

TRABAJO DE FIN DE GRADO

---

**MICROFLUÍDICA PARA LA ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS  
HÍBRIDAS**

---

*Autora:*

María Dorta Hernández

*Tutores:*

Dra. Carmen M. Évora García

Dr. Edgar Pérez Herrero



Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad  
de La Laguna

San Cristóbal de La Laguna, junio de 2020

### Abstract

Nanoparticles have been traditionally elaborated by bulk nanoprecipitation, a method where components are mixed in the macroscale, which results in batches with wide polydispersity of sizes and relatively large diameters. An alternative to these techniques is microfluidics, where mixing is carried out in a smaller scale using microchannels, being diffusion the physical phenomena that governs the mixing process. This results on batches with smaller sizes and distribution.

In this work we study the influence of a sum of factors such as flow rate ratio, total flow rate and the solvent evaporation phase on size and polydispersity index of nanoparticles made of poly (D,L- lactic acid-co-glycolic) (PLGA) and 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine 2000 (DSPE-MPEG2000). A size reduction and polydispersity index augmentation were observed when flow rate ratio and total flow rate were increased. Likewise, a size reduction of nanoparticles was found after the solvent evaporation phase, especially in batches where a larger flow rate of organic phase was used.

### Resumen

La elaboración de nanopartículas por nanoprecipitación se suele realizar tradicionalmente por mezclado de los componentes a escala macroscópica, siendo difícil el control total de su tamaño y polidispersión. Una alternativa a estas técnicas es la microfluídica, que realiza el mezclado a pequeña escala haciendo uso de microcanales donde el proceso físico que gobierna el mezclado es la difusión, consiguiendo de esta forma tamaños reducidos con distribuciones estrechas.

En este trabajo se estudia la influencia de distintos factores, como la relación de fases, el caudal total y el efecto de la fase de evaporación en el tamaño y polidispersión de nanopartículas híbridas compuestas por poli (D, L- ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina con metoxil poli(etilenglicol) conjugado 2000 (DSPE MPEG 2000). Se observó una disminución del tamaño y un aumento del índice de polidispersión al aumentar la relación de fases y el caudal total. Así mismo, se constató una disminución del tamaño de las nanopartículas tras someterlas al proceso de evaporación de disolvente, especialmente en aquellas donde se utilizó mayor caudal de la fase orgánica.

# Índice

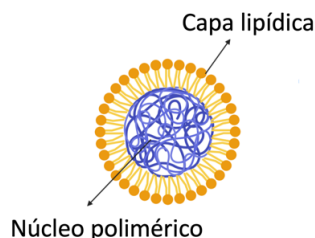
<b>Índice .....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>4</b>
<b>Objetivo .....</b>	<b>11</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>12</b>
<b>Materiales .....</b>	<b>12</b>
<b>Métodos de elaboración de las nanopartículas. ....</b>	<b>12</b>
Elaboración de las fases .....	12
Elaboración por el método convencional.....	13
Elaboración por microfluídica .....	13
<b>Caracterización de las nanopartículas.....</b>	<b>14</b>
<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>16</b>
<b>Influencia de la relación de fases sobre el tamaño y PDI.....</b>	<b>17</b>
<b>Influencia del caudal total sobre el tamaño y PDI .....</b>	<b>18</b>
<b>Influencia del proceso de evaporación en el tamaño y PDI de las nanopartículas .....</b>	<b>18</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>20</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>21</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>24</b>

# Introducción

La nanotecnología es un campo que se ha desarrollado rápidamente en los últimos años. Su aplicación al desarrollo de medicamentos se denomina nanomedicina, y se define como el uso de nanomateriales para el diagnóstico, control, prevención y tratamiento de enfermedades <sup>1</sup>. Hay numerosos tipos de nanomateriales, pero este trabajo se centra en los nanotransportadores y, más concretamente, en las nanopartículas (NPs).

Los nanotransportadores son sistemas de naturaleza coloidal con tamaño inferior a 500 nm <sup>2</sup>, donde uno o varios agentes terapéuticos pueden estar unidos a la superficie de un polímero o estar incluidos en diferentes estructuras de diversa composición. El uso de nanotransportadores confiere una serie de ventajas, como una mejora en la farmacocinética y farmacodinámica de los fármacos sin alterar su estructura molecular y la posibilidad de dirigir el fármaco hacia órganos, tejidos o células <sup>3</sup>. En la Tabla 1 se recogen los principales nanotransportadores utilizados en terapéutica, incluyendo sus ventajas e inconvenientes <sup>4,5</sup>.

Los liposomas y las NPs poliméricas son las estructuras más prometedoras para su utilización en terapéutica por su capacidad para transportar productos hidrofílicos e hidrofóbicos y otras ventajas detalladas en la Tabla 1. Sin embargo, tienen algunas limitaciones. En el caso de los liposomas, destacan los problemas de estabilidad fisicoquímica, baja reproducibilidad entre lotes, dificultad en la esterilización y limitada capacidad de carga <sup>6</sup>. Con respecto a las NPs poliméricas, resalta la baja eficiencia de encapsulación de moléculas hidrofílicas, la liberación del fármaco antes de llegar al tejido diana, la degradación prematura del polímero y sus problemas de escalado <sup>7</sup>.



*Figura 1. Esquema de una nanopartícula híbrida*

	Ventajas	Desventajas
<b>POLÍMEROS TERAPÉUTICOS</b>		
Estructuras macromoleculares lineales conjugadas con fármacos o proteínas.		
<b>Conjugados polímero-proteína</b>	-Reducción de inmunogenicidad de la proteína -Aumento de estabilidad y tiempo de circulación en sangre	-Baja capacidad de carga -Capacidad restringida de <i>active targeting</i>
<b>Conjugados polímero-fármaco</b>	-Aumento tiempo circulación en sangre -Solubilidad acuosa. -Reducción toxicidad	-No hay control de la liberación del fármaco
<b>LIPÍDICOS</b>		
<b>Liposomas</b> Vesículas coloidales con una bicapa lipídica como membrana	-Pueden encapsular fármacos hidrofílicos (incluyendo siRNA) en su core e hidrofóbicos en su membrana -Elevada biocompatibilidad -Casi biológicamente inertes -Elevado tiempo de circulación en sangre	-Muy poca capacidad de carga de fármacos hidrofóbicos y poca carga de hidrofílicos -Pseudoalergia cuando son inyectados IV -Problemas de estabilidad y reproducibilidad a nivel industrial -Dificultad en su esterilización -Bajo control de liberación del fármaco (efecto burst)
<b>Nanopartículas sólidas lipídicas</b> Nanopartículas esféricas estabilizadas por surfactantes que son sólidas tanto a temperatura ambiente como en el organismo. <sup>5</sup>	-Baja toxicidad -Elevada biocompatibilidad -No se usan disolventes orgánicos -Encapsulación de moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas	-Baja capacidad de carga -Problemas de estabilidad en el almacenamiento
<b>ORGANOMETÁLICOS</b>		
<b>Nanotubos de carbono</b> Redes hidrofóbicas tubulares con un diámetro de 1-4nm y 1-100 μm de largo.	-Muy elevada superficie, por lo que tienen elevada capacidad de carga -Pueden atravesar la membrana plasmática	-Insolubles en todos los disolventes -Tóxicos
<b>POLIMÉRICOS</b>		
<b>Micelas poliméricas</b> Compuestas por polímeros anfifílicos que forman estructuras esféricas con un núcleo hidrofóbico	-Útiles para fármacos muy poco solubles -Elevado tiempo de circulación en sangre	-Salida del fármaco prematura -Poca estabilidad en circulación sistémica
<b>Dendrímeros</b> Macromoléculas sintéticas de 10-100nm muy ramificadas	-Control elevado de la biocompatibilidad y farmacocinética en la síntesis -Propiedades uniformes -Elevada capacidad de carga -Posibilidad de múltiples grupos funcionales en su superficie -Reducida eliminación por macrófagos	-Elevado coste de producción
<b>Nanopartículas</b> Sistemas coloidales biodegradables esféricos. Se dividen en nanocápsulas y nanoesferas.	-Transportadores más efectivos para terapia controlada y prolongada. -Baja toxicidad -Distribución de varios fármacos sinérgicos -Mayor estabilidad y distribución de tamaños -Mayor control de liberación del fármaco	-Baja eficiencia de encapsulación de moléculas hidrofílicas -Salida del fármaco antes de llegar al tejido diana -Citotoxicidad del polímero -Degradación -Problemas de escalado

NANOTRANSPORTADORES PARTICULADOS

Tabla 1. Clasificación de los principales nanotransportadores: ventajas y desventajas <sup>4,5</sup>

La combinación de éstas dos estructuras en NPs híbridas puede reducir las limitaciones mencionadas. Las NPs híbridas están compuestas por un núcleo polimérico, que aloja al agente terapéutico y una capa externa lipídica (Figura 1). El núcleo polimérico proporciona integridad estructural y estabilidad, y la capa lipídica controla la liberación y mejora la internalización y distribución en las células.

Los métodos de preparación de las NPs híbridas pueden agruparse en técnicas de uno o dos pasos. Los métodos en dos pasos se utilizaron en los inicios del desarrollo de las NPs híbridas, y consisten en el mezclado de vesículas lipídicas con NPs poliméricas, ambas preformadas previamente, lo que supone su mayor inconveniente <sup>8</sup> (Figura 2).

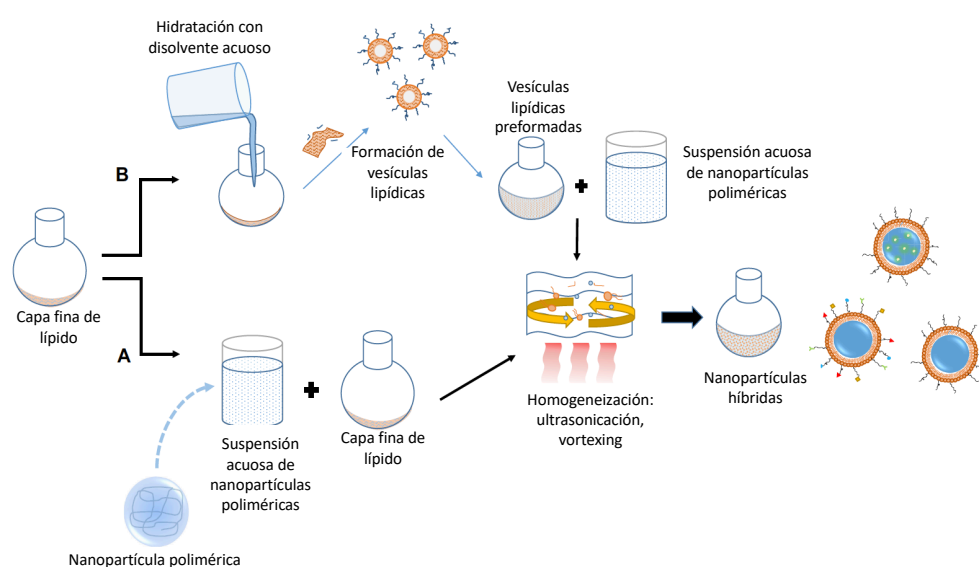


Figura 2. Elaboración de NPs híbridas en dos pasos. Reproducida con variaciones con permiso de Mukherjee. et al. (2019)<sup>3</sup>

Los métodos en un paso solo requieren el mezclado de las soluciones de polímero y lípido, que formarán las NPs bien por nanoprecipitación o emulsificación- evaporación del disolvente. El método de nanoprecipitación, que se utiliza en más del 50% de los casos, consiste en poner en contacto el polímero disuelto en un disolvente orgánico miscible en agua (por ejemplo, la acetona), con el lípido dispersado en agua. La sustancia a encapsular puede incorporarse a cualquiera de las fases, dependiendo de su hidrofilia. La precipitación del polímero y el

autoensamblaje del lípido a su alrededor, que se produce después del intercambio entre solvente orgánico y el agua, lleva a la formación de las NPs (Figura 3).

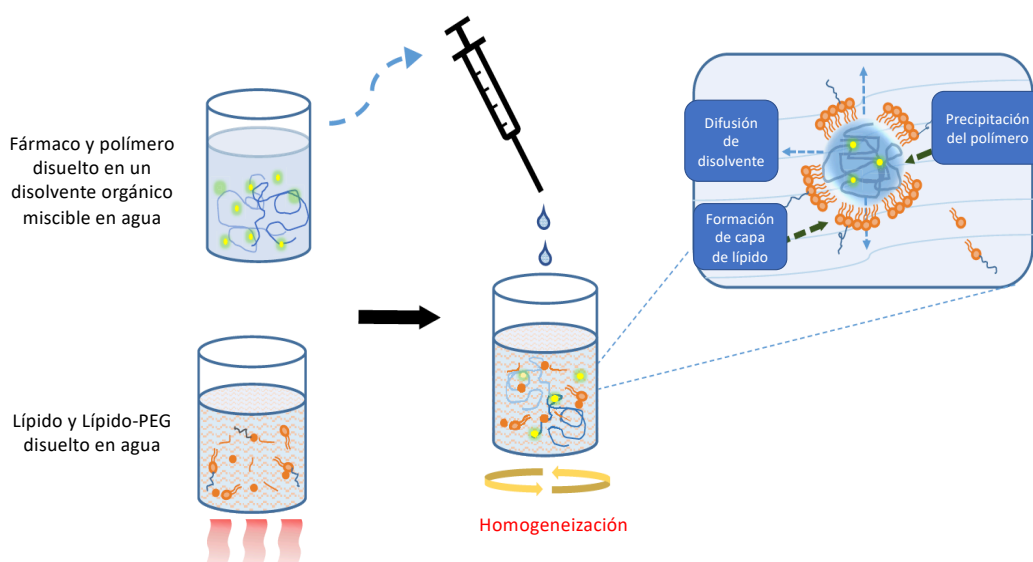


Figura 3. Elaboración de NPs híbridas por nanoprecipitación. Reproducida con variaciones con permiso de Mukherjee et al. (2019)<sup>3</sup>

Con respecto a la emulsificación con evaporación del disolvente, esta técnica tiene dos variantes: emulsión simple y doble emulsión (Figura 4). La primera se utiliza para encapsular sustancias hidrófobas y consiste en la adición de una fase oleosa, que contiene el polímero y la sustancia a encapsular, sobre una fase acuosa que contiene el lípido (Figura 4A). Cuando se evapora el disolvente de esta mezcla, el lípido se ensambla alrededor del polímero y se forman las NPs<sup>9</sup>. La doble emulsión se utiliza para incorporar compuestos insolubles en disolventes orgánicos y requiere de un paso adicional de mezclado. En este sentido, la fase acuosa interna, que contiene la sustancia a encapsular, se añade sobre la fase oleosa, que contiene el polímero y el lípido, y la emulsión resultante se adiciona sobre la fase acuosa externa, que contiene el lípido-PEG (Figura 4B)<sup>10</sup>. El paso de evaporación de disolvente se realiza de manera similar. Cabe mencionar que las NPs resultantes de la emulsificación con evaporación del disolvente son de tamaño superior a las obtenidas por nanoprecipitación<sup>3</sup>.

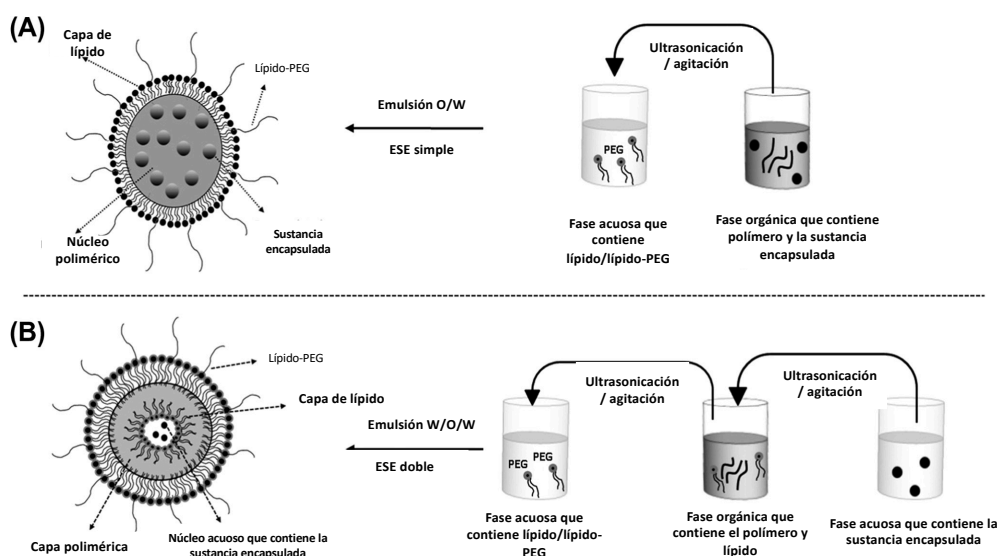


Figura 4. Métodos de elaboración de NPs híbridas: emulsión con evaporación del disolvente (ESE, del inglés Emulsion Solvent Evaporation), simple y doble. Reproducida con variaciones con permiso de Hadinoto et al., (2013).

Estos métodos convencionales tienen un paso limitante común: el mezclado de las fases a escala “macroscópica”, generando amplias distribuciones de tamaño y variaciones entre lotes cuando se compara con tecnologías como la de la microfluídica.

La tecnología de la microfluídica permite la manipulación de fluidos en canales micrométricos, donde predomina el flujo laminar, de tal forma que el mezclado de fases o corrientes se produce rápidamente por difusión molecular de forma controlada, al producirse en distancias muy pequeñas. En el caso concreto de la técnica de la nanoprecipitación, la microfluídica permite aumentar la velocidad del intercambio entre el solvente y el no solvente, consiguiéndose controlar y reducir el tamaño y la polidispersión de las NPs (Figura 5)<sup>11</sup>.

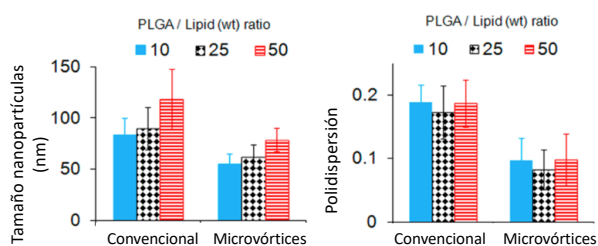


Figura 5. Resultados publicados por Kim et al. (2012)<sup>11</sup>, donde se compara el tamaño y la polidispersión de NPs preparadas por nanoprecipitación por el método convencional y por microfluídica. Reproducida y modificada con permiso de Kim et al., (2012).<sup>11</sup>



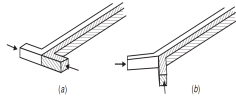
Los equipos de microfluídica están formados básicamente por un sistema de bombeo unido mediante una serie de capilares y conectores a un micromezclador o chip. La función de la bomba (peristáltica, de presión, de jeringa,...) es impulsar las fases a través del micromezclador. Generalmente se utilizan sistemas sin pulsos, salvo cuando se desee realizar un mezclado usando micromezcladores activos pulsátiles o pasivos de tipo *Droplet* (Figura 6) con el fin de generar una perturbación en el flujo laminar. Una ventaja añadida de los sistemas de bombeo actuales es su manejo mediante software, lo que permite un control preciso sobre los flujos de las fases. En cuanto a los capilares, es importante minimizar los volúmenes muertos, siendo esto especialmente relevante cuando se hace uso de productos de elevado valor económico.

Finalmente, el micromezclador, una estructura formada por una serie de canales de tamaño micrométrico de diferentes geometrías, es esencial para lograr un buen patrón de mezclado y, con ello, controlar las características físico-químicas de las NPs. En general, los micromezcladores pueden dividirse en pasivos y activos. Los primeros no requieren energía externa para realizar el mezclado, que se produce por difusión molecular o advección caótica, mientras que los segundos utilizan una perturbación externa al micromezclador, teniendo más factores a controlar, y siendo por ello, más impredecibles<sup>12</sup>. En este trabajo nos vamos a centrar en los pasivos, cuyos principales diseños están reflejados en la Figura 6.

Con respecto al material de fabricación de los micromezcladores, el polidimetilsiloxano (PDMS), un elastómero de silicona, es el más utilizado al ser transparente, económico y permitir una fabricación rápida y sencilla. Sin embargo, este material es poco resistente a disolventes orgánicos, no es inerte químicamente y no soporta altas temperaturas<sup>13</sup>. Por ello, los micromezcladores fabricados en vidrio están siendo cada vez más utilizados debido a su mayor durabilidad, resistencia y transparencia.

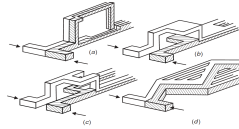
Una de las aplicaciones más prometedoras de los nanotransportadores es su uso como alternativa a los vectores virales para dirigir selectivamente ácidos nucleicos exógenos al interior de células diana para modular la expresión de un gen, bloqueando rutas de transducción o proteínas relacionadas con él<sup>4</sup>. Los vectores virales fueron los primeros sistemas que se utilizaron<sup>16</sup> para ello, pero sus problemas de estabilidad, especificidad y su potencial inmunogenicidad y carcinogenicidad, además de la poca capacidad de carga de la sustancia a transportar y la imposibilidad de producirlos en masa<sup>17</sup> motivó la búsqueda de nuevos sistemas, como los nanotransportadores. Sin embargo, aún no se han alcanzado las altas eficiencias de transfección que se observan con los vectores virales, siendo esto un reto en el que se está trabajando intensamente en la actualidad<sup>18</sup>.

### Laminación paralela



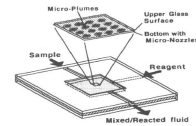
- Divide los flujos de entrada en  $n$  subflujos, donde el modelo más básico es  $n=2$
- Pueden ser en forma de T (a) o Y (b)
- Mezclado por difusión
- Ideal para la investigación de los fenómenos básicos de transporte en la microescala

### Laminación serial



- Aumenta el mezclado dividiendo y uniendo los flujos.
- Tras  $m$  fases donde el flujo se divide y  $2^m$  se une las láminas de flujo pueden ser laminadas
- La mejora en tiempo de mezclado es igual a  $4^m - 1$

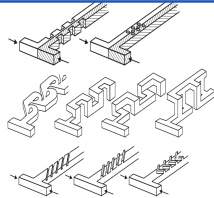
### Inyección



- Aumenta el mezclado dividiendo y uniendo los flujos.
- Tras  $m$  fases donde el flujo se divide y  $2^m$  se une las láminas de flujo pueden ser laminadas
- La mejora en tiempo de mezclado es igual a  $4^m - 1$

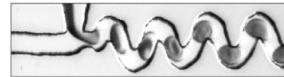
### Basados en advención caótica

- Alto número de Reynolds
- Número de Reynolds intermedio
- Bajo número de Reynolds



- La advención caótica es generada por geometrías especiales en el canal de mezclado
- Según la "agresividad" del entramado, pueden dividirse su nº de Reynolds en:
  - Alto (más de 100), con diseños con obstáculos en la pared, en el canal o en forma de zig-zag
  - Intermedio (entre 10 y 100): Estructura Tesla modificada, Forma de C, Forma de L
  - Bajo (menos de 10): *Slanted Ribs, Slanted grooves, Staggered-Herringbone* .

### Droplet



- Se gotea una fase sobre otra.
- El movimiento de las gotículas causa un campo interno de flujo que hace que el mezclado dentro de la gota sea posible
- Pueden ser generadas y transportadas usando presión termocapilaridad y *electrowetting*

Figura 6. Descripción de distintos diseños de micromezcladores pasivos según la geometría de sus canales <sup>12</sup>. Imágenes de los esquemas reproducidas y modificadas con permiso de Nguyen et al., (2005)<sup>12</sup>, Stone et al., (2005)<sup>15</sup> y Elwenspoek et al (1994)<sup>14</sup>

# Objetivo

El objetivo de este trabajo es poner a punto el equipo de microfluídica, recientemente adquirido por el grupo de investigación que propone este TFG, para elaborar NPs híbridas de PLGA y los lípidos DSPE-PEG y lecitina, de cara a su utilización futura en la encapsulación de oligonucleótidos para terapia génica, incluyendo protamina para su encapsulación. Se estudia la influencia del caudal total, de la relación de los caudales de las fases orgánica y acuosa y de la etapa de evaporación sobre el tamaño y la polidispersión de las NPs.

# Materiales y métodos

## Materiales

Los productos utilizados para la elaboración de las NPs híbridas fueron PLGA (50:50) (Resomer® RG 502; Evonik) con masa molecular de 12000 Da y viscosidad intrínseca 0,22 g/dl; sulfato de protamina (Sigma Aldrich®); DSPE-MPEG200 (Nanosoft polymers®) con masa molecular de 2000 Da; lecitina de soja PC (95%); L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (95%) (Avanti Lipids); acetona para análisis (EMSURE®, Merck) con masa molecular de 58,07g/mol y densidad 0,79kg/l, y etanol absoluto (EMSURE®, Merck).

## Métodos de elaboración de las nanopartículas.

Los métodos de elaboración de las NPs utilizados en este trabajo fueron la nanoprecipitación modificada por el método convencional y por la técnica de microfluídica.

### Elaboración de las fases

La fase orgánica contiene PLGA y protamina en acetona y la fase acuosa contiene los lípidos, DSPE-MPEG y lecitina en etanol al 4%, debiendo calentar ésta última a 65 °C para disolver la lecitina. La protamina se disuelve aparte en agua destilada y, justo antes del mezclado, se añade a la fase orgánica. Las cantidades de cada componente están especificadas en la Tabla 2.

Fase acuosa		Fase orgánica	
<b>DSPE-MPEG</b>	1,1mg/10ml	<b>PLGA</b>	5mg/ml
<b>Lecitina</b>	0,4mg/10ml	<b>Protamina</b>	45 $\mu$ g de protamina/50 $\mu$ l de agua por cada ml de fase orgánica
<b>Disolvente</b>	Etanol 4%	<b>Disolvente</b>	Acetona

Tabla 2. Composición de las fases utilizadas para la elaboración de NPs por nanoprecipitación utilizando los método convencional y microfluídica

## Elaboración por el método convencional

Una vez mezclada la protamina con la fase orgánica, por agitación manual, se vierte sobre la fase acuosa bajo agitación magnética y se mantiene así durante una hora en campana de extracción para la evaporación del disolvente y el endurecimiento de las NPs.

## Elaboración por microfluídica

Las fases previamente filtradas (filtro de jeringa de 0,45 $\mu$ m de diámetro de poro, Chromafil Xtra PET -45/25, Macherey-Nagel, Alemania) son impulsadas mediante una bomba de jeringa de dos canales (Mitos Duo XS-Pump Basic, Dolomite, Reino Unido), a un flujo fijado mediante software (Flow Control Center, v4.1.9, Dolomite, Reino Unido) hacia el micromezclador (part No: 3200401, Dolomite, Reino Unido). Es importante la optimización del diámetro interno y la longitud de los capilares utilizados para reducir los volúmenes muertos (Tabla 3).

	Fase acuosa	Fase orgánica
Díámetro interno	0,8 mm	0,25 mm
Longitud	37cm	2 x 10cm
Volumen muerto	186 $\mu$ l	100 $\mu$ l

Tabla 3. *Díámetro interno, longitud y volumen muerto de los conectores utilizados para cada fase en el sistema diseñado.*

A la salida del micromezclador se recoge la suspensión de las NPs generada y se deja en agitación magnética en campana de extracción durante una hora para la evaporación del disolvente y el endurecimiento de las NPs. Un esquema del sistema descrito se encuentra en la Figura 7, donde se incluye un microscopio que se utiliza para la observación de los microcanales, lo cual permite la evaluación de la limpieza de los canales.

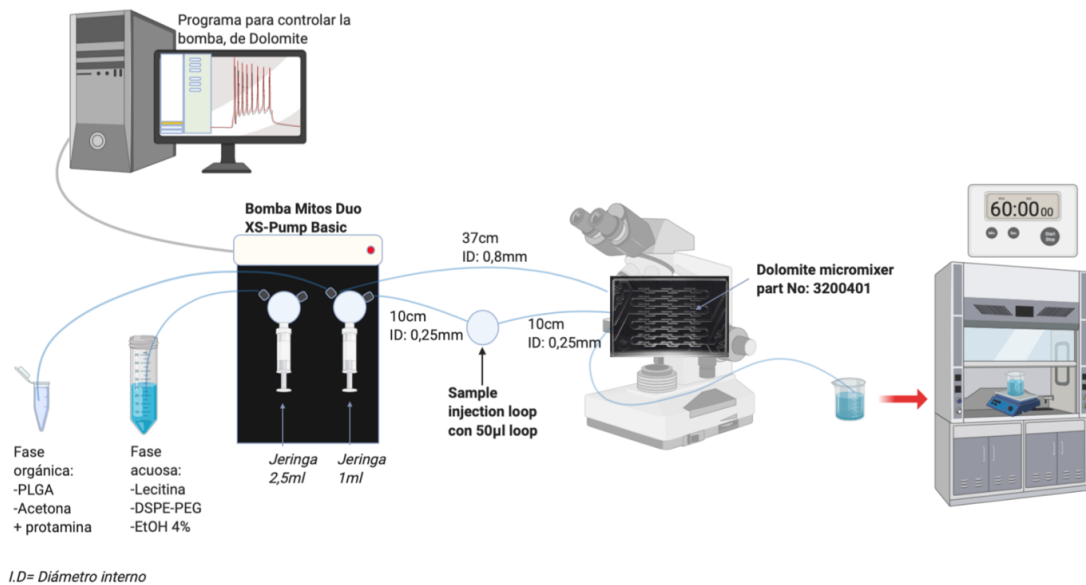


Figura 7. Esquema del sistema de microfluídica empleado en este trabajo

## Caracterización de las nanopartículas

La caracterización de las NPs obtenidas se realiza utilizando el equipo Zetasizer nano ZS (Malvern Panalytical, Reino Unido). Se evalúan dos parámetros: el tamaño de partícula (Z size) y el índice de polidispersión (PDI). La manipulación de las muestras se describe en la Figura 8.

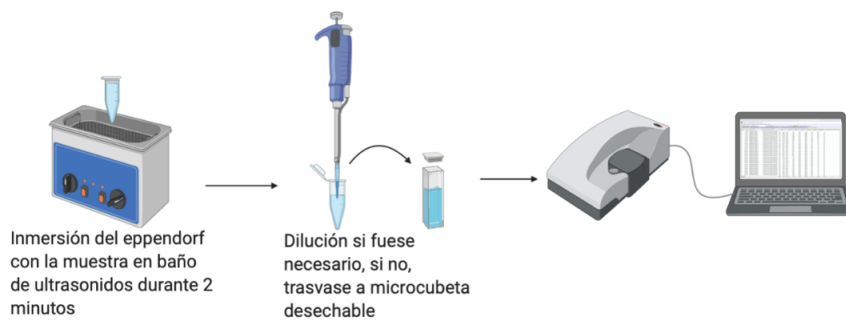


Figura 8. Esquema del procedimiento de medición de tamaño y potencial Z en el equipo Zetasizer ZS de Malvern Instruments

El tamaño de partícula y el PDI se determinan por dispersión de luz dinámica, técnica no destructiva basada en la medición de la fluctuación del movimiento Browniano. El haz de luz láser se hace pasar a través de la muestra y como la velocidad de movimiento de las partículas es mayor cuanto más pequeñas son, las fluctuaciones de intensidad de la luz de láser se producirán más seguidas en el tiempo. Esto se puede interpretar con una función de correlación donde el tiempo en el que la señal empieza a decaer proporciona el tamaño de partícula y la polidispersión. La línea base de la función informa sobre macroagregados.

## Resultados y discusión

El tamaño de las NPs es una característica clave que influye en distintos aspectos de la distribución y liberación del fármaco. Por un lado, tamaños muy pequeños (menores de 10 nm) se eliminan rápidamente por riñón<sup>19</sup> y tamaños superiores a 200 nm activan el sistema del complemento<sup>20</sup> disminuyendo la vida media de las NPs en sangre. El tamaño también afecta a la captación por las células, siendo máxima cuando se trata de tamaños de entre 10 y 60 nm<sup>21</sup>. Además, a menor tamaño se observa una liberación más rápida y homogénea de fármaco<sup>22</sup>. El índice de polidispersión, medida de la distribución de tamaños, interesa que sea lo menor posible para obtener NPs homogéneas.

Es necesario optimizar ambos parámetros en conjunto, de modo que se obtengan unas NPs con un tamaño adecuado y distribuciones estrechas. En este sentido, se pueden encontrar numerosos ejemplos en los que se modifican distintos factores, tales como el caudal total, la relación de fases o la composición de las mismas, para optimizar las características fisicoquímicas de NPs. Con respecto al caudal, Bokare et al., (2019)<sup>23</sup>, encontraron que un mayor caudal producía menor tamaño, usando una configuración de micromezclador de *flow focusing*, donde la fase acuosa (con el lípido) se introduce por los canales de los extremos y la orgánica con el polímero por el canal central. En el caso de la relación de fases, Shokoohinia et al., (2019)<sup>24</sup> optimizaron este factor para obtener valores mínimos de PDI y tamaño usando un diseño del micromezclador similar a la de Bokare et al., (2019)<sup>23</sup>, salvo que en este caso por los extremos se introduce alcohol polivinílico. Por último, la composición de las fases, que en el caso de las NPs híbridas puede ser representada como la proporción de polímero/lípido, fue estudiada por Kim et al., (2012)<sup>11</sup>, haciendo uso de un diseño de micromezclador que permite formar microvórtices, con tres entradas e introduciendo la fase acuosa por los extremos y la orgánica por la central. Estos autores observaron que al incrementar la proporción de polímero frente a lípido, aumenta el tamaño de las NPs.

En el presente trabajo se analiza la influencia de la relación de fases y el caudal total sobre estas características, fijando diferentes caudales de partida de la fase orgánica. En particular, se contemplaron las siguientes variables:

- Relación de fases (O/W): 1:2, 1:3, 1:5, 1:8, 1:10, 1:20.
- Caudal de la fase orgánica: 50µl/min, 100µl/min, 200µl/min, 400µl/min.



En el anexo se encuentra una tabla con todos los lotes elaborados, incluyendo la relación de fases y el caudal de la fase orgánica usado para cada uno.

## Influencia de la relación de fases sobre el tamaño y PDI

La influencia de la relación de fases sobre el tamaño y el PDI se ilustra en la Figura 9. Se han agrupado los datos en cuatro gráficos en función del caudal de la fase orgánica. En todos los casos se observa una tendencia descendente en el tamaño y ascendente en el PDI cuando la relación de fases aumenta. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Lababidi et al., (2019)<sup>25</sup>, que consiguieron disminuir el tamaño de NP poliméricas de 150 a 70 nm con un aumento del PDI, de 0,085 a 0,142. Esta reducción de tamaño se puede atribuir a un proceso de mezclado más rápido y eficiente <sup>26</sup>.

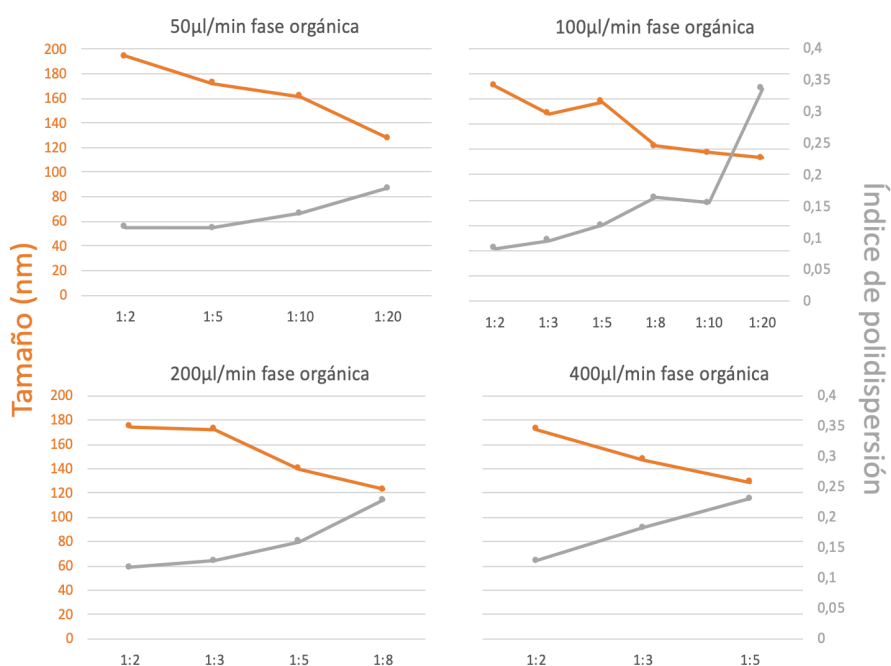


Figura 9. Tamaño e índice de polidispersión según la relación de fases para distintos lotes de nanopartículas, agrupados en función del caudal de la fase orgánica. El eje izquierdo corresponde al tamaño en nanómetros (los puntos de color naranja) y el derecho al PDI (los puntos de color gris).

## Influencia del caudal total sobre el tamaño y PDI

Utilizando la relación de fases 1:5 se determinó la influencia del caudal total en el tamaño y PDI de las NPs. En la Figura 10 se puede observar que el tamaño disminuye y el PDI aumenta cuando aumenta el caudal total.

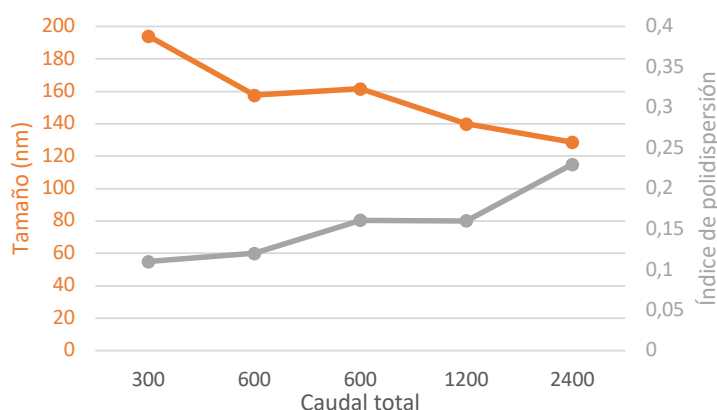


Figura 10. Tamaño e índice de polidispersión para distintos caudales donde la relación de fases ha sido 1:5. El eje izquierdo corresponde al tamaño en nanómetros (los puntos de color naranja) y el derecho al PDI (los puntos de color gris).

Ambos efectos pueden deberse al aumento del número de Reynolds. Cuando el número de Reynolds aumenta, hay una tendencia a la formación de agregados, especialmente en las paredes del canal, debido a una mayor interacción entre partículas, y se incrementa el PDI <sup>27</sup>. En cuanto al tamaño, a mayor número de Reynolds, indicativo de mezclado más homogéneo, menor tamaño de NPs <sup>11</sup>.

## Influencia del proceso de evaporación en el tamaño y PDI de las nanopartículas

Cuando se elaboran NPs es esencial evaporar el disolvente orgánico al final del proceso ya que, por un lado, es tóxico y, por otro, la evaporación permite el endurecimiento de las partículas y evita su agregación. Durante el proceso de evaporación el disolvente orgánico difunde hacia la

fase externa acuosa y abandona la partícula, reduciéndose su tamaño ya que el polímero, al ser insoluble en el agua, precipita. Como se observa en el panel superior de la Figura 11 la reducción del tamaño es mayor cuanto mayor es el caudal de la fase orgánica. Por otro lado, bajo las condiciones aplicadas en este estudio, no parece que esta etapa de evaporación afecte a la polidispersión (panel inferior de la Figura 11).

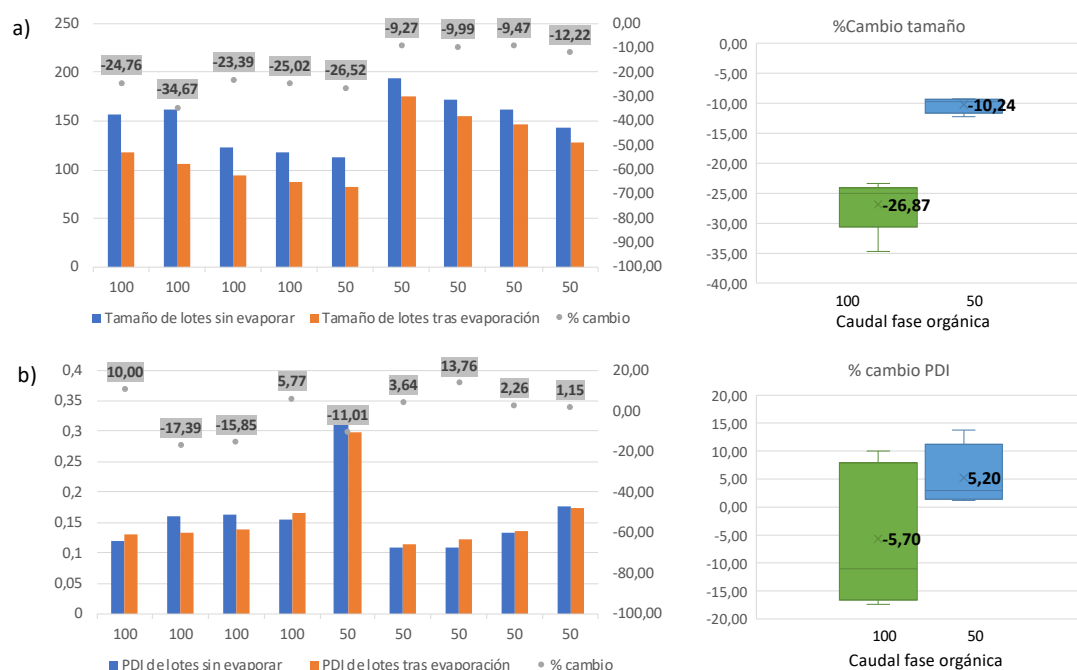


Figura 11. Influencia de la fase de evaporación en el tamaño y PDI de distintos lotes de nanopartículas. En el eje y principal se representa el tamaño (a) o PDI (b) y en el de la derecha el % de cambio del lote evaporado frente al dato previo a la evaporación. En las imágenes de la derecha se agrupan todos los lotes en función del caudal de la fase orgánica y se representa la media de las variaciones en % de tamaño (a) o PDI (b) con una etiqueta.

# Conclusiones

En este de trabajo fin de grado se han obtenido NPs híbridas, utilizando la técnica de nanoprecipitación modificada mediante una instalación de microfluídica que permite controlar las características fisicoquímicas de las NPs. El análisis de los datos obtenidos en este trabajo sugiere que:

- El tamaño de las NPs disminuye cuando aumenta el caudal y la relación de fases
- El índice de polidispersión aumenta al hacerlo a su vez el caudal y la relación de fases
- Dentro del proceso de elaboración de las NPs, la etapa de evaporación del disolvente produce una disminución en el tamaño de las NPs, especialmente cuando el caudal de la fase orgánica aumenta.

Todos los resultados obtenidos son preliminares, dado que los experimentos se han realizado sin réplicas. Para que dichos resultados fuesen estadísticamente significativos sería necesario realizar un diseño experimental que permita evaluar el efecto de los factores estudiados. En este caso esto no ha sido posible debido a las circunstancias sanitarias que han afectado a este segundo cuatrimestre y han limitado el tiempo de trabajo en el laboratorio.

## Referencias

1. Tinkle S, Mcneil SE, Mühlebach S, et al. Nanomedicines: Addressing the scientific and regulatory gap. *Ann NY Acad Sci.* 2014;1313(1):35-56. doi:10.1111/nyas.12403
2. Neubert RHH. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;77(1):1-2. doi:10.1016/j.ejpb.2010.11.003
3. Mukherjee A, Waters AK, Kalyan P, Achrol AS, Kesari S, Yenugonda VM. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a nextgeneration drug delivery platform: State of the art, emerging technologies, and perspectives. *Int J Nanomedicine.* 2019;14:1937-1952. doi:10.2147/IJN.S198353
4. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;93:52-79. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.018
5. Mukherjee S, Ray S, Thakur RS. Solid lipid nanoparticles: A modern formulation approach in drug delivery system. *Indian J Pharm Sci.* 2009;71(4):349-358. doi:10.4103/0250-474X.57282
6. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Front Pharmacol.* 2015;6(DEC). doi:10.3389/fphar.2015.00286
7. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2006;2(1):8-21. doi:10.1016/j.nano.2005.12.003
8. Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85(3 PART A):427-443. doi:10.1016/j.ejpb.2013.07.002
9. Bershteyn A, Chaparro J, Yau R, et al. Polymer-supported lipid shells, onions, and flowers. *Soft Matter.* 2008;4(9):1787-1791. doi:10.1039/b804933e
10. Cheow WS, Hadinoto K. Factors affecting drug encapsulation and stability of lipid-

- polymer hybrid nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2011;85(2):214-220.  
doi:10.1016/j.colsurfb.2011.02.033
11. Kim Y, Lee Chung B, Ma M, et al. Mass production and size control of lipid-polymer hybrid nanoparticles through controlled microvortices. *Nano Lett*. 2012;12(7):3587-3591. doi: 10.1021/nl301253v
  12. Nguyen NT, Wu Z. Micromixers - A review. *J Micromechanics Microengineering*. 2005;15(2). doi:10.1088/0960-1317/15/2/R01
  13. Beebe DJ, Mensing GA, Walker GM. Physics and Applications of Microfluidics in Biology. *Annu Rev Biomed Eng*. 2002;4(1):261-286.  
doi:10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916
  14. Elwenspoek M, Lammerink TSJ, Miyake R, Fluitman JHJ. Towards integrated microliquid handling systems. *J Micromechanics Microengineering*. 1994;4(4):227-245.  
doi:10.1088/0960-1317/4/4/008
  15. Stone ZB, Stone HA. Imaging and quantifying mixing in a model droplet micromixer. *Phys Fluids*. 2005;17(6):1-11. doi:10.1063/1.1929547
  16. Chen J, Guo Z, Tian H, Chen X. Production and clinical development of nanoparticles for gene delivery. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. 2016;3:16023.  
doi:10.1038/mtm.2016.23
  17. Kaiser J. How safe is a popular gene therapy vector? *Science (80- )*. 2020;367(6474):131.  
doi:10.1126/science.367.6474.131
  18. Muhammad Q, Jang Y, Kang SH, Moon J, Kim WJ, Park H. Modulation of immune responses with nanoparticles and reduction of their immunotoxicity. *Biomater Sci*. 2020;8(6):1490-1501. doi:10.1039/c9bm01643k
  19. Zuckerman JE, Choi CHJ, Han H, Davis ME. Polycation-siRNA nanoparticles can disassemble at the kidney glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(8):3137-3142. doi:10.1073/pnas.1200718109
  20. Kulkarni SA, Feng SS. Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Pharm Res*.

2013;30(10):2512-2522. doi:10.1007/s11095-012-0958-3

21. Zhang S, Li J, Lykotrafitis G, Bao G, Suresh S. Size-dependent endocytosis of nanoparticles. *Adv Mater.* 2009;21(4):419-424. doi:10.1002/adma.200801393
22. Singh R, Lillard JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol.* 2009;86(3):215-223. doi:10.1016/j.yexmp.2008.12.004
23. Bokare A, Takami A, Kim JH, et al. Herringbone-Patterned 3D-Printed Devices as Alternatives to Microfluidics for Reproducible Production of Lipid Polymer Hybrid Nanoparticles. *ACS Omega.* 2019;4(3):4650-4657. doi:10.1021/acsomega.9b00128
24. Shokohinia P, Hajialyani M, Sadrajavadi K, et al. Microfluidic-assisted preparation of PLGA nanoparticles for drug delivery purposes: Experimental study and computational fluid dynamic simulation. *Res Pharm Sci.* 2019;14(5):459-470. doi:10.4103/1735-5362.268207
25. Lababidi N, Sigal V, Koenneke A, Schwarzkopf K, Manz A, Schneider M. Microfluidics as tool to prepare size-tunable PLGA nanoparticles with high curcumin encapsulation for efficient mucus penetration. *Beilstein J Nanotechnol.* 2019;10. doi:10.3762/bjnano.10.220
26. Karnik R, Gu F, Basto P, et al. Microfluidic platform for controlled synthesis of polymeric nanoparticles. *Nano Lett.* 2008;8(9):2906-2912. doi:10.1021/nl801736q
27. Afkhami M, Hassanpour A, Fairweather M. Effect of Reynolds number on particle interaction and agglomeration in turbulent channel flow. *Powder Technol.* 2019;343:908-920. doi:https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.11.041

## Anexo

Tabla 4. Resultados de tamaños y PDI de los distintos lotes de nanopartículas elaborados por microfluídica. La SD corresponde a la desviación estandar que proporciona el programa del Zetasizer, calculada a partir de las três medidas que realiza el aparato sobre la muestra

n° de lote	Rel fases (1:)	Caudal fase orgánica	Caudal total	Tamaño ± SD (nm)	PDI ± SD
11	2	200	600	174,2 ± 6,295	0,117 ± 0,028
12	3	200	800	172,1 ± 1,531	0,128 ± 0,012
13	5	200	1200	139,9 ± 0,5774	0,160 ± 0,012
14	8	200	1800	123 ± 0,8544	0,228 ± 0,005
15	2	400	1200	172,1 ± 2,15	0,128 ± 0,016
16	3	400	1600	147,2 ± 1,201	0,182 ± 0,007
17	5	400	2400	128,6 ± 1,682	0,230 ± 0,048
18	2	100	300	170,1 ± 2,139	0,083 ± 0,018
19	3	100	400	148,4 ± 3,281	0,096 ± 0,014
21	5	100	600	157,5 ± 3,612	0,120 ± 0,015
23	10	100	1100	129,4 ± 1,877	0,130 ± 0,009
26	5	100	600	161,5 ± 0,7024	0,161 ± 0,003
27	8	100	900	122,7 ± 2,443	0,164 ± 0,021
28	10	100	1100	117,6 ± 2,290	0,156 ± 0,038
29	20	100	2100	113,2 ± 5,490	0,336 ± 0,054
31	5	50	300	194,1 ± 2,479	0,110 ± 0,003
32	8	50	450	172,2 ± 1,229	0,109 ± 0,019
33	10	50	550	161,6 ± 0,6245	0,133 ± 0,014
34	20	50	1050	127,7 ± 1,242	0,174 ± 0,017



Tabla 5. Medidas de los lotes tras la evaporación y previo a la misma, así como variación de la medida (tras evaporación - previo) y expresado en porcentaje relativo a la medida antes de realizar la fase de evaporación.

Caudal fase orgánica	Lotes tras evaporación		Lotes previo a evaporación		$\Delta$ tamaño	$\Delta$ PDI	% $\Delta$ tamaño	% $\Delta$ PDI
	Tamaño (nm)	PDI	Tamaño (nm)	PDI				
100	118,5	0,132	157,5	0,12	-39	0,012	-24,76	10,00
100	105,5	0,133	161,5	0,161	-56	-0,028	-34,67	-17,39
100	94	0,138	122,7	0,164	-28,7	-0,026	-23,39	-15,85
100	88,18	0,165	117,6	0,156	-29,42	0,009	-25,02	5,77
50	83,18	0,299	113,2	0,336	-30,02	-0,037	-26,52	-11,01
50	176,1	0,114	194,1	0,11	-18	0,004	-9,27	3,64
50	155	0,124	172,2	0,109	-17,2	0,015	-9,99	13,76
50	146,3	0,136	161,6	0,133	-15,3	0,003	-9,47	2,26
50	127,7	0,174	143,3	0,176	-15,6	0,002	-12,22	1,15

