colisiones de los liposomas. Y segunda, los liposomas contenidos en el medio entre dos burbujas que colisionan, pueden prevenir la coalescencia por medio de fuerzas de superficie repulsivas [21].

1.7. Coalescencia de burbujas en dispositivos de enfoque de flujo

De los modelos de coalescencia de partículas fluidas como las burbujas se sabe que la frecuencia de coalescencia depende de la frecuencia de colisiones y la eficiencia de coalescencia. La frecuencia de colisiones entre burbujas puede ser aumentada por flujos turbulentos, gradientes de velocidad en el flujo, flotabilidad o atrapamiento en remolinos. La eficiencia de coalescencia resulta del hecho de que experimentalmente está comprobado

que no todas las colisiones terminan en una coalescencia [25].

En un dispositivo de enfoque de flujo una burbuja recién formada tendrá una velocidad mayor a la de sus predecesoras debido al ensanchamiento del canal que va hacia la salida. Conforme una burbuja avanza en el eje horizontal del canal x su velocidad disminuye (Figura 1.10). Entonces la burbuja de mayor velocidad colisiona con la burbuja generada antes que ella la cual a su vez ya ha empujado a otra burbuja por el mismo principio. De esta manera las burbujas se presionan entre sí haciéndose propensas a coalescer. Este proceso se muestra en la secuencia de imágenes de la Figura 1.11.

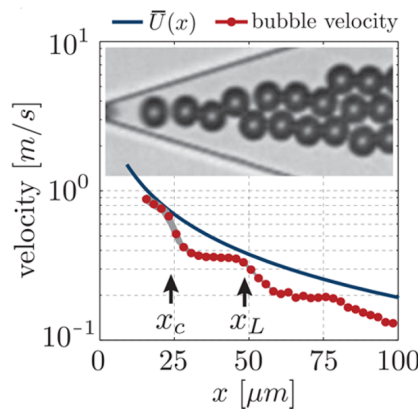


Figura 1.10: Velocidad de una burbuja en el eje x . Los puntos rojos corresponden a mediciones experimentales. La línea azul representa la velocidad media teórica en el canal. El origen en x comienza en la constricción como se muestra en la captura insertada en la gráfica. Imagen tomada de [21].

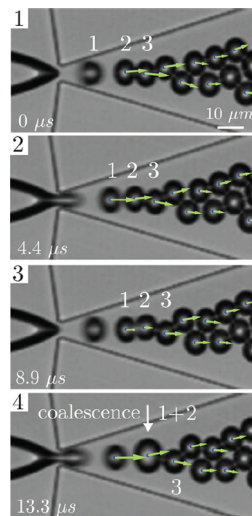


Figura 1.11: Burbujas coalesciendo. las flechas verdes indican los vectores de velocidad. Imagen tomada de [21].

El modelo de drenado de líquido permite describir a la coalescencia de las burbujas como un proceso probabilístico que depende de dos tiempos característicos, el tiempo de drenado (τ_D) y el tiempo de contacto τ_C [21], [25]

$$P = \exp\left(-\frac{\tau_D}{\tau_C}\right), \quad (1.4)$$

donde P es la probabilidad de coalescencia. El tiempo de drenado corresponde al tiempo necesario en el cual una fuerza externa F acerca dos burbujas separadas una distancia inicial h_i (distancia a la cual las burbujas no pueden coalescer) a una distancia crítica h_c (usualmente entre 10 y 100nm) en la cual las burbujas pueden coalescer. Existe una manera de aumentar este tiempo y es aumentando la viscosidad en la capa de líquido que está entre las dos burbujas.

Como se mencionó anteriormente las burbujas con membranas lipídicas contienen un fosfolípido pegilado. Por lo que, tanto las monocapas pegiladas en la superficie de las burbujas como la de los liposomas tienen distribuidas en su superficie cadenas de PEG que generan fuerzas de superficie como de van der Waals, electrostáticas, estéricas, entre otras [26]. Las interacciones liposoma-liposoma pegilados y liposoma-monocapa de burbuja pegilados son complejas y no existe un modelo analítico que pueda describirlas. Por lo que se recurre a la aproximación de medio continuo. Por lo que, todas estas fuerzas se simplifican en una viscosidad efectiva η_e la cual nos indica que la viscosidad de la delgada capa entre dos burbujas es diferente a la viscosidad del medio o viscosidad de bulto η_0 , de hecho mayor a esta última en el sistema de interés de membranas pegiladas [21]. Debido a esto podemos determinar la viscosidad relativa Φ_r como

$$\Phi_r = \frac{\eta_e}{\eta_0}. \quad (1.5)$$

Segers y colaboradores desarrollaron la teoría para determinar la función de probabilidad de coalescencia de las burbujas pegiladas en los dispositivos de enfoque de flujo obteniendo la siguiente ecuación [21], [23]

$$P(T) \simeq \exp\left[-\Phi_r(T)\beta\frac{R}{H}\frac{Q_t}{Q_g}\right], \quad (1.6)$$

donde $\beta = 0.024$, T es la temperatura, R es el radio de la burbuja, H es la altura de los canales, Q_t y Q_g son los flujos total y de gas durante la fabricación. El factor $\frac{R}{H}$ depende de la geometría de los canales y $\frac{Q_t}{Q_g}$ depende de los parámetros de flujo de líquido y de gas empleados durante el experimento. Ambas relaciones permiten comparar las producciones realizadas bajo diferentes condiciones experimentales y entre diferentes dispositivos. La viscosidad relativa fue determinada de manera experimental (resultados mostrados más adelante) y tiene la siguiente expresión [23]:

$$\Phi_r(T) = 1 + \frac{c_\infty^2 \phi_{PEG}^3 M_W^4}{\eta_0(T)} \Omega e^{kT}, \quad (1.7)$$

donde c_∞ es la concentración total de los fosfolípidos en mol m^3 , ϕ_{PEG} es la fracción molar del fosfolípido pegilado, M_W es el peso molecular de la cadena de PEG, $k = 0.047\text{K}^{-1}$ y $\Omega = 5.024 \times 10^{-17} \text{mol}^2 \text{m}^5 \text{kg}^{-3} \text{s}^{-1}$ si el fosfolípido primario es DPPC.

En la ecuación (1.6) se observa que la probabilidad de coalescencia depende en gran medida de la viscosidad relativa, así que, es de gran importancia aumentar el valor de Φ_r y en consecuencia reducir P . No existe un estudio analítico que permita obtener la viscosidad relativa de una suspensión acuosa de liposomas pegilados en una capa adelgazante entre superficies pegiladas [21], por lo tanto, Φ_r fue determinada experimentalmente. La ecuación (1.7) muestra que existen dos actores principales para poder aumentar el valor de viscosidad relativa: las cadenas PEG en la superficie de las burbujas y la temperatura.

La validación del modelos de Segers y colaboradores para calcular la probabilidad de coalescencia (ec. (1.6)), y la determinación de la viscosidad relativa (ec. (1.7)) se obtuvieron experimentalmente generando burbujas con diferentes composiciones y a diferentes temperaturas. Tales resultados se muestran en las dos siguientes secciones.

1.7.1. Variaciones de composición

Empleando un dispositivo de enfoque de flujo (características mencionadas más adelante) se fabricaron burbujas con una composición basada en la del UCA *Definity*. Se hicieron variaciones en la composición para determinar la probabilidad de coalescencia y evaluar qué factores influían en la viscosidad relativa.

La mezcla de fosfolípidos empleada fue DPPC:DPPA:DPPE-PEG5000 siempre man-

formulación	ϕ_{PEG}	λ_G	λ_{PG}	legenda	Fig.1.10
DPPC/DPPA/DPPE-PEG1000	0.10	0.05	0.05		●
DPPC/DPPA/DPPE-PEG2000	0.10	0.05	0.05		●
DPPC/DPPA/DPPE-PEG3400	0.10	0.05	0.05		●
DPPC/DPPA/DPPE-PEG5000	0.10	0.05	0.05		●
DPPC/DPPA/DPPE-PEG5000	0.10	0.15	0.05		■
DPPC/DPPA/DPPE-PEG5000	0.10	0.25	0.05		■
DPPC/DPPA/DPPE-PEG5000	0.10	0.05	0.00		▲
DPPC/DPPA/DPPE-PEG5000	0.10	0.05	0.10		▲
DPPC/DPPA/DPPE-PEG5000	0.10	0.05	0.15		▲
DPPC/DPPA/DPPE-PEG5000	0.05	0.05	0.05		▼
DPPC/DPPA/DPPE-PEG5000	0.15	0.05	0.05		▼
DPPC/DPPA/DPPE-PEG5000	0.20	0.05	0.05		▼

Tabla 1.2: Formulaciones empleadas por Segers y colaboradores en 2017. Tabla tomada de [21]

teniendo la relación molar

$$\frac{8}{9}(1 - \phi_{PEG}) : \frac{1}{9}(1 - \phi_{PEG}) : \phi_{PEG} \quad (1.8)$$

donde ϕ_{PEG} es la fracción molar del fosfolípido pegilado. El uso de esta relación molar es porque en trabajos anteriores se ha observado que aporta estabilidad a las burbujas. Se usaron diferentes moléculas de PEG con pesos moleculares de 1000, 2000, 3400 y 5000g mol⁻¹. Los fosfolípidos se mezclaron con una solución acuosa formada por solución búfer (20mM de TRIS en agua), propilenglicol y glicerol (estos dos últimos también usados en la preparación de *Definity*) para formar una dispersión de liposomas. En la solución acuosa hubo variaciones de la fracción de masa el propilenglicol (λ_{PG}) y del glicerol (λ_G) en 0.05, 0.10 y 0.15 y en 0.05, 0.10 y 0.25 respectivamente. Entonces las formulaciones con las que trabajaron se muestran en la Tabla 1.2. Con cada una de ellas se fabricaron burbujas en dispositivos con las siguientes características. La constricción con un ancho $w = 5\mu m$ se expande a un canal de ancho $2T = 500\mu m$ con un ángulo de apertura $\theta = 17.5^\circ$ (Figura 1.12). La altura de los canales fue de $H = 14\mu m$.

Durante la fabricación ellos obtuvieron capturas de las burbujas avanzando hacia la salida (Figura 1.13(a)). En tales imágenes se observan burbujas de diferentes tamaños debido a que hay burbujas sin coalescer y burbujas que han coalescido una o más veces. Al analizar estas imágenes se pueden medir y contar todas las burbujas por captura. Después las mediciones en varias capturas se obtiene la distribución de tamaños (Figura 1.13(b)).

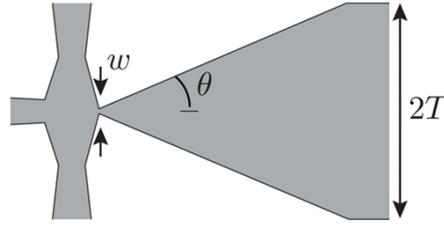


Figura 1.12: Esquema que muestra la geometría del dispositivo usado por Segers y colaboradores. Imagen de [21]

En esta gráfica de distribuciones de tamaños se aprecian varios picos. El primero corresponde a las burbujas que no han coalescido, el segundo a las burbujas que han coalescido una vez, y así para los siguientes picos. Con estos datos obtuvieron la probabilidad de coalescencia de las burbujas:

$$P = \frac{\sum_2^n nN_n}{N_{Tot}} \quad (1.9)$$

donde n es el número del pico, N_n es el número de burbujas en cada pico y $N_{Tot} = \sum_1^n nN_n$ es el número total de burbujas.

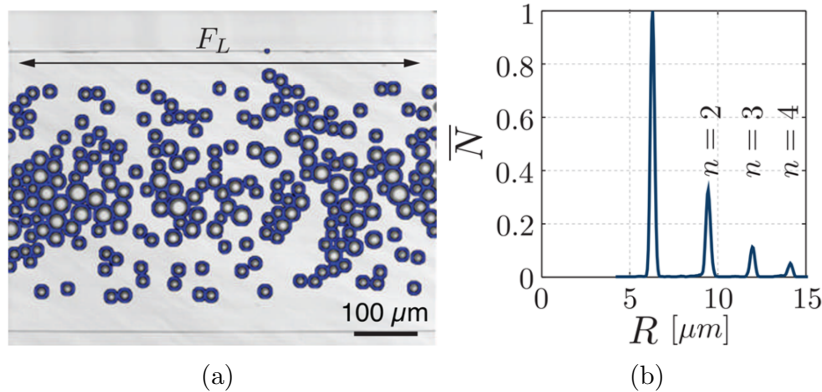


Figura 1.13: (a)Burbujas avanzando en el canal rectangular de salida. F_L es la longitud del canal de salida que se observa en las captura. (b)Tamaños de las burbujas en este canal según el número normalizado de la moda \bar{N} .

Al fabricar burbujas en el dispositivo se tienen casi todos los valores del lado derecho de la ecuación 1.6, sólo se desconoce la viscosidad relativa. Y al obtener el valor de probabilidad de coalescencia por medio de la ecuación 1.9 queda como única incógnita de la ecuación 1.6 el valor de Φ_r . de esta manera Segers y colaboradores pudieron obtener la curva maestra de probabilidad de coalescencia (Figura 1.14).

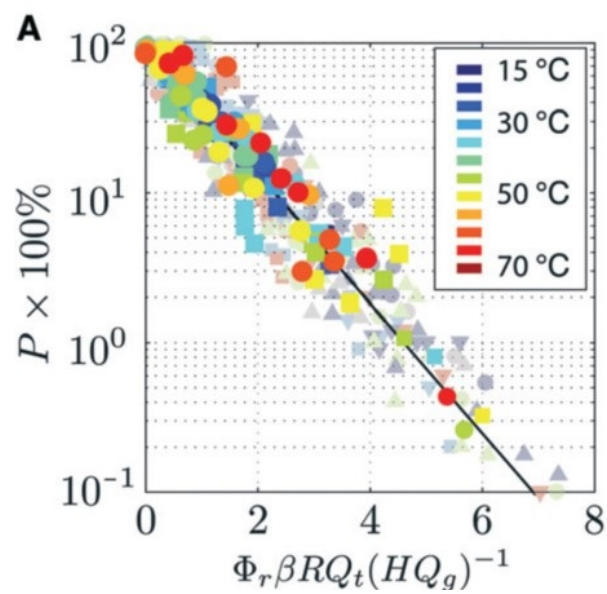


Figura 1.14: Curva maestra de probabilidad de coalescencia. Se resaltan los resultados obtenidos en experimentos variando la temperatura. En marca de agua se encuentran los experimentos en los que se varía la composición (fracción molar del lípido pegilado, peso molecular de la cadena de PEG y porcentaje de glicerol y propilenglicol en la suspensión de burbujas). Imagen tomada de [23].

Planteamiento del problema

En general, a las burbujas fabricadas en dispositivos de enfoque es difícil recolectarlas monodispersas y su coalescencia ha sido bien estudiada cuando su membrana es únicamente de lípidos, pero aún no se tiene información de lo que sucede al añadir agentes terapéuticos.

Hipótesis

La incorporación de moléculas terapéuticas en la fabricación de microburbujas usando dispositivos de enfoque de flujo va a alterar la probabilidad de coalescencia de las burbujas.

Objetivos

General

Identificar y controlar los parámetros relevantes que determinan la distribución de tamaños y probabilidad de coalescencia de burbujas con membranas de fosfolípidos y que contengan moléculas terapéuticas.

Particulares

- Fabricar burbujas pequeñas (2-5 μm), monodispersas ($\text{CV} \leq 5\%$) y estables cuya membrana esté compuesta sólo de lípidos.
- Estudiar el efecto en el tamaño y probabilidad de coalescencia de las burbujas al agregar un fármaco a sus membranas.
- Entender el papel de las características de los liposomas en el tamaño, estabilidad y probabilidad de coalescencia de las burbujas.

Capítulo 2

Métodos y materiales

2.1. Dispositivo microfluídico

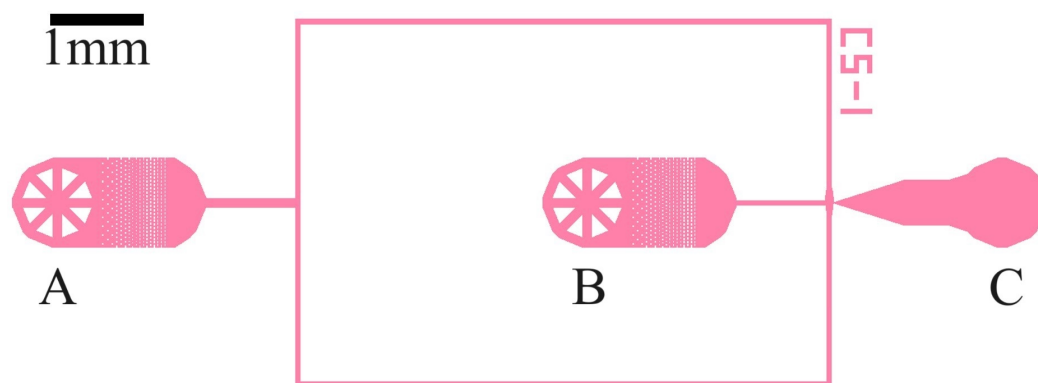
Para la generación de microburbujas se necesitó la producción de dispositivos de enfoque de flujo. La técnica para obtener este tipo de dispositivos fue el de litografía suave.

2.1.1. Diseño del dispositivo

Usando el programa *Autodesk AutoCAD 2016* (*Autodesk, Inc.*) se obtuvo el diseño mostrado en la Figura 2.1(a). Para la entradas del dispositivo se agregaron una gran cantidad de pilares rectangulares cuya función es actuar como filtros (Figura 2.1(b)). El ancho de la constricción del dispositivo se eligió de $5\mu\text{m}$ (Figura 2.1(c)), el ángulo de apertura de la constricción y el ancho y largo del canal de salida se tomaron de [21] (Figura 2.1(d)). Este diseño se replicó para obtener 10 dispositivos dentro de una circunferencia de 9cm de diámetro. El diseño se generó en un archivo tipo DXF para ser abierto por el programa *KLayout* (*Matthias Köfferlein*). Aquí el diseño se seccionó separando las hileras que contenían los diseños repetidos del dispositivo. Cada sección se guarda en un archivo GDS.

2.1.2. Fabricación del molde maestro

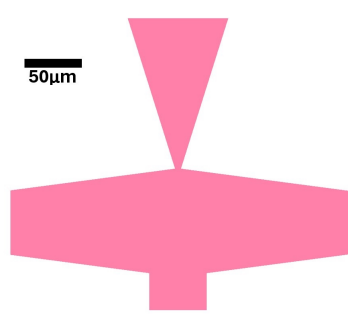
La base del molde fue una oblea de silicio de 10cm de diámetro (*Desert Silicon Inc.*). El tratamiento que recibió la oblea fue el siguiente:



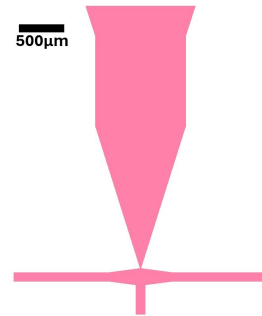
(a) Dispositivo completo



(b) Entrada con filtro



(c) Constricción del dispositivo



(d) Canal de salida

Figura 2.1: Diseño de uno de los dispositivos de enfoque de flujo. En (a) se indican con *A* la entrada del líquido al dispositivo, con *B* la entrada del gas y con *C* la salida.

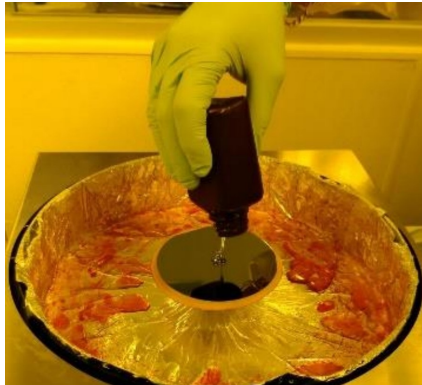


Figura 2.2: Agregando resina fotosensible a la oblea

1. Usando una corriente de nitrógeno se retiraron pelusas o basuras pequeñas.
2. Se expuso a plasma de oxígeno durante 10min usando un sistema de plasma (*Zepto, Diener electronic GmbH+Co KG*) para asegurar la limpieza de la superficie.
3. La oblea se colocó en la base de un *spin coater* (*6808 Spincoater, Specialty Coating Systems Inc.*). Sobre la oblea se añadió una pequeña cantidad (no se midió) de la resina fotosensible SU-8 2015 (*Kayaku Advanced Materials, Inc.*) (Figura 2.2). Después se siguió el siguiente protocolo para obtener una delgada capa de la resina (se esperaba que fuera de $14 \mu\text{m}$). El grosor de esta capa determina la tienen los dispositivos.
 - a) Paso 1. Pasar de 0 a 500rpm en 10s (rampa de 5s).
 - b) Paso 2. Pasar de 500 a 3500rpm en 30s (rampa de 10s).
 - c) Paso 3. Pasar de 3500rpm a 0 en 11.6s.
4. El siguiente paso fue el *soft bake* que consistió en colocar la oblea en la parrilla durante 3min a 95°C . Esto fue para evaporar una parte de los solventes de la resina y evitar que la capa de resina se adelgace.
5. La oblea se colocó en una base del generador de *micropatrones* (*$\mu\text{PG} 101$ Heidelberg Instrumets Inc.*). Esta máquina se controla usando el programa *$\mu\text{PG} Exposure Wizard$* . En este programa se cargaron los archivos GDS con los diseños de los dispositivos. La máquina tiene un láser de UV que va pasando por las zonas que contienen diseño (en nuestro caso corresponde a las zonas de color rosa en la Figura 2.1(a)),

polimerizando la resina de esas áreas, proporcionándoles rigidez. Se usó el cabezal de 4mm y los parámetros energéticos de exposición fueron 30mW al 60 %. El barrido del haz por todas las áreas a tratar tardó varias horas.

6. Se realizó el *post exposure bake*. Consistió colocar la oblea en la plancha durante 4min a 95°. Similar al caso del soft bake, este paso fue para evaporar solventes.
7. Se hizo el revelado de las estructuras de la oblea. Para esto la oblea se cubre con el revelador (SU-8 Developer, MicroChem Corp.) de propilenglicol metil éter (PGMEA por sus siglas en inglés), se deja actuar durante unos 10s y todo se enjuaga con isopropanol (Fermont). La resina no polimerizada se desprende con el revelador, formando una solución lechosa que se lava con el alcohol. Así que este paso se repitió hasta que el solvente salió transparente. Para revisar que la resina no polimerizada se había lavado, se revisó en el microscopio (*StemiDV4, Carl Zeiss Microscopy*) que no quedaran manchas de resina.
8. Se hizo el *hard bake* a 150° durante 30min. En este paso se evaporan todos los solventes, dando la dureza necesaria a las estructuras del molde.
9. La oblea se colocó vertical en un contenedor y se agregaron 200 μ l de clorotrimetilsilano (*Sigma Aldrich*), se cerró el contenedor y se dejó reposar durante 30min a temperatura ambiente. En este proceso el clorotrimetilsilano se evapora y se adhiere a la superficie del molde y deja la superficie lipofílica para evitar que el polidimetilsilano (PDMS) se pegue a las estructuras.

2.1.3. Fabricación de los microdispositivos

Con la litografía suave produjimos dispositivos de PDMS con una base de vidrio.

La preparación del PDMS (*Sylgard 184 Silicone Elastomer, The Dow Chemical Company*) consiste en mezclar 50g de pre-polímero base con 5g de agente curador en un vaso de plástico de 100ml. El vaso se coloca en una mezcladora centrífuga (*Thinky Mixer AR-100, Thinky Corporation*) y se centrifuga durante 2min.

El molde se colocó dentro de una caja Petri forrada con papel aluminio y se cubrió con la mezcla de PDMS, dejando una capa de aproximadamente 1 cm. La caja Petri se

introdujo a un desecador y se aplicó vacío durante 20min. Esto para extraer las burbujas de aire atrapadas en la mezcla. Después las burbujas que quedaron en la superficie se rompieron con corrientes de nitrógeno y con una punta de plástico. Para solidificar el PDMS la caja Petri se hornea a 80°C durante 1h.

El PDMS curado sobre el molde se corta por todo el borde de la oblea empleando un bisturí y se desprende con cuidado. Así una cara del PDMS queda grabada con los que serán los canales del dispositivo. Luego cada dispositivo es cortado usando una navaja. Las entradas y salidas de los dispositivos se perforan usando una microperforadora (*MP10-UNV, SCHMIDT Technology Corporation*) y con pinzas se retiraron los fragmentos que resultaron de perforar el PDMS. Usando cinta adhesiva se retiran las basuras de la superficie de cada cara de los trocitos de PDMS. Al perforar se generan algunos residuos que pueden quedarse pegados en el borde de la perforación. Entonces, los pedacitos de PDMS se lavaron, para esto se metieron en tubos Falcon que se llenaron con etanol para sonicarlos durante 30min. Después el PDMS se secó durante toda la noche a 37°C.

Para determinar las dimensiones de los canales de los 10 dispositivos se tomaron micrografías siendo de mayor interés el ancho de la constricción y la altura de los canales (Figura). En el caso de la altura el PDMS se cortó transversalmente. Usando una regla micrométrica se pudo hacer la conversión de pixeles a micrómetros.

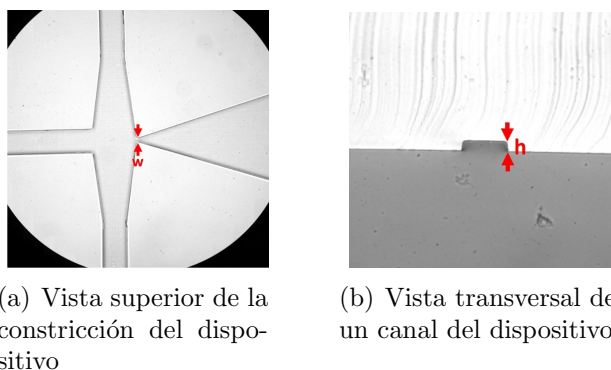


Figura 2.3: Micrografías de los dispositivos. Se marcan con w el ancho de la constricción y con h la altura de los canales.

Pegado de los dispositivos

Antes de empezar el experimento se pegaban los dispositivos. El PDMS se limpiaba con cinta adhesiva para retirar basuras de su superficie. Los portaobjetos que sirvieron como

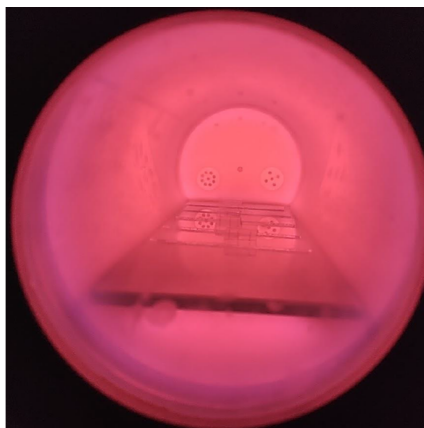


Figura 2.4: Cámara del sistema de plasma. En el interior se encuentran tres dispositivos. El brillo rosado es característico del plasma de oxígeno.

base se limpiaban con etanol al 70 % y usando un trapo que no libera pelusa (*W-SNTR, NCI, Inc.*). Ambos pasos se realizaban justo antes del pegado.

Por cada experimento se colocaban tres trocitos de PDMS y tres portaobjetos en una placa de vidrio para introducirlos a la cámara del sistema de plasma. La exposición a plasma de oxígeno se hacía durante 1.5min (Figura 2.4). En este proceso radicales de oxígeno desprenden grupos hidroxilo de las moléculas de la superficie del PDMS y del vidrio del portaobjetos, entonces en el caso del PDMS la superficie resulta hidrófoba. Inmediato al tratamiento las caras expuestas del PDMS y del vidrio se unían. Se presionaba ligeramente sobre cada uno de los chips durante 30s. Después los dispositivos se dejaban en reposo durante 1.5min. Para conservar la propiedad hidrofílica de la superficie del PDMS, los dispositivos se sumergían en agua y se metían a un desecador para aplicar vacío durante 15 min. Cada 5 min el desecador se inclinaba en diferentes direcciones para romper las burbujas de aire que se formaron en la superficie del PDMS. Al finalizar, los chips se dejaban en el agua hasta que se utilizaban en el experimento. Para cada experimento sólo se necesitó un chip, pero se preparaban tres para los casos en los que los chips no pegaban correctamente o tenían una basura que obstruía los canales.

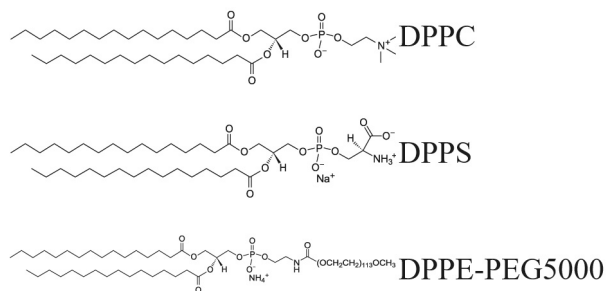


Figura 2.5: Estructura de los lípidos empleados. Imágenes de *Avanti Polar Lipids*.

2.2. Preparación y medición de liposomas

2.2.1. Preparación de la mezcla de lípidos

La mezcla lipídica empleada para preparar los liposomas se basó en la literatura y en la experiencia que se tenía en el laboratorio. Se emplearon tres lípidos (*Avanti Polar Lipids*): dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS) y dipalmitoilfosfatidiletanolamina - PEG5000 (DPPE-PEG5000). Entonces en nuestra mezcla DPPC es el lípido primario, DPPS es el lípido cargado y DPPE-PEG5000 es el lípido pegilado. En la Figura 2.5 Cada lípido se pesó de tal manera que la mezcla resultante tuviera una relación molar de 7:2:1. Los lípidos se disolvieron en cloroformo (*Sigma Aldrich*) para el caso del DPPC y el DPPE-PEG5000, y en una solución 3:1 de cloroformo y metanol (*Sigma Aldrich*) para el DPPS. Los volúmenes de la tres soluciones de los lípidos se mezclaron en frascos de vidrio en las cantidades necesarias para mantener la relación molar mencionada, el cual después se agitó vigorosamente. Después los solventes se evaporaron con corrientes de nitrógeno mientras se agitaba empleando un agitador magnético a temperatura ambiente durante 15min. Para asegurar la completa evaporación de los solventes los frascos destapados se colocaron en un desecador al cual se le aplicó vacío durante 2h a temperatura ambiente. Al finalizar los frascos se sellaron presurizando el interior con nitrógeno y se almacenaron a -15°C .

La dispersión de liposomas se preparaba el mismo día del experimento o un día antes. Para los experimentos sin fármaco los liposomas se hidrataron con búfer de PBS. En los casos en los que se necesitaba el fármaco, clorhidrato de doxorrubicina (*Sigma Aldrich*) se disolvía en el PBS en concentraciones que correspondían al 25 %, 50 % o el 100 % de la concentración molar del DPPS. Recordemos que el fármaco se une al lípido cargado.

Estas concentraciones se eligieron por mantener una alta relación molar entre el lípido cargado y la DOX [12]. Los lípidos hidratados se colocaban en la plancha y se agitaba a 65°C durante 20min, después se dejaban en reposo a esa temperatura mientras se iniciaba al siguiente paso. Los liposomas se extruyeron por un poro de 1 μ m a una temperatura \sim 63°C. Este paso permitía reducir el tamaño de las estructuras formadas por los lípidos y reducir la probabilidad de que taparan la pequeña constricción. Si los liposomas se usaban ese mismo día, se almacenaban en una incubadora a 37°C, si se usaban al siguiente día se almacenaban a 4°C.

2.2.2. Mediciones de tamaño de los liposomas

La determinación de tamaños de los liposomas se hizo por dispersión dinámica de luz usando un *Malvern Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical Ltd)*. De cada muestra se tomaron 50 μ l para realizar 3 mediciones a 25°C.

2.3. Fabricación de burbujas

El flujo volumétrico del líquido suministrado al dispositivo fue regulado con una bomba de jeringa (*Pump 11 Pico Plus Elite, Harvard Apparatus*). El gas suministrado fue nitrógeno y su presión fue regulada con un regulador de presión (R230-02B, *Parker Hannifin Corporation*) y fue medida con un manómetro digital (*DPG108-030G, OMEGA Engineering Inc.*). Los flujos volumétricos del líquido se variaron entre 11 μ l/min y 21 μ l/min y las presiones del gas entre 5psi y 7.5psi. Por cada experimento se hacían 4 variaciones de flujo y presión, para fabricar a las burbujas en esas 4 condiciones. En la platina del microscopio donde se realizaba el experimento se colocaba un recipiente de vidrio y plástico dentro del cual se colocaba el dispositivo (Figura 2.6). Al chip se le conectaban tres tuberías flexibles de 0.2" de diámetro interno (*Tygon, Saint-Gobain*), dos para la entrada de líquido y una para la salida de burbujas. El recipiente se llenaba con agua para termalizar el sistema y se enfriaba o calentaba usando un recirculador (LCB-R08, *Daihan LabTech Co.*). La captura de imágenes del experimento se lograba usando una cámara rápida (*FASTCAM SA3, Photron*) conectada al microscopio invertido. Por cada condición experimental (presión y flujo volumétrico) se grabaron 3 a 5 videos. En la Figura

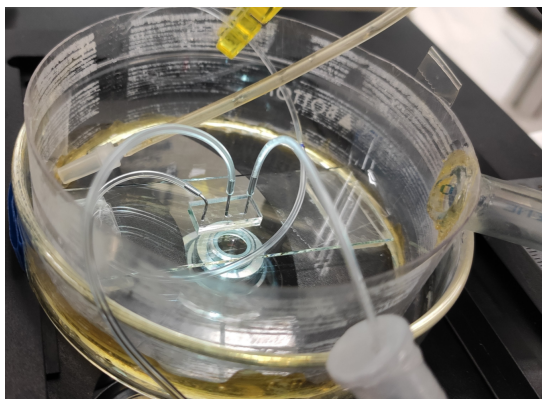


Figura 2.6: Recipiente con el chip montado. El recipiente tiene una base de vidrio y paredes de plástico. En medio se aprecia el dispositivo al cual se le conectaron tres mangueras, dos de entrada y una de salida. En la fotografía se aprecia que la manguera de salida se conecta a un tubo para recolectar las burbujas. Debajo del dispositivo se encuentra el objetivo del microscopio.

2.7 se muestran dos cuadros obtenidos para diferentes condiciones de flujo volumétrico y presión.

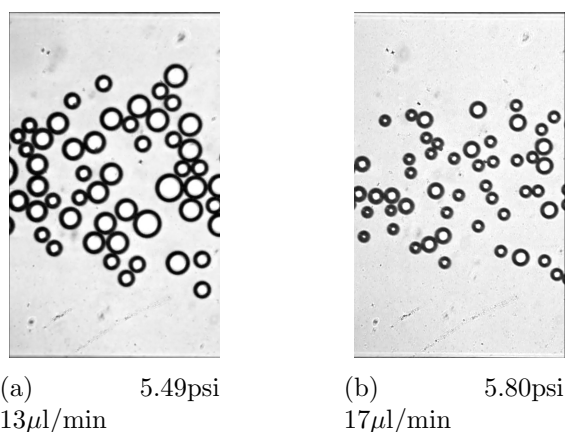


Figura 2.7: Canal de salida de un mismo experimento con diferentes condiciones de flujo volumétrico y presión de gas. Se aprecia una diferencia en el tamaño de las burbujas.

2.4. Procesamiento de imágenes

Como se mencionó en el capítulo anterior para determinar la probabilidad de coalescencia en la literatura realizaron la detección de círculos en el canal de salida. A continuación se explica el método que desarrollamos para realizar la medición de las burbujas en el canal de salida.

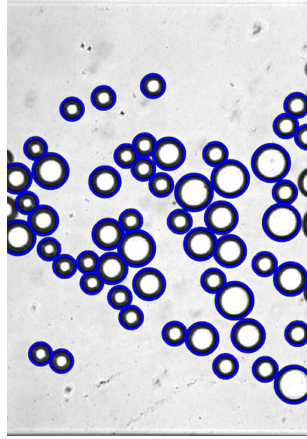


Figura 2.8: Burbujas en el canal de salida. En azul se muestran los círculos detectados por MATLAB.

La cámara rápida generaba videos en formato AVI. La velocidad de captura de imágenes en la parte de ancho constante ($500\mu\text{m}$) fue de 60fps, esto para asegurar que en cada cuadro había burbujas diferentes. Los videos se abrieron en *ImageJ* para recortar, alinear y aumentar el tamaño de los cuadros en un 50%. Los videos se guardaban como secuencias de imágenes.

La siguiente parte del procesamiento se hizo en *MATLAB R2019b* (*The MathWorks, Inc*). Empleando diferentes códigos se unieron las secuencias de imágenes de los videos de cada condición experimental, se binarizaron las imágenes, se realizó la detección de círculos, se hizo la conversión de pixeles a micrómetros y se hizo el ajuste de radios. Este último paso se explica más adelante. En la Figura 2.8 se muestra uno de los cuadros con los círculos detectados sobrepuestos.

2.4.1. Ajuste de radios

Después de realizar las mediciones de altura de los canales y obtener los radios de las burbujas en el canal de salida, se halló que las burbujas observadas no eran esféricas pues estaban aplastadas. En la literatura se halló una aproximación de pancake para determinar el radio que tendrían las burbujas aplastadas si fueran esféricas. La ecuación que relaciona el radio detectado y el radio de la esfera es [27]

$$R_b = \left[\frac{3}{4\pi} \left(2\pi h(R_p - h)^2 + \pi^2 h^2(R_p - h) + \frac{4}{3}\pi h^3 \right) \right]^{1/3}, \quad (2.1)$$

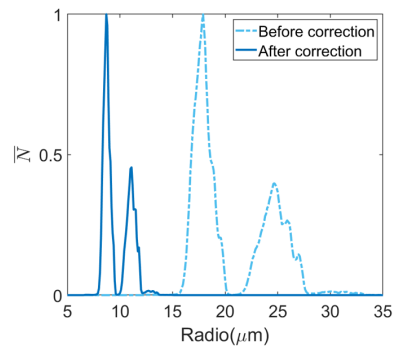


Figura 2.9: Comparación de distribución de tamaños de burbujas antes y después de hacer el ajuste de pancake. En el histograma se grafica el número de burbujas normalizado respecto a la moda de la distribución contra el radio de las burbujas.

donde R_b es el radio de la burbuja esférica, R_p es el radio del pancake y h es la mitad de la altura del canal.

Entonces de los radios obtenidos con MATLAB se construyeron histogramas como el mostrado en la Figura 2.9 usando la ecuación 2.1.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. Radio medio y coeficiente de variación

La ventaja de la fabricación de burbujas por microfluídica es la producción de burbujas monodispersas. Así que a partir del coeficiente de variación (CV) de las distribuciones de tamaño podemos determinar si cumplen con esta característica. También es importante evaluar su tamaño, ya que como se mencionó anteriormente, su efectividad en el tratamiento y seguridad dependen de él.

Dado que se fabricaron burbujas bajo diferentes condiciones de temperatura y concentración total de lípidos, se construyeron las gráficas de dispersión donde se tiene al CV de la distribución según el radio medio de las burbujas (Figura 3.1(a)). Podemos ver que en los casos donde hay una mayor concentración de lípidos y temperaturas elevadas el CV está cerca o dentro del 5% lo cual nos habla de distribuciones monodispersas. Luego, tenemos que el radio de estos casos con CV bajo es menor a $9\mu\text{m}$. Recordemos que el tamaño de las burbujas para aplicaciones biomédicas debe estar entre $2\mu\text{m}$ y $5\mu\text{m}$. Sin embargo, las burbujas fabricadas en dispositivos de enfoque de flujo se caracterizan por reducir su tamaño después de ser fabricadas. Los lípidos de estas burbujas están separados entre sí por lo que el gas del interior se escapa con mayor facilidad, conforme se reduce el tamaño de las burbujas, aumenta el empaquetamiento de los lípidos hasta que la burbuja llega a un tamaño estable[22]. Se tiene que para nuestras burbujas la relación de radio entre una burbuja recién formada y una estabilizada es de 2.2[23]. Entonces, el rango deseable de radio es entre $2\mu\text{m}$ y $9\mu\text{m}$ para burbujas recién formadas. De la gráfica

de la Figura 3.1(a) tenemos que las burbujas monodispersas están en ese rango.

Ahora para el caso de burbujas con fármaco se hicieron diferentes experimentos con diferentes concentraciones de fármaco, pero sólo se hicieron dos variaciones de concentración total de lípidos y temperatura. Como en el caso anterior, en la Figura 3.1(b) se muestra la respectiva gráfica de dispersión. Nuevamente, la producción de burbujas con mayor concentración de lipídica y temperatura genera burbujas monodispersas y con el radio deseado.

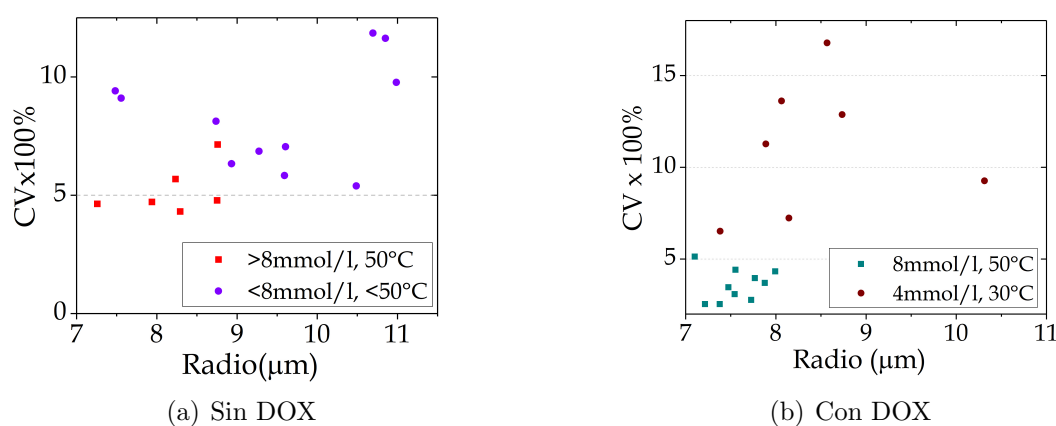


Figura 3.1: Gráficas de dispersión del coeficiente de variación de la distribución de tamaños en función del radio de las burbujas sin y con fármaco.

3.2. Distribuciones de tamaño de burbujas sin fármaco

Para corroborar los resultados de Segers y colaboradores [21] se fabricaron burbujas con diferentes concentraciones de lípidos pero con condiciones similares de presión de gas (entre 5.19psi y 6.38psi), flujo volumétrico del líquido ($13\mu\text{l}/\text{min}$ y $15\mu\text{l}/\text{min}$) y temperatura (30°C). En la Figura 3.2 se muestran los histogramas obtenidos. Recordemos que el primer pico de los histogramas debe corresponder a burbujas que no han coalescido, el segundo a burbujas que han coalescido una vez y el tercero a burbujas que han coalescido dos veces, y así sucesivamente (como ejemplo tenemos la Figura 1.13). Tomando esto en cuenta, vemos cómo el segundo y tercer pico se reducen de tamaño al aumentar la concentración

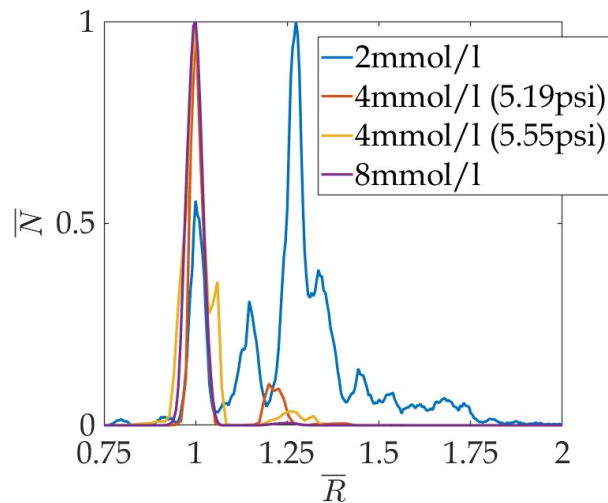
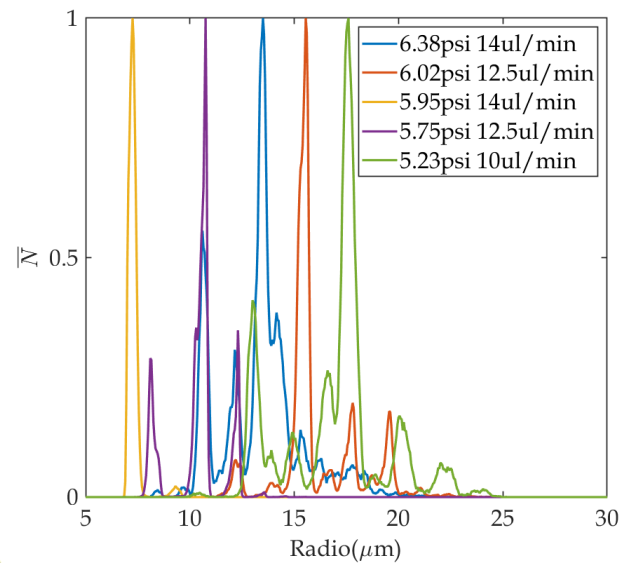


Figura 3.2: Histogramas de las burbujas fabricadas a diferentes concentraciones molares. El eje horizontal está normalizado respecto al radio del primer mayor pico. El eje vertical está normalizado respecto a la moda del número de burbujas. En el caso de 4mmol/l se muestran dos casos con diferente presión de gas.

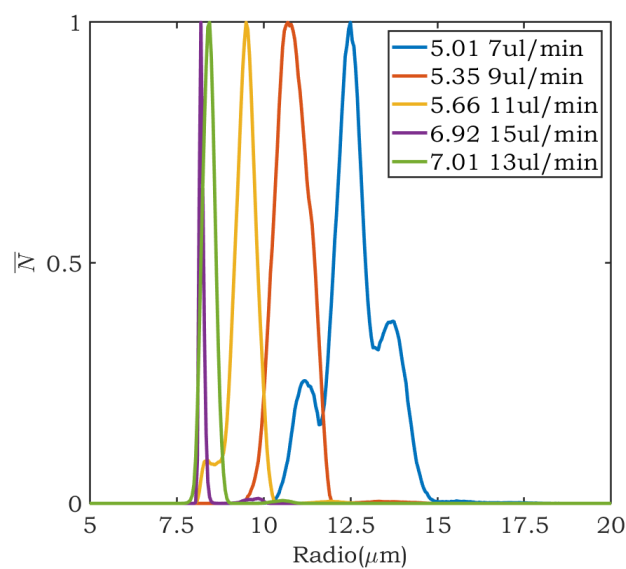
lipídica indicando que se reduce la cantidad de burbujas que han coalescido, aunque en el caso de 2mmol/l es más complejo como veremos más adelante.

Cuando observamos nuestros histogramas hallamos dos cosas. Primero, de la literatura sabemos que al reducir la concentración de lípidos aumenta la coalescencia [21], así que se obtienen más picos en los casos de mayor coalescencia. Esto es evidente cuando comparamos la curva de 2mmol/l con la de 8 mmol/l. Sin embargo, la distribución de 2mmol/l también parece tener ruido, es decir que los picos de coalescencia están acompañados de otros o tienen un "hombro". Esta situación se observa en otras condiciones de fabricación (al variar el flujo de líquido y la presión de gas) para esa concentración (Figura 3.3(a)), situación que sólo es evidente en uno de los casos de 8 mmol/l (Figura 3.3(b)).

Segundo, naturalmente el radio de las burbujas de radio R que han coalescido una vez debe ser $\sqrt[3]{2}R$, las que han coalescido dos veces deben tener un radio de $\sqrt[3]{3}R$, y así sucesivamente. Entonces esta relación debe observarse en los histogramas. Consideremos nuevamente los histogramas mostrados en la Figura 3.2, pero ahora centrándonos en la relación de radios mencionada. En la Figura 3.4 se muestran los ejes donde deben estar los picos correspondientes a la primera y segunda coalescencia. En el caso de 8mmol/l se observa que los picos caen correctamente en las posiciones de los ejes. En el caso de 2mmol/l se aprecian picos que no corresponden a las coalescencias de las burbujas mos-



(a) 2mmol/l



(b) 8mmol/l

Figura 3.3: Distribuciones de tamaño de burbujas fabricadas con diferentes condiciones de flujo volumétrico de líquido y presión de gas.

tradas y ningún pico cae exactamente en el valor esperado para la primera coalescencia. En el caso de 4mmol/l encontramos los dos casos. En la Figura 3.4(b) los picos no caen en las coalescencias esperadas y en la Figura 3.4(c) a pesar de que las curvas no están bien definidas, es decir, tienen picos adjuntos, sí caen en los radios de las coalescencias correspondientes. Debemos resaltar que el problema de los picos fuera del valor esperado de coalescencia puede darse para cualquier concentración, sin embargo, en los casos donde hay una mayor coalescencia es más común.

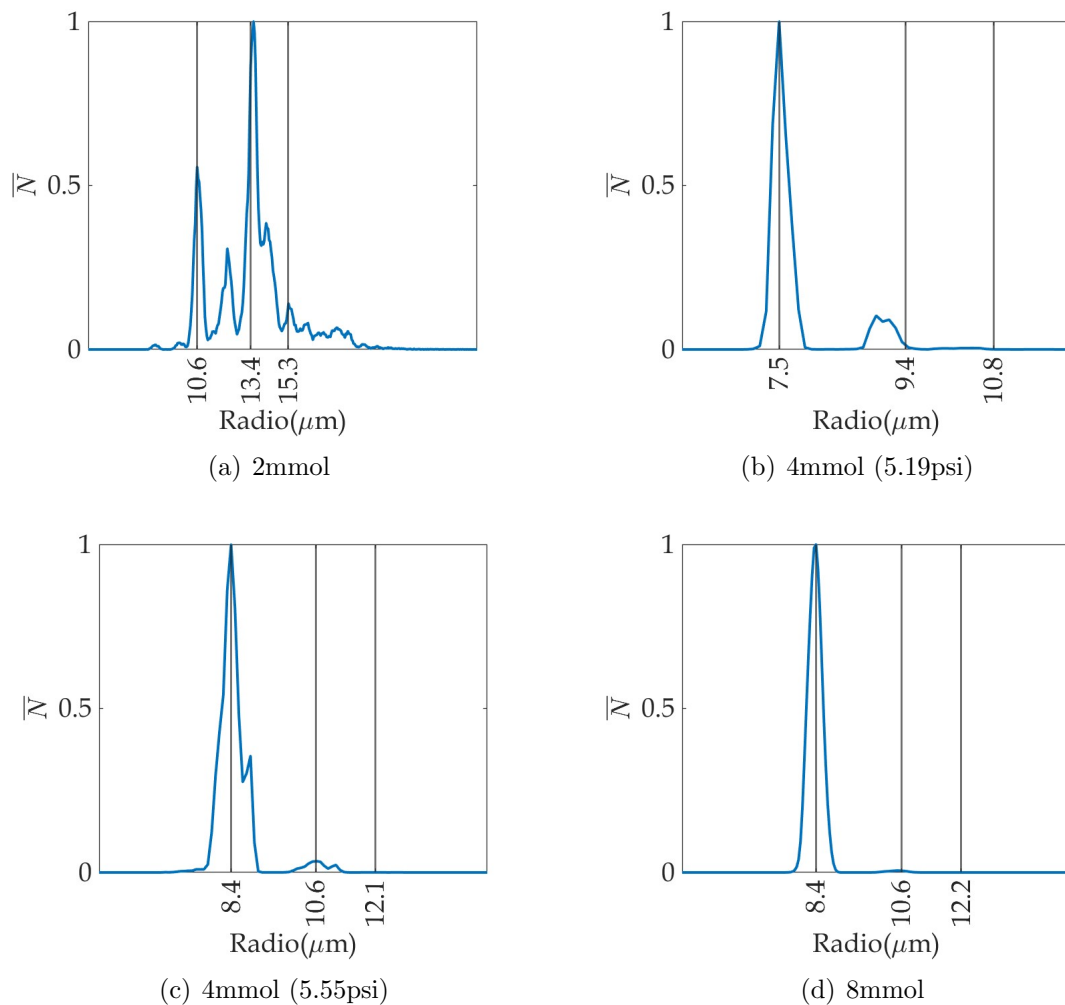


Figura 3.4: Histogramas con las distribuciones de tamaño para 3 concentraciones diferentes. Las líneas verticales corresponden al radio de las burbujas producidas en el primer pico y a los radios de su primera y segunda coalescencia.

Entonces, tenemos que en situaciones que favorecen la coalescencia las burbujas producidas pueden generarse en más de un tamaño. Además, las coalescencias no coinciden con los valores esperados. Estos resultados son interesantes pues en la literatura no hay re-

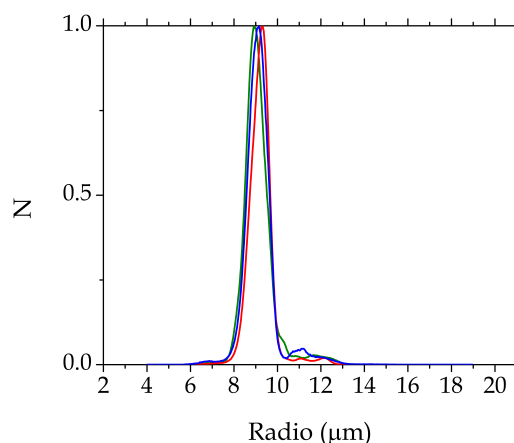


Figura 3.5: Distribuciones de tamaño para 3 fabricaciones independientes con las mismas condiciones experimentales (concentración lipídica de 8mmol/l).

ferencias a estas situaciones. Estas irregularidades no corresponden a problemas de equipo o de análisis cuando se trabajó en condiciones de baja coalescencia se logró la reproducibilidad de experimentos, como se muestra en la Figura 3.5. No tenemos evidencia que indique cuál es la causa de las inestabilidades en la producción de burbujas. Durante el experimento, a simple vista no es posible evaluar si las burbujas están en el régimen de producción adecuado. Las variaciones de tamaño se observan hasta el final del procesamiento de imágenes. Es necesario hacer un estudio de las burbujas durante su producción, es decir en la zona de la constricción y no en el canal de ancho constante en la salida (zona de interés para nuestro estudio).

3.3. Distribuciones de tamaño de las burbujas con fármaco

Como en la sección anterior se obtuvieron las distribuciones de tamaño para fabricaciones de burbujas con condiciones de flujo de líquido y presión de gas similares, pero ahora con diferentes concentraciones de fármaco para concentraciones lipídicas de 4 mmol/l y 8 mmol/l.

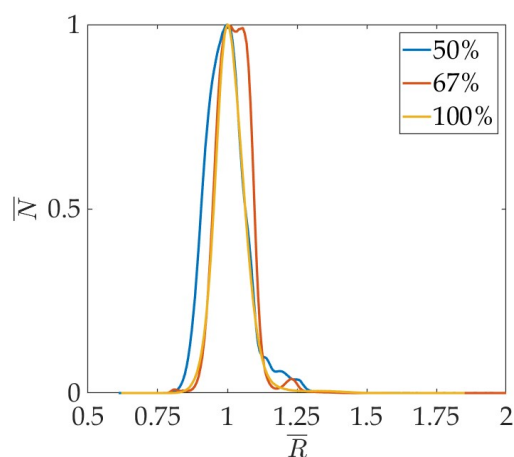


Figura 3.6: Histogramas de las burbujas fabricadas a diferentes concentraciones de fármaco (concentración lipídica de 8 mmol/l). El eje horizontal está normalizado respecto al radio del primer mayor pico. El eje vertical está normalizado respecto a la moda del número de burbujas. Los porcentajes corresponden a la concentración del fármaco en relación a la concentración molar del DPPS.

3.3.1. Concentración total de lípidos: 8 mmol/l

De los experimentos mostrados anteriormente sabemos que con una concentración lipídica de 8 mmol/l tenemos una producción monodispersa y estable. Esta situación se mantiene aún agregando el fármaco. En la Figura 3.6 observamos sólo un pico de producción para tres diferentes concentraciones del fármaco (comparar con 3.5). Esto indica que el efecto por la concentración de lípidos encubre el efecto generado por el fármaco.

Este resultado es bastante interesante porque indica que usando los dispositivos de enfoque de flujo podemos fabricar burbujas monodispersas con DOX (corroborando lo mostrado en los resultados de CV). Aunque no se estudió la estabilidad de las burbujas fuera del dispositivo, en el laboratorio estas burbujas pudieron emplearse para otras aplicaciones aún después de 4h de haberlas recolectado. Esto indica que si se usa un gas de mayor peso molecular, estas burbujas son viables para hacer pruebas de estabilidad y biológicas.

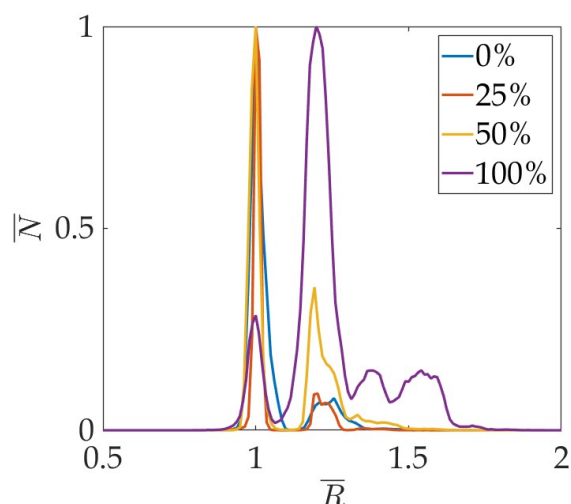


Figura 3.7: Histogramas de las burbujas fabricadas a diferentes concentraciones de fármaco (concentración lipídica de 4mmol/l). El eje horizontal está normalizado respecto al radio del primer mayor pico. El eje vertical está normalizado respecto a la moda del número de burbujas. Los porcentajes corresponden a la concentración del fármaco en relación a la concentración molar del DPPS.

3.3.2. Concentración total de lípidos: 4mmol/l

Al reducir la concentración total de lípidos a 4 mmol/l, aumenta la probabilidad de coalescencia y es más probable entrar a un régimen donde se puedan obtener efectos por añadir el fármaco. El efecto que genera aumentar la concentración de DOX es similar a lo que genera la reducción en la concentración de lípidos. Entonces, al aumentar la concentración de DOX, también aumentan los picos de coalescencia (Figura 3.7). También, sin fármaco la curva es más suave y es más común encontrar los picos de coalescencia en los valores esperados. Las curvas son irregulares y aparecen picos de producción de varios tamaños con la mayor concentración de lípidos.

Al tener resultados similares a los de la sección anterior, aplican las mismas observaciones respecto a las inestabilidades generadas en las producciones más favorecedoras para la coalescencia.

3.4. Distribuciones de tamaño de los liposomas

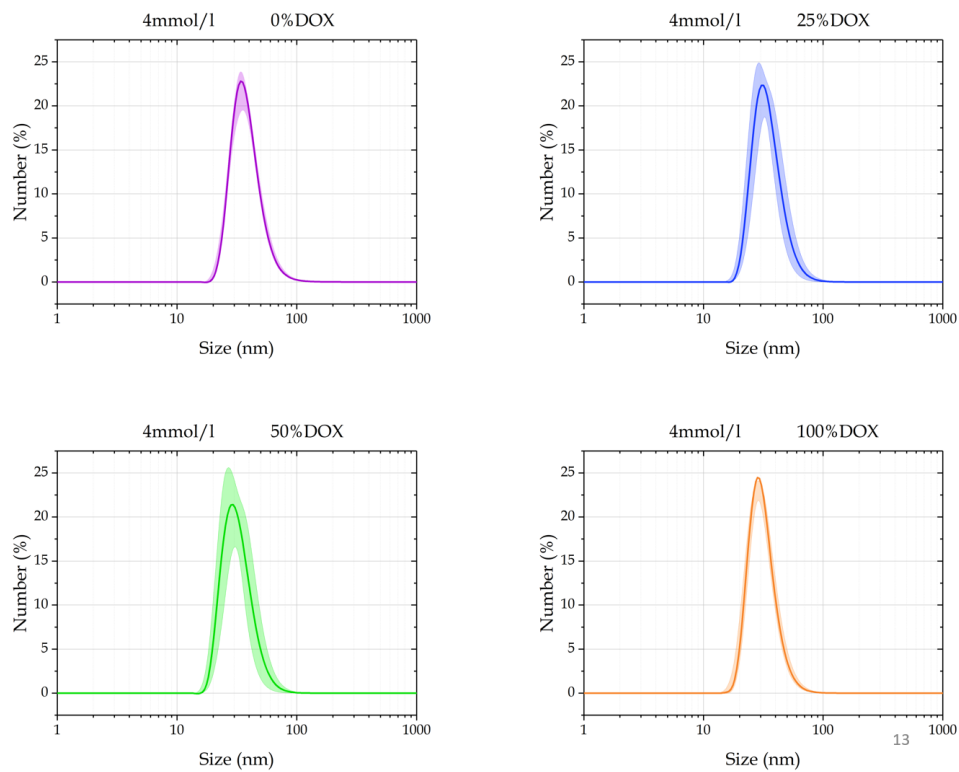
Al haber una diferencia en la coalescencia y estabilidad de la producción de burbujas con fármaco a concentraciones de 8 mmol/l y 4mmol/l, realizamos las mediciones de

tamaño de los liposomas. Un mayor número de liposomas presentes en la dispersión de burbujas aumenta la viscosidad relativa [21], [23], y por lo tanto reduce la probabilidad de coalescencia.

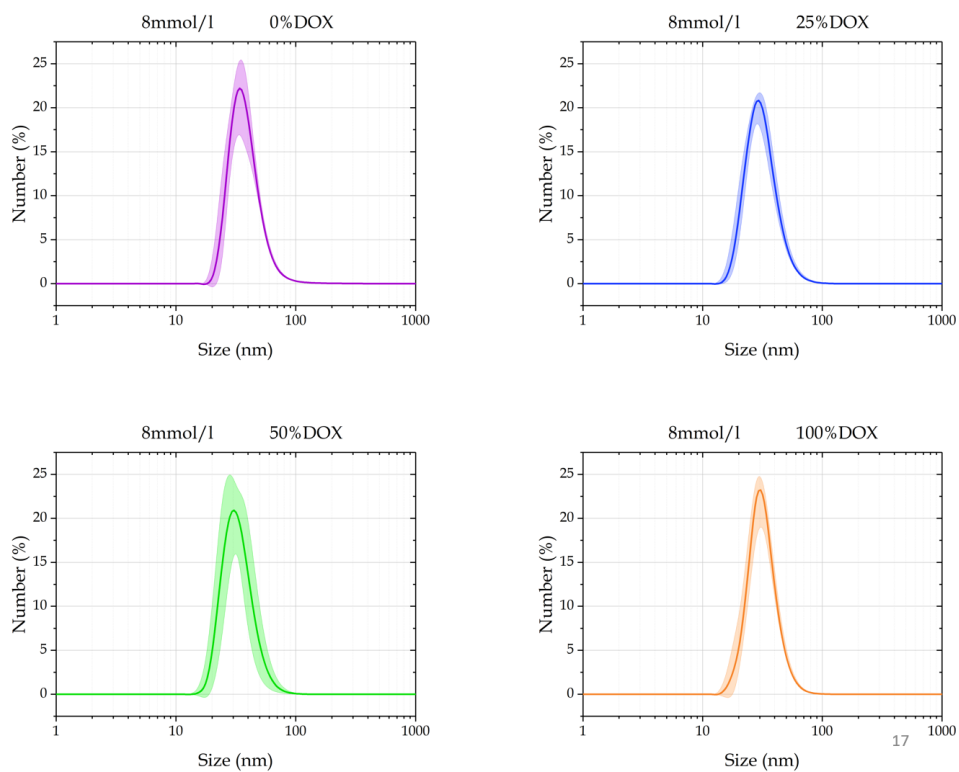
Para cada concentración molar (4 mmol/l y 8 mmol/l) se evaluaron 4 concentraciones de fármaco (0 %, 25 %, 50 % y 100 %). Para cada concentración se realizaron 3 mediciones. En la Figura 3.8 se muestra la curva promedio con su respectiva desviación estándar de cada caso.

Para ver claramente si hay diferencias de tamaño, en la Figura 3.9 se comparan los tamaños medios de las mediciones por cada caso. Para las dos concentraciones lipídicas es evidente que el tamaño se reduce cuando hay fármaco. En el caso de 8mmol/l la diferencia sólo aplica para indicar si hay o no fármaco, pero en el caso de 4mmol/l se aprecia un leve decrecimiento del tamaño al aumentar la concentración.

A pesar de haber obtenido un cambio en los tamaños de los liposomas al agregar el fármaco, esto no justifica el efecto en la coalescencia y estabilidad de la producción de burbujas. Pues en el caso de 8mmol/l los histogramas no mostraron mayor coalescencia al agregar el fármaco, pero sí cambia el tamaño de los liposomas. Indicando que el mecanismo por el cual DOX modifica la viscosidad relativa no está asociado al número de liposomas en la dispersión.



(a) 4mmol/l



(b) 8mmol/l

Figura 3.8: Distribuciones de tamaño de liposomas para concentraciones lipídicas de 4mmol/l y 8mmol/l.

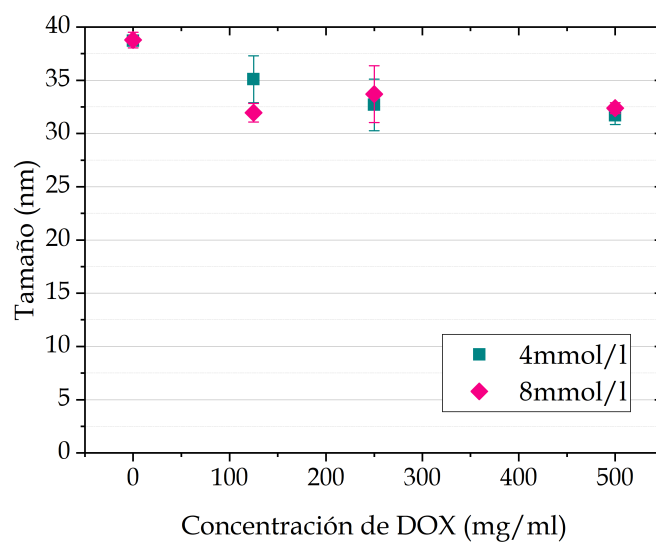


Figura 3.9: Comparación de tamaños de liposomas.

Capítulo 4

Conclusiones

- Las burbujas fabricadas con concentraciones elevadas de lípidos (8mmol/l) fabricadas en dispositivos de enfoque de flujo tienen tamaños y coeficientes de variación útiles para aplicaciones terapéuticas, aún con DOX.
- A partir de las distribuciones de tamaños, se halló que las burbujas con alta concentración lipídica no muestran cambios en su coalescencia al aumentar la concentración de DOX.
- La fabricación de burbujas en nuestros dispositivos es sensible a las condiciones de las burbujas producidas. Cuando hay una mayor probabilidad de coalescencia la producción de burbujas se desestabiliza y reduce la monodispersidad. Esto requiere un mayor estudio pues no ha sido reportado anteriormente.
- En condiciones favorables para la coalescencia, los histogramas de distribución de tamaños indican que al aumentar la concentración de DOX, aumenta la probabilidad de coalescencia y se reduce la estabilidad en la producción de burbujas, generando burbujas de más de un tamaño.
- El cambio en la probabilidad de coalescencia no está asociado a un cambio en el tamaño de los liposomas. Esto implica que se requieren otras caracterizaciones de los liposomas para asociarlo al efecto.

Capítulo 5

Perspectivas

- Emplear mediciones de calorimetría para entender mejor el mecanismo por el cual la DOX modifica la probabilidad de coalescencia. Esto permitiría determinar si un cambio en la rigidez de membrana es el causante del cambio. Esto no ha sido considerado en la literatura asociada a la probabilidad de coalescencia en dispositivos de enfoque de flujo.
- Probar el efecto en la probabilidad de coalescencia de nanopartículas y de otros tipos de agentes terapéuticos.
- Estudiar la estabilidad de las burbujas fuera del dispositivo. Esto en vista de poder emplearlas en pruebas biológicas, que como sabemos es viable por la experiencia del laboratorio y por información de la literatura.
- Determinar las causas que generan una producción inestable de burbujas monodispersas en nuestros dispositivos. Esto permitiría corregir y poder realizar producciones estables y que se puedan comparar con los reportados en la literatura y así ampliar los modelos conocidos.

Bibliografía

- [1] M. Azmin, C. Harfield, Z. Ahmad, M. Edirisinghe y E. Stride, “How do microbubbles and ultrasound interact? Basic physical, dynamic and engineering principles.”, *Curr. Pharm. Des.*, vol. 18, n.º 15, págs. 2118-2134, 2012.
- [2] H.Lin, J.Chen y C. Chen, “A novel technology: microfluidic devices for microbubble ultrasound contrast agent generation”, *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 54, n.º 9, págs. 1317-1330, 2016.
- [3] E. S. et al., “Microbubble Agents: New Directions”, *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 46, n.º 6, págs. 1326-1343, 2020.
- [4] E.-H. et al., “Microbubble generation in a co-flow device operated in a new regime”, *Lab Chip*, vol. 2011, n.º 31, págs. 2023-2029, 2011.
- [5] S. R. et al, “The Role of Ultrasound-Driven Microbubble Dynamics in Drug Delivery: From Microbubble Fundamentals to Clinical Translation”, *Langmuir*, vol. 35, n.º 31, págs. 10 173-10 191, 2019.
- [6] K.Kooiman, H.J.Vos, M. Versluis y N. D. Jong, “Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 72, págs. 28-48, 2014.
- [7] E. C. Unger, T. Porter, W. Culp, R. Labell, T. Matsunaga y R. Zutshi, “Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 56, n.º 9, págs. 1291-1314, 2004, Advances in lipid-based drug solubilization and targeting.
- [8] B. S. Pattni y V. P. Torchilin, “Targeted Drug Delivery Systems: Strategies and Challenges”, en *Targeted Drug Delivery : Concepts and Design*, P. V. Devarajan y S. Jain, eds. Cham: Springer International Publishing, 2015, págs. 3-38, ISBN: 978-3-319-11355-5.
- [9] V. Pereno, “Characterisation of microbubble-membrane interactions in ultrasound mediated drug delivery”, Tesis doct., University of Oxford, Oxford,UK, mayo de 2018.
- [10] E. U. et al., “Therapeutic applications of microbubbles”, *Eur. J. Radiol.*, vol. 42, n.º 2, págs. 160-168, 2002.
- [11] E. Stride, “Physical Principles of Microbubbles for Ultrasound Imaging and Therapy”, *Cerebrovascular Diseases*, vol. 27(suppl 2), págs. 1-13, 2009.

- [12] S. Tinkov, G. Winter, C. Coester y R. Bekeredjian, “New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: Part I — Formulation development and in-vitro characterization”, *Journal of Controlled Release*, vol. 143, n.º 1, págs. 143-150, 2010, ISSN: 0168-3659. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.12.026>. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365910000039>.
- [13] C.-W. Lin, C.-H. Fan y C.-K. Yeh, “The Impact of Surface Drug Distribution on the Acoustic Behavior of DOX-Loaded Microbubbles”, *Pharmaceutics*, vol. 13, n.º 12, 2021, ISSN: 1999-4923. dirección: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/12/2080>.
- [14] K. Johnson-Arbor y R. Dubey, *Doxorubicin*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2023. dirección: <http://europepmc.org/books/NBK459232>.
- [15] S. Sritharan y N. Sivalingam, “A comprehensive review on time-tested anticancer drug doxorubicin”, *Life Sciences*, vol. 278, pág. 119 527, 2021, ISSN: 0024-3205. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119527>. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320521005129>.
- [16] F. A. de Wolf, M. Maliepaard, F. van Dorsten, I. Berghuis, K. Nicolay y B. de Kruijff, “Comparable interaction of doxorubicin with various acidic phospholipids results in changes of lipid order and dynamics”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1096, n.º 1, págs. 67-80, 1990, ISSN: 0925-4439. DOI: [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(90\)90014-G](https://doi.org/10.1016/0925-4439(90)90014-G). dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/092544399090014G>.
- [17] <https://www.drugs.com/mtm/doxorubicin.html>, *Doxorubicin Uses, Side Effects & Warnings — drugs.com*, <https://www.drugs.com/mtm/doxorubicin.html>, [Accessed 26-01-2024].
- [18] S. Tinkov, C. Coester, S. Serba et al., “New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: In-vivo characterization”, *Journal of Controlled Release*, vol. 148, n.º 3, págs. 368-372, 2010, ISSN: 0168-3659. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.09.004>. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365910007479>.
- [19] T. Segers, P. Kruizinga, M. P. Kok, G. Lajoinie, N. de Jong y M. Versluis, “Monodisperse Versus Polydisperse Ultrasound Contrast Agents: Non-Linear Response, Sensitivity, and Deep Tissue Imaging Potential”, *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 44, n.º 7, págs. 1482-1492, 2018.
- [20] A. Helbert, E. Gaud, T. Segers, C. Botteron, P. Frinking y V. Jeannot, “Monodisperse versus Polydisperse Ultrasound Contrast Agents: In Vivo Sensitivity and safety in Rat and Pig”, *Ultrasound in Medicine Biology*, vol. 46, n.º 12, págs. 3339-3352, 2020, ISSN: 0301-5629. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.07.031>. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301562920303410>.
- [21] S. Tim, L. Detlef, V. Michel y F. Peter, “Universal Equations for the Coalescence Probability and Long-Term Size Stability of Phospholipid-Coated Monodisperse Microbubbles Formed by Flow Focusing”, *Langmuir*, vol. 33, n.º 39, págs. 10 329-10 339, 2017.

- [22] T. Segers, L. de Rond, N. de Jong, M. Borden y M. Versluis, “Stability of Monodisperse Phospholipid-Coated Microbubbles Formed by Flow-Focusing at High Production Rates”, *Langmuir*, vol. 32, n.º 16, págs. 3937-3944, 2016.
- [23] T. Segers, A. Lassus, P. Bussat, E. Gaud y P. Frinking, “Improved coalescence stability of monodisperse phospholipid-coated microbubbles formed by flow-focusing at elevated temperatures”, *Lab Chip*, vol. 19, págs. 158-167, 1 2019.
- [24] J. J. Kwan y M. A. Borden, “Lipid monolayer collapse and microbubble stability”, *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 183-184, págs. 82-99, 2012.
- [25] Y. Liao y D. Lucas, “A literature review on mechanisms and models for the coalescence process of fluid particles”, *Chemical Engineering Science*, vol. 65, n.º 10, págs. 2851-2864, 10, ISSN: 0009-2509.
- [26] J. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces* (Intermolecular and Surface Forces). Elsevier Science, 2015, ISBN: 9780080923635. dirección: <https://books.google.com.mx/books?id=MVbWBhubrgIC>.
- [27] T. Gaillard, C. Honorez, M. Jumeau, F. Elias y W. Drenckhan, “A simple technique for the automation of bubble size measurements”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 473, págs. 68-74, 2015, ISSN: 0927-7757. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.01.089>. dirección: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777571500117X>.