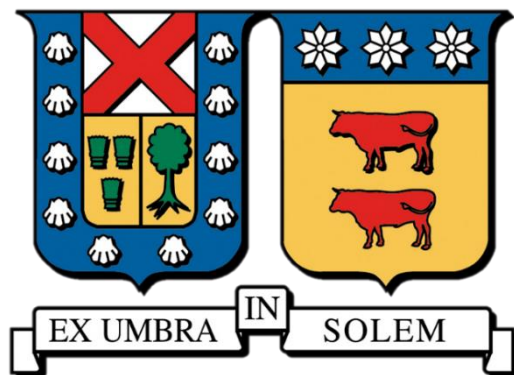


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUÍMICA Y AMBIENTAL
VALPARAÍSO - CHILE



EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FUNCIONALES DE UN MICRO-REACTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE LIPOSOMAS

VICTOR MANUEL CANO VEGA

**MEMORIA PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL QUÍMICO**

PROFESORA GUÍA:

Aldonza Jaques

PROFESOR CO-REFERENTE:

Yusser Olguin

Valparaíso 2024

Índice

Índice	2
Índice de Figuras	4
Índice de Tablas.....	7
Índice de Anexos	8
Resumen	9
Objetivo General.....	10
Objetivos Específicos	10
Estado del arte	11
Parámetros de formación de gotas.	12
Números adimensionales en microfluidica.	13
Configuraciones pasivas para la generación de gotas.	15
Aplicaciones de microfluidica.	17
Sistemas de microfluidica para la producción de liposomas.	18
Métodos convencionales para producir liposomas.	22
Fenomenología del proceso.	26
Modelación en COMSOL MULTYPHISYCS ®.	27
Liposomas en la Industria.	29
Simulación Comsol.....	31
Material es y métodos.....	32
<i>Material es.</i>	36
Reactivos.	36
Equipos e implementos.	37
Fabricación Chips Microfluidica.	40
Experimentación.	46

Preparación soluciones:.....	46
Preparación de los chips:.....	46
Operación de los chips:	46
Resultados y discusión	48
Análisis general.....	48
Análisis de datos.	49
Tamaño de liposomas.	63
Ancho central y tamaño de liposomas.	64
Scale up.....	71
Conclusiones.....	73
Continuidad de la presente investigación	74
Anexos	75
Bibliografía.....	81

Índice de Figuras

Figura 1. Ejemplos de generación de gotas por flujo cruzado. (Zhu, P., & Wang, L, 2017)	15
Figura 2. Ejemplo de Co--flujo para la generación de gotas. (Zhu, P., & Wang, L, 2017)..	15
Figura 3. Ejemplo de configuraciones de generación de gota mediante la aplicación de constricción. (Zhu, P., & Wang, L, 2017)	16
Figura 4. imágenes experimentales de las tres formas pasivas de generación de gotas. (Christopher, G. F., & Anna, S. L. 2007)	16
Figura 5. Formación de gota con reacción química, cambio en geometría provoca mezclamiento por advección. (Bringer et al, 2004).....	17
Figura 6. Sistema de microcanales en chips para producir biomoléculas. Biomolecular Synthesis in Microfluids. (Li, D 2008).....	18
Figura 7. Membrana bi-lipídica nombrada liposoma.	19
Figura 8. fosfolípido genérico.	19
Figura 9. Equilibrio entre fosfolípidos y liposomas.	20
Figura 10. Ejemplo del aumento de concentración de fosfolípidos en una solución.	20
Figura 11. Factor de Empaque P y posibles estructuras de agregados lipídicos. (Phospholipid Research Gate. 2023).....	21
Figura 12. Tipos de ensambles de liposomas según las características del fosfolípido. (Neuhaus et al 2017).....	22
Figura 13. Modelo de sistema microfluidicos y disminución de concentración del Solvente del fosfolípido.....	27
Figura 14. Evidencia experimental de la interfase generada.	28
Figura 15. Intersección en Cruz de flujo cruzado para formación de liposomas.	29
Figura 16. Grafica de incremento de la demanda de sistemas convencionales de suministro de drogas y transporte de droga mediante liposomas. (Trucillo et al 2020).....	31
Figura 17. Modelos de chip a utilizar en el trabajo experimental.	33
Figura 18. Cotas de cada chip en mm.....	34
Figura 19. Molécula de POPE. 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (Avanti Lipids).	34

Figura 20. Molécula de POPG. 1-palmitoyl-d31-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)] (sodium salt)	34
Figura 21. Panel del equipo de ultrafiltración indicando conductividad y temperatura del agua filtrada.....	36
Figura 22. Recipiente de Isopropanol utilizado en la experimentación.	37
Figura 23. Recipiente NaCl marca Merck.	37
Figura 24. Viales de fosfolípidos utilizados.	37
Figura 25. Balanza analítica Sartorius.	38
Figura 26. Bomba de jeringa apagada.	38
Figura 27. Bomba de jeringa configurada para suministrar 196.1 ul/min.	38
Figura 28. Microscopio Nikon utilizado para visualizar la operación del chip.....	39
Figura 29. Visor y cámara electrónica Nikon.....	39
Figura 30. Equipo de purificación de agua ELGA PURELAB Classic UVF.	39
Figura 31. Set up de chip en operación.	40
Figura 32. Infografía producción de chip para microfluidica 1, por D. Benavente.....	41
Figura 33. Infografía producción de chip para microfluidica 2, por D. Benavente.....	42
Figura 34. Infografía producción de chip para microfluidica 3, por D. Benavente.....	43
Figura 35. Equipo de fotolitografía utilizado para la fabricación de los moldes.....	44
Figura 36. Placa de silicio con moldes de chip.	44
Figura 37. Placa de silicio con molde de los chips utilizados.	44
Figura 38. Chip co flow.....	45
Figura 39. Chip Co Flow Focusing	45
Figura 40. Chip Flow Focusing T.....	45
Figura 41. Chip Flow Focusing Y.	45
Figura 42. Modelación deformación de liposomas realizada por Jan et al, 2004.....	50
Figura 43. Tamaño de liposomas, POPE: POPG 2:1.	51
Figura 44. Tamaño de liposomas, POPE: POPG 3:1.	51
Figura 45. Formación y aumento de tamaño de liposomas.	52
Figura 46. Comparación tamaños de liposomas 2:1 y 3:1.....	53
Figura 47. Diferencia de tamaños de grupos funcionales.....	54
Figura 48. Resultados medición de tamaño de liposoma chip Co-Flow POPE: POPG 3:1.	55

Figura 49. Ensuciamiento de chip.	56
Figura 50. Simulación COMSOL Chip Co Flow operando con cada FRR. (2.5,5,10,20,30 y 50).....	56
Figura 51. Simulación COMSOL Chip Co Flow Focusing operando con cada FRR. (2.5,5,10,20,30 y 50)	57
Figura 52.Simulación COMSOL Chip Flow Focusing T operando con cada FRR. (2.5,5,10,20,30 y 50)	57
Figura 53.Simulación COMSOL Chip Flow Focusing Y operando con cada FRR. (2.5,5,10,20,30 y 50)	58
Figura 54. Chip Co Flow operando con cada FRR. (2.5,5,10,20,30 y 50).....	59
Figura 55. Chip Co Flow Focusing operando con cada FRR. (2.5,5,10,20,30 y 50)	59
Figura 56.Chip Flow Focusing T operando con cada FRR. (2.5,5,10,20,30 y 50)	59
Figura 57. Chip Flow Focusing Y operando con cada FRR. (2.5,5,10,20,30 y 50).....	60
Figura 58. Ensuciamiento por operación del chip.FRR 30 Chip Flow focusing T	61
Figura 59. Burbuja atrapada en el sistema. Chip Co Flow Focusing	61
Figura 60. Chip Co flow Focusing FRR 50.....	62
Figura 61. Chip Flow Focusing Y FRR 50.....	62
Figura 62. Flujo central casi invisible por inestabilidad del flujo.	63
Figura 63. Simulaciones Chip Flow Focusing T, FRR 2.5 a la izquierda FRR 50 a la derecha.	64
Figura 64. Sistema en estado estacionario, balance de materia.....	65
Figura 65. Modelo Chip Y.....	69
Figura 66. Modelo Chip T	69
Figura 67. Modelo Chip Co Flow Focusing.....	70
Figura 68. Modelo Chip Co Flow.....	70
Figura 69. Modelo de bomba para 12 jeringas.	72

Índice de Tablas

Tabla 1. Numero adimensionales sobre inercia y transferencia de materia. (Ren. C, Lee. A 2021).....	13
Tabla 2. Nomenclatura.	14
Tabla 3. Resumen diseño experimental.	46
Tabla 4. Tamaños de liposomas en nm según condiciones experimentales.	49
Tabla 5. Desviaciones estándar mediciones DLS para Chip T.....	52
Tabla 6. Menor tamaño de liposoma obtenido.	63
Tabla 7. Ancho del flujo central en función de FRR.....	67
Tabla 8. Medición del ancho real en mm mediante imágenes de microscopio.	67
Tabla 9. Resumen ajuste de modelo.	68
Tabla 10. Resumen valores de escalamiento.	72

Índice de Anexos

Anexos A 1. Tamaño de liposomas Chip Y 2:1	75
Anexos A 2. Tamaño de liposomas Chip Y 3:1	75
Anexos A 3. Tamaño de liposomas Chip T 2:1.....	76
Anexos A 4. Tamaño de liposomas Chip T 32:1.....	76
Anexos A 5. Tamaño de liposomas Chip Co Flow Focusing 2:1	76
Anexos A 6. Tamaño de liposomas Chip Co Flow Focusing 3:1	77
Anexos A 7. Tamaño de liposomas Chip Co Flow 2:1	77
Anexos A 8. Tamaño de liposomas Chip Co Flow 3:1	78
Anexos A 9. Residuos modelo ancho flu central Chip Y.....	78
Anexos A 10. Residuos modelo ancho flujo central Chip T.	78
Anexos A 11. Residuos modelo ancho flujo central Chip Co Flow F.	79
Anexos A 12. Residuos modelo ancho flujo central Chip Co Flow.....	79
Anexos A 13. Normalidad modelo ancho flujo central Chip Y.	79
Anexos A 14. Normalidad modelo ancho flujo central Chip T.....	80
Anexos A 15. Normalidad modelo ancho flujo central Chip Co Flow F.	80
Anexos A 16. Normalidad modelo ancho flujo central Chip Co Flow.	80

Resumen

La utilización de la microfluídica para la generación de liposomas es un área de alto interés para la encapsulación de diversos agentes terapéuticos como fármacos, proteínas, células y material genético para el tratamiento de numerosas patologías. Existen diversas metodologías para lograr la formación de liposomas, en general, estas se pueden dividir en técnicas de alta o baja energía. En este sentido, si bien las técnicas de alta energía suelen ser eficientes en términos de lograr tamaños menores de liposomas, las condiciones de operación suelen dañar los elementos encapsulados y por ello existe un gran interés en lograr el desarrollo eficiente de técnicas de baja energía, en donde los sistemas microfluídicos destacan por sus capacidades potenciales vinculadas a la precisión, versatilidad, eficiencia y seguridad para los componentes que se desean encapsular. Para lograr la formación de liposomas mediante la utilización de sistemas microfluidicos, existe un conjunto de variables que afectan el tamaño final de estos como, tamaño del sistema, geometría del sistema, flujo total, razones de flujo, concentraciones de fosfolípidos, fluidos utilizados, tipos de fosfolípidos, proporción de fosfolípidos y la temperatura. En el presente trabajo se evaluaron diferentes condiciones experimentales para la producción de liposomas mediante chips de microfluídica con un diseño experimental que evalúa cinco variables y su relación con el tamaño final de los liposomas. Estas variables corresponden a: a) la disposición geométrica del sistema, b) el flujo total dentro del sistema, c) las razones de flujo, d) la concentración de fosfolípidos y e) razón de fosfolípidos. Las configuraciones geométricas utilizadas según el ángulo de intersección $45^{\circ}/90^{\circ}/180^{\circ}$, chips Y, T y Co flow respectivamente, estas geometrías fueron las más vistas durante las revisiones bibliográficas. Estos chips fueron fabricados con PMDS utilizando placas de silicio en cuya superficie se inscribe el molde de los chips con técnicas de fotolitografía. El flujo total en los sistemas fue de 200 ul/min a razones de flujo de 2.5, 5, 10, 20, 30 y 50, con una concentración de fosfolípidos de 0.27 mM con razones de 2:1 y 3:1 de fosfolípidos POPE y POPG. Se propone un modelo que permite relacionar el tamaño de liposomas con una variable operacional para escalar el sistema de tamaño con miras a una producción industrial.

Objetivo General

En el contexto de la síntesis de liposomas mediante sistemas microfluídicos, el objetivo general de este proyecto es la determinación de la relación entre las variables de diseño de chips de microfluídica y el tamaño final de liposomas

Objetivos Específicos

- Diseñar y producir chips microfluídicos con configuraciones de intersección de flujos en 45° tipo “Y”, 90° tipo “T” y de tipo Co-flow para la síntesis de liposomas.
- Modelar y simular los sistemas microfluídicos utilizando el software COMSOL®.
- Determinar el efecto de parámetros funcionales (geometría de los conductos microfluídicos, flujo total y razones de flujo entre fases) en el tamaño de los liposomas.
- Dimensionar un sistema de producción de liposomas de forma industrial

Estado del arte

La microfluidica es un área de la mecánica de fluidos y fenómenos de transporte cuyos comienzos datan de 1940, lo cual la posiciona como una tecnología reciente comenzando a estudiarse con gran interés y creciendo de manera exponencial desde el año 2000 hasta la actualidad, aunque todavía siendo un área inexplorada en su totalidad. La microfluídica es la ciencia y la tecnología de la manipulación de pequeñas cantidades de líquidos, en dimensiones micrométricas. La diferencia con los sistemas convencionales radica en el número utilizado normalmente para caracterizar sistemas de fluido, en este sentido, el número de Reynolds, el cual para estos sistemas suelen ser valores pequeños, preponderando así flujos laminares y cuya dinámica suele estar dominada más por efectos viscosos que de inercia (Boulez et al, 2017). Estas propiedades físicas son las que resultan altamente atractivas para el desarrollo de diferentes aplicaciones, donde destacan la generación de micro reactores, producción de nanomateriales, y la generación de partículas lipídicas por medio de sistemas formadores de gotas, estas últimas de gran interés en el desarrollo de sistemas de transporte de fármacos y material genético, esto último de gran interés en el desarrollo de nuevas vacunas (Bastián et al 2017).

La generación de gotas utilizando sistemas de tamaños micrométrico permite control del proceso, permitiendo diámetros y frecuencia de formación, controlables mediante la modulación de parámetros conocidos como; Flujo, presión, viscosidad y tensión superficial de los fluidos involucrados. (Droplets microfluidics Chapter-1, 2020)

La finalidad de producir gotas de tamaño micro o nanométrico es variada, ya sea para utilizarlas como sistemas reactivos mediante la inyección de reactivos, generación de capsulas con aplicaciones médicas como vacunas o generación de medicamentos, análisis biológicos, informáticos y químicos. (Jhan et al, 2013). El enfoque principal de esta memoria es la generación de liposomas en chips de microfluidica predeterminados o confeccionados mediante técnicas de fotolitografía, utilizando COMSOL como optimizador de la fase experimental, para la modulación del tamaño de liposomas producidos.

Parámetros de formación de gotas.

La Microfluidica es la ciencia de los fluidos manipulados a escalas micro y nanométricas. No existe un claro requisito para que los sistemas sean tratados como microfluidicos, pero en comparación con su contraparte macroscópica se puede definir diferencias tales como, que el flujo laminar es la norma en los fluidos bajo condiciones microfluídicas y fuerzas intermoleculares como la tensión superficial comienzan a tomar relevancia, en cambio en casos comunes macroscópicos como abrir un grifo de agua cuya dinámica está gobernada principalmente por las fuerzas de inercia producto de un campo de velocidad, causando regímenes turbulentos. (Bastián E. 2017) Dadas las dimensiones en las que se suele trabajar en sistemas micrométricos con conductos cuyos tamaños varían entre 10^{-6} y 10^{-3} metros con volúmenes entre 10^{-9} y 10^{-18} litros (Whitesides, 2006). El diámetro característico de estos sistemas es pequeño y considerando a la baja velocidad que se desplazan los fluidos por los conductos el número de Reynolds de estos sistemas es bajo, por lo que el régimen predominante es el laminar. Esto es porque los efectos de la viscosidad del fluido, la propiedad inherente de cada fluido a cohesionarse consigo mismo por interacciones intermoleculares, es mayor a la inercia del fluido producto de un campo de velocidad y pierde relevancia el momento del fluido. (Boulez et al, 2017).

La formación de gotas en sistemas microfluidicos suele estar controlados por parámetros inherentes a los fluidos, viscosidad y densidad además de otros dependientes del sistema, (compréndase el sistema como el conjunto de formaciones geométricas por el cual viajan los fluidos y los fluidos seleccionados) cuya interacción es distinta caso a caso, estos son: tensión superficial, esfuerzos de corte y razón de flujo entre la fase continua y dispersa. Todas estas variables dictaminan cuando, como y con qué frecuencia se generan gotas siendo la tensión superficial entre las fases la determinante de si el fenómeno ocurrirá o no. (Ren, C. Chapter-2, 2020)

Existen métodos de formación de gotas de manera activa y pasiva. La formación pasiva de gotas implica solo la interacción entre las dos fases viajando por los conductos del sistema, cuyo posible resultado de ponerse en contacto será la generación de gotas. Existe otro método de formación activa de gotas que incluye, usar el método pasivo con añadido de potencial externo para cambiar el procedimiento de generación de gotas. El potencial externo puede

ser de carácter térmico, magnético, neumático acústico hidrodinámico y eléctrico (Lee et al 2012, Link et al, 2006 Xi, et al 2017, Wu et al 2013). Además, pueden añadirse de sales o surfactantes para empeorar la coalescencia de las gotas generadas y aumentar su duración para posteriores almacenamientos. (Mazutis et al 2012, Courtois, F et al 2008).

La viscosidad, densidad son propiedad de los fluidos, es función de la temperatura, presión y esfuerzo de corte a la cual está sometido. Estos parámetros son relevantes a hora de considerar la totalidad de estos parámetros en la ecuación de Navier-Stokes.

Números adimensionales en microfluidica.

En estos regímenes microfluidicos la utilización de números adimensionales para caracterizar comportamientos suele ser muy útil para demostrar que factores tienen real injerencia en el comportamiento de la generación de gotas. (Ren. C, Lee. A 2020). En la tabla 1, se observan algunos para describir movimiento y transferir materia de uso general.

Tabla 1. Numero adimensionales sobre inercia y transferencia de materia. (Ren. C, Lee. A 2021)

Número adimensional	Ecuación	Significado
Reynolds	$Re = \frac{\rho v d}{\eta}$	Indica la razón en la inercia del fluido comparado con las fuerzas viscosas del mismo.
Capilaridad	$Ca = \frac{\eta v}{\sigma}; Ca = \frac{\eta \dot{\gamma} d}{\sigma}$	Indica la razón entre las fuerzas viscosas en comparación a las fuerzas generadas en las interfases de los fluidos
Ohnesorge	$Oh = \left(\frac{Ca}{Re}\right)^{\frac{1}{2}}$	Relaciona las fuerzas viscosas con las fuerzas de tensión superficial e inerciales.
Weber	$We = Re * Ca$	Compara las fuerzas inerciales con las fuerzas interfaciales.

Bond	$Bo = \frac{\Delta\rho g d^2}{\sigma}$	Compara fuerzas gravitacionales respecto de aquellas causadas por el contacto en la interfase.
Grashof	$Gr = \frac{g\beta(T_s - T_\infty)d^3}{\left(\frac{\eta}{\rho}\right)^2}$	Compara las fuerzas producidas por la flotabilidad por respecto de fuerzas viscosas.
Péclet	$Pe = \frac{vd}{D_{diff}}$	Compara la tasa de transporte de materia producto de la advección, producto de un campo de velocidad, con la tasa de difusión.
Schmidt	$Sc = \frac{Pe}{Re}$	Compara el momento de difusividad con la tasa de difusión.

Tabla 2. Nomenclatura.

Símbolo	Nombre	Unidad
d	Diámetro característico del sistema	[m]
ρ	Densidad del fluido	[kg/m ³]
η	Viscosidad cinemática	[Pa/s]
v	Velocidad característica del desplazamiento del fluido	[m/s]
$\dot{\gamma}$	Esfuerzo de corte	[1/s]
σ	Tensión superficial	[N/m]
β	Coefficiente de expansión térmica	[1/K]
g	Gravedad de la tierra	[m/s ²]
T_s	Temperatura superficial de un solido	[K]
T_∞	Temperatura en el seno del fluido	[K]
D_{diff}	Coefficiente de difusividad	[m/s]

Configuraciones pasivas para la generación de gotas.

Existen tres formatos/configuraciones geométricas que permiten la generación de gotas de forma pasiva y suelen ser las más utilizadas para los estudios de microfluidica. (Zhu, P., & Wang, L, 2017)

- (i) Flujo Cruzado: Consiste en generar configuraciones geométricas tal que la fase dispersa se conecte al canal por el cual fluye la fase continua en un ángulo variable desde mayores a 0° hasta 90° , pudiendo generarse más de un canal para la unión. Varios ejemplos se muestran en la figura 1.

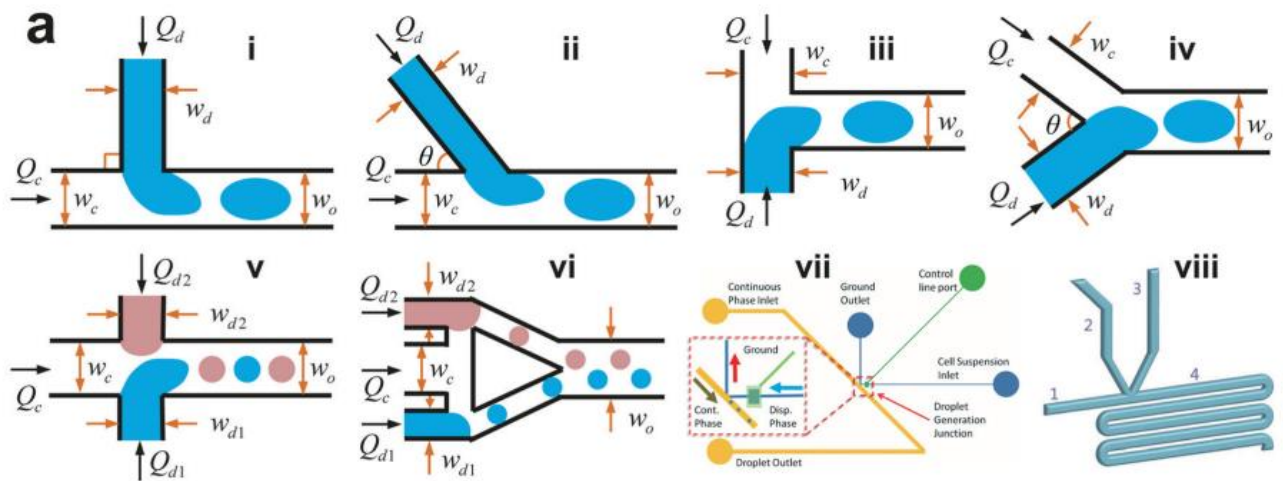


Figura 1. Ejemplos de generación de gotas por flujo cruzado. (Zhu, P., & Wang, L, 2017)

- (ii) Co-Flujo: Se general canales concéntricos tanto para la fase dispersa como continua de manera que fluyen en la misma dirección separados solo por las paredes de los conductos hasta que se acaba el conducto de la fase dispersa, la cual generalmente se encuentra dentro del canal mayor, donde se ponen en contacto permitiendo la generación de gotas. Esto se puede visualizar en la figura 2.

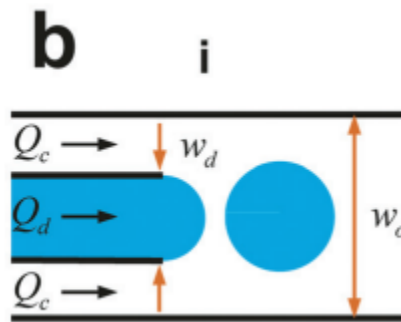


Figura 2. Ejemplo de Co-flujo para la generación de gotas. (Zhu, P., & Wang, L, 2017)

- (iii) Flujo en constricción: Se utilizan las configuraciones (i) y (ii) con cambios de en la salida de la fase dispersa tal que se generen constricciones que ayudan a la generación de gotas. Varias configuraciones de este tipo pueden observarse en la figura 3.

El resto de las configuraciones son combinaciones de estas últimas con variaciones.

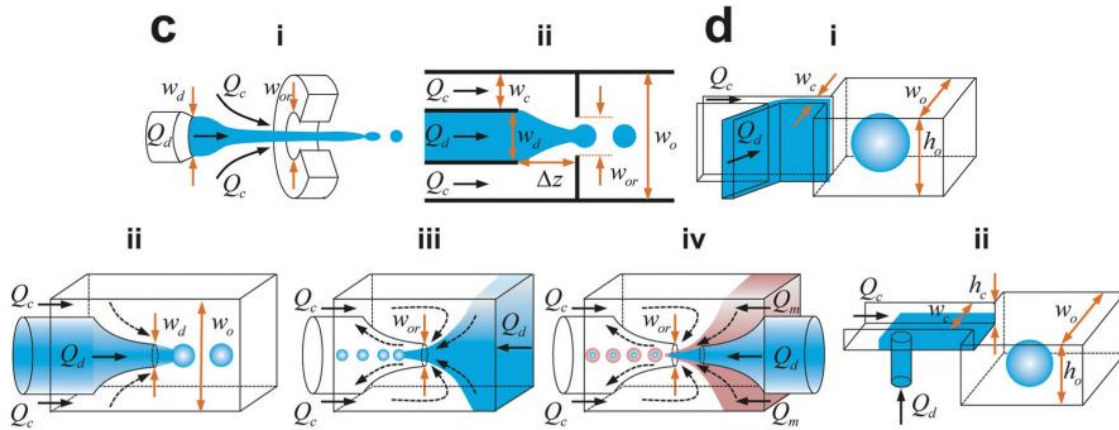


Figura 3. Ejemplo de configuraciones de generación de gota mediante la aplicación de constricción. (Zhu, P., & Wang, L, 2017)

Se han realizado variados experimentos con las configuraciones antes señaladas en los estudios de Anna, S. L., & Mayer, H. C. (2006) y Cramer, et al (2004), con la utilización de microscopios y cámaras de alta velocidad se obtienen las imágenes de la figura 4.

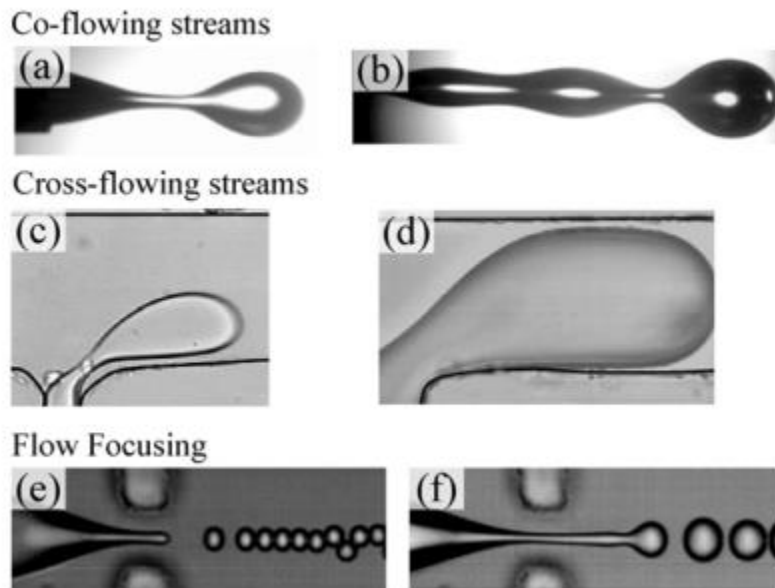


Figura 4. imágenes experimentales de las tres formas pasivas de generación de gotas. (Christopher, G. F., & Anna, S. L. 2007)

En los que se observa el fenómeno de formación de gotas en las configuraciones señaladas, ya que suele ser un fenómeno de alta frecuencia escapa a la vista común.

Aplicaciones de microfluidica.

Las aplicaciones de la microfluidica son variadas abarcando desde el estudio fenomenológico desde el punto de vista de la física, en aplicaciones directa a la ingeniería, aplicaciones para la ciencia de materiales y usadas en las áreas biológicas y de la bioquímica. (Bastián et al 2017)

Para el caso de la ingeniería se pueden generar sistemas completos de cañerías y reactores. Estos sistemas son altamente eficientes en la transferencia de calor y capacidad cinética de la reacción. Se utilizan tanto sistemas pasivos como activos para ayudar a completar la reacción. Los reactivos pueden ponerse en contacto de variadas maneras, y posterior al contacto entre ambos se pueden generar cambios geométricos en los conductos para ayudar a que se mezclen los reactivos y facilitar la reacción lo cual se puede visualizar en la figura 5.

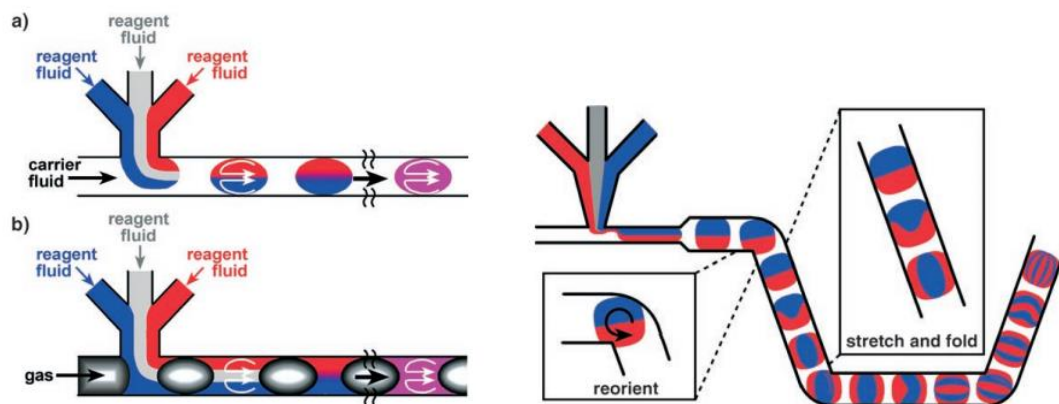


Figura 5. Formación de gota con reacción química, cambio en geometría provoca mezclamiento por advección. (Bringer et al, 2004)

Las aplicaciones en la producción de materiales se tiene la elaboración de nanopartículas de Quitosano cuya función principal es generar la estructura recubrimiento para medicamentos, ya que sus propiedades de degradabilidad son aptas para luego ser biodegradada por el organismo. (Cetin, B et al 2013)

La utilización de celdas microfluídicas para sintetizar biomoléculas, en las cual se generan sistemas de conductos y válvulas para mantener en un proceso continuo la producción de moléculas. Como ejemplo está la producción de péptidos, que se puede observar en la figura 6.

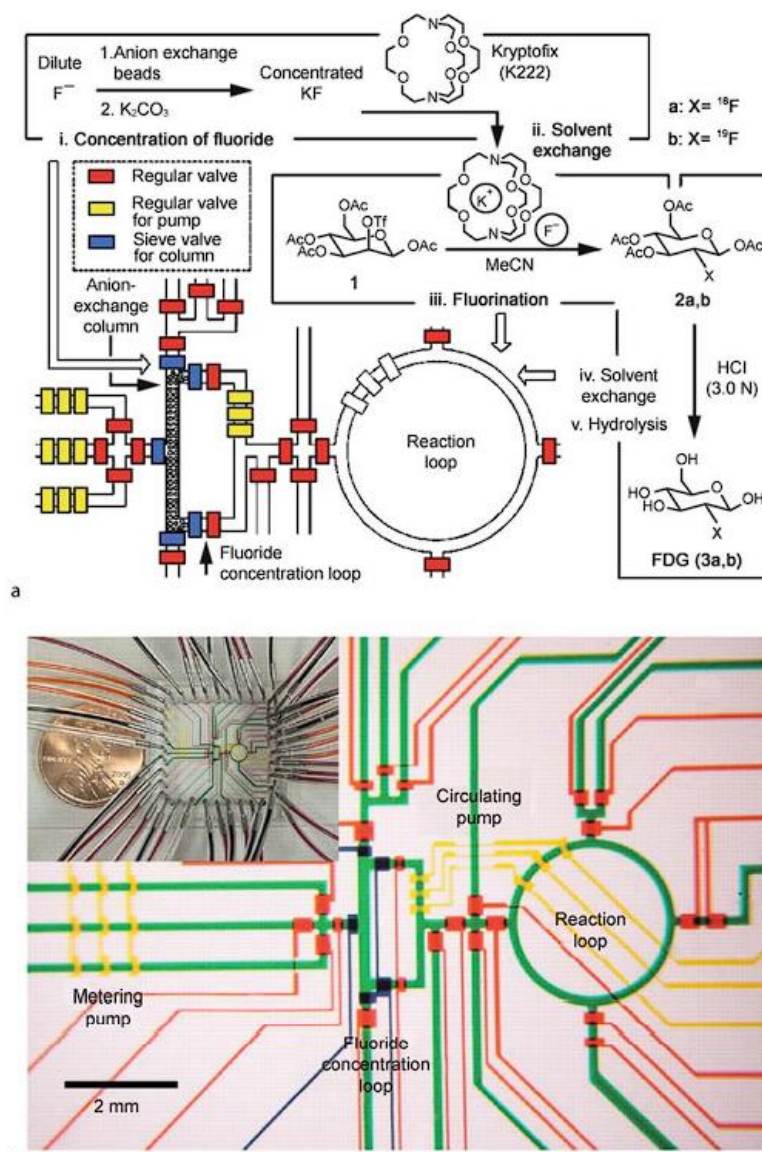


Figura 6. Sistema de microcanales en chips para producir biomoléculas. *Biomolecular Synthesis in Microfluids*. (Li, D 2008)

Sistemas de microfluidica para la producción de liposomas.

Finalmente, en las aplicaciones biológicas se encuentra la utilización de la microfluídica para formar liposomas. La formación de liposomas obedece mayormente a interacciones intermoleculares difusivas más que a efectos físicos entre dos líquidos inmiscibles cuya característica principal es la existencia de una interfase cuyas variables asociadas son la tensión superficial y resistencia asociada a la difusivas de las soluciones utilizadas en el proceso. La formación de gotas y liposomas son dos áreas totalmente diferentes.

Un liposoma es una bicapa esférica con un núcleo acuoso (Ver figura 7). Esta bicapa está formada por fosfolípidos, moléculas orgánicas que se obtienen de membranas plasmáticas celulares o sintetizadas.

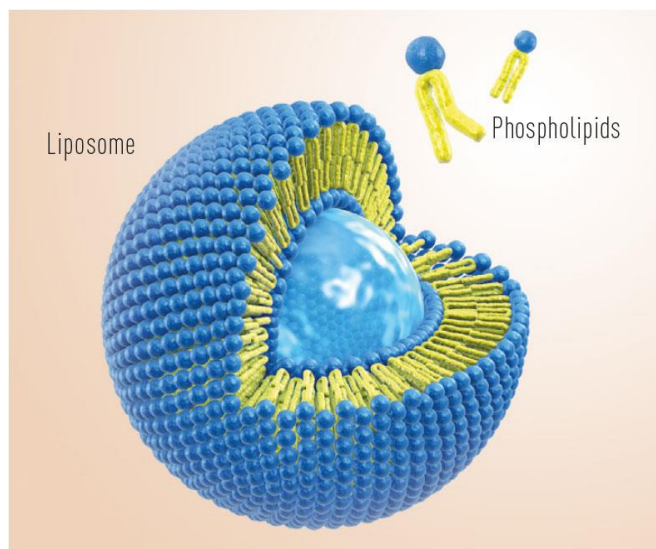


Figura 7. Membrana bi-lipídica nombrada liposoma.

La característica principal de un fosfolípido es que está compuesta por dos cadenas de ácidos grasos unidos a un grupo fosfato, el cual puede estar unido a un grupo Funcional R de variable tamaño ver figura 8. Al poseer una gran cadena apolar y un grupo fuertemente polar debido al grupo fosfato y las posibles resonancias de los grupos funcionales, los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, que poseen un extremo soluble en agua y otro que no, y anfóteros, que tienen propiedades tanto de ácido como base.

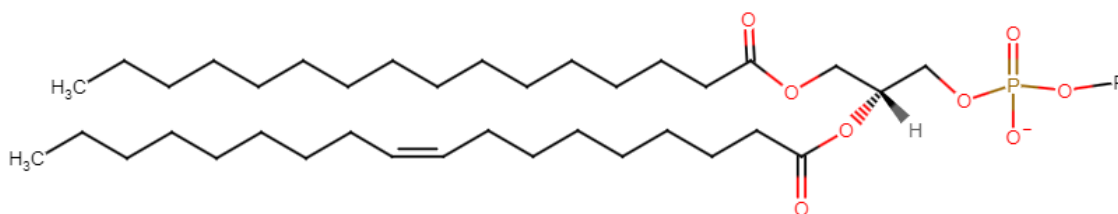


Figura 8. fosfolípido genérico.

Los liposomas se forman cuando los fosfolípidos se encuentran en medio acuoso, donde las colas hidrofóbicas se ordenarán hacia el interior de la estructura y las cabezas hidrofílicas hacia el exterior, la primera para minimizar el contacto en las moléculas de agua y la segunda para maximizar el contacto. Esta acción de las moléculas es reversible, los fosfolípidos se

agrupan para formar liposomas y también se desagregan separándose en fosfolípidos.

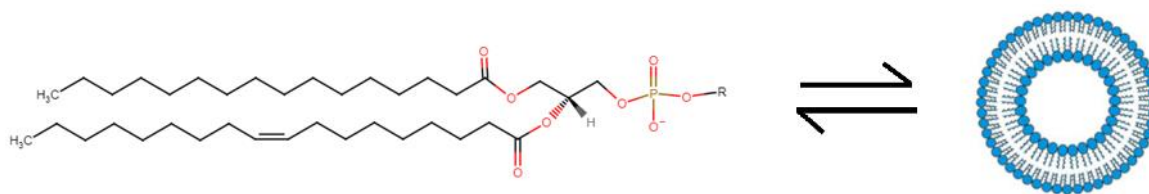


Figura 9. Equilibrio entre fosfolípidos y liposomas.

La formación de los liposomas solo ocurre cuando se logra romper la concentración crítica de fosfolípidos en el medio acuoso, esta concentración es usualmente conocida como Concentración Micelar Crítica. Esta concentración indica que hay un mínimo de fosfolípidos requeridos en un volumen para comenzar la formación de liposomas.

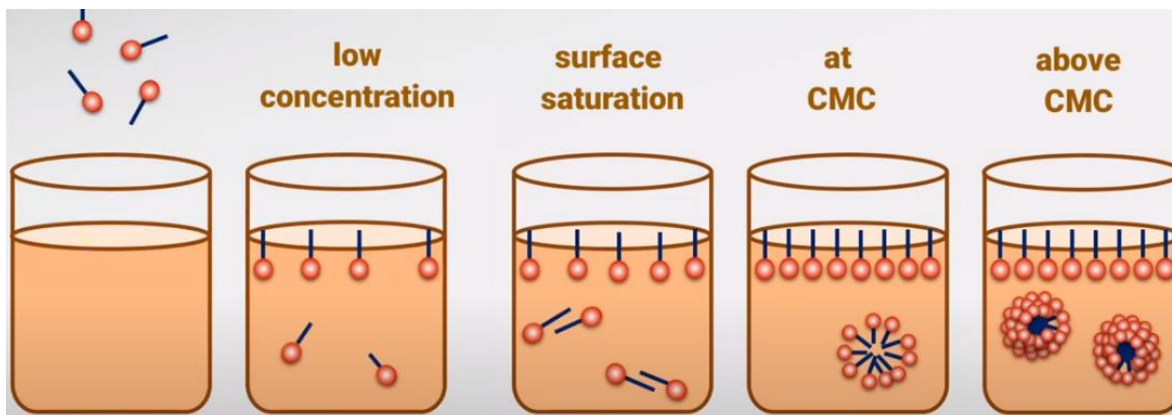


Figura 10. Ejemplo del aumento de concentración de fosfolípidos en una solución.

Estos liposomas pueden usarse como capsulas artificiales en cuyo interior puede cargarse con material genético, células, fármacos y/o reactivos. (Carvalho et al 2022). La primera persona en utilizar este método fue Alec Bangham en un estudio acerca de difusión de iones en lecitina, un fosfolípido común en las yemas de huevos. (Bangham, 1965). La unión del material lipídico para generar liposomas suele ocurrir debido atracciones moleculares del mismo fosfolípido y así genera la esfera lipídica en el sistema microfluidicos, pero el liposoma solo se generará si el medio continuo es un buffer. (Carugo et al, 2016). La formación de liposomas obedece

Dentro de las aplicaciones de este campo esta la producción de mRNA y siRNA utilizando microfluidos (Shepherd et al 2021) Sistemas de monitoreo de tratamiento in vitro de genes

(Courtis et al 2008) generación de células lipídicas artificiales y nano transportadores (Carvalho et al 2022).

Las estructuras que se pueden formar en soluciones acuosas a partir de fosfolípidos son dependientes de su estructura molecular en conjunto de factores externos a la misma molécula como temperatura, pH y concentración del lípido. La estructura en la cual se agruparán los fosfolípidos se puede conocer con cierta confianza si no se consideran las otras variables involucradas, mediante un parámetro geométrico P , factor de empaquetamiento, en que se relaciona el área transversal del grupo fosfato, el volumen de las cadenas ramificadas y el largo de estas. Este parámetro de empaque indica que tan conificado se encuentra la molécula lo cual determina la capacidad de encaje entre ellas para formas diferentes tipos de estructuras. (Israelachvili, 1980) Todo lo anterior se encuentra resumido en la Figura 11.

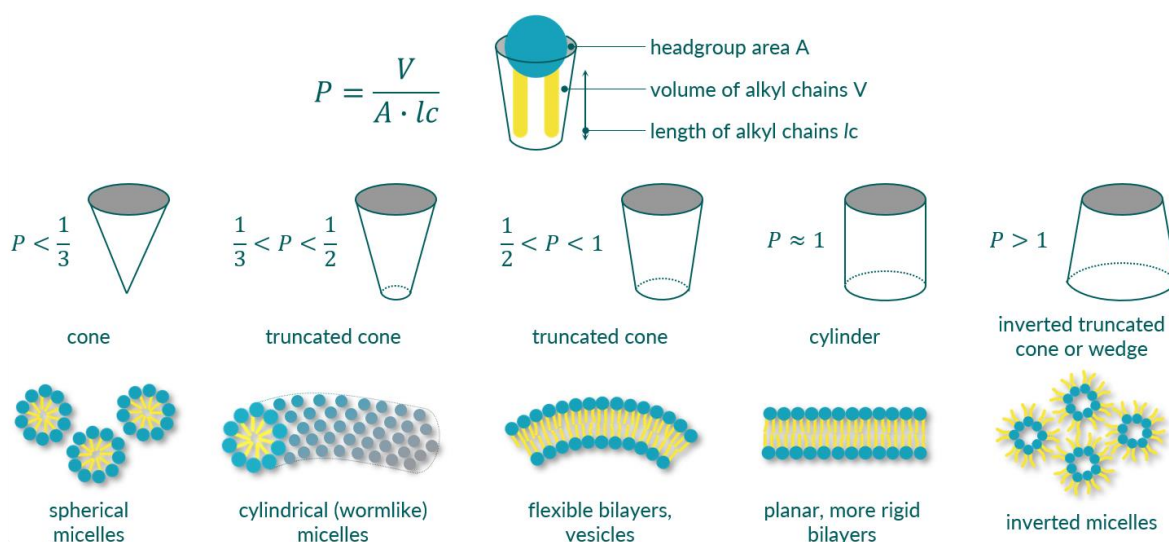


Figura 11. Factor de Empaque P y posibles estructuras de agregados lipídicos. (Phospholipid Research Gate. 2023)

Pero existen caso en los cuales el autoensamble de los lípidos no generen estructuras esféricas, siendo esto posible dado los grupos funcionales que posean los fosfolípidos. En la Figura 12, es posible observar cómo diferentes moléculas logran ensamblarse en geometrías distintas entre sí.

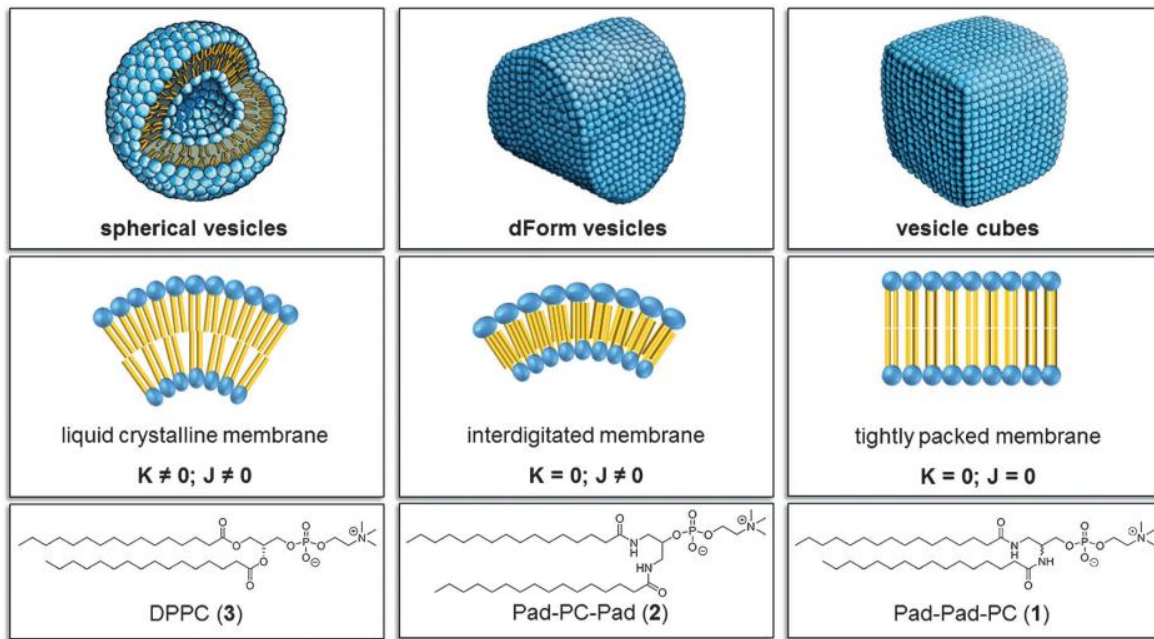


Figura 12. Tipos de ensambles de liposomas según las características del fosfolípido. (Neuhaus et al 2017)

La formación de estos liposomas no esférico se da en temperaturas controladas en las que se aplica calor hasta alcanzar la temperatura de transición en la que los fosfolípidos adoptan propiedades liquidadas, para luego enfriarse y cristalizarse rápidamente.

Métodos convencionales para producir liposomas.

La preparación de liposomas mediante el uso de microfluidica es relativamente reciente. Existen diversas metodológicas para lograr la formación de liposomas, en general, estas se pueden dividir en técnicas de alta o baja energía.

Métodos de Baja Energía:

1. Filtración de Membrana:

Consiste en pasar una mezcla lipídica a través de una membrana porosa para obtener liposomas. La baja presión ayuda a controlar el tamaño de los liposomas.

2. Rotación de Película Delgada:

Involucra la evaporación de un disolvente orgánico que contiene lípidos, formando una película delgada que luego se rehidrata con una solución acuosa para generar liposomas.

3. Agitación:

La agitación de una mezcla de lípidos y solución acuosa induce la formación espontánea de liposomas. Este método es simple y efectivo para obtener liposomas de tamaños variados.

4. Inyección de Solución Acuosa:

Los lípidos se disuelven en un disolvente orgánico y se inyectan en una solución acuosa, generando liposomas durante la mezcla.

Métodos de Alta Energía:

5. Homogeneización a Alta Presión:

Implica pasar la mezcla lipídica a través de una válvula a alta presión, generando liposomas pequeños y uniformes debido a la turbulencia y cizalle de los lípidos.

6. Ultrasonido de Alta Intensidad:

Las ondas ultrasónicas de alta intensidad inducen la formación de liposomas mediante la creación de microcavidades y perturbaciones en la mezcla lipídica y acuosa.

7. Microfluidización:

Se trata de pasar una mezcla lipídica y acuosa a través de una cámara de microfluidización a alta presión y velocidad, resultando en la formación de liposomas uniformes.

8. Electroporación:

Se aplica un campo eléctrico de alta intensidad para crear poros en las membranas lipídicas, permitiendo la formación de liposomas.

Estos métodos convencionales ofrecen diferentes enfoques para la formación de liposomas, y la elección del método dependerá de factores como el tamaño deseado de los liposomas, el tipo de lípidos utilizados y las características del fármaco o sustancia a encapsular. Es importante caracterizar los liposomas resultantes en términos de tamaño, estabilidad y capacidad de carga para su aplicación específica. Los métodos de baja energía son amigables con muchos elementos a encapsular, mientras que los de alta energía pueden controlar más preciso el tamaño de los liposomas, pero cuyos procesos no permiten la adición conjunta mientras se forman los liposomas, de sustancias sensibles a temperaturas y presiones altas. (Lombardo et al, 2022)

La prevalencia de los liposomas en la investigación facilita la búsqueda de métodos de preparación de manera económica y factible. Además de la evaporación inversa y la inyección de etanol, los métodos de producción comúnmente utilizados incluyen hidratación de película delgada, extrusión, electroformación, liofilización y doble emulsión. Aunque estos métodos a escala macro son comúnmente utilizados debido a su facilidad de uso, son criticados por su incapacidad para lograr un control preciso sobre el tamaño y la polidispersidad de los liposomas, así como por la explotación insuficiente de reactivos y materiales. Por ejemplo, los compartimentos celulares artificiales requieren un control preciso de forma y tamaño para emular células vivas, pero es extremadamente desafiante (casi imposible) lograr tal precisión utilizando técnicas a escala macro. Se ha reconocido que un tamaño de liposoma más pequeño (≤ 100 nm) puede ser adecuado para mejorar la actividad de un fármaco antitumoral encapsulado en liposomas (Sang et al, 2021). La producción de liposomas de "tamaño límite" con diámetros inferiores a 50 nm solo es factible mediante técnicas a escala macro como la sonicación y la homogeneización; sin embargo, la microfluídica permite fácilmente la producción escalable de SUVs con un tamaño de 20–200 nm. Los materiales encapsulados dentro de los liposomas disueltos en solución acuosa son muy costosos (como el ARN mensajero), y los métodos a granel propensos a reproducibilidad y desperdicio de material pobre. La aparición de la tecnología microfluídica resuelve este dilema, ya que la formación de liposomas se reduce a un chip a nivel de centímetros, reduciendo significativamente los costos asociados y mejorando la eficiencia y maniobrabilidad de la producción de liposomas. (Zhan et al, 2021)

La microfluídica ha sido utilizada para la producción de liposomas mediante métodos como la electroformación, hidratación, extrusión, eyectado pulsado, templado de doble emulsión, hidratación de gotas de hielo, eyección transitoria de membrana, transferencia de emulsión de gotas y control hidrodinámico. Sin embargo, muchas de las técnicas mencionadas anteriormente resultan en la producción de sistemas vesiculares relativamente grandes (es decir, vesículas grandes unilamelares o microtúbulos), limitando su potencial para la producción de vehículos de entrega de medicamentos a nanoescala. Estos métodos si son comparados con los métodos convencionales de producción en masa no son más que simples versiones miniaturizadas y muchas de las técnicas mencionadas no pueden considerarse estrictamente microfluídicas, pese a utilizarse en conductos pequeños. Dentro de las técnicas

de microfluidica resalta el enfoque hidrodinámico (MHF) presenta las particularidades físicas típicas de los sistemas microfluídicos cuya característica principal es un bajo número de Reynolds y transferencia de masa dominada por difusión. Según la revisión de Carugo et al, 2020, es el único método reconocido por varios autores viable para la producción de liposomas nanométricos basados en lípidos con potencial de uso clínico. El método MHF se basa en el uso de dispositivos microfluídicos con una geometría de flujo cruzado en el cual se dirección los flujos desde varios conductos a un único conducto. Típicamente, se fuerza a un flujo de lípido en solución alcohólica a fluir en el canal central (o interno) del dispositivo. El flujo de lípidos es interceptado y envuelto por dos flujos laterales (o coaxiales) de una fase acuosa típicamente agua destilada o tampones acuosos de PBS o NaCl. De esta manera, el flujo que contiene lípidos se enfoca hidrodinámicamente en una lámina estrecha con una sección transversal rectangular en el caso de microchips con geometría de flujo. (Lombardo et al, 2022)

El grosor del flujo focalizado puede ajustarse tanto por el de flujo volumétrico (TRR) entre los flujos de fase de lípidos y agua y razón entre estos flujos (FFR). La formación de liposomas en chips MHF está gobernada por la difusión de diferentes especies moleculares (principalmente alcohol y agua, pero también lípidos) en la interfaz líquida entre el disolvente (alcohol) y el no disolvente (agua) de las fases. El alcohol en el que los lípidos están inicialmente solubilizados difunde en el agua y simultáneamente el agua difunde en el alcohol hasta que la concentración de alcohol disminuye a un nivel crítico, por debajo del límite de solubilidad de los lípidos. Como tal, la difusión del alcohol desencadena la formación de liposomas mediante un mecanismo descrito como "autoensamblaje". En concreto, se cree que la difusión recíproca de alcohol y agua a través de la interfaz de alcohol/agua provoca que el lípido precipite, dando lugar a estructuras intermedias, en forma de micelas oblatas, que luego forman liposomas. (Jahn et al, 2010)

Se ha demostrado que las técnicas microfluídicas MHF producen liposomas uniformemente dispersos y permiten el control directo del tamaño de los liposomas mediante ajustes finos tanto a FRR como a TFR. El autor Jahn et al. 2007 en su estudio enuncia que "la disminución del ancho del flujo de la muestra a escalas de micrómetros permite condiciones mecánicas y

químicas controladas y reproducibles a lo largo del ancho del flujo, en comparación con las técnicas de preparación a granel más tradicionales (tubos de ensayo y probetas)". Carugo et al, 2020 señala que los diversos autores no pueden más que concluir que el método de producción de liposomas mediante MHF no tiene un análogo a nivel macro.

Se suele aceptar que los métodos a granel se asocian con condiciones químicas y mecánicas heterogéneas y mal controladas durante la formación de vesículas lipídicas, dando lugar a vesículas no uniformes en la molaridad y tamaño. Por estas razones, a menudo se requieren pasos de postprocesamiento adicionales para obtener suspensiones homogéneas de vesículas. Estos procesos incluyen: (a) extrusión de vesículas a través de los poros de membranas de policarbonato, (b) tratamiento con ultrasonido o (c) congelación y descongelación repetitivas. En contraste, al estar caracterizado por condiciones de flujo laminar y transferencia de masa difusiva, MHF tiene la capacidad, al menos en teoría, de producir liposomas con un excelente control sobre el tamaño. Además, la tecnología microfluídica ofrece ventajas adicionales sobre los métodos a granel, incluida la posibilidad de monitorear in situ el proceso de formación de liposomas, producción continua y escalado mediante la paralelización de microreactores. (Carugo et al, 2016)

Fenomenología del proceso.

La generación de liposomas a partir de sistemas microfluidicos es un fenómeno combinado de efectos difusivos en fluidos laminares siendo parte de los métodos de baja energía para la producción de liposomas. La característica principal de los flujos laminares en estas condiciones microfluídicas es que las fuerzas inerciales son despreciables frente a las viscosas, permitiendo controlar la dirección del flujo con mayor precisión. Esta precisión ayuda a que las mezclas dentro del chip sean rápidas y eficientes generando distribuciones de tamaños homogéneas para los liposomas. (Jahn et al, 2010)

Los efectos difusivos se aprecian cuando los fosfolípidos quedan abandonados cuando su solvente, más afinidad con la fase continua de una solución salina, se dispersa en esta última permitiendo que los fosfolípidos se agrupen entre ellos dado sus propiedades anfipáticas. La geometría de los conductos permite contactar ambas fases, solvente del lípido y solución salina, generando una interfase que a lo largo del proceso desaparece por la difusión del solvente hacia la solución salina. El fenómeno de formación de liposomas ocurre en la

interfase que se genera entre ambos fluidos. Esta interfase cambia lentamente a lo largo de los conductos permitiendo la homogeneidad del proceso de formación de los liposomas por la agrupación de fosfolípidos. (Aranguren et al, 2020).

Modelación en COMSOL MULTYPHISYCS ®.

En la siguiente Figura 13 modelada en COMSOL MULTYPHISYCS ® se observa como la concentración de isopropanol en rojo se ve drásticamente disminuida al entrar en contacto con la solución salina y que a lo largo de los conductos su concentración disminuye.

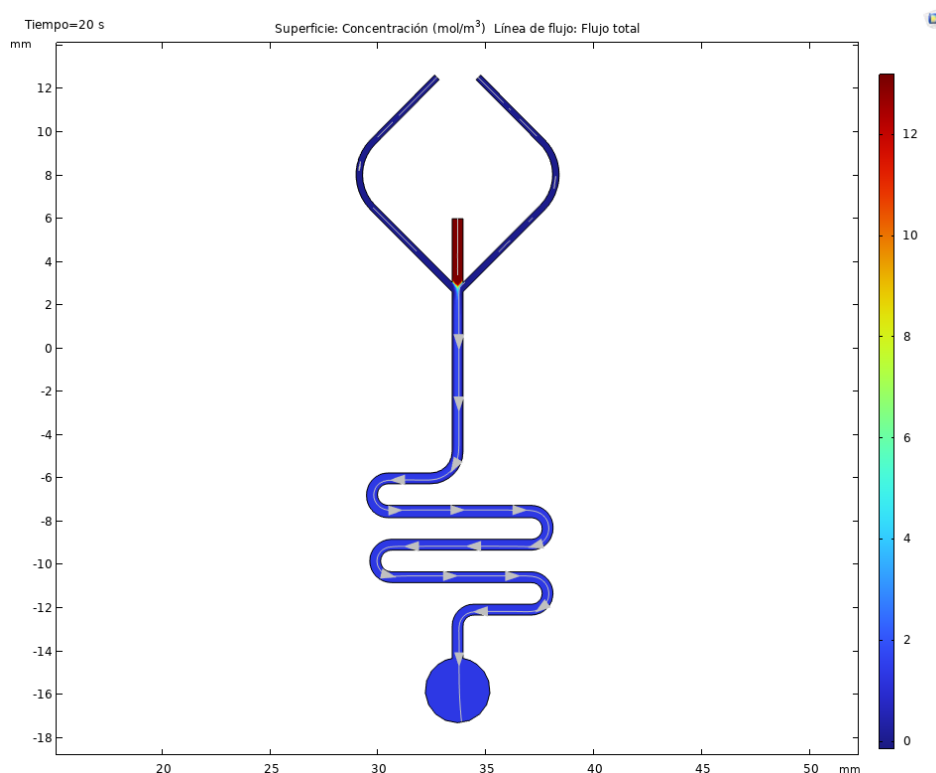


Figura 13. Modelo de sistema microfluidicos y disminución de concentración del Solvente del fosfolípido.

Aunque en la realidad lo observable difiere al modelado se acerca bastante, pues hay una interfase entre el solvente y la solución salina que desaparece en el proceso.

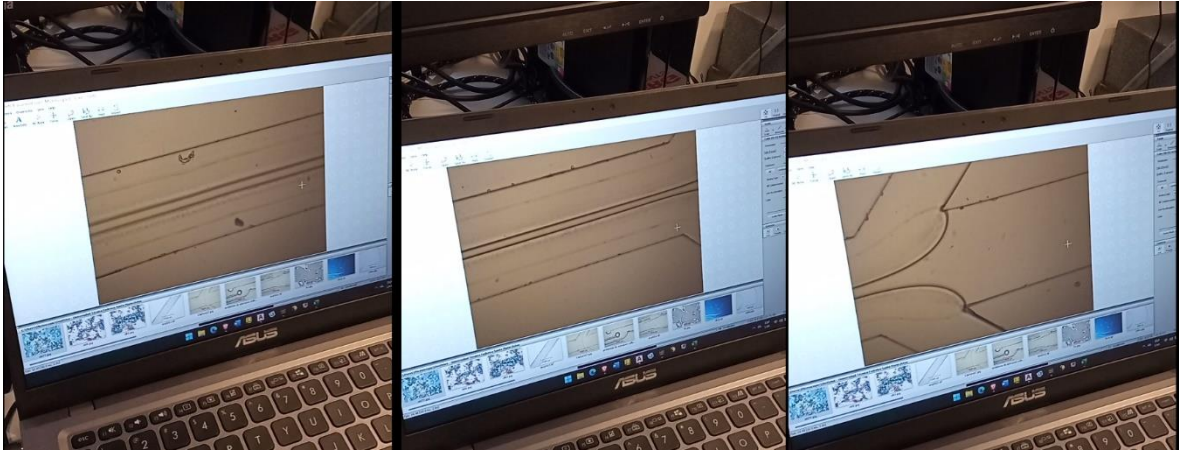


Figura 14. Evidencia experimental de la interfase generada.

Para describir el fenómeno de manera numérica es necesario plantear ecuaciones que permitan describir el flujo dentro de los sistemas microfluidicos tanto a lo largo del sistema como en el tiempo.

La ecuación que permite englobar toda la fenomenología es la ecuación de Navier Stokes.

$$\rho \left(\frac{du}{dt} + \mathbf{u} \cdot \nabla \mathbf{u} \right) = -\nabla p + \rho \vec{g} + \mu \nabla^2 \vec{u}$$

Esta expresión contempla los cambios de momento de cualquier fluido dado las condiciones vectoriales de los campos de velocidades y aceleración que afecten al sistema. Esta expresión puede aplicarse a sistema coordenados cartesianos, cilíndricos y esféricos.

Del mismo modo la ecuación de continuidad también debe de cumplirse.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \mathbf{u}) = 0$$

Las condiciones de borde del sistema en conjunto de las ecuaciones (1) y (2) permiten describir a cualquier sistema en sus cambios de momento dado una cantidad de masa sometida a campos de velocidades. Estas ecuaciones son solucionadas por la aplicación Comsol.

En la microfluidica la inercia deja de ser relevante en si misma ya que efectos de interacción intermolecular como la capilaridad, mojabilidad y efectos de interfases como la tensión superficial toman relevancia.

El proceso de generación de liposoma, si bien tiene relación con los efectos de capilaridad y mojabilidad, tiene un funcionamiento distinto. Ya que los lípidos se suelen diluir en alcoholes para mejorar sus propiedades reológicas, para transportarse por conductos micrométricos. La formación de liposomas ocurre cuando la dilución del lípido disminuye debido a efectos

difusivos del alcohol y el buffer acuoso. Este fenómeno causa que los lípidos pierdan su solvente y queden expuestos en un ambiente poco soluble. La baja solubilidad en agua a causa de las colas hidrofóbicas de los lípidos causa que se unan entre si las bicapas de lípido, formando los liposomas. (Jahn et al, 2004). En la figura 15 se puede apreciar esquemáticamente el proceso de unión de los fosfolípidos en bicapas para luego formar liposomas al perder en afinidad con el alcohol.

La generación de liposomas como indica Jahn et al. (2013), obedece a efectos viscosos locales, generando cúmulos de liposomas, esto implica que mejorando el efecto de mezclamiento de la fase dispersa en la fase continua promueve la generación de liposomas. Por esto último se propone la simulación del proceso para encontrar FRR que permitan agilizar el proceso de mezclamiento del solvente del lípido en la fase continua para promover la generación de liposomas, ya que una vez queda expuesto el liposoma en la fase continua sucede el proceso de autoensamble entre estos, formando así la gota. (Shum et al 2008).

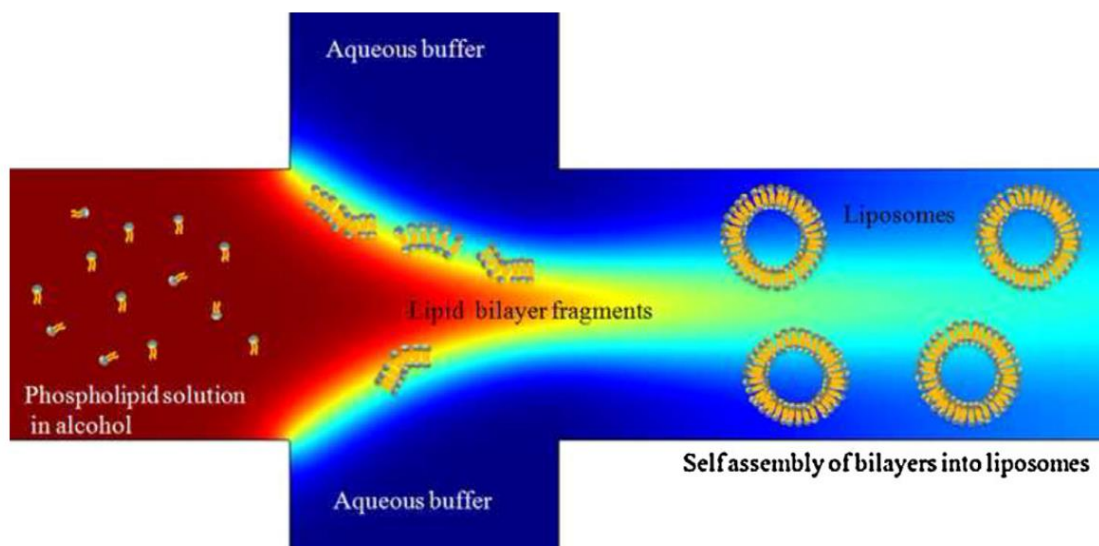


Figura 15. Intersección en Cruz de flujo cruzado para formación de liposomas.

Liposomas en la Industria.

La producción de liposomas es altamente demandada por diferentes industrias. En la industria farmacéutica, los liposomas se utilizan como vehículos de entrega de fármacos debido a su capacidad para encapsular moléculas hidrófilas y lipófilas junto a su efectividad para penetrar

las membranas celulares del cuerpo. Los liposomas también pueden mejorar la biodisponibilidad de algunos fármacos, prolongar su acción y reducir los efectos secundarios. En la industria cosmética, los liposomas se utilizan como ingredientes activos en cremas y lociones para la piel. Los liposomas pueden encapsular ingredientes activos, como vitaminas y antioxidantes, para mejorar su estabilidad y efectividad. También pueden utilizarse para mejorar la penetración de los ingredientes activos en la piel.

En la industria alimentaria, los liposomas se utilizan como encapsulantes para proteger los ingredientes activos sensibles al pH o al oxígeno. Los liposomas también pueden utilizarse para mejorar la absorción de nutrientes y mejorar la estabilidad de los alimentos.

En resumen, los liposomas tienen un gran potencial en la industria debido a sus propiedades únicas como vehículos de entrega de fármacos, ingredientes activos en cosméticos y encapsulantes en la industria alimentaria.

Algunas de las productoras más conocidas de liposomas para diferentes industrias son:

1. Lipoid GmbH: Es una empresa alemana que produce liposomas para la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Ofrecen una amplia gama de productos lipídicos y servicios personalizados de formulación y desarrollo de liposomas.
2. Novartis International AG: Es una empresa suiza que se dedica a la producción de medicamentos y productos para la salud. Utilizan liposomas para la entrega de fármacos y tienen varios productos basados en liposomas en el mercado.
3. Encapsula NanoSciences: Es una empresa estadounidense que se especializa en la producción de liposomas y otros sistemas de entrega de fármacos. Ofrecen productos personalizados para la industria farmacéutica y cosmética, así como servicios de formulación y desarrollo de liposomas.
4. Merck & Co., Inc.: Es una empresa estadounidense que produce medicamentos y productos químicos. Ofrecen productos basados en liposomas, incluyendo sistemas de entrega de fármacos y encapsulantes para la industria alimentaria.

Respecto de la producción anual de liposomas no existen datos estadísticos precisos, pero la tendencia acerca de la producción va en aumento. La pandemia del Covid-19 fue un punto de inflexión para la producción de vacunas la cual vio impulsada su producción y desarrollo hacia la industria médica.

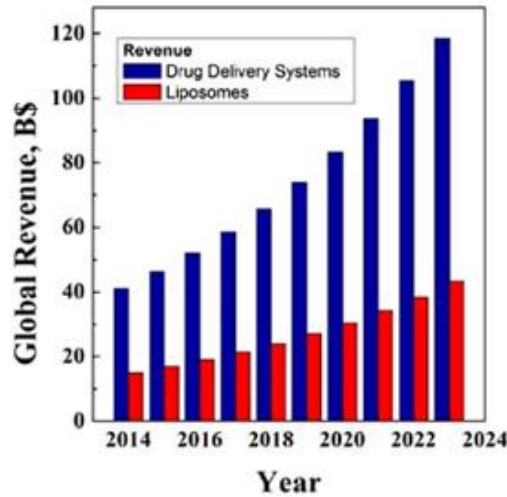


Figura 16. Grafica de incremento de la demanda de sistemas convencionales de suministro de drogas y transporte de droga mediante liposomas. (Trucillo et al 2020)

Simulación Comsol.

COMSOL MULTYPHYSICS® es un simulador que utiliza iteración numérica para resolver diferentes sistemas diferenciales y vectoriales. Las ecuaciones mostradas que describen el sistema de fluidos a utilizar para la generación de Liposomas. Las ecuaciones presentes son a) Ecuación de Navier-Stoke para fluidos incompresible, b) Ecuación de continuidad y c) Ecuación de difusión mediante convección.

$$\nabla[-PI + \mu(\nabla u + (\nabla u)^T)] + F = 0$$

$$\rho \nabla \cdot (u) = 0$$

$$\frac{dc}{dt} + \nabla \cdot (-D \nabla C) + u \cdot \nabla c = R$$

El objetivo de la simulación es analizar la difusión recíproca entre las fases líquidas a lo largo del conducto y comparar la realidad experimental con la simulación. La información

obtenida será utilizada en el control experimental. La importancia de usar este simulador es para optimizar el tiempo se necesitará para obtener muestras, planificar así la cantidad de experimentos necesarios y orientar lo que debe suceder en la realidad experimental y ser una herramienta para apoyar los resultados obtenidos de esta experiencia.

Materiales y métodos

El interés de estudiar la producción de liposomas es radica en sus aplicaciones biológicas y bioquímicas. En los interiores del liposoma, específicamente en su núcleo se pueden introducir, fármacos, genes e incluso material celular hasta células. (Almeida et al 2020, Sercombe et al, 2015). En general según la aplicación que se necesite el tamaño ideal del liposoma puede variar, en un estudio impartido por Mirahmadi et al (2010), se utilizan cuatro tamaños diferentes de liposomas 100, 400, 1000 y 3000 nm para observar la capacidad de retención en la zona peritoneal, en el cual se observó una mayor estabilidad para aquellos lipomas de 1000 nm. En una revisión de Patil et al (2014) se mencionan diferentes estudios que analizan el tamaño óptimo para el transporte de drogas y este encuentra en el rango de 50-200 nm para los cuales generalmente es necesario aplicar técnicas de ultrasonido y congelación para lograr esos tamaños. Debido a la necesidad de producir tamaños de liposomas pequeños, que no presente dificultades con los elementos a encapsular y que además se mantenga la homogeneidad en la distribución de tamaños la microfluidica tiene la ventaja de controlar estas variables.

Los tamaños de los liposomas están sometidos a múltiples variables dentro de estas se encuentran las siguientes:

1. Propiedades de los fosfolípidos.
2. Concentración de los fosfolípidos.
3. Emulsionantes.
4. Geometría del sistema
5. Parámetros de operación. (Flujo total y razones de flujo)

Existen estudios acerca de la generación de liposomas mediante sistemas microfluidicos (Aranguren et al, (2020), Patil et al. (2014), Jahn et al. (2010), Jahn et al. (2013), Michelin et al (2017)), pero de estos solo uno se enfoca en los parámetros operacionales y sus efectos en el tamaño de liposomas generados. En la revisión de Carugo et al (2016), se señala que

gran parte de los estudios de liposomas se generan en chip de flujo focalizado en ángulos de $45^\circ/90^\circ/180^\circ$ estos son Y/T/Co Flow respectivamente. El estudio incluyó cuatro chip de diferentes geometrías que se pueden observar en la Figura 17 y 18 con sus cotas.

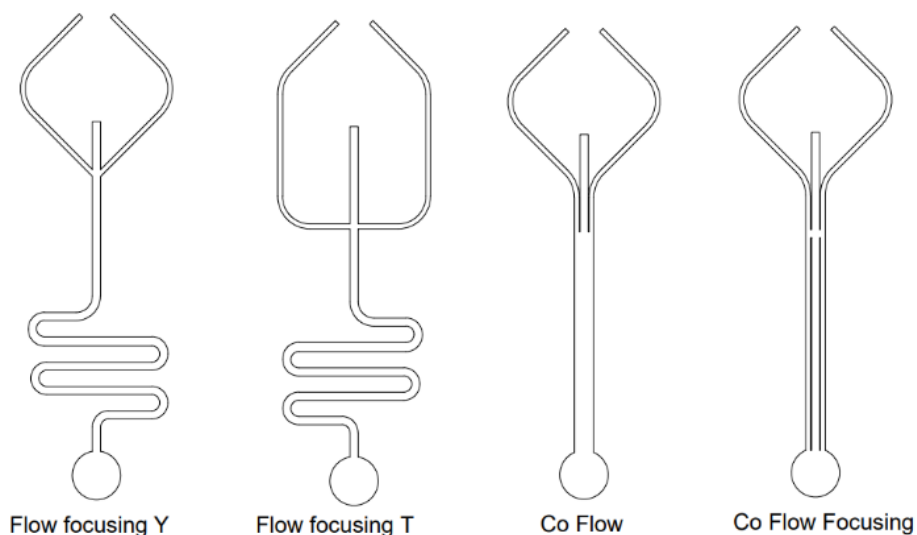


Figura 17. Modelos de chip a utilizar en el trabajo experimental.

Las dimensiones de los chips para ser considerados microfluidicos no está claro para varios autores, algunos dicen que deben estar bajo los 2000 micrones, otros que van relacionado con los flujos suministrados. (Ren et al, 2021). Dentro de las revisiones de Xi et al, 2020, Chen 2017 et al y Carugo et al, las dimensiones varían desde 50 micrones hasta 2000 micrones. Por lo que la selección de un tamaño de chip no es fácil de determinar, dado estas razones se opta por dejar en 500 y 300 micrones los conductos para el alcohol y agua respectivamente con una altura de 1000 micrones con un largo total de 32 mm.

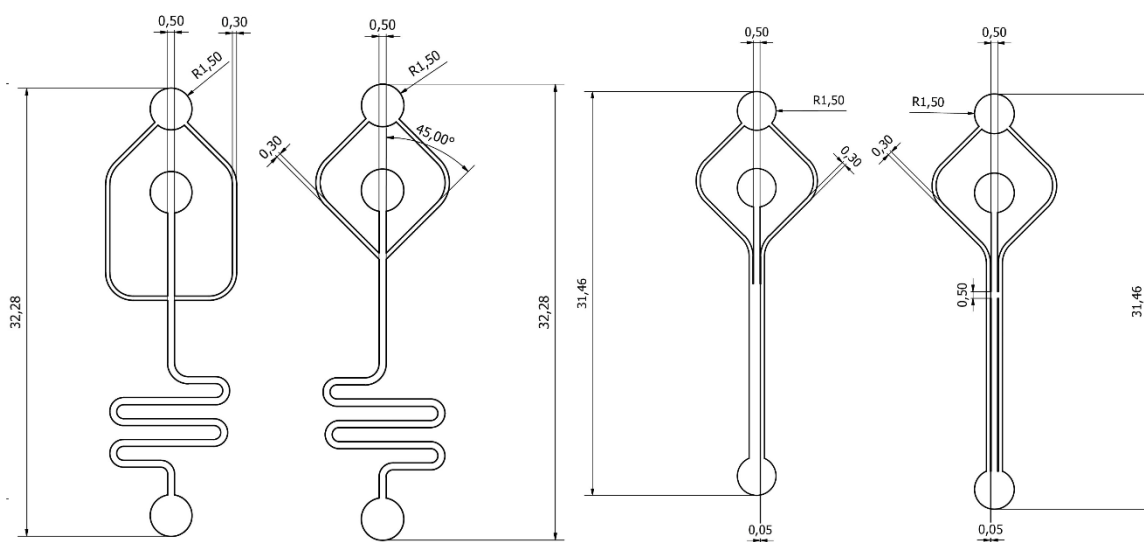


Figura 18. Cotas de cada chip en mm.

Las concentraciones de fosfolípidos se mantendrán fijas y se trabajará con dos fosfolípidos en conjunto POPE y POPG (ver fig. 16-17). Con una concentración de 2.7 mM con razones de 2:1 y 3:1 respectivamente.

POPE

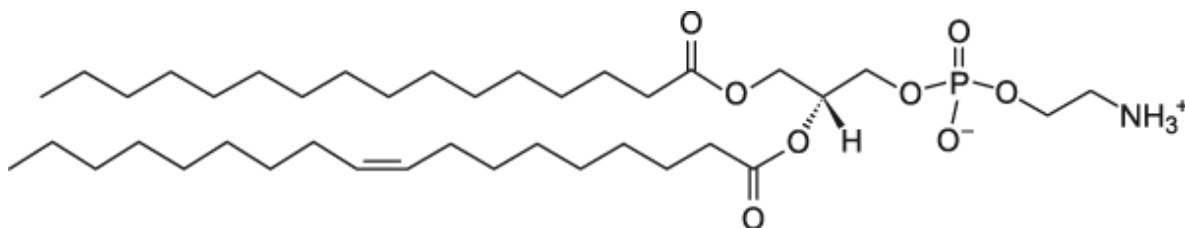


Figura 19. Molécula de POPE. 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (Avanti Lipids).

POPG

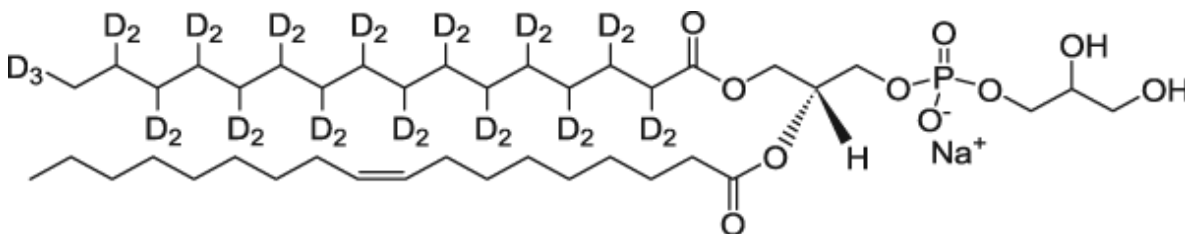


Figura 20. Molécula de POPG. 1-palmitoyl-d31-2-oleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)] (sodium salt) . (Avanti lipids).

El interés en usar estos fosfolípidos es debido a estos suelen conformar gran parte de las membranas de bacterias y su afinidad para interactuar con las membranas celulares. Suelen ser utilizados para verificar la efectividad de péptidos antibacterianos, en un estudio de Jang

et al (2008) se utilizan POPE/POPG como base de estructuras bilipídicas para analizar la permeabilidad iónica. Su unión por tanto es estable a la hora de conformar estructuras agregadas y la probabilidad de que se agrupen en estructuras bilipídicas como liposomas es alta, dado sus tamaños y capacidad de empaquetamiento. (Lu et al 2006). Esto permite que los liposomas conformados a partir de POPE/POPG sean altamente estables y considerados para transporte de medicamentos hacia zonas de interés con una mayor selectividad dado que son altamente resistente a ambientes alcalinos o ácidos logrando minimizar la descomposición y oxidación de las drogas suministradas en el cuerpo humano (Sang et al 2021). La utilización de liposomas es un gran campo de investigación en curso, en una revisión para el tratamiento de cáncer de mamas por Yang et al (2021) es posible notar una gran variedad de técnicas distintas cuya base es encapsular en liposomas fármacos hidrofóbicos/hidrofílicos, anticuerpos, péptidos, moléculas y aptámeros. Uno de estos es el POPE, es una de las razones por las que se genera liposomas a partir de este fosfolípido, ya que las membranas celulares pueden aceptar los liposomas formados por POPE. (Alberts et al, 2002). Las Concentraciones micelares críticas para cada molécula es: CMC(POPE) 0.029 mM y CMC(POPG) 0.13 mM entregados por el proveedor Avanti lipids.

Se modularán los parámetros operacionales, como la tasa de flujo total (TFR) y la relación de flujo (acuoso: solvente) (FRR), y los parámetros de diseño y los operacionales se reportaron como significativos en el control del tamaño de liposomas a generar, pero la variación conjunta y determinación de correlaciones de ambos tipos de variables se ha estudiado poco. La capacidad de predecir tamaños tiene relevancia al momento de generar la escalabilidad de la producción de liposomas. (Hood et al 2015, Michelon et al 2017). El TFR utilizado fue de 200 mL/min a razones de las fases alimentadas de 2.5:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 y 50:1

La experimentación constara de la utilización de una solución salina de 0.05 M de NaCl y otra con 0.27 mM de POPE y POPG en alcohol isopropílico replicando lo realizando en el estudio de Aranguren et al. (2020), con dos proporciones 2:1 y 3:1. Los flujos de las fases se suministrarán y manipularán mediante bombas de jeringa y se monitoreará la operación con microscopio. En el estudio de Aranguren et al, (2020) se utilizaron FFR de entre 2:1 hasta 5:1 obteniéndose diferencia significativas en los tamaños de liposomas generados, en el

estudio de jahn et al, 2004 utiliza razones de flujos de 10 a 60 con 8 casos analizados en un chip co flow, obteniendo resultados significativos en los tamaños de liposomas formados, se desea comprobar estos resultados y obtener un rango de información entre razones de 2.5:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 y 50:1, para todos los chip utilizados.

Para medir el tamaño de partículas obtenidos de los liposomas se utilizará el equipo Zetasizer utilizando el método Dynamic Light Scattering (DLS). Este equipo requiere cubetas de al menos 2 mL para realizar mediciones, por lo que cada corrida experimental debe recolectar al menos dicha cantidad. Para conocer el tiempo necesario de recolección de muestras se utilizó las simulaciones COMSOL MULTYPHYSICS® para encontrar un tiempo de **13 min** para todos los casos.

Materialles.

Reactivos.

Para la realización de la experiencia se utilizaron los siguientes componentes:

1. Agua Ultrafiltrada con contenido bajos de partículas suspendidas 5-10 ppb y conductividad eléctrica 0.055 $\mu\text{S}/\text{cm}$.



Figura 21. Panel del equipo de ultrafiltración indicando conductividad y temperatura del agua filtrada.

2. Isopropanol grado de análisis químico, ExpertQ ACS, ISO, Reag. Proveedor Scharlau.

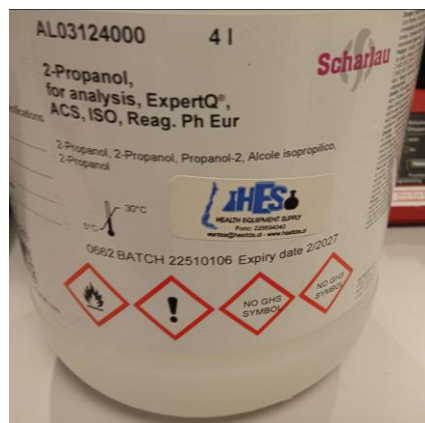


Figura 22. Recipiente de Isopropanol utilizado en la experimentación.

3. Cloruro de Sodio (NaCl) marca Merck, para preparar la solución de acuosa 0.05 M.

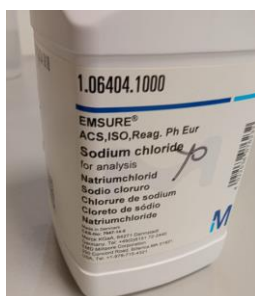


Figura 23. Recipiente NaCl marca Merck.

4. Un vial de 0.1 gramo de fosfolípido POPE y POPG obtenidos de *Avanti lipids*.



Figura 24. Viales de fosfolípidos utilizados.

Equipos e implementos.

Para el masado de fosfolípidos y NaCl se utilizó una balanza analítica Sartorius Entris calibrada con mueble fijado.



Figura 25. Balanza analítica Sartorius.

Para la operación del sistema de microfluidica se dispuso de dos bombas de jeringas marca New era instrument modelo SyringeTWO NE-1000 para la inyección de los flujos al chip.



Figura 26. Bomba de jeringa apagada.

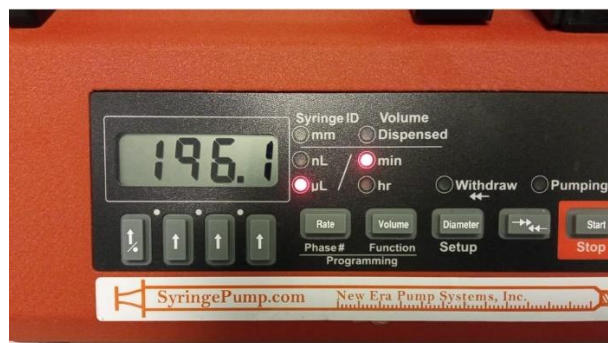


Figura 27. Bomba de jeringa configurada para suministrar 196.1 ul/min.

Se utilizo el microscopio NIKON ECLIPSE LV 100 ND con cámara para verificar la operación del chip, utilizando como guía lo simulado en comsol para visualizar el fenómeno esperado.

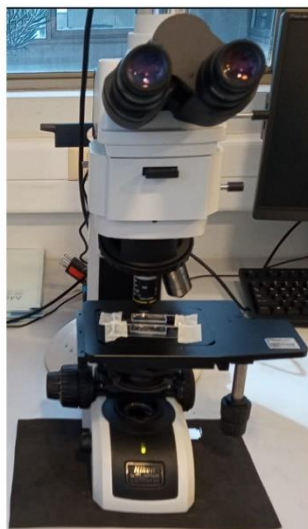


Figura 28. Microscopio Nikon utilizado para visualizar la operación del chip.

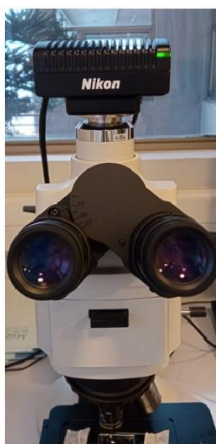


Figura 29. Visor y cámara electrónica Nikon.

El agua ultrafiltrada fue obtenida del equipo ELGA PURELAB Classic UVF.



Figura 30. Equipo de purificación de agua ELGA PURELAB Classic UVF.

Se dispuso todo este equipamiento en la sala limpia disponible del cctval, la cual cuenta con un sistema de extracción de aire y aire con baja cantidad de material particulado muy importante a la hora de trabajar con componentes tan pequeños como los equipos de fotolitografía y operación del chip de microfluidica.

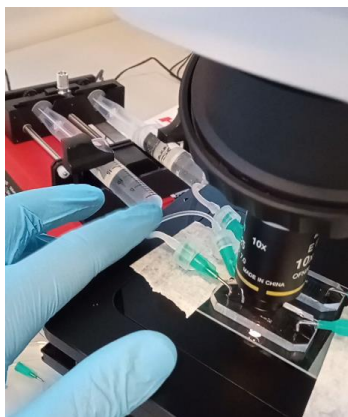


Figura 31. Set up de chip en operación.

Fabricación Chips Microfluidica.

La Fabricación de los chips de microfluidica estuvo a cargo de Diego Benavente. La producción de estos chips queda resumida en la siguiente infografía. Los pasos principales con la preparación del molde de los conductos en una placa de silicio mediante el endurecimiento utilizando un equipo de fotolitografía. Realizado el molde en relieve de la placa, se mezclan los reactivos necesarios para fabricar el PMDS, estructura solida del chip. Finalmente, el PMDS se adhiere a una placa de vidrio mediante la aplicación de plasma.

PREPARACIÓN DE OBLEA

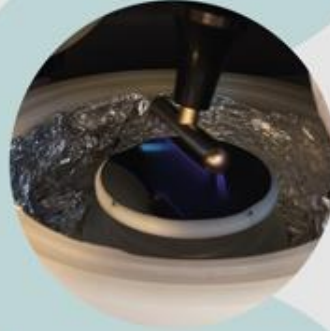
LIMPIEZA

Eliminación de contaminantes de la oblea mediante tratamiento térmico y con solventes.



TRATAMIENTO PLASMA

Promueve la adhesión entre la oblea de silicio y el fotorresistente.



SPING-COATING

Permite crear una capa homogénea de fotorresistente en la oblea de silicio, este paso determina el espesor del molde.



SOFT- BAKING

Evapora solventes del fotorresistente, mejora la adhesión y permite el uso de máscaras UV.



Figura 32. Infografía producción de chip para microfluidica 1, por D. Benavente.

FOTOLITOGRAFÍA

EXPOSICIÓN

Curado mediante un láser UV en la oblea con fotorresistente generando el patrón diseñado.



POST EXPOSURE BAKE

Evapora solventes, mejora la adhesión del patrón curado y reduce tensiones estructurales al promover una relajación mecánica.



DESARROLLO

Elimina todo el fotorresistente no curado en la etapa de exposición.



HARD BAKE

Elimina la formación de grietas en el fotorresistente.



Figura 33. Infografía producción de chip para microfluidica 2, por D. Benavente

VERIFICACIÓN Y CREACIÓN DE CHIP

CONTROL



MOLDEADO
EN PDMS



CREACIÓN
DEL CHIP



PUESTA
EN MARCHA Y
ANÁLISIS DE
RESULTADOS



Figura 34. Infografía producción de chip para microfluidica 3, por D. Benavente

En las figuras 34, 35 y 36 se aprecia el equipo de fotolitografía usado para generar los moldes de los chips sobre placas de silicio y los chips ya finalizados que se utilizarán en las experiencias.

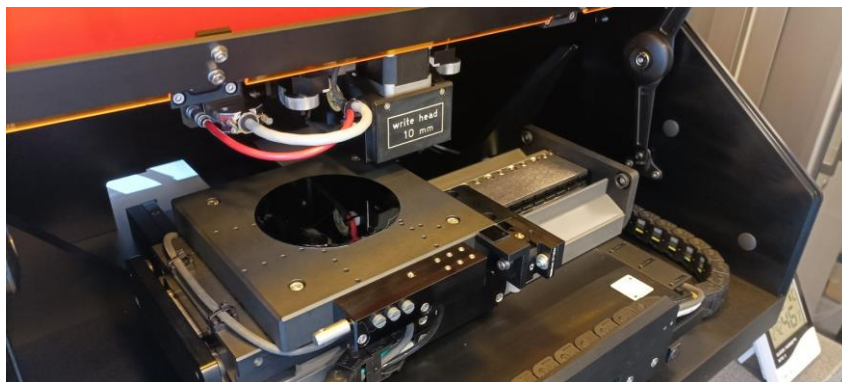


Figura 35. Equipo de fotolitografía utilizado para la fabricación de los moldes.

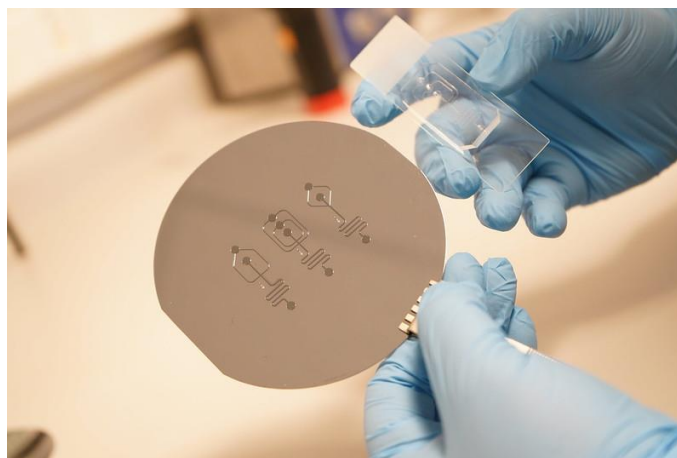


Figura 36. Placa de silicio con moldes de chip.

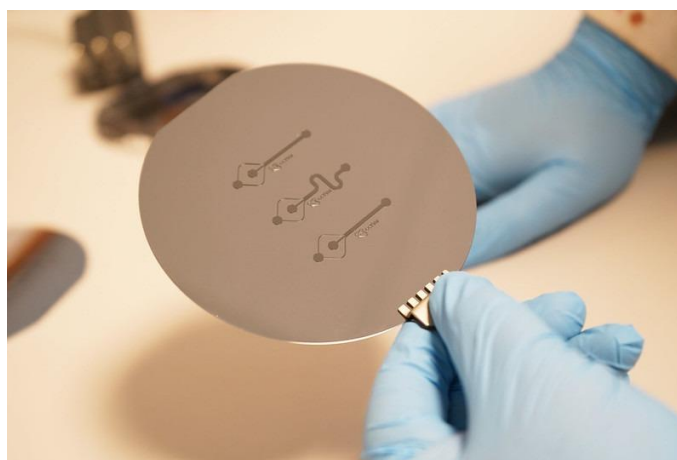


Figura 37. Placa de silicio con molde de los chips utilizados.

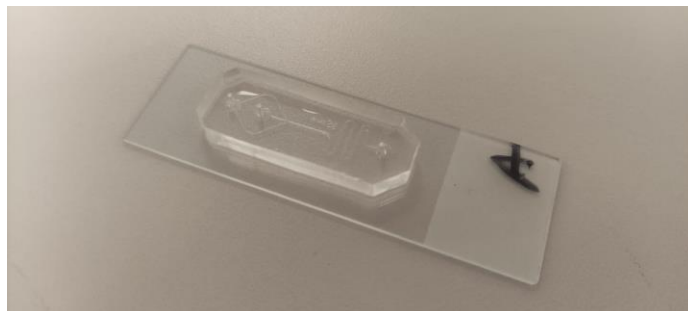


Figura 38. Chip co flow.

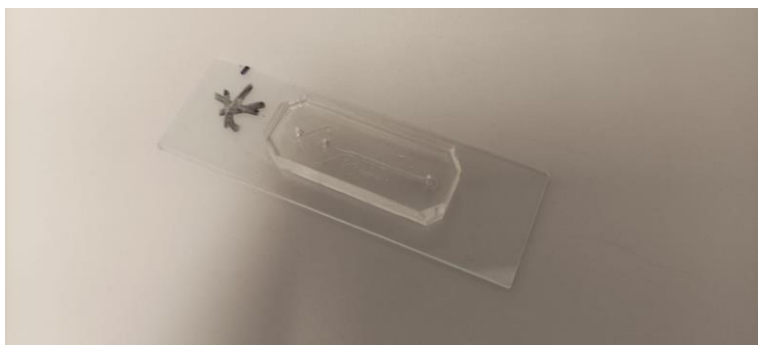


Figura 39. Chip Co Flow Focusing



Figura 40. Chip Flow Focusing T.



Figura 41. Chip Flow Focusing Y.

Experimentación.

Preparación soluciones:

Se prepararon soluciones de 0.05 M de NaCl en agua MILI Q, esta solución será la fase continua. Además, se generaron soluciones de 0.27 mM de POPE y POPG en alcohol isopropílico, con dos proporciones 2:1 y 3:1, (Lu et al, 2006, Sang et al, 2021) POPE: POPG respectivamente, las cuales son la fase dispersa. Las soluciones fueron refrigeradas a 5 °C, pero para ser utilizadas deben ser calefaccionadas a 30 °C para disolver cualquier partícula que haya cristalizado. Las soluciones son extraídas en jeringas de 20 mL para ser operadas en las bombas de jeringa.

Preparación de los chips:

Se prepararon 4 configuraciones de chip de microfluidica utilizadas comúnmente según lo revisado por la revisión de Carugo et al, 2016:

- 1) Intersección Flow Focusing T.
- 2) Intersección Flow Focusing Y.
- 3) Intersección Co-Flow.
- 4) Intersección Co-Flow focusing.

Operación de los chips:

Se utilizaron 4 configuraciones geométricas (Flow focusing Y, Flow focusing T, Co Flow, co-Flow focusing) a un flujo total (TFR) de 200 µl/min con razón de flujo entre agua y alcohol isopropílico de 2.5:1, 5:1, 10:1, 20:1, 30:1 y 50:1. Resumida en la siguiente tabla N°3.

Tabla 3. Resumen diseño experimental.

	TFR ul/min	FRR	Q _{AGUA} ul/min	Q _{ISOPROPANOL} ul/min
		50.0	196.1	3.9
Chip Flow Focusing Y		30	193.5	6.5
Chip Flow Focusing T	200.000	20	190.5	9.5
Chip Co Flow Focusing		10	181.8	18.2
Chip Co Flow		5	166.7	33.3
		2.5	142.9	57.1

Para observar la operación del sistema se utilizar el microscopio NIKON ECLIPSE LV 100 ND para el control de operación, ya que es necesario visualizar el contacto de las interfases al fluir dentro del chip para replicar las condiciones que COMSOL dio como resultado, producto del flujo de las distintas proporciones de fluidos, difusividad de las fases y tensión superficial. (Jahn et al, 2013).

Resultados y discusión

Análisis general.

Se observó que los tamaños de liposomas disminuyen a razones de flujo mayor entre las fases alimentadas, a un flujo total constante. La proporción entre los fosfolípidos POPE y POPG afecta el tamaño final de los liposomas siendo la proporción 3:1 de POPE: POPG la cual generó tamaño de liposomas menores, esto se debe a interacciones intermoleculares entre estos fosfolípidos, ya que el fosfolípido POPG tiene mayor afinidad a interactuar con moléculas de POPE y además el grupo polar de este fosfolípido es de mayor volumen generando interacciones estéricas. Los grupos hidroxilos de las moléculas impiden que los fosfolípidos se compacten al generar la bicapa requiriendo menos moléculas para lograr el cierre de los liposomas, por este mismo efecto se forman tamaños menores.

Los tamaños de liposomas generados mediante la microfluidica están sujeta a diversas variables asociadas al sistema en uso. Estas variables son Flujo, razones entre las fases, concentración de fosfolípidos, fosfolípidos utilizados, temperatura, tipo de fluidos y fosfolípidos utilizados. Lograr encontrar una correlación entre el tamaño de liposoma y alguna de estas variables es crucial para analizar el funcionamiento de este método. Se obtuvo una causalidad entre el tamaño de los fosfolípidos y el ancho del flujo central, donde están disueltos estos. Si bien no se puede obtener una función que indique explícitamente el tamaño de los liposomas y las variables mencionadas que afectan este tamaño la expresión asociada al ancho del flujo central puede ser el primer acercamiento. Mediante balances de materia se logra encontrar una expresión para el ancho central el cual depende de tres variables principales siendo estos el ancho del conducto principal, la razón de flujo entre los fluidos alimentados (FRR) y un factor de corrección asociado a las densidades y velocidades medias de cada fluido en esta zona del chip. Este último factor depende de la geometría del chip ya que las velocidades medias pueden ser sutilmente distintos productos de estas variaciones geométricas. Se obtuvieron parámetros de corrección asociados a cada geometría utilizada y se seleccionó la mejor para realizar los cálculos del escalado inicial. La mejor condición fue obtenida para el chip Co flow cuyo factor de corrección fue de 0.441 con tamaños de liposomas promedio de 157 nm.

Se planteó la producción de 1 m^3 de esta solución de la cual 0.3 mL son necesarios por dosis dando un total de $3.33 \cdot 10^6$ dosis que pueden ser generadas a una tasa de 200 uL/min con 1200 chip en paralelo y con 100 bombas. Esta producción se realiza en 130 horas y se utilizan 166.6 kW/h durante toda esta operación. Este balance se simplifica porque se necesita conocer el factor de encapsulamiento de los elementos a encapsular, ya sean fármacos, mRNA o células y la efectividad de la dosis para conocer la cantidad necesaria de materiales, algo que no se estudió en esta ocasión. Además de otros sistemas más sofisticados para la administración de los flujos y nuevos ensambles de los conductos dejando abierta la continuidad de esta investigación.

Análisis de datos.

Los resultados medidos según diseño experimental anteriormente descrito se observan en las tablas 4 y 5. Como se puede observar se determinaron diferencias significativas para las condiciones Chip Y, 3:1 y FRR 50 con los tamaños de liposomas más pequeños de 160 nm. Las razones de POPE: POPG 3:1 producen tamaños de liposomas menores a las 2:1, debido a interacciones intermoleculares por el tamaño de los grupos fosfatos y puentes de hidrógenos generados entre las moléculas.

Tabla 4. Tamaños de liposomas en nm según condiciones experimentales.

	POPE: POPG	FRR 2.5	FRR 5	FRR 10	FRR20	FRR 30	FRR 50
Chip Flow Focusing Y	2:1	1217.4	601.125	439.856	352.9	218.8	253.7
	3:1	1246	335.9	242.3	299.967	288.7	159.6
Chip Flow Focusing T	2:1	1267.8	589.622	432.767	358.478	306.8	298.8
	3:1	1267.8	352.233	296	289.6	253.567	181.4
Chip Co Flow	2:1	-	423.667	380.733	345.833	324.9	251.833
	3:1	698.22	376.511	331.133	299.478	300.775	248.343
Chip Co Flow Focusing	2:1	1068	386.5	391.1	363.1	333.267	234.233
	3:1	1192.5	398.367	433.983	353.6	319.6	267.963

Se tiende a disminuir el tamaño de los liposomas al aumentar la razón de flujo entre el agua y el isopropanol. Esto se debe a que la formación de liposomas es dependiente del tamaño de

la constricción del flujo central, ya que el fenómeno de la formación de liposomas ocurre cuando se alcanza un punto crítico de baja solubilidad la cual ocurre en la interfase generada entre el agua y el Isopropanol. Este mismo resultado fue discutido por Jahn et al, 2007, en la figura 42 se observa que el fenómeno de formación de liposomas ocurre en la interfase de los flujos.

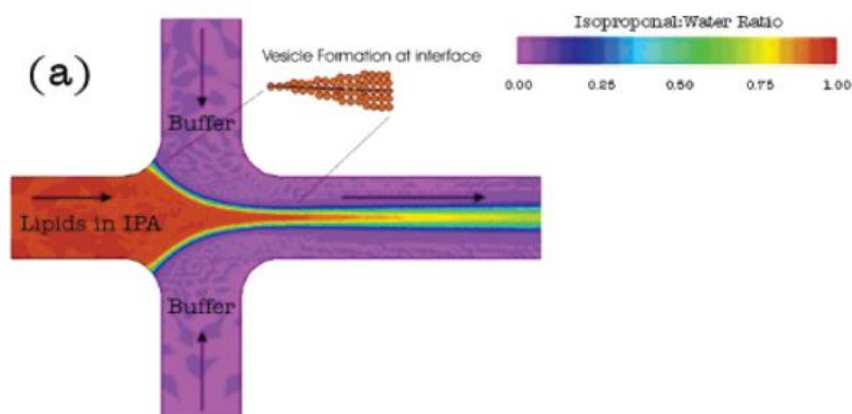


Figura 42. Modelación deformación de liposomas realizada por Jan et al,2004.

En la investigación de Jahn et al, 2007 se buscó demostrar cómo afectan las variables de los flujos al tamaño final de los liposomas y su distribución de tamaños. Determinaron que al fijar el flujo total (TFR) y variar la razón entre las fases (FRR) se obtiene el mismo resultado de esta experiencia, al disminuir la FRR se obtenían liposomas de mayor tamaño con una amplia dispersión en sus tamaños y al aumentar la FRR se obtenían liposomas de menor tamaños con dispersiones de tamaños más acotadas. Se visualizan en las Figuras 43 y 44 los tamaños para todas las condiciones experimentales realizadas.

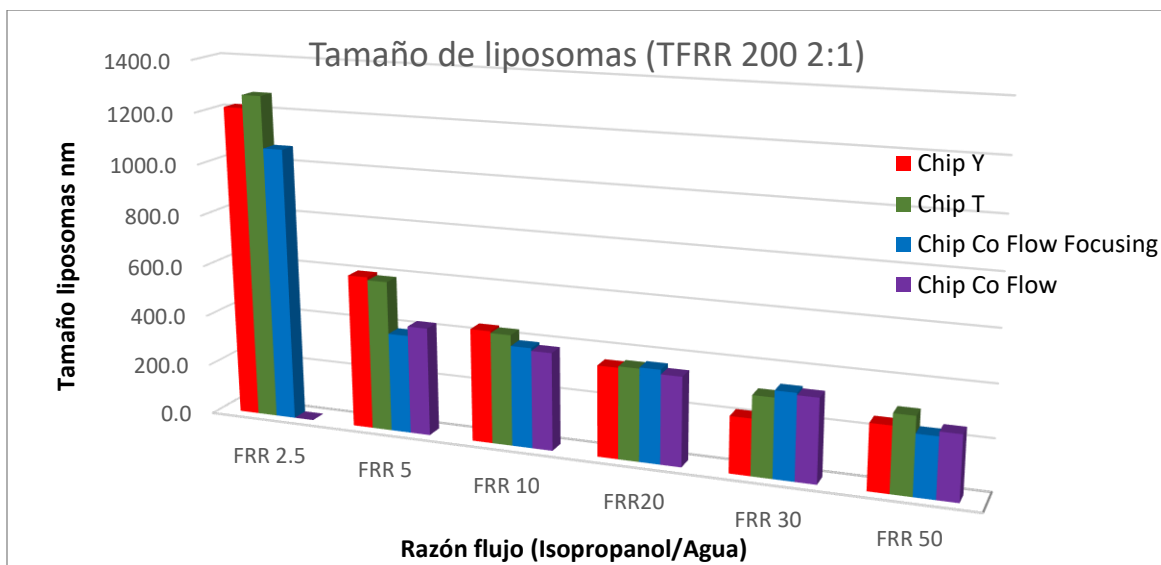


Figura 43 Tamaño de liposomas, POPE: POPG 2:1.

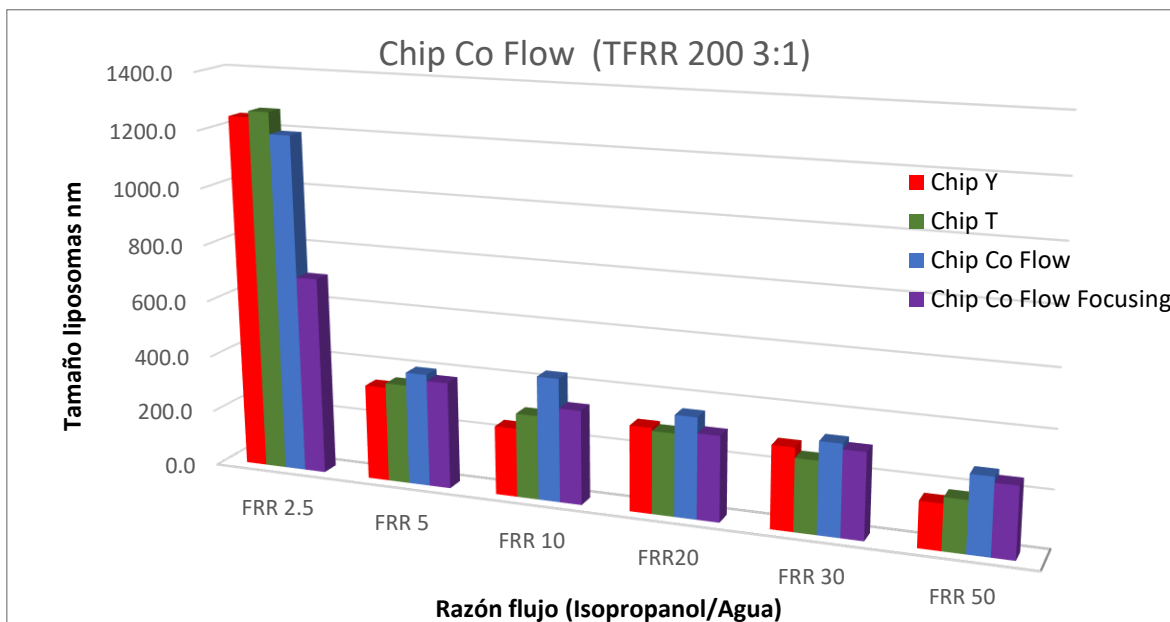


Figura 44. Tamaño de liposomas, POPE: POPG 3:1.

Esta distribución de tamaños se puede apreciar en las desviaciones estándar de las mediciones individuales entregadas por el equipo Zetasiser mediante el método DLS en la tabla 5 se encuentra esta información para el Chip T en algunas de las mediciones. Se observa una tendencia disminución de las desviaciones estándar al aumentar FRR, indicando que la dispersión de tamaño también disminuye.

Tabla 5. Desviaciones estándar mediciones DLS para Chip T.

Chip T	FRR 2.5	FRR 5	FRR 10	FRR20	FRR 30	FRR 50
	14.47	19.32	9.93	5.514	5.672	0.208
	15.62	10.57	11.02	8.982	3.86	2.82
	42.43	19.65	9.506	7.122	4.02	2.54

Los tamaños de los liposomas a razones de flujos menores aumentan y se encuentran con una mayor dispersión de tamaños. Esto se debe a que de manera local se generan puntos en los cuales la concentración crítica de isopropanol para el autoensamble de los liposomas es superada permitiendo su reapertura. Al generarse esta apertura permite la interacción con los fosfolípidos provenientes de la interfase u otros liposomas que hayan sufrido esta apertura, generando así aumento de los tamaños. La amplia dispersión de tamaños se asocia a la probabilidad de que los liposomas vuelvan a entrar a zonas en el cual la concentración local de Isopropanol supere la Concentración crítica generándose el incremento de tamaño en algunos liposomas cuyo incremento es variable.

La reapertura de estos liposomas puede amplificar su tamaño sustancialmente y otros que no. En la figura 45 se representa el fenómeno de reapertura y aumento de tamaño de liposomas.

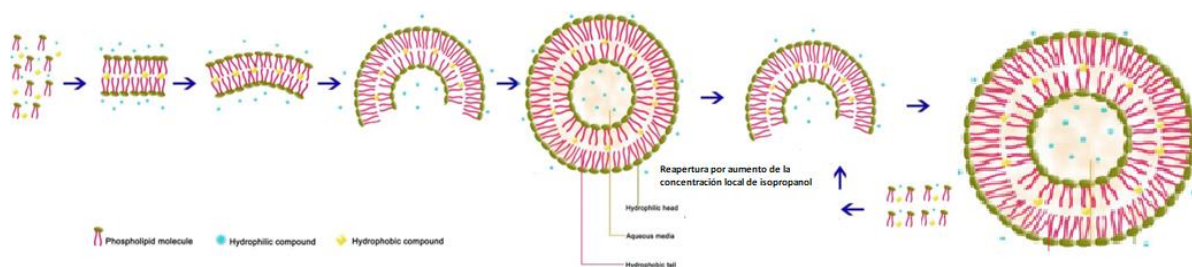


Figura 45. Formación y aumento de tamaño de liposomas.

Comparativamente los tamaños de liposomas generados con razones de POPE:POPG 3:1 fueron significativamente menores a los generados con la razón 2:1. Esto se debe a que las moléculas de POPE tienen mayor posibilidades de generar puente de hidrógenos y generar la unión intermolecular de estas consigo misma y con las moléculas de POPG, mientras que la molécula POPG es más afín a interactuar con las moléculas de POPE que entre sí todo esto fue discutido en el estudio realizado por Murzyn et al,2005.

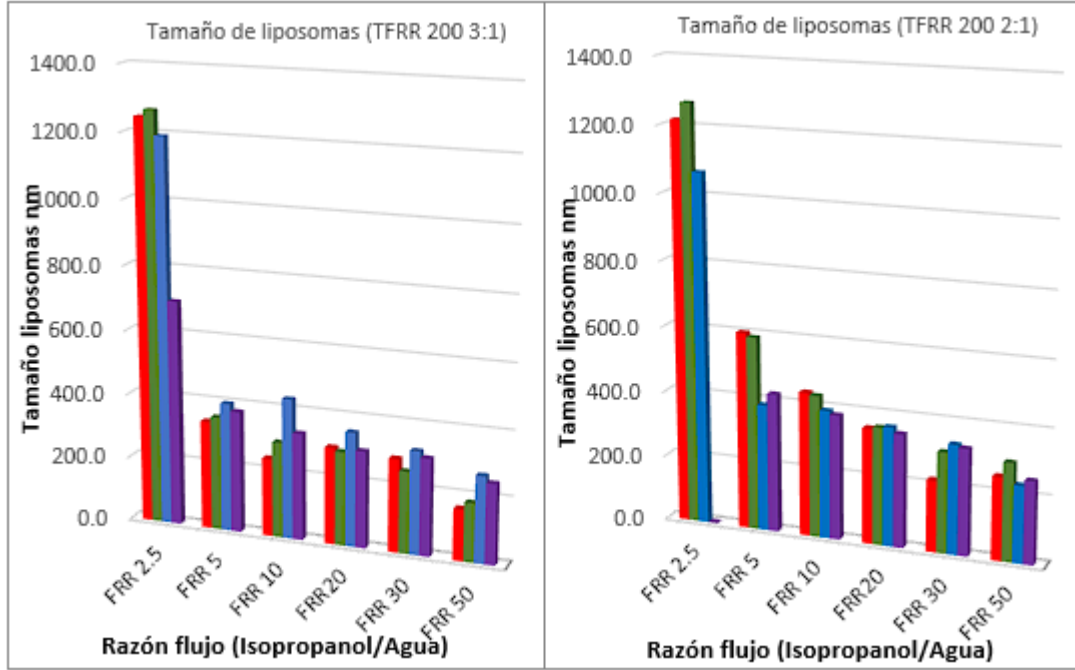


Figura 46. Comparación tamaños de liposomas 2:1 y 3:1.

Desde el punto de vista cinético en la formación de liposomas se pueden observar 3 casos de equilibrio fosfolípido liposomas con diferentes velocidades de formación:

$$POPE + POPG \rightleftharpoons \text{liposoma} ; r_{POPE+POPG} = \frac{dC_{POPE+POPG}}{dt}$$

$$POPE \rightleftharpoons \text{liposoma} ; r_{POPE} = \frac{dC_{POPE}}{dt}$$

$$POPG \rightleftharpoons \text{liposoma} ; r_{POPG} = \frac{dC_{POPG}}{dt}$$

Asumiendo que lo aseverado en el estudio de Murzyun es verdadero, el proceso de formación de liposomas es una competencia de reacciones con diferentes velocidades de reacciones asociadas a los casos presentados en los equilibrios fosfolípidos/liposomas. El proceso de formación de liposomas ocurre solo en la interfase Isopropanol/agua y en una distancia mínima hacia el seno del agua. Considerando bajo las variables en las cuales se están generando los liposomas se puede aseverar que las velocidades de reacción son diferentes y que los liposomas compuestos por POPE y POPG son los de mayor proporción.

$$r_{POPE+POPG} > r_{POPE} > r_{POPG}$$

En el caso en que se generó la solución con 3:1 de POPE: POPG, hay más cantidad de POPE aumentando la probabilidad de interactuar con el POPG reflejado con las velocidades de

reacción. La disminución de tamaño frente a la solución de 2:1 de POPG se puede explicar con los grupos funcionales asociados a los grupos fosfatos. Los grupos carbonilos asociados al fosfato de los POPG son de mayor tamaño. La sección polar entre los fosfolípidos presenta una diferencia de volumen significativa generando una unión de las moléculas de POPG y POPE menos compacta, esto significa que se necesitan menos moléculas para cerrar el liposoma y así generar tamaños más pequeños, por el impedimento estérico generado por los gliceroles del POPG.

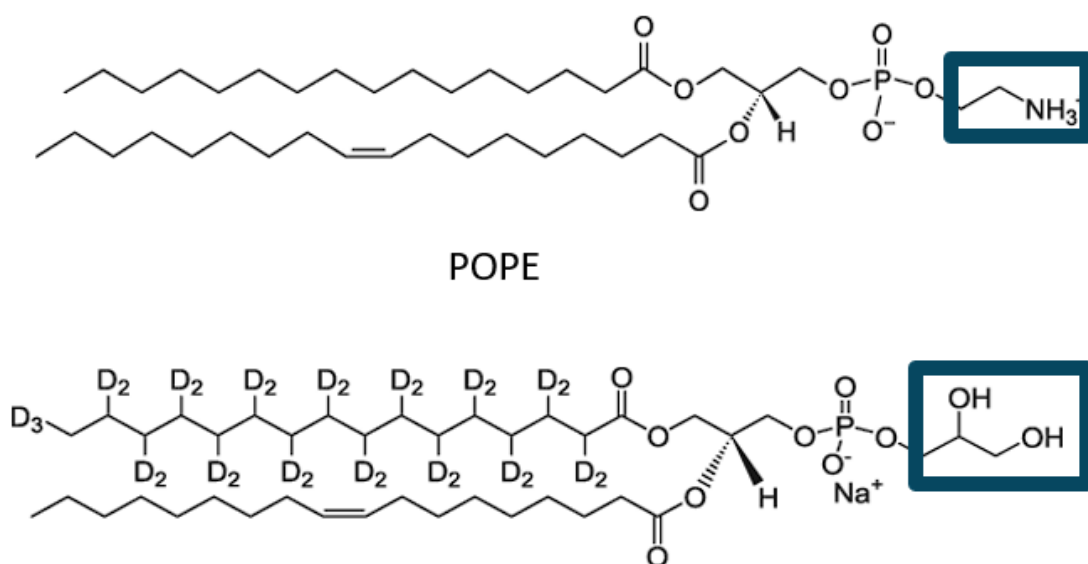


Figura 47. Diferencia de tamaños de grupos funcionales.

La amplia distribución de tamaños mencionada a razones de flujo menores se ve refleja en los resultados obtenidos de la experiencia del Chip Co Flow, con POPE: POPG 3:1, ver figura 47. De los 8 casos estudiados en 7 se observó que la desviación estándar de los tamaños medidos indica un rango de dispersión de tamaños amplios.

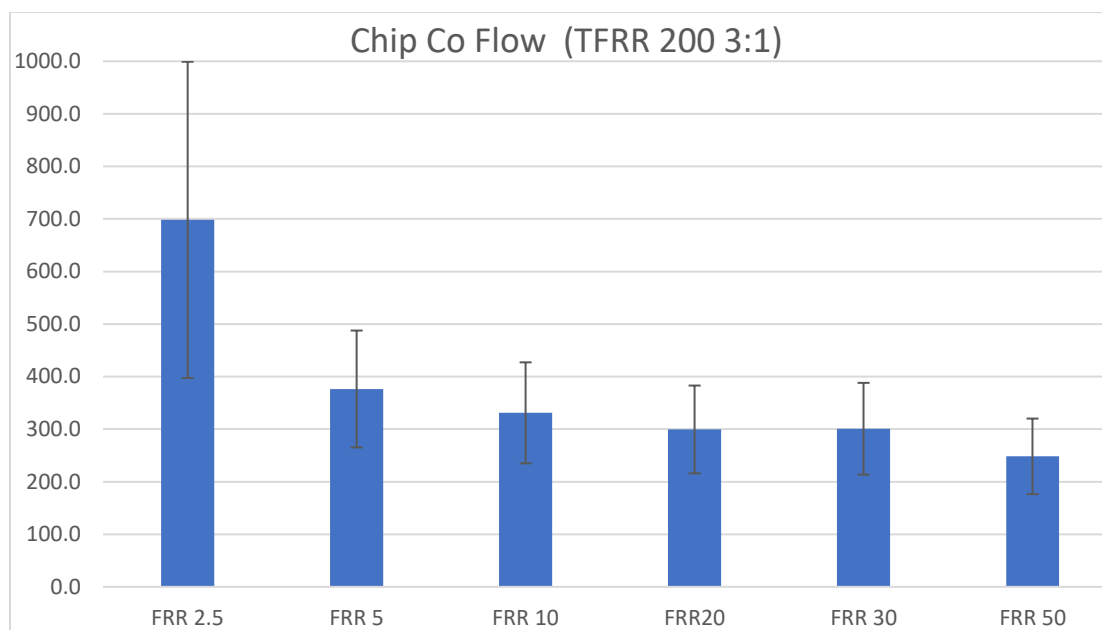


Figura 48. Resultados medición de tamaño de liposoma chip Co-Flow POPE: POPG 3:1.

Los resultados de la distribución de tamaños de liposomas no fueron descendentes para cada caso. Estos resultados se explican con una acumulación de materia de gotas de agua-alcohol en los canales del chip. Esta acumulación de materia ocurre en la interfase entre el flujo central y el exterior. Para ejemplificar se añade la figura 49 en la cuál se puede visualizar este fenómeno.

Esta acumulación de materia ocurre cuando se mantiene en operación durante largos periodos de tiempos. Otra forma en la que puede aparecer es cuando se generan cierres de aire en los conductos de alimentación del sistema. El flujo comprime el aire atrapado y mueve, la compresión de la gota llega a un límite en el que se expande de nuevo afectando al flujo. El alcohol isopropílico es sensible a esta situación debido a su presión de vapor (4.4 kPa 20°C), puede acumular vapores en volúmenes muertos dentro del sistema. En este caso, los volúmenes muertos se encuentran en los conectores y en las rugosidades del PMDS en el interior. No se puede señalar a la altura del sistema se encuentran estas partículas.

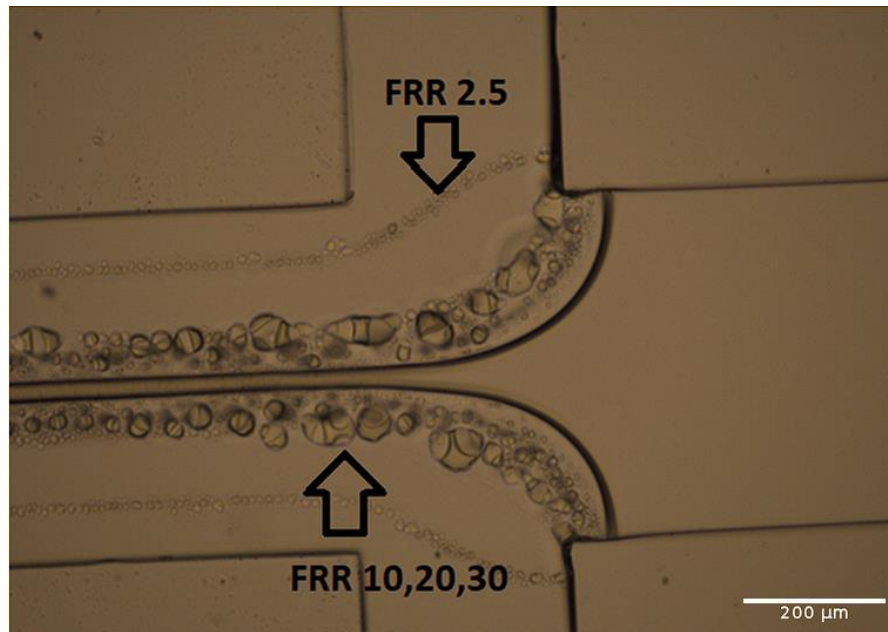


Figura 49. Ensuciamiento de chip.

La simulación de los sistemas microfluidicos se utiliza para comprender como las variables del sistema, Flujos, Concentraciones y Difusión de componentes del sistema pueden afectar al tamaño final de los liposomas. En el estudio de Aranguren et al, 2020 la finalidad de utilizar la simulación de COMSOL es poder comprender como la concentración de Isopropanol afecta al tamaño de liposomas encontrandose que los tamaños de los liposomas y FRR son inversamente proporcionales. Bajo este mismo punto se utiliza COMSOL para los los distintos chip y se obtuvieron los siguientes resultados para cada uno:

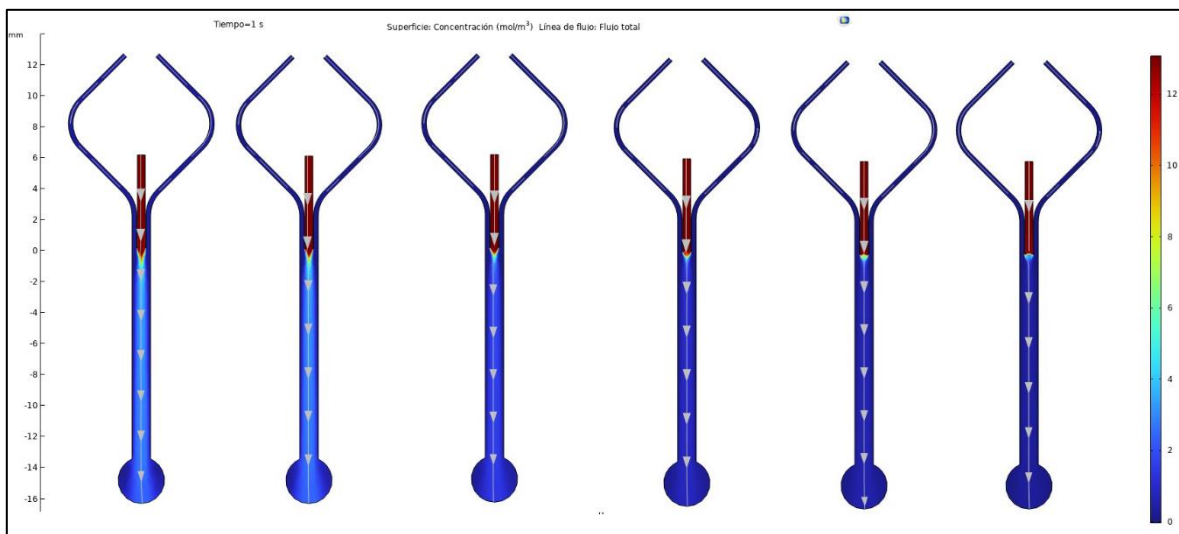


Figura 50. Simulación COMSOL Chip Co Flow operando con cada FRR. (2.5,5,10,20,30 y 50)

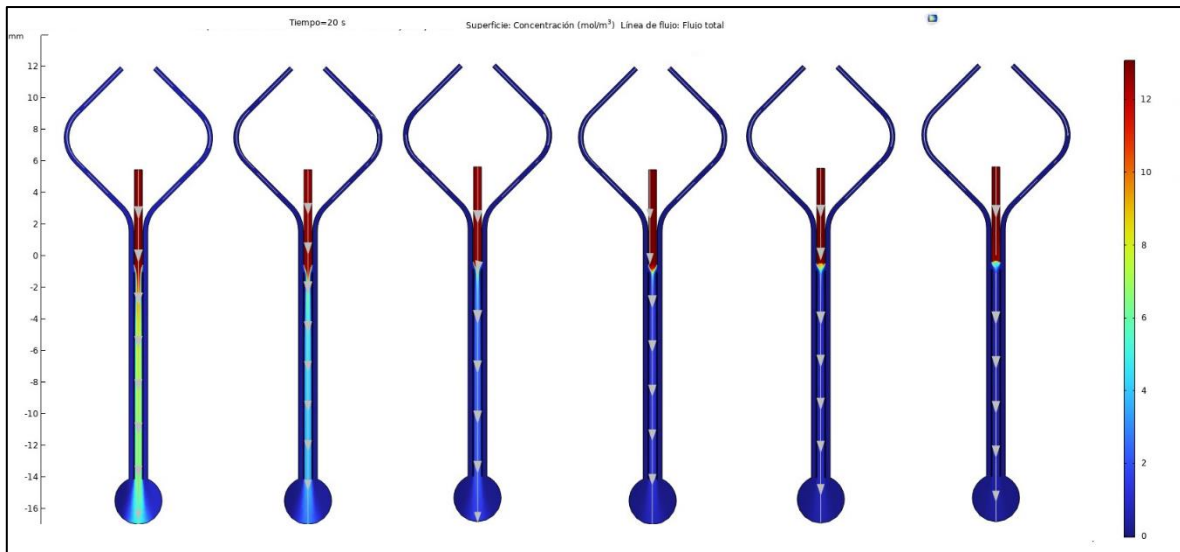


Figura 51. Simulación COMSOL Chip Co Flow Focusing operando con cada FRR. (2.5,5,10,20,30 y 50)

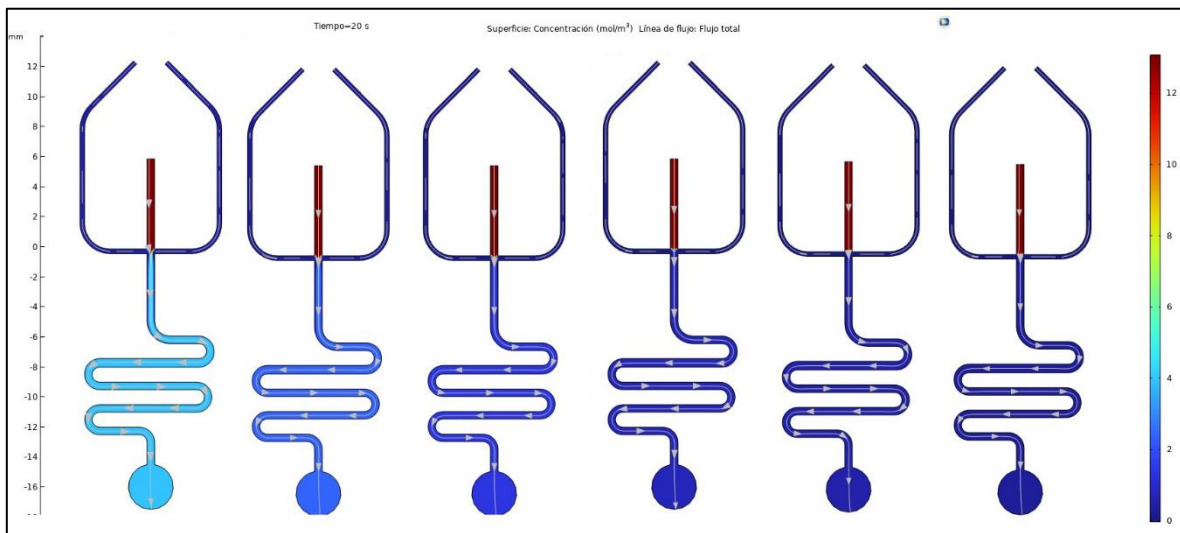


Figura 52. Simulación COMSOL Chip Flow Focusing T operando con cada FRR. (2.5,5,10,20,30 y 50)

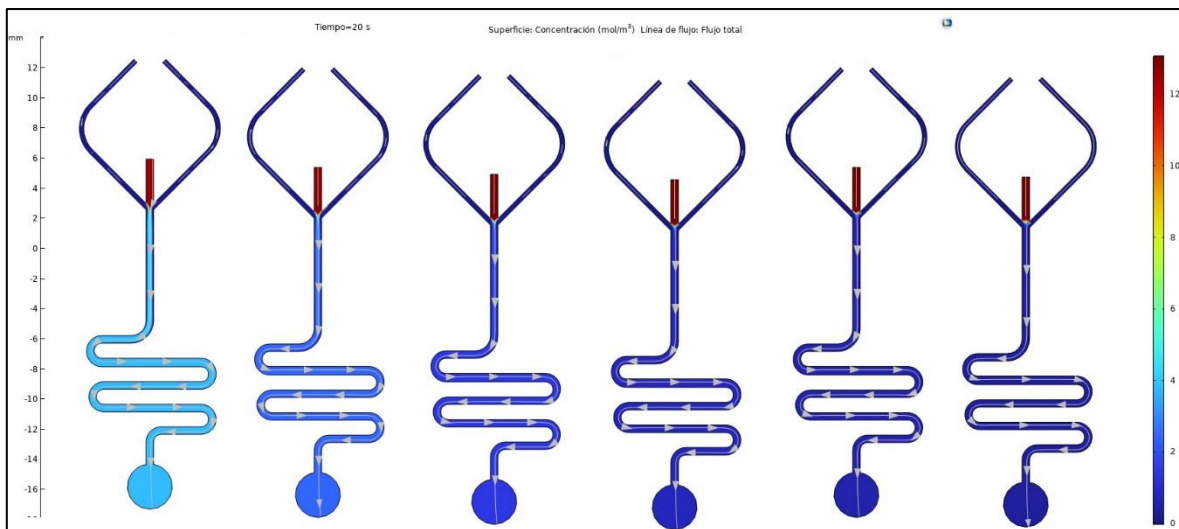


Figura 53. Simulación COMSOL Chip Flow Focusing Y operando con cada FRR. (2.5, 5, 10, 20, 30 y 50)

La coloración del sistema indica la concentración de Isopropanol (Rojo = máximo $13.7 \cdot 10^{-3}$ molar, Azul = 0 molar) respecto del Agua con NaCl. Se observan las razones de flujos de manera creciente de izquierda a derecha, 2.5, 5, 10, 20, 30 y 50 respectivamente. Las simulaciones permiten evidenciar que las concentraciones de Isopropanol, para FRR 20, 30, 50 se reducen significativamente, resultados que se contrastan con las mediciones de tamaños de los liposomas. Para FRR 2.5, 5 y 10 las mediciones de tamaños no se pudieron realizar correctamente debido a que la concentración de alcohol es demasiado alta aguas arriba afectando la concentración crítica de solubilidad de los fosfolípidos. El chip Co Flow focusing presenta un problema para FRR 2.5, en el que el ancho central es mayor o igual al ancho del conducto impidiendo el contacto con el agua a lo largo del conducto, no generándose la formación de liposomas.

Utilizando la cámara del microscopio se obtuvieron las siguientes imágenes una vez el proceso ya se encuentra en estado estacionario.

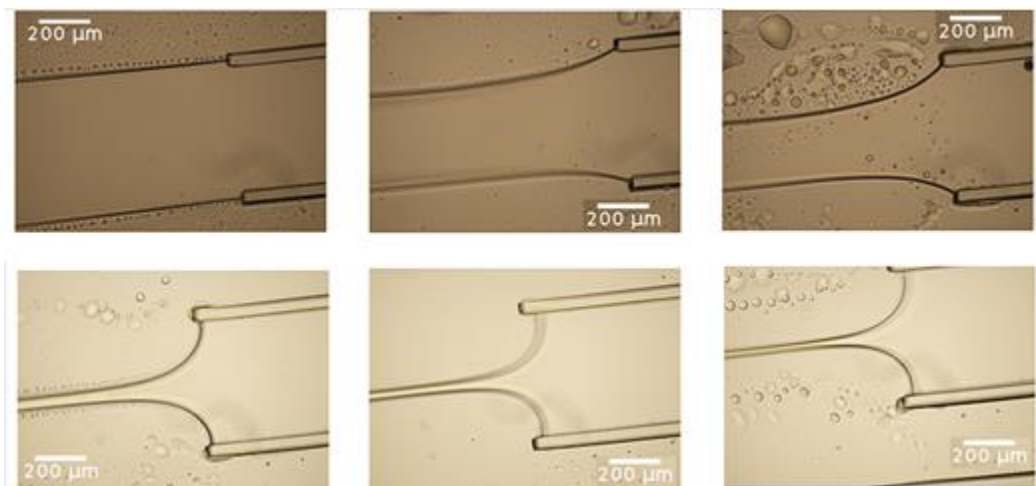


Figura 54. Chip Co Flow operando con cada FRR. (2.5,5,10,20,30 y 50)

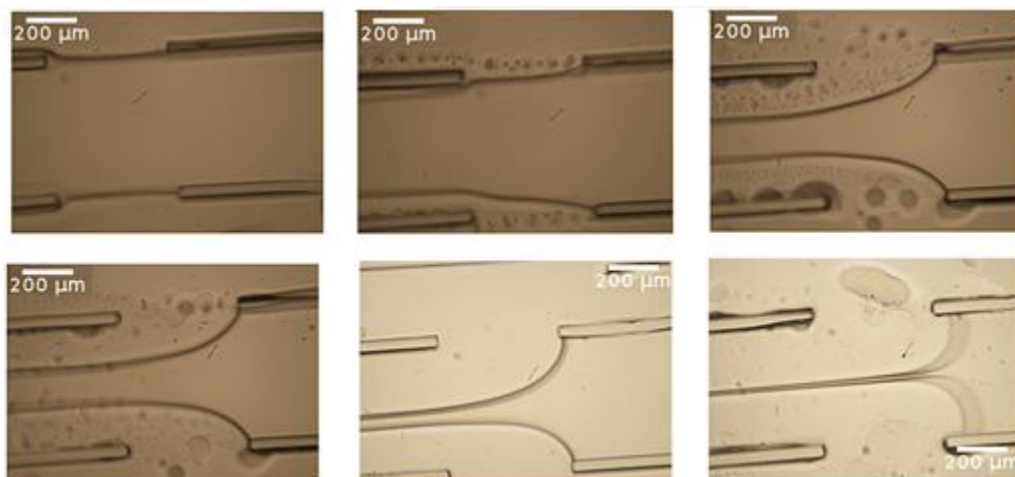


Figura 55. Chip Co Flow Focusing operando con cada FRR. (2.5,5,10,20,30 y 50)

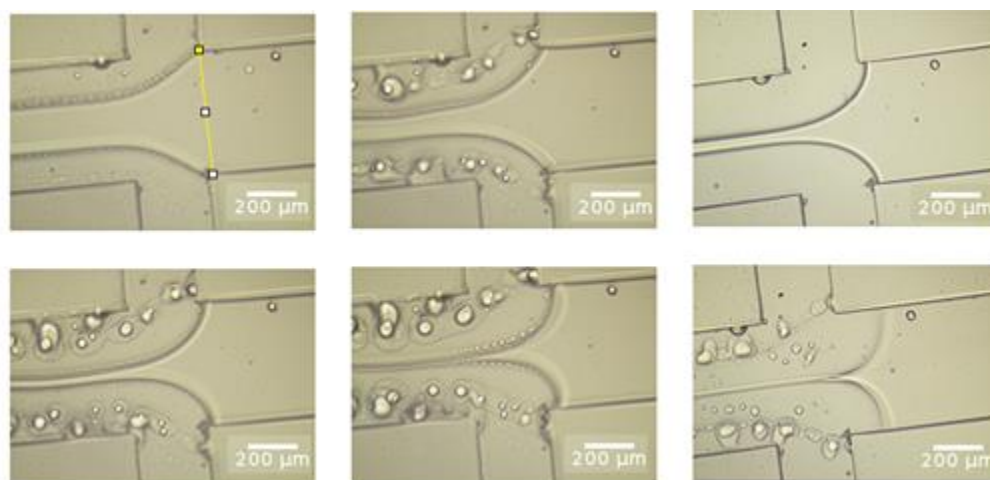


Figura 56. Chip Flow Focusing T operando con cada FRR. (2.5,5,10,20,30 y 50)

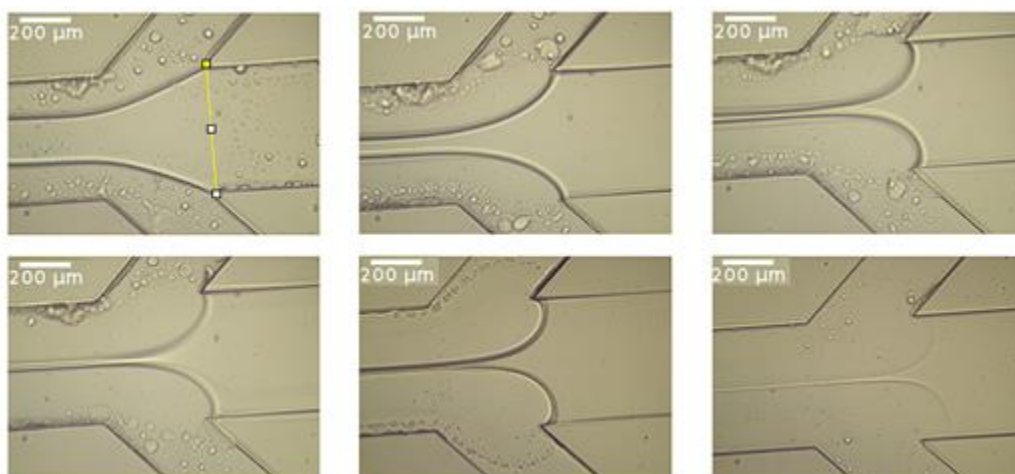


Figura 57. Chip Flow Focusing Y operando con cada FRR. (2,5,5,10,20,30 y 50)

De las imágenes captadas se visualiza el fenómeno real de la interacción entre el alcohol isopropílico cargado de los fosfolípidos POPE y POPG con el agua con NaCl. A diferencia de lo simulado con COMSOL, el comportamiento no es una disolución inmediata entre fases, se forma una interfase entre ambos fluidos que cuyo grosor disminuye en el conducto del chip, dada la difusión del alcohol hacia el agua.

La finalidad de generar liposomas utilizando sistemas microfluídicos es tener condiciones controlables y resultados con poca variabilidad. Estos sistemas al ser tan pequeños son altamente sensibles, por lo que es necesario que el sistema logre alcanzar un estado estacionario respecto al ancho del flujo central. Este flujo debe mantener una estabilidad vibracional, lo que implica que su ancho no debe fluctuar entre un valor mínimo y máximo mientras fluye. Asimismo, es crucial evitar la presencia de burbujas en el canal, ya que estas podrían ocasionar desviaciones en el flujo del sistema. La formación de los liposomas está condicionada por el campo de velocidad existente en la interfaz, esto quiere decir en qué dirección están siendo transportada, y las concentraciones locales de alcohol en las proximidades de dicha interfaz en dirección perpendicular al flujo.



Figura 58. Ensuciamiento por operación del chip. FRR 30 Chip Flow focusing T

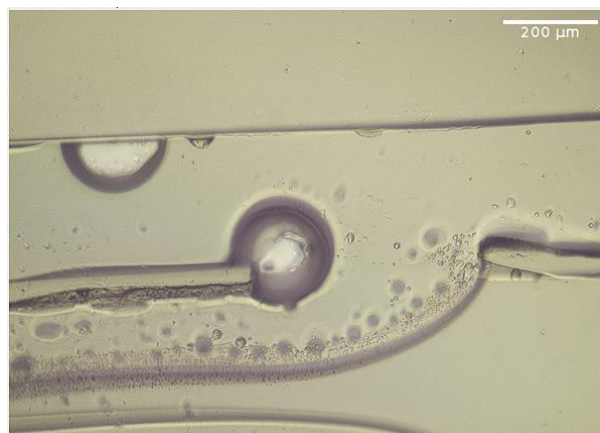


Figura 59. Burbuja atrapada en el sistema. Chip Co Flow Focusing

Dadas las dimensiones establecidas por los conductos del chip es posible notar al momento de operar a razones de flujos altas FRR 50 una inestabilidad de la interfase y del flujo central. En las figuras 59, 60 y 61 observa como esta interfase esta difuminada por la rápida difusión del alcohol dadas las diferencias de flujo en comparación a FRR menores. Esta opacidad en la interfase se debe a que la cantidad de alcohol fluyendo es menor y la difusión al agua es

rápida y los índices de refracción cambian suavemente. Las perturbaciones mecánicas a pueden causar que el flujo desaparezca totalmente alterando la producción de liposomas.

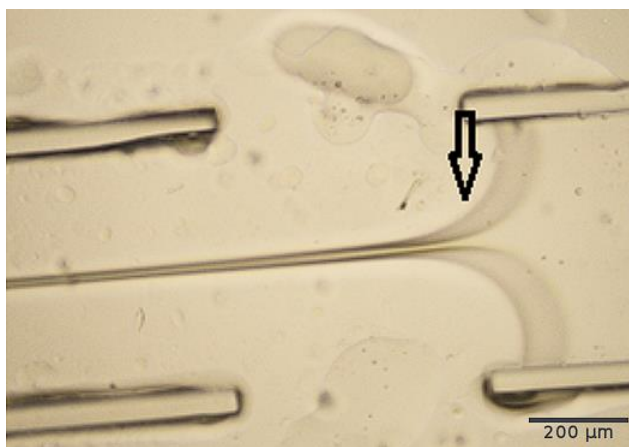


Figura 60. Chip Co flow Focusing FRR 50.

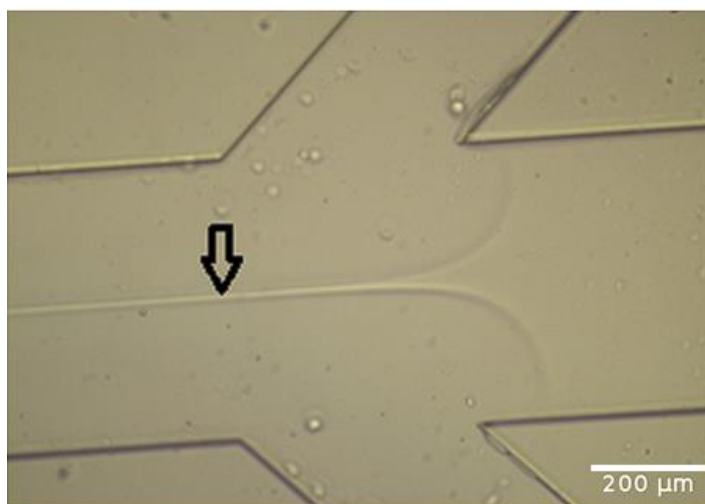


Figura 61. Chip Flow Focusing Y FRR 50

La formación de liposomas es sensible a las concentraciones locales de isopropanol una vez ya se han formado. Entre menor sea el grosor de este flujo central de isopropanol menor será la posibilidad de que las concentraciones locales de isopropanol en las inmediaciones de la interfase aguas arriba interactúen con los liposomas generando su reapertura e incremento de tamaño. Se visualizó durante la operación con FRR 50, la inestabilidad anteriormente mencionada. La inestabilidad del flujo central indica que existe tamaño mínimo que alcanza el grosor del flujo central, condicionado a las medidas geométricas del chip. Esto quiere decir que se pueden lograr los mismos grosores del flujo central con chips más pequeños con flujos y razones de flujos distintas, asegurando la estabilidad de este.

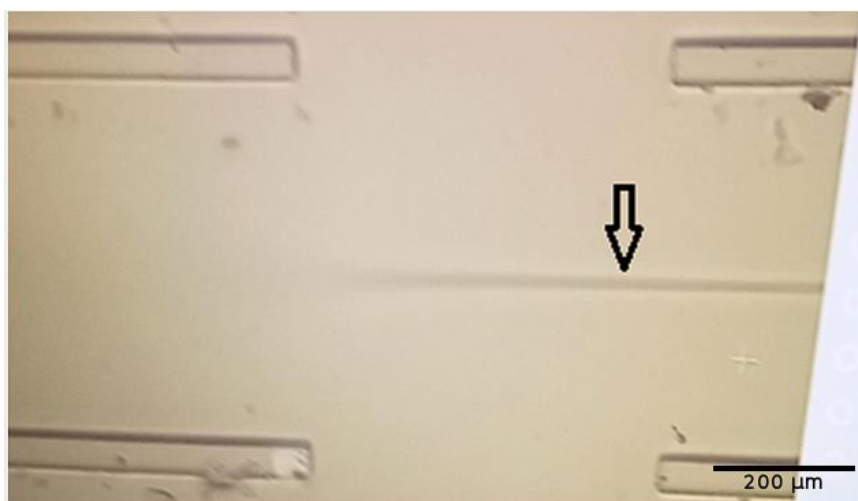


Figura 62. Flujo central casi invisible por inestabilidad del flujo.

Incluso en casos extremos la visibilidad del flujo central es demasiado baja como para poder observar la interfase inicial del sistema.

Tamaño de liposomas.

De los resultados obtenidos, el menor tamaño de liposoma promedio alcanzado para cada chip utilizado según su razón de flujo y razón de fosfolípidos se resumen en la tabla 6:

Tabla 6. Menor tamaño de liposoma obtenido.

Chip	POPE: POPG	Tamaño liposomas nm	FRR
Co-flow	2:1	239	50
Co-Flow Focusing		225	50
Flow Focusing T		280	30
Flow Focusing Y		206	30
Co-flow	3:1	145	50
Co-Flow Focusing		173	50
Flow Focusing T		171	50
Flow Focusing Y		152	50

Los resultados indican que en algunos casos el menor tamaño de liposoma se alcanza con FRR menores, pero como ya se discutió estos resultados no son del todo determinantes por las posibles variables que alteran el tamaño de los liposomas, como el ensuciamiento,

aparición de burbujas e inestabilidad de flujo, ya que la tendencia esperada es que el tamaño disminuya al incrementar las FRR.

Ancho central y tamaño de liposomas.

La formación de liposomas según lo ya discutido es sensible a las concentraciones locales de alcohol que difunden desde la interfase hacia el seno del líquido. La mayor concentración de alcohol aguas arriba en el conducto afecta al tamaño final de los liposomas y de manera contraria si la razón de flujo es mayor. La concentración inicial de 2-Propanol ingresada al sistema es de $13.7 \cdot 10^{-3}$ molar, cuyo valor disminuye a $4.4 \cdot 10^{-3}$ molar para un FRR de 2.5 y $1.6 \cdot 10^{-3}$ molar para un FRR 50, ver figura 63.

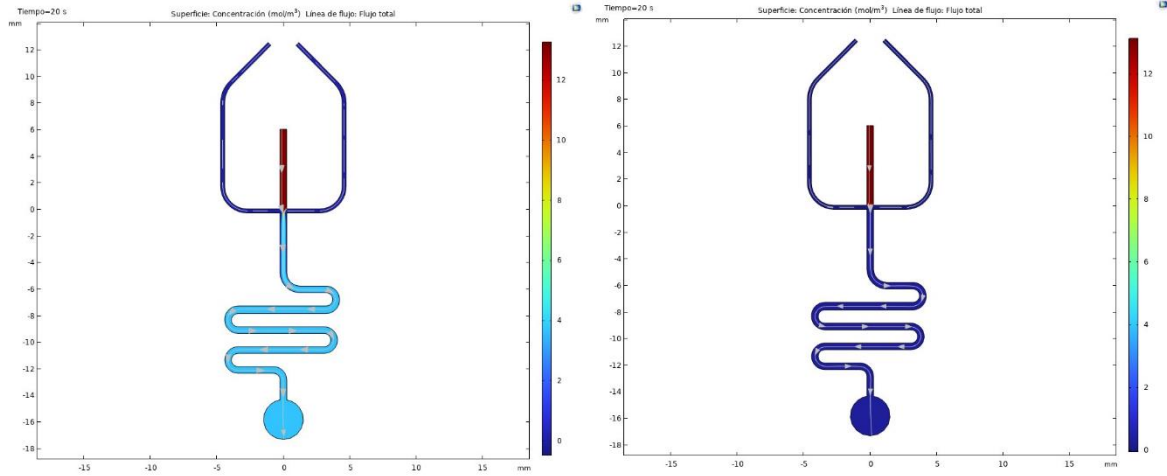


Figura 63. Simulaciones Chip Flow Focusing T, FRR 2.5 a la izquierda FRR 50 a la derecha.

Esta concentración aguas arriba se puede relacionar con el grosor inicial del flujo central (Jahn et al, 2007). El grosor central se puede aproximar por la siguiente expresión:

$$L_{central} = \frac{D_c}{1 + \frac{Q_A}{Q_B}} = \frac{D_c}{1 + FRR}$$

Donde:

$L_{central}$: Ancho del flujo central dentro del chip

D_c : ancho del canal central

Q_A : flujo de solución NaCl

Q_B : flujo de Isopropanol

FRR: Razon entre los caudales Q_A y Q_B

Esta expresión proviene del balance de materia que se puede realizar en el sistema considerando los flujos que se alimentan a cada sistema.

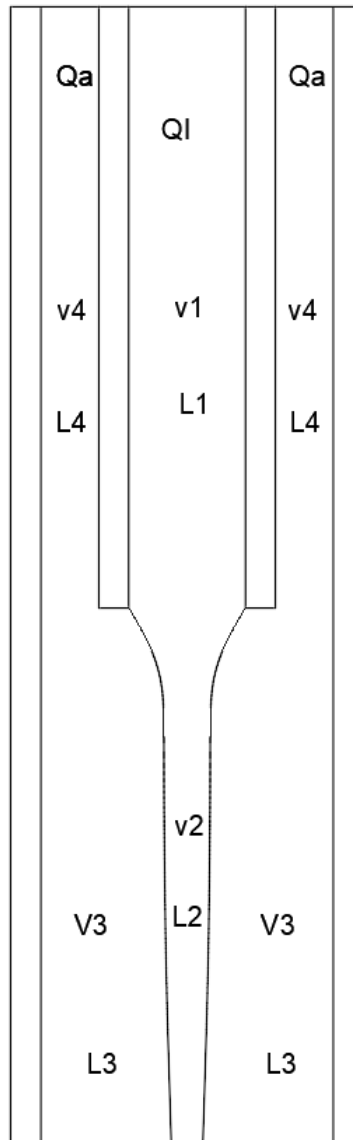


Figura 64. Sistema en estado estacionario, balance de materia.

$L (1,2,3,4)$: Ancho del flujo en cada punto señalado.

$v (1,2,3,4)$: Velocidad media del flujo en cada punto señalado.

Para este balance se tiene lo siguiente:

$$Q_a = FRR Q_I \quad ; \quad Q_I = L2 \, v2 \, h \, \rho_I \quad ; \quad Q_a = 2 \, v4 \, L4 \, h \, \rho_a = 2 \, v3 \, L3 \, h \, \rho_a$$

La cantidad de masa transportada por el flujo de isopropanol Q_I puede ser expresada como la multiplicación de su densidad ρ_I su velocidad media $v2$ el ancho del flujo $L2$ y la altura

del flujo h de esta misma manera se puede expresar el flujo de la solución salina Q_a . Se puede obtener lo siguiente:

$$L2 = \frac{Q_a}{FRR v2 h \rho_I}$$

$L2$ es el ancho del flujo de isopropanol en todo instante. Entonces tenemos:

$$L2 = \frac{2 v3 L3 h \rho_a}{FRR v2 h \rho_I} ; L = L2 + 2L3$$

L es el ancho total de ambos flujos en el conducto. Reemplazando:

$$L2 = (L - L2) \frac{v3 h \rho_a}{FRR v2 h \rho_I}$$

Reordenando y simplificando:

$$L2 = L \frac{v3 h \rho_a}{FRR v2 h \rho_I} - L2 \frac{v3 h \rho_a}{FRR v2 h \rho_I}$$

$$L2 = \frac{L \frac{v3 h \rho_a}{FRR v2 h \rho_I}}{1 + \frac{v3 h \rho_a}{FRR * v2 h \rho_I}}$$

Finalmente:

$$L2 = \frac{L v3 \rho_a}{FRR v2 \rho_I + v3 \rho_a}$$

$$L2 = \frac{L v3 \rho_a}{FRR v2 \rho_I + v3 \rho_a}$$

$$L2 = \frac{L}{1 + \left(\frac{v2 \rho_I}{v3 \rho_a}\right) FRR}$$

Para esta expresión se asume que la mezcla debido a la difusión no influye, se asumen perfiles parabólicos del flujo y las densidades de los líquidos mezclados son iguales en el estudio de Jahn et al 2004. Estas suposiciones afirman lo siguiente:

$$\rho_a = \rho_I ; v2 = v3$$

Si están condiciones son verdades se obtiene la expresión:

$$L2 = \frac{L}{1 + FRR}$$

Por estas mismas condiciones, esta expresión solo permite aproximar el grosor inicial, pero ya es suficiente para contrastar con los anchos observados y escalar el tamaño de los chips para mantener este ancho ideal para tamaños de liposomas de alto interés, menores a 150 nm. El ancho en que se mezclan ambos líquidos es el mismo para todos los chips 1.2 mm, se calcula el ancho del flujo central estimado para cada uno y se compara con el formado por las imágenes capturadas durante la experimentación.

En la siguiente tabla se presenta el grosor del flujo central según la expresión detallada anteriormente.

Tabla 7. Ancho del flujo central en función de FRR.

FRR	Ancho central mm
50	0.0235
30	0.0387
20	0.0571
10	0.1091
5	0.2000
2.5	0.3429

La medición del ancho del flujo central se realizó mediante escalado de imágenes, conociendo las medidas internas de los conductos.

Tabla 8. Medición del ancho real en mm mediante imágenes de microscopio.

	FRR					
	50	30	20	10	5	2.5
Chip Flow Focusing Y	0.03	0.04	0.05	0.06	0.18	0.42
Chip Flow Focusing T	0.03	0.07	0.08	0.08	0.17	0.43
Chip Co Flow	0.02	0.03	0.11	0.18	0.31	0.54
Chip Co Flow Focusing	0.04	0.07	0.16	0.26	0.37	0.54

Se observan diferencias significativas respecto de los valores estimados, esto se debe a que la densidad entre el agua 1000 kg/m³ y el isopropanol 786 kg/m³ no es despreciable. Otra condición que no se cumple es el perfil parabólico de los flujos, el PMDS es un polímero que posee cierta elasticidad, por tanto, al fluir en los conductos es esperable que existan deformaciones que terminen por afectar la interacción entre ambas fases, afectando a la velocidad media de los flujos, influyendo en los caudales de cada uno. Para esto se propone

un factor de corrección asociado a cada chip, ya que geometrías distintas tienen efectos distintos en el grosor del flujo central.

$$L_{central} = \frac{D_c}{1 + \gamma FRR}$$

γ : Factor de corrección

(Asociado a la diferencia de densidad, perfil de flujo y pérdidas de carga)

Al ajustar el modelo con el factor de corrección se observa una tendencia decreciente en el ancho del flujo central al incrementar FRR, comportamiento similar observado con el tamaño de los liposomas. El ajuste para cada caso presenta un coeficiente de correlación mayor a 0.9 pero solo en los casos del Co Flow y Co Flow Focusing se observa un buen ajuste en lo que respecta a esto. En lo que respecta a los intervalos de confianza del modelo tanto para el Chip T e Y se observan puntos fuera del intervalo. En lo que respecta a los residuos del modelo, el promedio se encuentra cercano a cero, pero la varianza de los residuos no es constante y existe normalidad en los residuos. El coeficiente de autocorrelación es menor a cero indicando la independencia de los datos medidos.

Tabla 9. Resumen ajuste de modelo.

Chip	γ	R ²	Intervalos de confianza	Intervalos de predicción	Prom. Res mm	Normalidad	Coef. Aurocorrel.
T	0.899	0.914	5/6	6/6	-0.007	Si	-0.050
Y	0.855	0.912	4/6	6/6	-0.00020	Si	-0.073
Co F. F	0.538	0.982	5/6	6/6	-0.009	Si	-0.112
Co F	0.441	0.982	6/6	6/6	0.003	Si	0.253

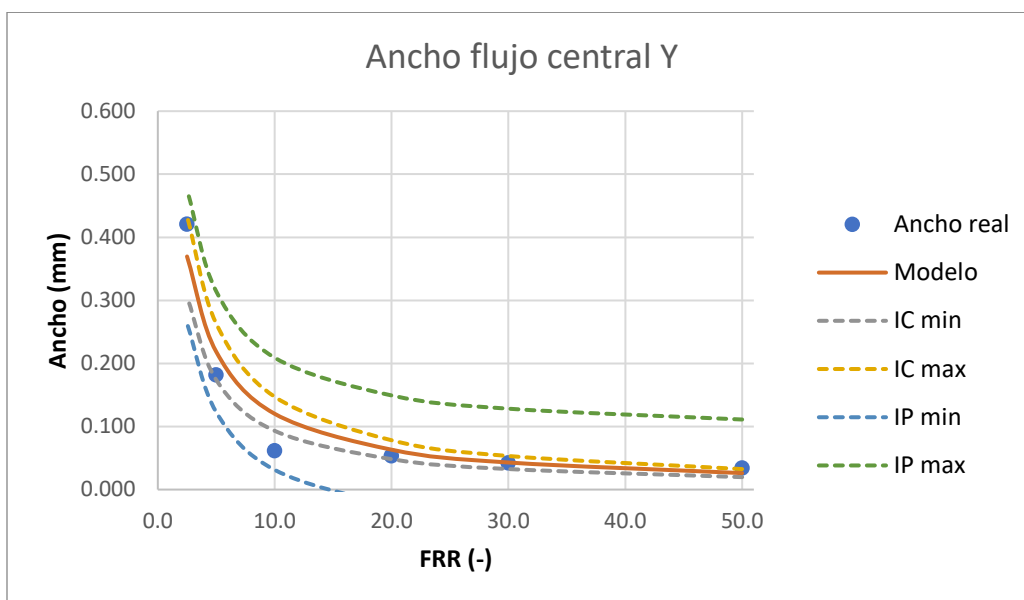


Figura 65. Modelo Chip Y.

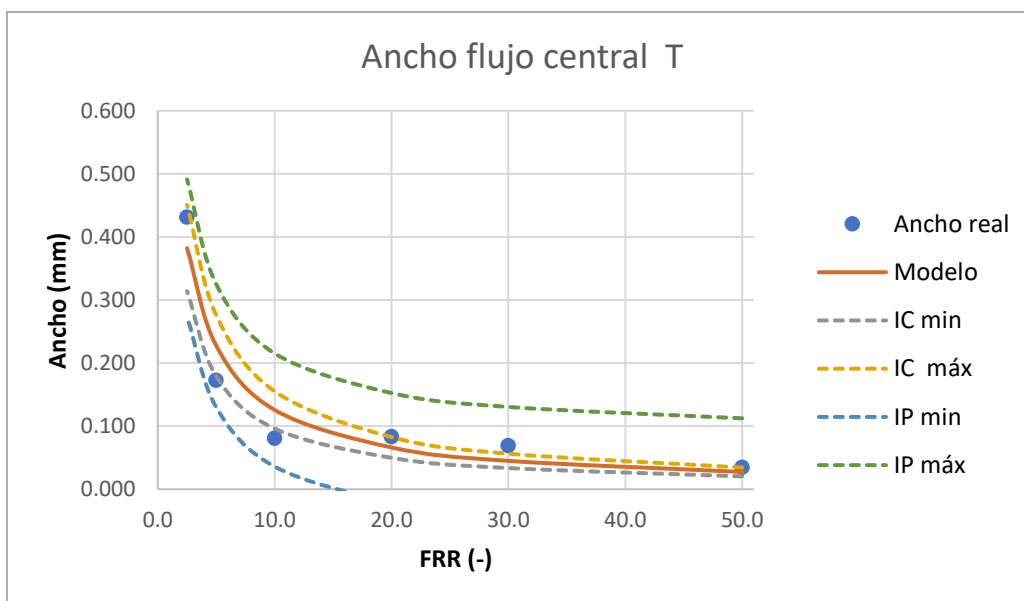


Figura 66. Modelo Chip T

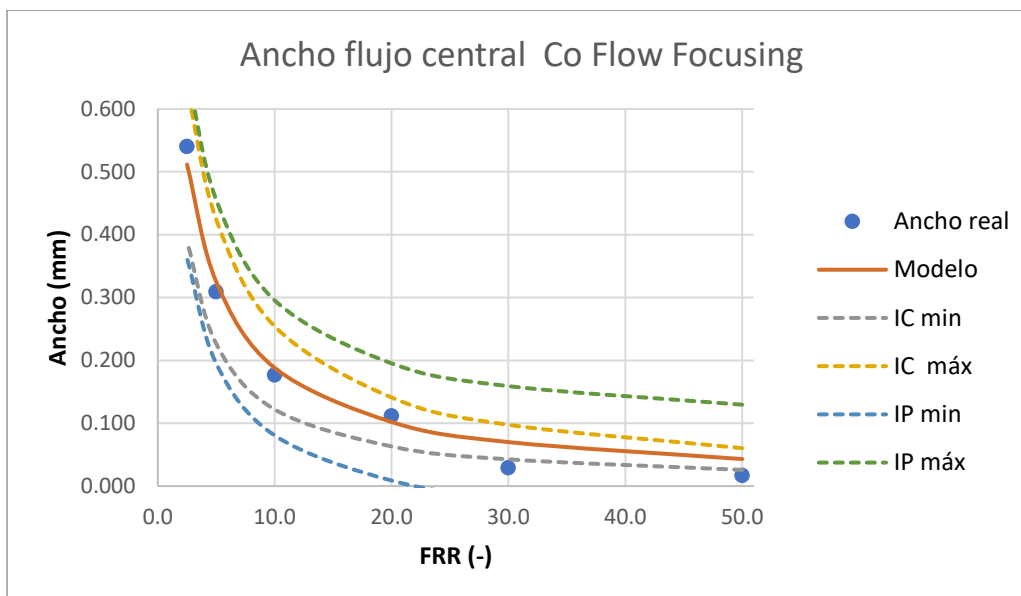


Figura 67. Modelo Chip Co Flow Focusing

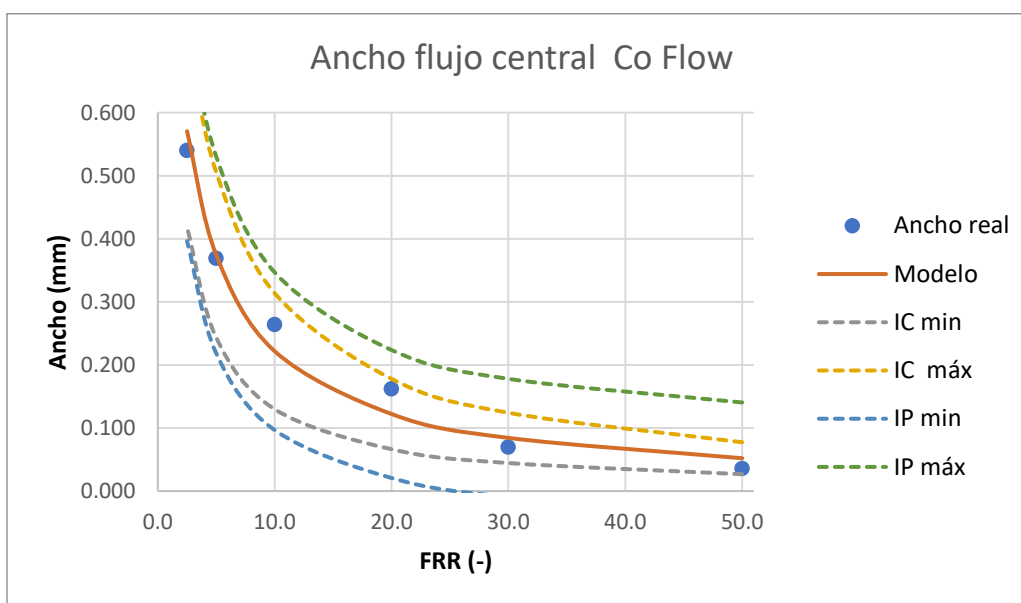


Figura 68. Modelo Chip Co Flow

Escalar un sistema de producción de liposomas de mayor tamaño a uno menor implica adaptar las condiciones y los parámetros de producción para mantener proporciones y propiedades similares en los liposomas a una escala diferente. Dentro de estas variables es relevante comprender que el tamaño final de los liposomas es directamente proporcional al ancho del flujo del solvente de fosfolípidos. El modelo propuesto puede predecir un rango de tamaño final de los liposomas solo conociendo las medidas del ancho del conducto principal

y la razón de flujos de los flujos alimentados, todo esto sujeto a las condiciones en las cuales se realizaron estos experimentos.

Scale up.

Escalar un sistema productivo de liposomas implica adaptar y aumentar la capacidad de producción desde volúmenes de laboratorio a escalas más grandes, expresadas comúnmente en litros. Considerando que las dosis de vacunas varían desde 0.3 mL hasta 1 mL. Se tomará como referencia la composición entregada por el MINSAL el 2021 acerca de la vacuna **BNT162b2** del laboratorio **Pfizer-BioNTech** para elaborar el escalamiento de esta producción. Cada dosis utiliza 0.3 mL de la solución madre la cual contiene 30 mcg de un ARNm. Se supondrá que el número de partículas lipídicas y el tamaño de las mismas usadas en la vacuna comercial es estándar.

En esta oportunidad se detallará lo necesario para validar la producción de 1000 litros de solución de liposomas utilizando equipamiento de escala de laboratorio. Se hará uso de un nuevo tamaño de chip de 0.6 mm de ancho del conducto, pero manteniendo el flujo central en cual se producen liposomas de 150 nm a un FRR de 50. Se usará de referencia la información obtenida de la operación del Chip Y a FRR 50.

$$FRR_N = \frac{D_c}{L_{central} * \gamma} - \frac{1}{\gamma}$$

FRR_N: Razón de flujo operación nuevo chip

La ecuación se usará para obtener las nuevas condiciones de operación respecto de los flujos que se deberán alimentar al sistema manteniendo TFR igual a 200 ul/min. Obteniéndose así el valor de FRR para la operación del nuevo chip y los caudales de solución de NaCl además de la de isopropanol fosfolípido.

$$FRR_N = 35.5 ; F_a = 194.5 \frac{ul}{min} ; F_b = 5.5 ul/min$$

Existen bombas de la misma marca que las utilizadas para esta experiencia las cuales permite utilizar hasta 12 jeringas en operación. Se estimará el consumo energético, periodo de operación, área de trabajo, cantidad de chip según la producción estimada de 1000 Litros.



Figura 69. Modelo de bomba para 12 jeringas.

Tabla 10. Resumen valores de escalamiento.

Chip	Bombas	Área	Tiempo	Energía	Dosis
1200	100	0.63 m ²	138.9 horas	166.6 kWh	3.3*10 ⁶

Una vez realizado el balance inicial, se obtiene que son necesario 1200 chips operando continuamente por aproximadamente 6 días para lograr producir 1m³ de la solución con liposomas. Si consideramos que se utilizan 0.3 mL por dosis de una vacuna, se pueden producir un total de 3.3 millones de dosis. Como comparativa en Chile en el año 2021 la población objetiva para recibir dosis de vacuna Covid-19 era de 15.200.840 personas, por tanto, la fabricación de estas 3.3 millones de dosis es capaz de proporcionar un 22% de la dosis necesarias para realizar una primera inmunización.

Conclusiones

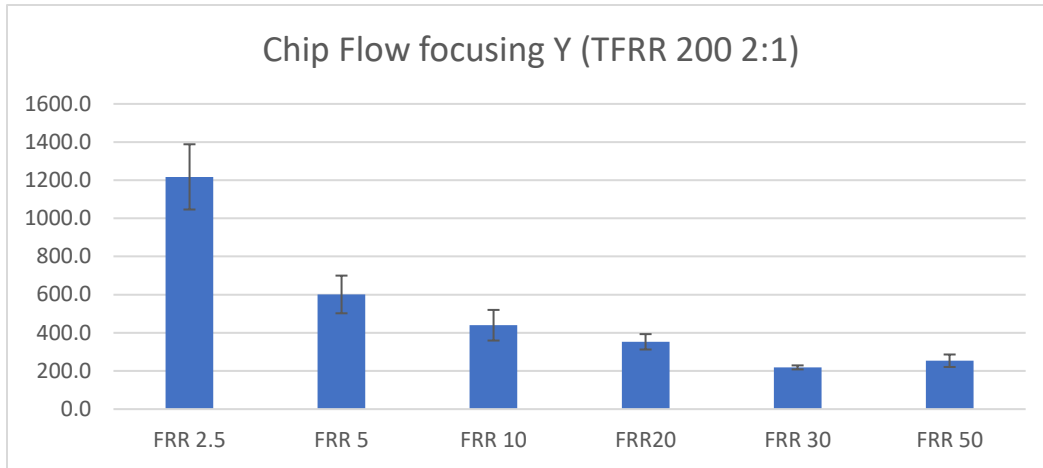
En esta investigación se ha establecido la relación entre las variables de diseño de chip de microfluídica y el tamaño de los liposomas formados mediante la técnica de flujo focalizado. Cada variable tiene un impacto en el tamaño de los liposomas, una disminución de tamaño de liposomas al aumentar FRR, la configuración de chip Y obtuvo menores tamaños de liposomas y la razón de fosfolípidos afecta al tamaño de liposomas por sus tamaños moleculares que condiciona su interacción. El tamaño del ancho del flujo central disminuye al aumentar FRR al igual que los liposomas, si bien es causalidad permite hacer una relación entre ambas variables, otorgando una oportunidad para tabular esta información según las condiciones utilizadas. El modelo presentado para predecir el tamaño del flujo central resulta ser un buen ajuste y primer alcance para escalar estos sistemas a chip más pequeños. Cada sistema posee un comportamiento particular reflejado en las velocidades medias cuando se encuentran fluyendo en el conducto principal. Para caracterizar este comportamiento, se otorga un factor de corrección a cada sistema, que puede escalar las dimensiones de los chips, manteniendo el ancho del flujo central. El escalamiento inicial obedece primeramente a balances de materia y la información obtenida en esta investigación al área de diseño y operación de los chips en función de un resultado buscado, el tamaño de interés de los liposomas.

Continuidad de la presente investigación

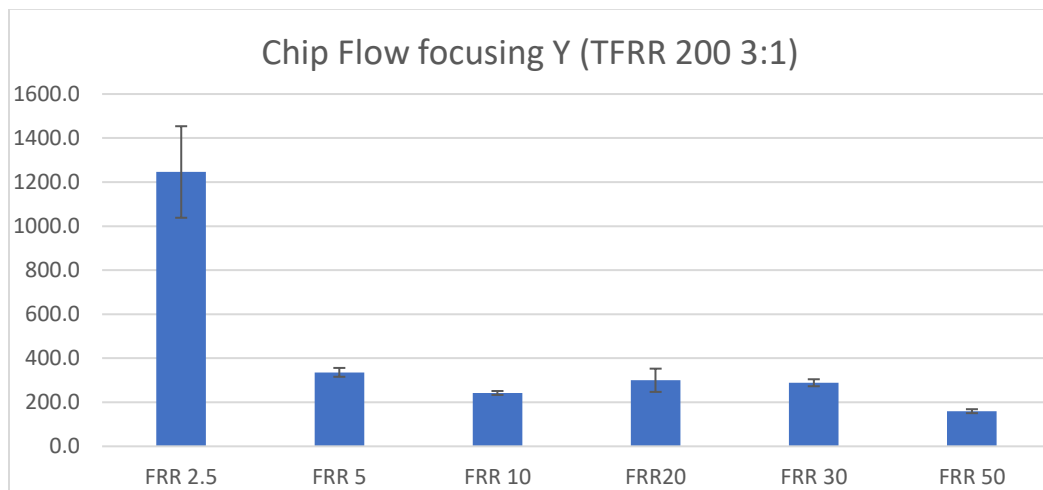
Para la continuación experimental a partir de los resultados del presente trabajo, existen puntos relevantes a considerar que se relacionan con efectos en los parámetros que gobiernan la formación de liposomas y con ello repercuten en la conversión de fosfolípidos a liposomas y la eficiencia de encapsulación. Por esto se considera relevante continuar con lo siguiente:

1. Utilizar chips de menor tamaño y condiciones de operación nuevas a partir de la información obtenida para lograr el rango deseado de liposomas 50-100 nm
2. Realizar cambios la geometría del flujo central para evitar el contacto de esta solución con las paredes del conducto y disminuir el ensuciamiento.
3. Analizar la conversión de fosfolípidos a liposomas.
4. Analizar la capacidad de encapsulamiento y la nueva disposición de los conductos necesarios para el encapsulamiento.

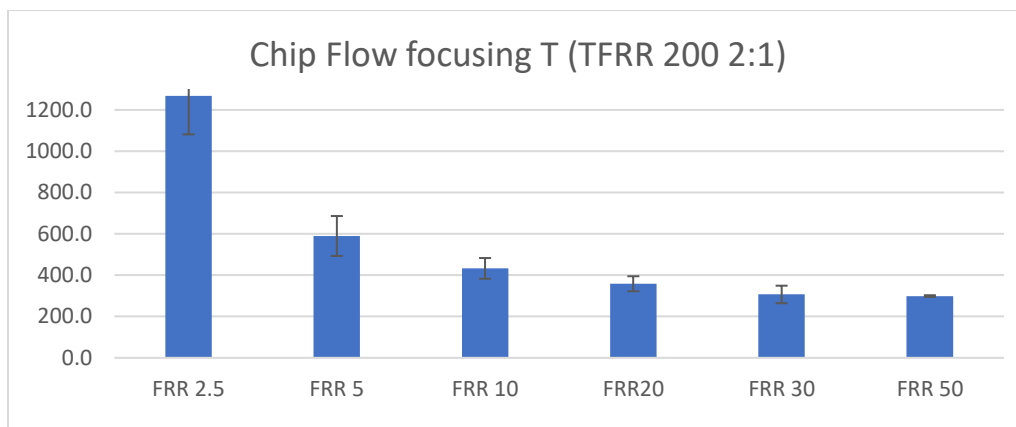
Anexos



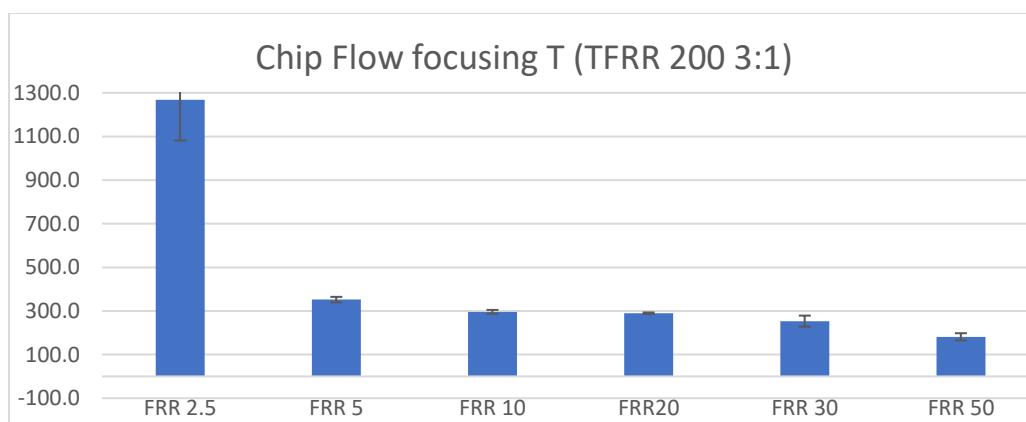
Anexos A 1. Tamaño de liposomas Chip Y 2:1.



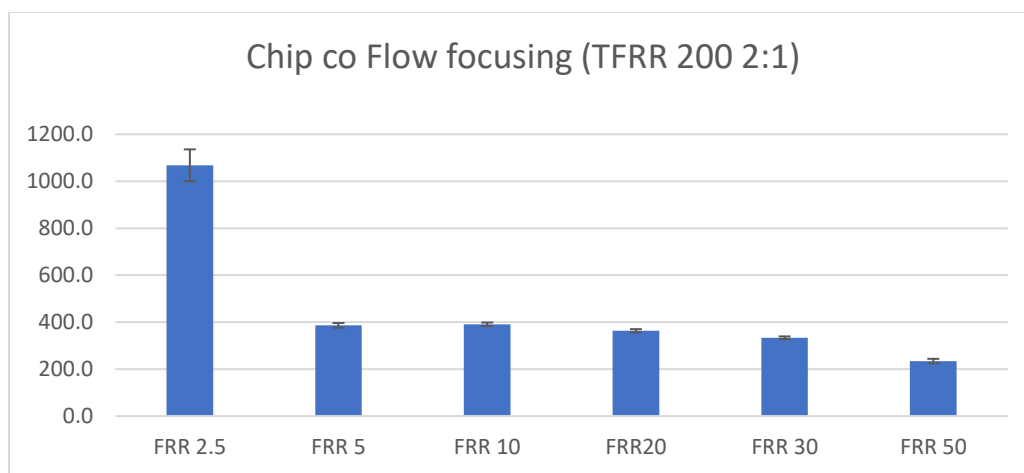
Anexos A 2. Tamaño de liposomas Chip Y 3:1



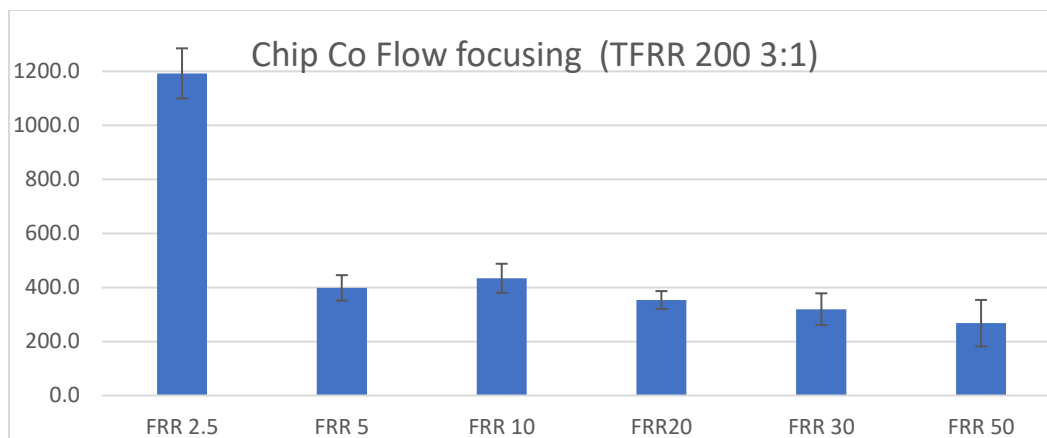
Anexos A 3. Tamaño de liposomas Chip T 2:1



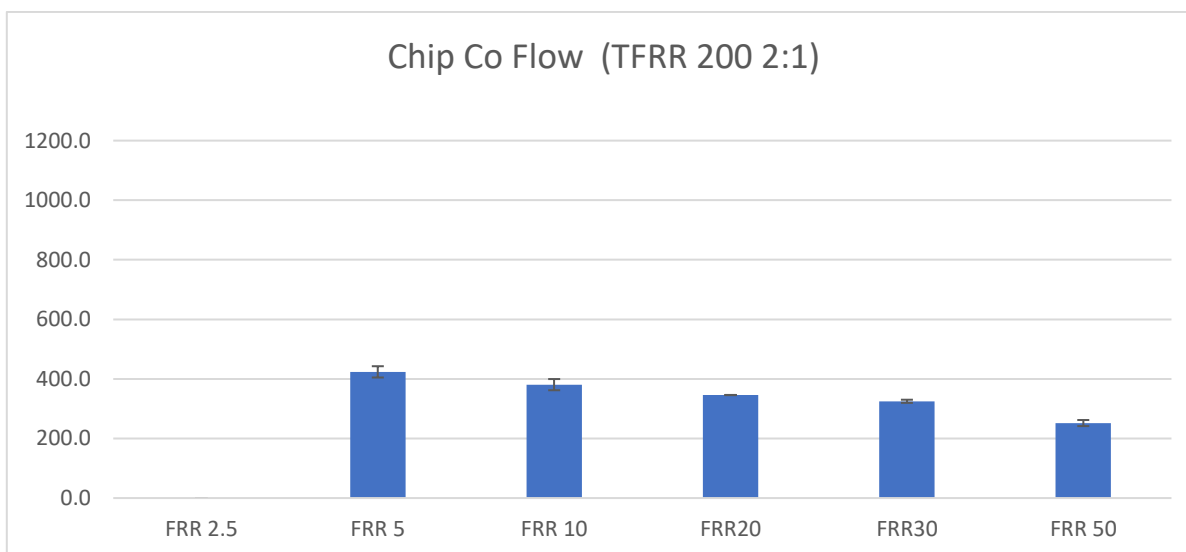
Anexos A 4. Tamaño de liposomas Chip T 32:1



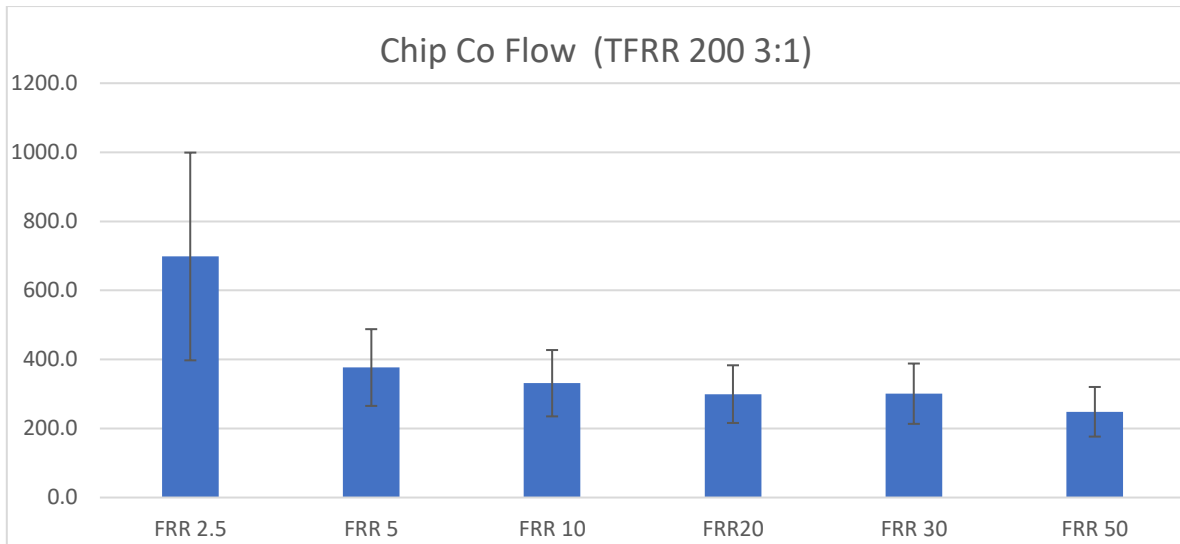
Anexos A 5. Tamaño de liposomas Chip Co Flow Focusing 2:1



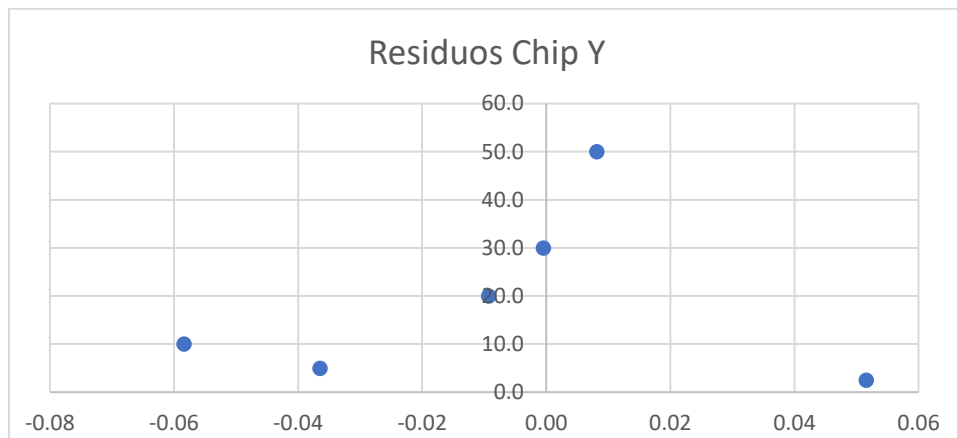
Anexos A 6. Tamaño de liposomas Chip Co Flow Focusing 3:1



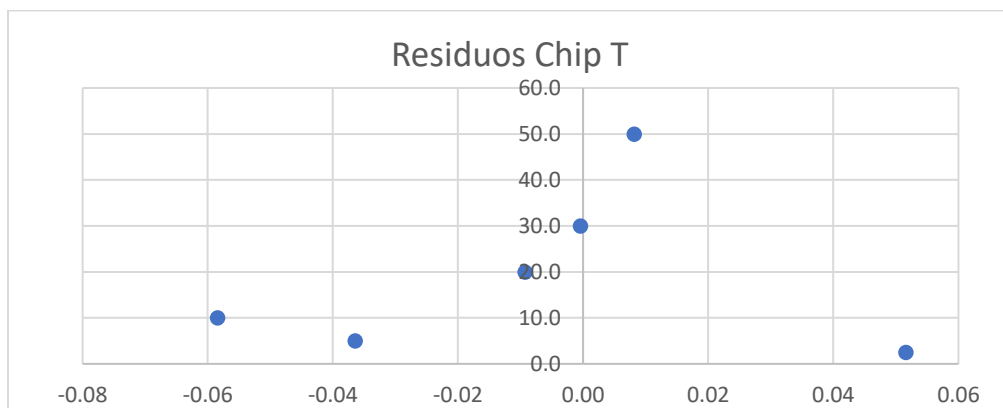
Anexos A 7. Tamaño de liposomas Chip Co Flow 2:1



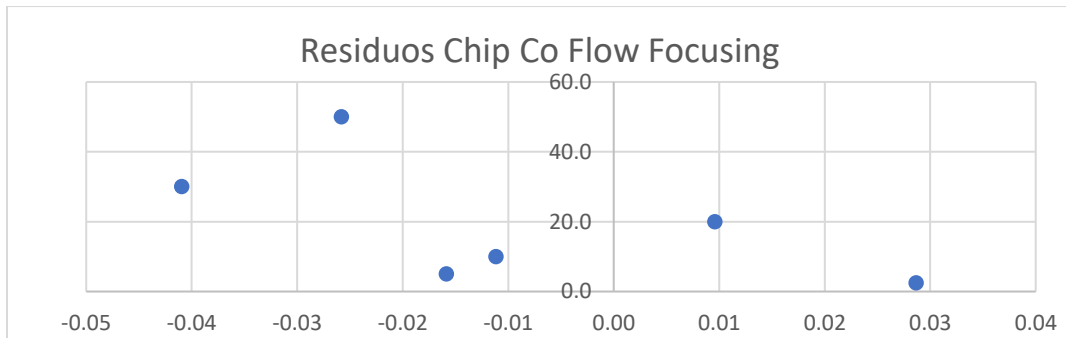
Anexos A 8. Tamaño de liposomas Chip Co Flow 3:1



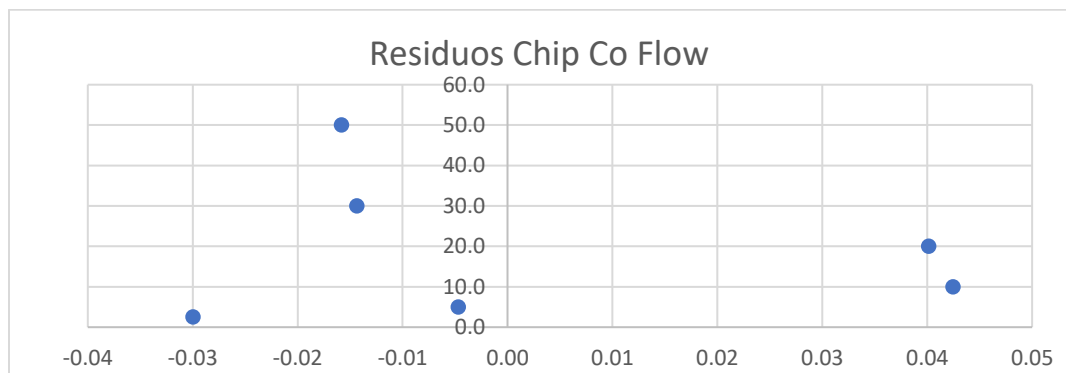
Anexos A 9. Residuos modelo ancho flu central Chip Y.



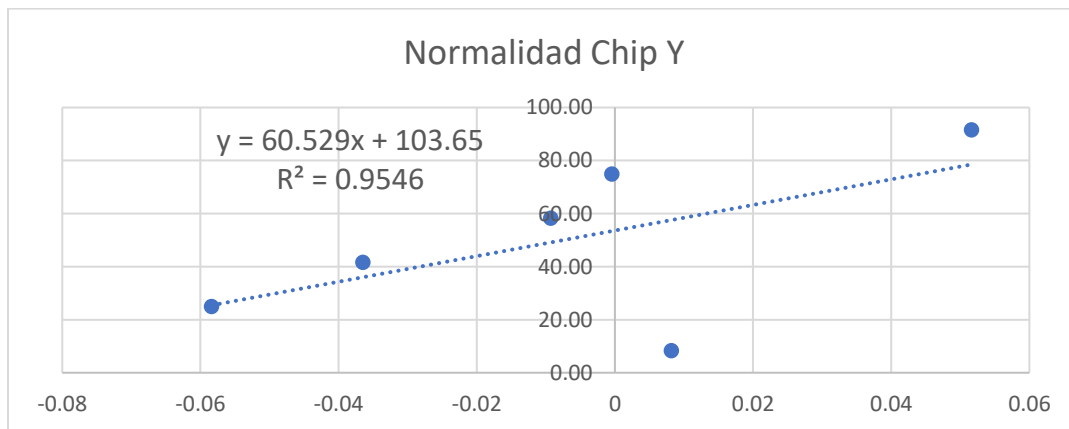
Anexos A 10. Residuos modelo ancho flujo central Chip T.



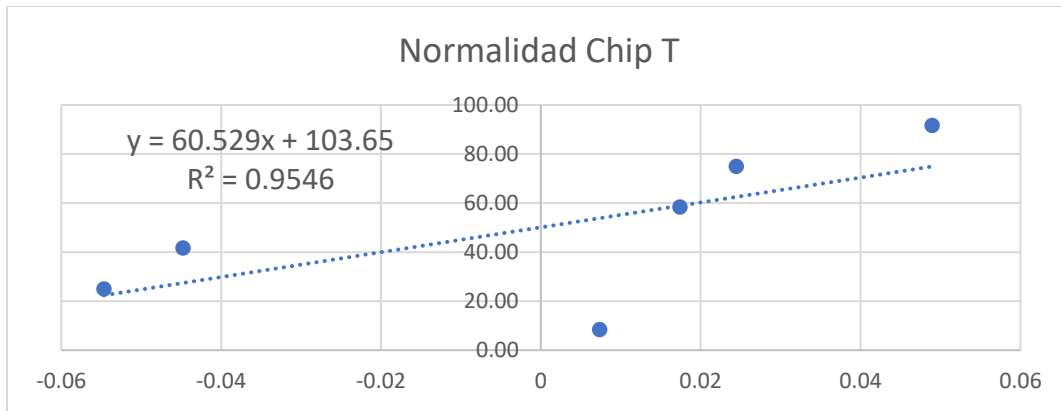
Anexos A 11. Residuos modelo ancho flujo central Chip Co Flow F.



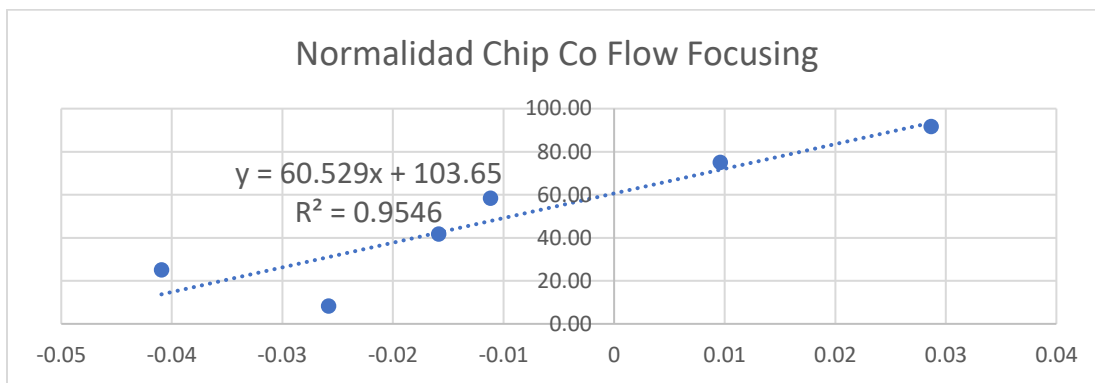
Anexos A 12. Residuos modelo ancho flujo central Chip Co Flow.



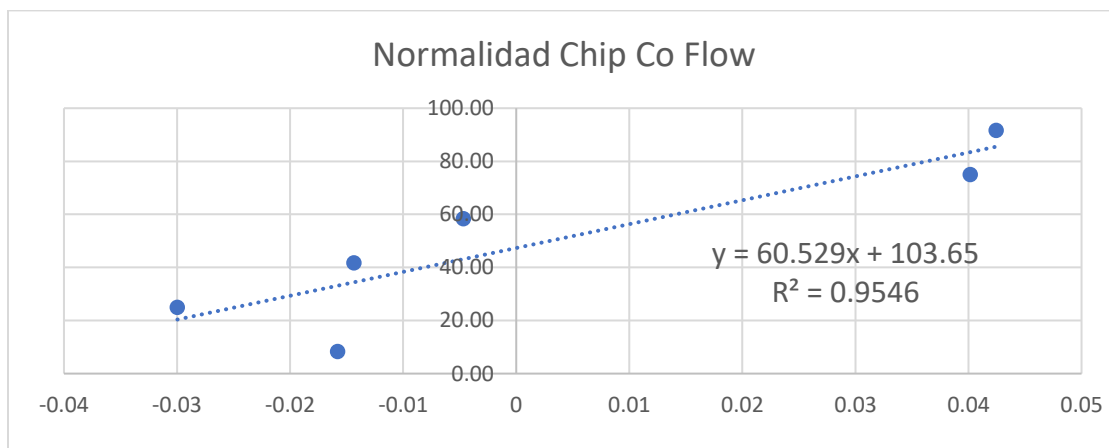
Anexos A 13. Normalidad modelo ancho flujo central Chip Y.



Anexos A 14. Normalidad modelo ancho flujo central Chip T.



Anexos A 15. Normalidad modelo ancho flujo central Chip Co Flow F.



Anexos A 16. Normalidad modelo ancho flujo central Chip Co Flow.

Bibliografía

Abedi, S., Suteria, N. S., Chen, C.-C., & Vanapalli, S. A. (2018). Microfluidic production of size-tunable hexadecane-in-water emulsions: Effect of droplet size on destabilization of two-dimensional emulsions due to partial coalescence. *Journal of Colloid and Interface Science*. doi: 10.1016/j.jcis.2018.08.045

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. The Lipid Bilayer. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26871/>

Almeida, B., Nag, O. K., Rogers, K. E., & Delehanty, J. B. (2020). Recent Progress in Bioconjugation Strategies for Liposome-Mediated Drug Delivery. *Molecules*, 25(23), 5672. doi:10.3390/molecules25235672

Anna, S. L., & Mayer, H. C. (2006). Microscale tipstreaming in a microfluidic flow focusing device. *Physics of Fluids*, 18(12), 121512. doi:10.1063/1.2397023

Aranguren, A., Torres, C. E., Muñoz-Camargo, C., Osma, J. F., & Cruz, J. C. (2020). Synthesis of Nanoscale Liposomes via Low-Cost Microfluidic Systems. *Micromachines*, 11(12), 1050. doi:10.3390/mi11121050

Bastian E. (2017) In *Micro and Nano Technologies, Microfluidics: Modelling, Mechanics and Mathematics*. Elsevier ISBN 9781455731411. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-3141-1.50048-4>.

Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238–IN27. doi:10.1016/s0022-2836(65)80093-6

Bandyopadhyay, G., Dutta, S., & Lahiri, S. C. (2010). Determination of Surface Tension, Structural and Related Properties of Aquo-alcoholic Mixtures at 298 K. *Zeitschrift Für Physikalische Chemie*, 224(05), 729–742. doi:10.1524/zpch.2010.5417

Baret JC (February 2012). "Surfactants in droplet-based microfluidics" (<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02148769/file/Baret-LOC-forHAL.pdf>) (PDF). *Lab on a Chip*. 12 (3): 422–33. doi:10.1039/C1LC20582J

(<https://doi.org/10.1039%2FC1LC20582J>). PMID 22011791 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22011791>).

Bouleuz. M, Kwon. H, Durey. G, Kasiulis. M, Reitz. A, Bello. L, Nier. J, David. P, Durey. G. The Lutetium Project. (29 Nov 2017). Aventuras de microfluidos n. ° 3: chips de microfluidos. <https://www.youtube.com/watch?v=EYuyRUjnTgc>

Bringer, M. R., Gerds, C. J., Song, H., Tice, J. D., & Ismagilov, R. F. (2004). Microfluidic systems for chemical kinetics that rely on chaotic mixing in droplets. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 362(1818), 1087–1104. doi:10.1098/rsta.2003.1364

Carugo, D., Bottaro, E., Owen, J., Stride, E., & Nastruzzi, C. (2016). Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors. *Scientific Reports*, 6(1). doi:10.1038/srep25876

Carvalho, B.G.; Ceccato, B.T.; Michelon, M.; Han, S.W.; de la Torre, L.G. Advanced Microfluidic Technologies for Lipid Nano-Microsystems from Synthesis to Biological Application. *Pharmaceutics* 2022, 14, 141. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010141>

Cetin, B., Taze, S., Asik, M. D., & Tuncel, S. A. (2013). Microfluidic Device for Synthesis of Chitosan Nanoparticles. Volume 2, *Fora: Cavitation and Multiphase Flow; Fluid Measurements and Instrumentation; Microfluidics; Multiphase Flows: Work in Progress*. doi:10.1115/fedsm2013-16349

Chen, P., Li, S., Guo, Y., Zeng, X., & Liu, B.-F. (2020). A review on microfluidics manipulation of the extracellular chemical microenvironment and its emerging application to cell analysis. *Analytica Chimica Acta*. doi: 10.1016/j.aca.2020.05.065

Christopher, G. F., & Anna, S. L. (2007). Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40(19), R319–R336. doi:10.1088/0022-3727/40/19/r01

Courtois, F., Olguin, L. F., Whyte, G., Bratton, D., Huck, W. T. S., Abell, C., & Hollfelder, F. (2008). An Integrated Device for Monitoring Time-Dependent in vitro Expression from Single Genes in Picolitre Droplets. *ChemBioChem*, 9(3), 439–446. doi:10.1002/cbic.200700536

Cramer, C., Fischer, P., & Windhab, E. J. (2004). Drop formation in a co-flowing ambient fluid. *Chemical Engineering Science*, 59(15), 3045–3058. doi:10.1016/j.ces.2004.04.006

De Gennes, P.-G., Brochard-Wyart, F., & Quéré, D. (2004). Capillarity and Wetting Phenomena. doi:10.1007/978-0-387-21656-0

Dopazo, Gonzalo & Martinez-Castillo, Cecilia & Alonso-Ferrer, Manuel & Mejuto, Juan. (2021). Modeling the Behavior of Amphiphilic Aqueous Solutions. 10.5772/intechopen.95613.

Elvira, K., i Solvas, X., Wootton, R. et al. The past, present and potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis. *Nature Chem* 5, 905–915 (2013). <https://doi.org/10.1038/nchem.1753>

Hood, R. R., & DeVoe, D. L. (2015). High-Throughput Continuous Flow Production of Nanoscale Liposomes by Microfluidic Vertical Flow Focusing. *Small*, 11(43), 5790–5799. doi:10.1002/smll.201501345

Ibrahim, A. M., Padovani, J. I., Howe, R. T., & Anis, Y. H. (2021). Modeling of Droplet Generation in a Microfluidic Flow-Focusing Junction for Droplet Size Control. *Micromachines*, 12(6), 590. doi:10.3390/mi12060590

Israelachvili, J. N., Marčelja, S., & Horn, R. G. (1980). Physical principles of membrane organization. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 13(02), 121. doi:10.1017/s0033583500001645

Jahn, A., Vreeland, W. N., Gaitan, M., & Locascio, L. E. (2004). Controlled Vesicle Self-Assembly in Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing. *Journal of the American Chemical Society*, 126(9), 2674–2675. doi:10.1021/ja0318030

Jahn, A., Vreeland, W. N., DeVoe, D. L., Locascio, L. E., & Gaitan, M. (2007). Microfluidic Directed Formation of Liposomes of Controlled Size. *Langmuir*, 23(11), 6289–6293. doi:10.1021/la070051a

Jahn, A., Stavis, S. M., Hong, J. S., Vreeland, W. N., DeVoe, D. L., & Gaitan, M. (2010). Microfluidic Mixing and the Formation of Nanoscale Lipid Vesicles. *ACS Nano*, 4(4), 2077–2087. doi:10.1021/nn901676x

Jahn, A., Lucas, F., Wepf, R. A., & Dittrich, P. S. (2013). Freezing Continuous-Flow Self-Assembly in a Microfluidic Device: Toward Imaging of Liposome Formation. *Langmuir*, 29(5), 1717–1723. doi:10.1021/la303675g

Jang, H., Ma, B., Lal, R., & Nussinov, R. (2008). Models of Toxic β -Sheet Channels of Protegrin-1 Suggest a Common Subunit Organization Motif Shared with Toxic Alzheimer β -Amyloid Ion Channels. *Biophysical Journal*, 95(10), 4631–4642. doi:10.1529/biophysj.108.134551

Jean-Christophe Baret. Surfactants in droplet-based microfluidics. *Lab on a Chip*, Royal Society of Chemistry, 2012, 12 (3), pp.422-433. ff10.1039/C1LC20582Jff. ffhal-02148769f

Lee C, Lee J, Kim HH, Teh SY, Lee A, Chung IY, et al. (August 2012). "Microfluidic droplet sorting with a high frequency ultrasound beam" (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3400154>). *Lab on a Chip*. 12 (15): 2736–42. doi:10.1039/C2LC21123H (<https://doi.org/10.1039/C2LC21123H>). PMC 3400154 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3400154>). PMID 22643737 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22643737>).

Li, D.(2008) *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, Springer US, Boston, DOI <https://doi.org/10.1007/978-0-387-48998-8>

Link, D. R., Grasland-Mongrain, E., Duri, A., Sarrazin, F., Cheng, Z., Cristobal, G., ... Weitz, D. A. (2006). Electric Control of Droplets in Microfluidic Devices. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(16), 2556–2560. doi:10.1002/anie.200503540

Liu, H., & Zhang, Y. (2009). Droplet formation in a T-shaped microfluidic junction. *Journal of Applied Physics*, 106(3), 034906. doi:10.1063/1.3187831

Lombardo D, Kiselev MA. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. *Pharmaceutics*. 2022; 14(3):543. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543>

Lombardo D, Kiselev MA. Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application. *Pharmaceutics*. 2022; 14(3):543. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543>Lu, J., Blazyk, J., & Lorigan, G. A. (2006). Exploring membrane selectivity of the antimicrobial

peptide KIGAKI using solid-state NMR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(9), 1303–1313. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.02.002

Mazutis, L., & Griffiths, A. D. (2012). Selective droplet coalescence using microfluidic systems. *Lab on a Chip*, 12(10), 1800. doi:10.1039/c2lc40121e

Michelon, M., Oliveira, D. R. B., de Figueiredo Furtado, G., Gaziola de la Torre, L., & Cunha, R. L. (2017). High-throughput continuous production of liposomes using hydrodynamic flow-focusing microfluidic devices. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 156, 349–357. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.05.033

Mirahmadi, N., Babaei, M. H., Vali, A. M., & Dadashzadeh, S. (2010). Effect of liposome size on peritoneal retention and organ distribution after intraperitoneal injection in mice. *International Journal of Pharmaceutics*, 383(1-2), 7–13. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.08.034

Mottaghi, S., Nazari, M., Fattahi, S. M., Nazari, M., & Babamohammadi, S. (2020). Droplet size prediction in a microfluidic flow focusing device using an adaptive network based fuzzy inference system. *Biomedical Microdevices*, 22(3). doi:10.1007/s10544-020-00513-4

Murzyn, K., Róg, T., & Pasenkiewicz-Gierula, M. (2005). Phosphatidylethanolamine-Phosphatidylglycerol Bilayer as a Model of the Inner Bacterial Membrane. *Biophysical Journal*, 88(2), 1091–1103. doi:10.1529/biophysj.104.048835

Neuhaus, F., Mueller, D., Tanasescu, R., Balog, S., Ishikawa, T., Brezesinski, G., & Zumbuehl, A. (2017). Vesicle Origami: Cuboid Phospholipid Vesicles Formed by Template-Free Self-Assembly. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(23), 6515–6518. doi:10.1002/anie.201701634

Patil, Y. P., & Jadhav, S. (2014). Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 177, 8–18. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011

Philpot, J. S. L. The use of thin layers in electrophoretic separation. *Trans. Faraday Soc.* 35, 38–4 (1940)

Ren, C., Lee, A. (2021). Droplet Microfluidics. Pubsorg. <https://doi.org/10.1039/9781839162855>

Rho, H. S., & Gardeniers, H. (2020). Microfluidic Droplet-Storage Array. *Micromachines*, 11(6), 608. doi:10.3390/mi11060608

Sang, R., Stratton, B., Engel, A., & Deng, W. (2021). Liposome technologies towards colorectal cancer therapeutics. *Acta Biomaterialia*, 127, 24–40. doi: 10.1016/j.actbio.2021.03.055

Sercombe, L.; Veerati, T.; Moheimani, F.; Wu, S.Y.; Sood, A.K.; Hua, S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Front. Pharmacol.* 2015, 6, 286.

Shan, H., Lin, Q., Wang, D., Sun, X., Quan, B., Chen, X., & Chen, Z. (2021). 3D Printed Integrated Multi-Layer Microfluidic Chips for Ultra-High Volumetric Throughput Nanoliposome Preparation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.773705>

Shum, H.C., Lee, D., Yoon, I., Kodger, T., Weitz, D.A., (2008). Double emulsion templated monodisperse phospholipid vesicles. *Langmuir* 24, 7651–7653.

Song, H., Chen, D. L., & Ismagilov, R. F. (2006). Reactions in Droplets in Microfluidic Channels. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(44), 7336–7356. doi:10.1002/anie.200601554

Shepherd, S. J., Warzecha, C. C., Yadavali, S., El-Mayta, R., Alameh, M.-G., Wang, L., ... Mitchell, M. J. (2021). Scalable mRNA and siRNA Lipid Nanoparticle Production Using a Parallelized Microfluidic Device. *Nano Letters*, 21(13), 5671–5680. doi: 10.1021/acs.nanolett.1c01353

The various phospholipid aggregates. (2023). Phospholipid Research Gate. <https://www.phospholipid-research-center.com/phospholipid/aggregates/>

Thorsen, T., Roberts, R. W., Arnold, F. H., & Quake, S. R. (2001). Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device. *Physical Review Letters*, 86(18), 4163–4166. doi:10.1103/physrevlett.86.4163

Trucillo, P., Campardelli, R., Iuorio, S., De Stefanis, P., & Reverchon, E. (2020). Economic Analysis of a New Business for Liposome Manufacturing Using a High-Pressure System. *Processes*, 8(12), 1604. <https://doi.org/10.3390/pr8121604>

Wang, A., Abdulla, A., & Ding, X. (2019). Microdroplets-on-chip: A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 095441191985091. doi:10.1177/0954411919850912

Wang S, Gou J, Wang Y, Tan X, Zhao L, Jin X, Tang X. Synergistic Antitumor Efficacy Mediated by Liposomal Co-Delivery of Polymeric Micelles of Vinorelbine and Cisplatin in Non-Small Cell Lung Cancer. *Int J Nanomedicine*. 2021 Mar 22; 16:2357-2372. doi: 10.2147/IJN.S290263. PMID: 33790554; PMCID: PMC7997865.

Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101), 368–373. doi:10.1038/nature05058

Wu L, Chen P, Dong Y, Feng X, Liu BF (June 2013). "Encapsulation of single cells on a microfluidic device integrating droplet generation with fluorescence-activated droplet sorting". *Biomedical Microdevices*. 15 (3): 553–60. doi:10.1007/s10544-013-9754-z (<https://doi.org/10.1007/s10544-013-9754-z>). PMID 23404263 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23404263>). S2CID 578099 (<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:578099>).

Xi, H.-D., Zheng, H., Guo, W., Gañán-Calvo, A. M., Ai, Y., Tsao, C.-W., ... Tan, S. H. (2017). Active droplet sorting in microfluidics: a review. *Lab on a Chip*, 17(5), 751–771. doi:10.1039/c6lc01435f

Yang, B., Song, B., Shankar, S., Guller, A., & Deng, W. (2021). Recent advances in liposome formulations for breast cancer therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(13), 5225–5243. doi:10.1007/s00018-021-03850-6

Zhang G, Sun J. Lipid in Chips: A Brief Review of Liposomes Formation by Microfluidics. *Int J Nanomedicine*. 2021; 16:7391-7416 <https://doi.org/10.2147/IJN.S331639>

Zhu, P., & Wang, L. (2017). Passive and active droplet generation with microfluidics: a review. *Lab on a Chip*, 17(1), 34–75. doi:10.1039/c6lc01018k