

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

GENERACIÓN MICROFLUÍDICA DE MICROPARTÍCULAS PARA VEHICULIZAR ACTIVOS CON FUNCIONES BIOLÓGICAS

Autor:

Lic. Robinson Cristian MARENGO

Director de Tesis: **Dr. Claudio Luis Alberto BERLI**

Co-directora de Tesis: **Dra. María Laura OLIVARES**

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC)
CONICET-UNL

-2023-

Dedicada a mi hija Josefina, con el deseo de mostrarle que nunca es demasiado tarde para aprender un poco más.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi gratitud a mis directores el Dr. Claudio Berli y la Dra. María Laura Olivares por sus invaluable aportes, estímulo y guía permanente durante la realización de la Tesis.

Al Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química, por brindarme el espacio y los recursos para la ejecución de las tareas experimentales involucradas en esta Tesis.

Al Grupo Santafesino de Microfluídica por brindarme su experticia y asesoramiento.

A los integrantes del grupo de Ingeniería de Alimentos y Biotecnología: Susana, Guille, Nacho, Richard, Bárbara, Juan Manuel, Dani y Fer. Su constante colaboración y buena predisposición me permitieron desarrollar todas las actividades experimentales previstas. Realizar una Tesis manteniendo otras actividades laborales no hubiese sido posible sin esas ayudas cotidianas y constantes que hicieron que los recursos estuviesen disponibles para mí en mis horarios de trabajos intermitentes.

A la Universidad Nacional del Litoral por el otorgamiento de la Beca de Doctorado para Docentes de UNL Tipo I, que me permitió dedicarme en forma exclusiva durante los dos primeros años, pudiendo realizar todos los cursos de formación de posgrado en este período junto con las primeras etapas de trabajo de Tesis.

Al Liceo Militar General Belgrano, por otorgarme una licencia por dos años en mis tareas docentes, lo cual me permitió dedicarme de lleno a esta actividad.

Al Centro Universitario Gálvez de la Universidad Nacional del Litoral, por facilitar y organizar mis tareas docentes que permitieron optimizar mis tiempos de trabajo.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por la formación de posgrado recibida.

A mi familia, por la paciencia y por los muchísimos fines de semana donde el único plan fue trabajar en esta Tesis.

A mis compañeras de oficina: Agustina, Brenda, Yesi, Florencia, Joana y Federico, por compartir alegrías y frustraciones.

Al Doctor Luciano Mengatto, por todo el apoyo técnico-científico para el desarrollo y optimización de ensayos de liberación de principios activos. Gracias por su calidez humana, ha sido un verdadero gusto trabajar y aprender juntos.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Dr. Emilio Coni" de la ciudad de Santa Fe, de manera especial a la Dra. Marcela López y personal técnico, por su colaboración para la evaluación de la actividad antibacteriana de micropartículas cargadas con isoniazida frente a *Mycobacterium tuberculosis*.

Al Laboratorio de Cultivos de Células del Centro Biotecnológico del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de UNL, en especial a la Dra. Mariana Masín, por la realización de los ensayos de evaluación de citotoxicidad sobre línea celular Caco-2 ante micropartículas encapsuladas con isoniazida y micropartículas con hierro hemínico encapsulado y de evaluación de permeabilidad biológica de hierro encapsulado en membranas de células Caco-2.

A la empresa Yeruva S.A. a través de la Ing. Elisabet Martínez, por la provisión de hemoglobina bovina en polvo e información técnica del producto.

Al Servicio Centralizado de Grandes Instrumentos (SECEGRIN)-CCT Conicet-Santa Fe, por la realización de los ensayos de absorción atómica.

Finalmente, a todas las personas que de alguna manera colaboraron para la concreción de esta Tesis.

APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS

- Marengo, R. C., Olivares, M. L., & Berli, C. L. (2019). Generation of egg white/carrageenan microparticles by droplet-based microfluidics. *Journal of Food Engineering*, 259, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.04.019>
- Marengo, R. C., Mengatto, L. N., Olivares, M. L., & Berli, C. L. (2021). Microfluidics-based encapsulation of isoniazid in egg white/carrageenan microparticles for sustained release. *Food Hydrocolloids for Health*, 1, 100041. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100041>

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	11
RESUMEN	13
ABSTRACT	16
I. Introducción general	19
I.1. Introducción	20
I.2. Encapsulación	20
I.3. Biopolímeros utilizados para encapsulación	22
1.3.1. Materiales a base de carbohidratos	23
1.3.2. Materiales a base de proteínas	23
1.3.3. Materiales a base de lípidos	24
I.4. Métodos de encapsulación	24
I.4.1. Procesos químicos	24
I.4.2. Procesos físico-químicos	25
I.4.3. Procesos mecánicos y físicos	27
I.5. Mecanismos generales de liberación de activos desde los sistemas particulados	29
1.5.1. Disolución	29
1.5.2. Difusión	30
1.5.3. Ósmosis	31
1.5.4. Hinchamiento (<i>Swelling</i>)	32
1.5.5. Erosión	33
I.6. Morfología y tamaño de partículas. Influencia en aplicaciones	35
I.7. Interacciones entre proteínas y polisacáridos	37
1.7.1 Naturaleza de los biopolímeros	37
1.7.2. pH y fuerza iónica	38
1.7.3. Temperatura	38
1.7.4. Relaciones de mezcla y concentración	38
I.8. Sistemas microfluídicos para liberación controlada de activos	40
I.8.1. Breve historia de la microfluídica y conceptos básicos asociados al flujo en microcanales	40
I.8.2. Beneficios en la reducción del tamaño y la automatización	41
I.8.3. Motivación de estudio: generación microfluídica	

de micropartículas para vehicular activos con funciones biológicas	42
II. Objetivos	44
II.1. Objetivo general	45
II.2. Objetivo específico	45
Capítulo 1: Diseño, fabricación y puesta a punto de dispositivos microfluídicos para la generación de micropartículas.	46
1.1. Introducción	47
1.1.1. Fundamentos de la generación de microgotas	47
1.1.2. Fabricación de dispositivos microfluídicos: Materiales y métodos.	51
1.1.3. Sistemas de bombeo	56
1.1.4. Conectores	57
1.2. Objetivos parciales	58
1.3. Materiales y métodos	58
1.3.1. Construcción de dispositivos microfluídicos	58
1.3.2. Ensayos de funcionamiento de los dispositivos	60
1.3.3. Optimización de regímenes de flujo para la obtención de microgotas	60
1.4. Resultados y discusión	61
1.5. Conclusiones parciales	69
Capítulo 2: Generación de micropartículas de clara de huevo/ κ-carragenato con dispositivos microfluídicos	71
2.1. Introducción	72
2.1.1. Conceptos generales asociados a proteínas constitutivas del huevo de gallina	72
2.1.2. Estructura general del huevo	72
2.1.3. Proteínas mayoritarias presentes en la EW	73
2.1.4. Propiedades tecnofuncionales asociadas a las proteínas de EW	75
2.1.5. Propiedades benéficas para la salud de distintos constituyentes del huevo	76
2.1.6. Conceptos generales asociados a carragenatos	78

2.1.7. Soluciones compuestas por EW y CG	80
2.2. Objetivos parciales	82
2.3. Materiales y métodos	82
2.3.1. Materiales	82
2.3.2. Fabricación del dispositivo microfluídico	82
2.3.3. Preparación de la FD	83
2.3.4. Caracterización de la FD y la FC	84
2.3.5. Generación de micropartículas	85
2.3.6. Curado de micropartículas	85
2.3.7. Medición del tamaño de las micropartículas	85
2.3.8. Análisis de estabilidad de partículas y retención de colorante	85
2.3.9. Estudio de liberación del principio activo hidrofílico	86
2.4. Resultados y discusión	86
2.4.1. Mezcla de proteína-polisacárido	86
2.4.2. Generación microfluídica de partículas proteína-polisacárido	87
2.4.3. Tamaño de las partículas y distribución del tamaño de las partículas	89
2.4.4. Análisis de liberación del principio activo hidrofílico	91
2.5. Conclusiones parciales	92

Capítulo 3: Aplicación farmacológica de las micropartículas:

Encapsulación de isoniazida	94
3.1. introducción	95
3.1.1. Tuberculosis	95
3.2. Objetivos parciales	97
3.3. Materiales y métodos	97
3.3.1. Materiales	97
3.3.2. Dispositivos microfluídicos	98
3.3.3. Preparación de las soluciones	98
3.3.4. Generación de micropartículas	99
3.3.5. Curado de micropartículas	100
3.3.6. Caracterización de micropartículas	100
3.3.7. Ensayos de liberación	101
3.3.8. Ensayo de estabilidad de RIF en presencia de INH	101

3.3.9. Evaluación de actividad antibacteriana de micropartículas con INH encapsulada	102
3.3.10. Evaluación de citotoxicidad celular de células Caco-2 ante micropartículas con INH	102
3.4. Resultados y discusión	104
3.4.1. Generación de micropartículas con INH encapsulada	104
3.4.2. Espectroscopía IR de partículas de EW/CG con INH encapsulada	109
3.4.3. Liberación de INH	110
3.4.4. Ensayo de estabilidad de RIF en presencia de INH	113
3.4.5. Evaluación de actividad antibacteriana de INH	114
3.4.6. Evaluación de citotoxicidad celular de células Caco-2 ante micropartículas con INH encapsulada	115
3.5. Conclusiones parciales	116

Capítulo 4: Aplicación nutricional de las micropartículas: Encapsulación de hemoglobina en polvo como fuente de hierro hemínico

Capítulo 4: Aplicación nutricional de las micropartículas: Encapsulación de hemoglobina en polvo como fuente de hierro hemínico	117
4.1. Introducción	118
4.1.1. Déficit de hierro	118
4.2. Objetivos parciales	120
4.3. Materiales y métodos	121
4.3.1. Materiales	121
4.3.2. Dispositivo microfluídico	121
4.3.3. Preparación de la FD	121
4.3.4. Generación de micropartículas	121
4.3.5. Curado de micropartículas	122
4.3.6. Caracterización de micropartículas	122
4.3.7. Ensayos de liberación	122
4.3.8. Evaluación de citotoxicidad celular de células Caco-2 ante micropartículas con Hmg encapsulada	123
4.3.9. Evaluación de la permeabilidad biológica de hierro encapsulado en membranas de células Caco-2.	124
4.4. Resultados y discusión	126
4.4.1. Generación de micropartículas con Hmg	

en polvo encapsulada.	126
4.4.2. Liberación de hierro	127
4.4.3. Evaluación de citotoxicidad celular de células Caco-2 ante micropartículas con Hmg encapsulada	129
4.4.4. Evaluación de la permeabilidad biológica de hierro en membranas de células Caco-2	129
4.5. Conclusiones parciales	130
Conclusión	131
Apéndices	135
A1. Determinación de parámetros reológicos para caracterización de la FD	136
A2. Estabilidad y liberación de colorante amarillo ocaso en FD y en FC.	138
A3. Metodología RP-HPLC para cuantificación de INH	140
A4. Determinación del contenido de Fe	142
Bibliografía	144

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Listado de símbolos

Símbolo	Definición
Re	Número de Reynolds
ρ	Densidad [Kg.m^{-3}]
d	Longitud característica ó diámetro hidráulico [m]
u	Velocidad media aparente del fluido [m.s^{-1}]
η	Viscosidad dinámica del fluido [Pa.s]
A	Sección transversal del canal [m^2]
D_w	Perímetro mojado del canal [m]
Ca	Número capilar
γ	Tensión interfacial [N.m^{-1}]

Listado de abreviaturas

Abreviatura	Definición
pH	- logaritmo de la concentración de hidrogeniones
AA	Absorción atómica
Ec	Ecuación
EW	Clara de huevo filtrada
AO	Colorante amarillo ocaso
W/O	Emulsión de agua en aceite
O/W	Emulsión de aceite en agua
IR	Espectroscopia Infrarroja
FC	Fase continua
FD	Fase dispersa ó Fase discreta
FES	Fase entrecruzante y surfactante
Hmg	Hemoglobina bovina en polvo
Fe	Hierro
FeH	Hierro Hemínico
FeNH	Hierro no hemínico
INH	Isoniazida
LoC	Laboratorio en chip (<i>Lab on chip</i>)
pK_a	-logaritmo de la constante ácida.

MA	Macrófago alveolar.
μm	Micrómetro
MW	Microondas.
MT	Mycobacterium tuberculosis
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PVA	Alcohol polivinílico.
PA	Principio Activo
PAs	Principios activos
pI	Punto isoeléctrico
RIF	Rifampicina
TB	Tuberculosis
TBPA	Tuberculosis pulmonar activa.
p/v	Unidad de concentración de peso en volumen
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana.
CG	κ-carragenato
PDMS	Poli dimetil siloxano
PMMA	Polimetacrilato de metilo
MEMS	Sistemas microelectromecánicos

RESUMEN

El interés y el uso de partículas micrométricas ha ido creciendo con la posibilidad de elaborar sistemas funcionales, diseñados para cumplir un rol específico en determinadas operaciones, como transporte y liberación de compuestos nutricionales y/o farmacológicos y una larga serie de aplicaciones que exceden las áreas de salud y alimentación. Como alternativa a las clásicas técnicas de encapsulación, la técnica microfluídica utiliza las ventajas de la miniaturización para confinar el flujo en microcanales, abriendo la posibilidad de realizar la encapsulación de principios activos (PA) en partículas, capsulas o gotas de tamaño micrométrico bajo condiciones altamente controladas. Este procedimiento permite el control sobre la cantidad de material encapsulado y sobre la composición química del material constituyente de la micropartícula. Así, la obtención de partículas altamente funcionalizadas, homogéneas y de tamaños controlados emerge como una propuesta superadora para la incorporación y liberación de activos.

En este trabajo de Tesis, con el objetivo de generar micropartículas capaces de encapsular PA con funciones biológicas, se diseñaron y desarrollaron dispositivos microfluídicos sobre placas de polimetacrilato de metilo (PMMA), donde los microcanales y orificios para entrada y salida de fluidos, se grabaron mediante ablación láser. La generación de micropartículas requirió primeramente de la formación de microgotas haciendo confluir líquidos inmiscibles en microcanales con junturas en forma de T, o de X (cruz), cuyas secciones características están en el rango de 50-500 μm . Uno de los fluidos consistió en una solución biopolimérica (fase dispersa, FD), y el otro consistió en aceite de oliva (fase continua, FC). El mecanismo de formación de la gota depende de la competencia entre la tensión impuesta por el flujo de la FC y la tensión interfacial. Para estas pruebas de concepto se utilizó una solución de alginato sódico 1.5 % p/v como FD. Se estudiaron los procesos de formación de gotas en dispositivos con ambos tipos de juntura, observándose que la juntura en cruz mostró una mayor estabilidad de flujo, facilitando su puesta en régimen y mantenimiento del funcionamiento durante varias horas.

Con estas consideraciones, se evaluó la capacidad de los dispositivos para generar microgotas y encapsular un PA hidrofílico modelo (colorante amarillo ocaso) utilizando una FD compuesta por una mezcla de proteínas de clara de huevo y κ -carragenato (EW/CG) dentro de la cual se disolvió el PA. Se obtuvieron micropartículas capaces de retener el PA por tratamiento de las microgotas mediante un método de curado o entrecruzamiento físico (microondas) y otro químico (glutaraldehído), y se analizó la capacidad de liberación del PA en medio acuoso. Se observó que se pueden

obtener diferentes cinéticas de liberación según el método de entrecruzamiento utilizado, lo cual ofrece un gran potencial para diseñar micropartículas.

Seguidamente los dispositivos microfluídicos diseñados se utilizaron para la encapsulación de dos PA: Isoniazida (INH), antibiótico de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis y hemoglobina bovina en polvo, como fuente de hierro hemínico, utilizado en suplementos nutricionales.

Para la encapsulación de INH se utilizaron dos dispositivos microfluídicos, uno con junta en simple cruz y otro con junta en doble cruz. Para la generación de micropartículas utilizando el dispositivo con junta en doble cruz se utilizó una FC de aceite de oliva, una FD compuesta de una solución de alginato sódico 2 % p/v y una fase con el rol de agente entrecruzante y surfactante formada por cloruro de calcio 2 % p/v disuelto en solución de polivinil alcohol 2 % p/v. Con esta metodología se obtuvieron micropartículas homodispersas y con buena esfericidad, capaces de entrapar el antibiótico, pero con baja retención del mismo. Para la generación de micropartículas utilizando el dispositivo con junta en simple cruz se utilizó una FC de aceite de oliva y una FD compuesta EW/CG. De esta manera se obtuvieron microgotas esféricas, monodispersas y altamente estables que lograron retener el PA. Las microgotas obtenidas con esta última metodología se curaron por irradiación con microondas aplicando dos potencias diferentes, 270 W y 900 W. La potencia de irradiación aplicada permitió modificar los perfiles de liberación de INH en soluciones *buffers* utilizadas frecuentemente para imitar condiciones de pH del estómago y del íleon. Una de las combinaciones de medicamentos más utilizadas en el tratamiento de la tuberculosis es la de Rifampicina (RIF) con INH. Sin embargo, se ha reportado que, en medio ácido, RIF se hidroliza y esta acción se acelera en presencia de INH. En tal sentido, se realizó un ensayo de estabilidad de RIF en presencia de INH, observándose una menor degradación de RIF cuando la INH se encontró encapsulada. Finalmente, la evaluación de actividad antibacteriana mostró que la INH encapsulada conserva su actividad luego de ser liberada desde las micropartículas y ensayos de evaluación de citotoxicidad celular sobre línea celular Caco-2 ante micropartículas con INH mostraron que se podrían utilizar de forma segura formulaciones con este PA en concentraciones menores a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ya que causan una reducción de la viabilidad celular inferior al 30 %.

Para la encapsulación de hemoglobina en polvo como fuente de hierro hemínico se utilizó también el dispositivo con junta en simple cruz, una FC de aceite de oliva y una FD compuesta EW/CG. Las microgotas se curaron por irradiación con microondas aplicando una potencia de 900 W. Se obtuvieron micropartículas con alta esfericidad y homodispersidad, que cargaron y retuvieron el PA. El ensayo de liberación permitió

evaluar la capacidad del sistema para retener el PA y liberarlo en condiciones de pH gastrointestinales simuladas, aunque en un bajo porcentaje. La viabilidad de la línea celular Caco-2 expuesta a estas micropartículas fue del 100 %. Finalmente, un ensayo de permeabilidad celular en línea celular Caco-2 mostró que parte del hierro encapsulado y luego liberado desde las micropartículas puede ser permeado a través de la mucosa intestinal para luego ser utilizado por las células, aunque de una manera poco eficiente.

Mediante estos estudios, se puede concluir finalmente que la versatilidad del proceso microfluídico para controlar las condiciones de funcionamiento permite la generación de micropartículas funcionales para diferentes aplicaciones tecnológicas.

ABSTRACT

The interest and use of micrometric particles has been growing with the possibility of developing functional systems, designed to fulfill a specific role in certain operations, as transport and release of nutritional and/or pharmacological compounds and a long range of applications exceeding the areas of health and nutrition. As an alternative to classic encapsulation techniques, the microfluidic technique uses the advantages of miniaturization to confine the flow in microchannels, opening the possibility of encapsulation of active principles (PA) in particles, capsules or droplets of micrometric size under highly controlled conditions. This procedure allows control over the quantity of encapsulated material and the chemical composition of the constituent material of the microparticle. Thus, obtaining highly functionalized, homogeneous particles of controlled sizes emerges as a superior proposal for the incorporation and release of actives.

In this Thesis work, in order to generate microparticles capable of encapsulating PA with biological functions, microfluidic devices were designed and developed on plates of methyl polymethacrylate (PMMA), where microchannels and holes for fluid input and output were recorded by laser ablation. The generation of microparticles first required the formation of microdrops by bringing together immiscible liquids in microchannels with T-shaped junctions, or X-shaped junctions (cross), whose characteristic sections are in the range of 50-500 μm . One of the fluids consisted of a biopolymer solution (dispersed phase, FD), and the other consisted of olive oil (continuous phase, FC). The mechanism of formation of the drop depends on the competition between the tension imposed by the flow of the FC and the interfacial tension. For these concept tests, a solution of 1.5 % p/v sodium alginate was used as FD. The processes of formation of drops in devices with both types of junction were studied, observing that the cross junction showed a greater stability of flow, facilitating its implementation and maintenance of operation for several hours.

With these considerations, the ability of the devices to generate microdrops and encapsulate a model hydrophilic PA (sunset yellow dye) was evaluated using an FD composed of a mixture of egg white and κ -carragenate (EW/CG) proteins into which the PA was dissolved. Microparticles capable of retaining the PA were obtained by applying a physical (microwave) and a chemical (glutaraldehyde) curing or cross-linking method, and the release capacity of PA in aqueous medium was analyzed. It was observed that different release kinetics can be obtained according to the crossover method used, which offers great potential for designing microparticles.

Then the microfluidic devices designed were used for the encapsulation of two PAs: Isoniazid (INH), a first-line antibiotic for the treatment of tuberculosis and bovine hemoglobin powder, as a source of hemic iron, used in nutritional supplements.

Two microfluidic devices were used for INH encapsulation, one with a single cross joint and the other with a double cross joint. For the generation of microparticles using the device with double cross junction an olive oil FC was used, a FD consisting of a solution of sodium alginate 2% w/v and a phase with the role of cross-crossing agent and surfactant formed by calcium chloride 2% w/v dissolved in a solution of polyvinyl alcohol 2% w/v. With this methodology homodispersed microparticles were obtained with good sphericity, able to entrap the antibiotic, but with low retention. For the generation of microparticles using the single cross joint device, an olive oil FC and a EW/CG solution FD were used. In this way, spherical, monodispersed and highly stable microdroplets were obtained that retained the PA. The microdrops obtained with this last methodology were cured by microwave irradiation applying two different powers, 270W and 900W. The applied irradiation power allowed modifying INH release profiles in buffers frequently used to mimic stomach and ileum pH conditions. One of the most commonly used drug combinations in the treatment of tuberculosis is Rifampicin (RIF) with INH. However, it has been reported that in acid medium, RIF is hydrolyzed and this action is accelerated in the presence of INH. In this sense, a RIF stability test was performed in the presence of INH, and a lower degradation of RIF was observed when INH was encapsulated. Finally, the evaluation of antibacterial activity showed that encapsulated INH retains its activity after being released from microparticles and cell line cytotoxicity evaluation assays Caco-2 exposed to microparticles with INH showed that formulations with this PA could be safely used in a concentration in concentrations lower than $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, since they cause a reduction in cell viability less than 30%.

For the encapsulation of hemoglobin powder as a source of hemic iron, the device with a simple cross joint, an olive oil FC and a compound FD EW/CG were also used. The microdrops were cured by microwave irradiation applying a power of 900 W. Microparticles with high sphericity and homodispersity were obtained, which included and retained the PA. The release test allowed to evaluate the ability of the system to retain the PA and release it under simulated gastrointestinal pH conditions, although in a low percentage. The viability of the Caco-2 cell line exposed to these microparticles was 100%. Finally, a Caco-2 cell line cell permeability assay showed that some of the iron encapsulated and then released from the microparticles can be permeated through the intestinal mucosa and then used by the cells, although in an inefficient manner.

Through these studies, it can finally be concluded that the versatility of the microfluidic process to control operating conditions allows the generation of functional microparticles for different technological applications.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. Introducción

Lo avances y adaptaciones de distintas tecnologías orientadas a incorporar nuevos principios activos (PAs) en alimentos y productos farmacéuticos se tornaron en un gran desafío, dado que en muchos casos la adición en forma directa de estos PAs es impracticable, genera efectos indeseables en la matriz encapsulante o en las propiedades organolépticas del producto al que se desea agregar, se degrada durante el tiempo de almacenamiento, como consecuencia de las condiciones fisicoquímicas que debe atravesar durante su manufactura, o presenta baja eficacia durante su aplicación in vivo. Las principales razones de estos resultados según sea el principio activo (PA) seleccionado, podrían deberse a la baja solubilidad de muchos de ellos, tanto en medios hidrofílicos como lipofílicos, una inadecuada concentración o alta toxicidad bioactiva y/o terapéutica (Haag & Kratz, 2006; Kakkar et al., 2017). En este contexto, surge la encapsulación como alternativa tecnológica para solucionar estos problemas, dando lugar al diseño de nuevos alimentos y a una nueva generación de productos farmacéuticos y biotecnológicos más eficaces. Más aún, la aplicación de esta técnica se ha extendido en campos tan diversos como la agricultura, la cosmética, insumos médicos, etc.

Como alternativa a las técnicas clásicas de encapsulación, la técnica microfluídica utiliza las ventajas de la miniaturización para confinar el flujo en microcanales, abriendo la posibilidad de realizar la encapsulación de PAs en partículas, capsulas o gotas de tamaño micrométrico bajo condiciones altamente controladas. Este procedimiento permite el control sobre la cantidad de material encapsulado y sobre la composición química del material constituyente de la micropartícula. Así, la obtención de partículas altamente funcionalizadas, homogéneas y de tamaños controlados emerge como una propuesta superadora para la incorporación y liberación de PAs (Dietzel, 2016; Li et al., 2019).

En este capítulo se presenta una descripción de los distintos tópicos requeridos para abordar este trabajo de Tesis. Se realiza una descripción de distintas técnicas de encapsulación y materiales encapsulantes más utilizados, de las interacciones entre los biopolímeros utilizados y las versatilidades que presenta la técnica microfluídica.

I.2. Encapsulación

La encapsulación es un proceso en el que el PA de interés, sea sólido, líquido o gaseoso es incorporado dentro de un material portador homogéneo o heterogéneo (membrana, cáscara, matriz, fase externa) para formar partículas o cápsulas a escala micrométrica o nanométrica con propiedades específicas.

Entre los materiales de recubrimiento, los polisacáridos, lípidos y proteínas son los más utilizados para la encapsulación en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas, debiéndose seleccionar cuidadosamente, ya que de ellos dependerán aspectos estructurales y funcionales como la solubilidad, las propiedades interfaciales, la capacidad de gelificación y factores económicos como el costo y su disponibilidad (Timilsena et al., 2020).

El proceso de encapsulación puede ser categorizado en función del tamaño de las partículas resultantes como: nanopartículas ($< 0.2 \mu\text{m}$), micropartículas ($0.2\text{-}5000 \mu\text{m}$) y macropartículas ($> 5000 \mu\text{m}$) (Da Silva et al., 2014; Dietzel, 2016; Geczy, 2016). El término partícula hace referencia tanto a esferas como cápsulas. Sin embargo, ambos sistemas se diferencian por su morfología y estructura interna. Las esferas son sistemas de tipo matricial, donde el PA se encuentra disperso en un material que no es posteriormente recubierto. Por otro lado, las cápsulas son sistemas tipo reservorio, constituidas por un núcleo (líquido, semisólido o sólido) donde se encuentra el PA, rodeado por una cubierta externa que lo envuelve y protege (Brignone et al., 2020).

Como se mencionó anteriormente, como tecnología, la encapsulación reviste interés en una amplia gama de disciplinas, encontrándose en constante evolución y adaptación a nuevos desafíos, limitada sólo por la naturaleza de los PA, las propiedades físicas y químicas del material de cobertura y las propiedades deseadas del producto final en función de su uso previsto (Alu'datt et al., 2022). Su potencial radica en la posibilidad de protección de los PAs de condiciones físicas, químicas o fisiológicas adversas que pudieran modificar su estabilidad, hicieran perder su viabilidad, favorecieran su oxidación, como así también, la posibilidad de separar aquellos componentes incompatibles y la capacidad de enmascaramiento de olores, colores y sabores (Borgogna et al., 2010; Devi et al., 2017; Timilsena et al., 2020).

El tamaño del sistema encapsulante de PAs afecta su modo óptimo de administración y sus propiedades de biodistribución. Un gráfico simplificado de diámetros de partículas aproximados para su utilización por diferentes vías de administración se muestra en la Figura 1. Las partículas submicrónicas son requeridas para tecnologías de aplicación intravenosa, utilizándose a menudo, por ejemplo, para el diagnóstico por imágenes (Slack et al., 1981).

Las nanopartículas ligeramente más grandes (50 - 200 nm de diámetro) tienden a ser de larga circulación y particularmente apropiadas para tratamientos sobre distintos órganos y tejidos (Ernsting et al., 2013). Los regímenes de tamaño mayor al micrón se utilizan principalmente para la administración intramuscular/subcutánea o inhalación. Para la administración intramuscular, los diámetros de las partículas se sitúan entre 0,5-

5 μm , aunque los resultados muestran que 0,5-1 μm produce el nivel más bajo de daño muscular (Kanke et al., 1980) y puede ser el tamaño óptimo. Para la inhalación de aerosoles, el diámetro de partícula determina el sitio de deposición dentro del tracto respiratorio. Las partículas más pequeñas (1-5 μm de diámetro) se depositan en los bronquios y los alvéolos, mientras que las partículas más grandes (entre 8-20 μm) se depositan en el tracto respiratorio superior, a menudo en la garganta y la cavidad nasal (Labiris & Dolovich, 2003). Por último, las partículas más grandes, de cientos de micrones, son adecuadas para la administración oral o localizada (Luppi et al., 2010, Geczy, 2016; Cooper & Yang, 2019).

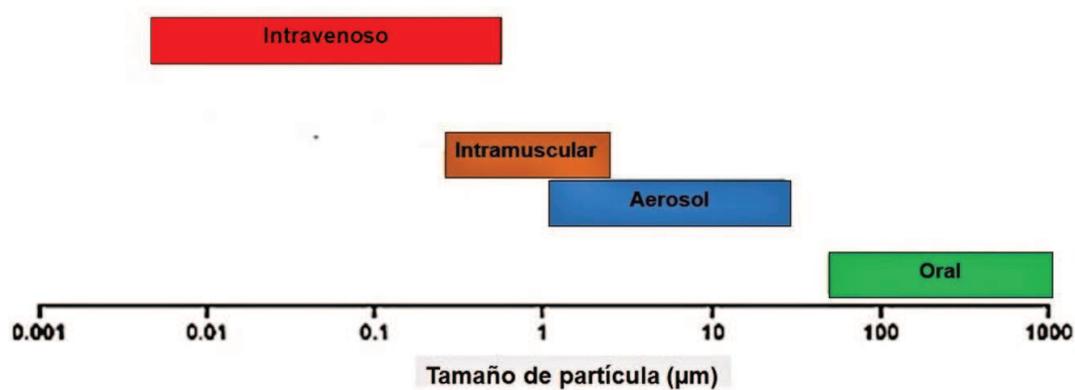


Figura 1: Diámetros de partículas aproximados utilizados en diferentes vías de administración (Figura modificada de Geczy, 2016; Danaei et al., 2018).

Este detalle permite poner en contexto los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, dado que las partículas obtenidas con los dispositivos microfluídicos diseñados serían factibles para aplicaciones de administración oral. En tal sentido, la caracterización realizada a las mismas cubre algunas condiciones de esta vía de administración.

I.3. Biopolímeros utilizados para encapsulación

Se pueden utilizar numerosos materiales encapsulantes, entre ellos se destacan los carbohidratos, las proteínas, los lípidos y algunos polímeros especiales con capacidades específicas (ej. ácido poli láctico co-glicólico, PLGA). En la mayoría de los casos son satisfactorios para uso en el tracto gastrointestinal, disolviéndose según el grado de reticulación y las condiciones del medio.

La selección del material encapsulante adecuado determina las propiedades físicas y químicas de las micropartículas resultantes. Al seleccionar un polímero, se deben tener en cuenta los requisitos del producto a diseñar, es decir, la estabilización,

la reducción de la volatilidad, las características de liberación, las condiciones ambientales, etc.

El polímero debe ser químicamente compatible y no reactivo con el PA y proporcionar las propiedades de encapsulación deseadas, como resistencia, flexibilidad, impermeabilidad, propiedades ópticas y estabilidad. Se utilizan generalmente polímeros hidrofílicos, polímeros hidrofóbicos o una combinación de ambos ([Peanparkdee et al., 2016](#); [Timilsena et al., 2020](#)).

1.3.1. Materiales a base de carbohidratos

El almidón y algunos de sus derivados (maltodextrina, dextrina, ciclodextrina y polidextrosa), así como derivados de la celulosa (metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa) tienen importantes capacidades como encapsulantes y no son digeribles por muchos organismos. Por lo tanto, pueden usarse para inhibir el crecimiento de hongos, como se muestra en un estudio de la metilcelulosa para encapsulación de aceites esenciales de plantas ([Hossain et al., 2019](#)), y también, de la hidroxipropilcelulosa para encapsular fosfatasa alcalina ([Karewicz et al., 2014](#)).

Entre los exudados y extractos de plantas disponibles comercialmente, la goma arábica es el exudado vegetal más común para encapsular PAs ([Nussinovitch, 1997](#)). Los extractos marinos, como, por ejemplo, carragenatos y alginatos, se originan principalmente de algas pardas, aunque también pueden ser sintetizados por algunas bacterias como material extracelular ([Zhang et al., 2016](#)). Los polisacáridos microbianos y animales, como, por ejemplo, xantano, gellan, dextrano y quitosano, también son adecuados para ciertas aplicaciones, pero deben evitarse en productos veganos. El uso generalizado de estos materiales encapsulantes en los sistemas alimentarios y farmacéuticos se debe a sus propiedades esenciales, tales como no toxicidad, buena estabilidad, biodegradabilidad, bioaccesibilidad, así como también presentar un costo relativamente bajo ([Fathi et al., 2014](#); [Assadpour & Jafari, 2019](#)).

1.3.2. Materiales a base de proteínas

La capacidad de gelificación y de formación de películas de las proteínas, las hacen muy buenos materiales encapsulantes. Entre las más utilizadas, se destacan las de soja, maní y trigo (proteínas vegetales), a pesar de las limitaciones significativas debido a la alergenicidad y la sensibilidad al gluten (enfermedad celíaca) que pueden presentar algunas personas ([Damodaran, 2005](#)) y las provenientes de huevo, lactosuero, caseínas y gelatina. Su aplicación es muy amplia, incluyendo, entre ellas la

encapsulación de probióticos, células, ácidos grasos, antioxidantes, aromatizantes y antibióticos (Eratte et al., 2015; Ghasemi et al., 2017; Assadpour & Jafari, 2019).

1.3.3. Materiales a base de lípidos

Algunos compuestos lipídicos como los fosfolípidos, glicéridos, ceras y ácidos grasos se pueden utilizar para encapsular sustancias tanto hidrofílicas como lipofílicas (Păvăloiu et al., 2021). Se presentan como una alternativa de relevancia debido a la solubilidad mejorada en alimentos que contienen lípidos, su alta biodisponibilidad y la capacidad para liberación controlada de PAs (Akhavan et al., 2018).

1.4. Métodos de encapsulación

Existen varios métodos de encapsulación, especialmente para la micro y nanoencapsulación, dependiendo de la naturaleza del PA y de su aplicación final, sea en alimentos, productos farmacéuticos, agricultura, textiles, papel y otras industrias relacionadas (Mohammadian et al., 2020).

La complejidad de los métodos es variable y en muchos casos suelen solaparse las técnicas, pero en forma general las distintas metodologías implican encerrar un PA por generación de esferas o cápsulas o mediante la formación de una emulsión que lo contenga. En algunos casos luego se someten a secado para facilitar su manipulación y almacenamiento. En general, pueden clasificarse en métodos químicos, fisicoquímicos, electrostáticos o mecánicos/físicos (Noore et al., 2021).

El diseño y funcionamiento adecuado de los sistemas de encapsulación requiere una comprensión fisicoquímica de los mecanismos de encapsulación, la posible interacción de los PA con las matrices encapsulantes, su estabilidad y el comportamiento de liberación.

Entre los métodos clásicos de encapsulación se mencionan a continuación los más utilizados dentro de cada clasificación.

1.4.1. Procesos químicos

Polimerización interfacial

En este proceso se utilizan dos monómeros, uno soluble en aceite y otro soluble en agua, que posteriormente reaccionan en la interfaz de la FD y FC de un sistema de emulsión agua en aceite (W/O) produciéndose, a ese nivel, una reacción de policondensación en la superficie del PA provocando la formación de microcápsulas o microesferas (Brignone et al., 2020).

En general, el PA, en función de su solubilidad, se encuentra dispersado en una de las dos fases que contienen uno de los monómeros en disolución. Existen reportes sobre la obtención de microesferas de ácidos carboxílicos por polimerización interfacial, lo que las convierte en candidatas promisorias de su aplicación para bioseparación, liberación de fármacos y biocatálisis ([Lopretti et al., 2007](#)).

Inclusión molecular

La inclusión molecular es definida como una nueva asociación supramolecular de un ligando (material encapsulado) dentro de un sustrato con una cavidad (agente encapsulante) por enlaces de hidrógeno y/o fuerzas de van der Waals. La ciclodextrina es uno de los materiales encapsulantes más utilizados, sobre todo para proteger saborizantes y otros ingredientes termolábiles en los alimentos, vitaminas y aceites ([Hill et al., 2013](#)).

I.4.2. Procesos físico-químicos

Emulsificación. Evaporación de solvente.

La emulsificación es una técnica muy utilizada en la industria alimentaria y básicamente consiste en la dispersión de un líquido en otro, pudiéndose obtener gotas que oscilan entre 0,1 y 100 μm . La generación de una sola emulsión es bastante simple y solo requiere la mezcla de dos fases inmiscibles: una fase dispersa (a menudo un solvente orgánico) con una fase continua (a menudo una solución tensioactiva acuosa).

La metodología fundamental para obtener cualquiera de los regímenes de tamaño (micro/nano emulsiones) es la misma, aunque los diferentes niveles de "energía" (agitación, ultrasonido) y el diseño del reactor, permitirán lograr el tamaño deseado.

En forma general, las emulsiones pueden clasificarse según la organización de las fases de aceite y agua. Existen dos tipos de procesos generales: emulsiones de agua / aceite y emulsiones de aceite / agua, aunque se puede hacer una emulsión donde los dos tipos de emulsiones estén relacionados y se le llama doble emulsión, por ejemplo, agua / aceite / agua ([de Souza Simões et al., 2017](#)). El PA que se desea encapsular se adiciona en el sistema de gotas obtenido.

En algunos sistemas, se pueden generar gotas en la emulsión que luego se polimerizan generando partículas. En estos casos, muchas veces luego se procede a evaporar el solvente o fase continúa de la emulsión para obtener partículas sólidas y secas.

Coacervación/Separación de fases.

La coacervación es la separación en dos fases líquidas en sistemas coloidales. La fase más concentrada en el componente coloidal es el coacervado y la otra fase es la solución de equilibrio. La separación en fase asociativa de dos polímeros en el agua ocurre si hay una atracción electrostática.

La microencapsulación por coacervación generalmente consta de tres pasos realizados bajo agitación continua: (a) formación de tres fases químicas inmiscibles, (b) deposición de revestimiento y (c) rigidización del revestimiento. Suele clasificarse la metodología en dos categorías: coacervación simple y coacervación compleja.

La primera implica la adición de una sustancia fuertemente hidrofílica a una solución de coloide dando origen a dos fases. La coacervación compleja es principalmente un proceso dependiente del pH y es causada por la interacción de dos coloides de carga opuesta. La naturaleza ácida o básica del sistema debe ser manipulada para producir microcápsulas. Por encima de un cierto valor crítico de pH, el sistema dependiendo de su naturaleza ácida o básica puede producir microcápsulas. Por debajo de ese valor de pH no se formarán. Generalmente la coacervación compleja trata con el sistema que contiene más de un coloide ([de Kruif et al., 2004](#); [Devi et al., 2017](#); [Timilsena et al., 2019](#)).

En especial, los coacervados complejos formados por interacciones proteína/polisacárido, son ideales para encapsular PAs y para el desarrollo de sistemas de liberación desde los mismos, ya que se encuentran frecuentemente involucrados en procesos fisiológicos. Esta condición, hace mejorar la biodisponibilidad de los PAs y minimizar posibles efectos secundarios ([Singh et al., 2010](#)).

Atrapamiento por liposomas

Los liposomas son vesículas lipídicas esféricas con un diámetro comprendido entre 50-500 nm. Están compuestos de una o más bicapas lipídicas, como resultado de la emulsión de lípidos naturales o sintéticos en un medio acuoso ([Lopretti et al, 2007](#); [Jha et al., 2016](#)).

Los liposomas son muy utilizados en nanomedicina debido principalmente a su biocompatibilidad, estabilidad, facilidad de síntesis, alta eficiencia de carga de PAs y alta biodisponibilidad ([Hafner et al., 2014](#)). Debido a su tamaño, características hidrofóbicas e hidrofílicas y su capacidad para encapsular PAs en el interior acuoso de las vesículas o en la membrana lipofílica, se utilizan eficazmente como sistemas de administración de PAs ([Bulbake et al., 2017](#)).

En la actualidad y en concomitancia con los métodos clásicos de obtención de liposomas (Hidratación de película delgada o método de Bangham, evaporación en fase reversa, inyección de solvente, etc.) (Pradhan et al., 2015) se está utilizando el método microfluídico. En este método, los lípidos se disuelven en etanol o isopropanol, y la solución resultante se inyecta en posición vertical o en la dirección opuesta al medio acuoso dentro de los microcanales. Este método implica la mezcla axial continua de las soluciones orgánicas y acuosas y conduce a la formación de liposomas. Los liposomas se estabilizan utilizando tensioactivos para evitar la coagulación y la separación. El método microfluídico controla el proceso de mezcla de fases orgánicas y acuosas para lograr liposomas reproducibles con un tamaño medio adecuado, buena polidispersidad, morfología (Gkionis et al., 2021).

I.4.3. Procesos mecánicos y físicos

Revestimiento de lecho fluidizado/suspensión neumática.

El revestimiento de lecho fluidizado y suspensión neumática desarrollado por D.E. Wurster en la década de 1950, también se denomina proceso Wurster y puede utilizarse mediante tipos diferentes de técnicas: pulverización superior, pulverización inferior y lecho fluidizado de fusión en caliente; el revestimiento de capa superior se considera el proceso más viable, por razones técnicas y económicas, para la aplicación industrial.

El método consiste en la preparación de la solución de revestimiento, la fluidización del material del núcleo como partículas/comprimidos/gránulos, el recubrimiento de las partículas del núcleo y posterior secado mediante aire circulante para producir una fina capa de revestimiento uniforme alrededor del material del núcleo.

Se utiliza comúnmente para el recubrimiento secundario de productos ya encapsulados con el propósito de mejorar su estabilidad (Timilsena et al., 2020).

Secado por aspersion (spray) y congelación por pulverización.

Son técnicas muy efectivas y permiten obtener productos con morfologías regulares y tamaños de partícula que van de 100 a 1000 nm para nanocápsulas y de 1 a 1000 μm para microcápsulas (Piñón-Balderrama et al., 2020, Neves et al., 2021).

Debido a ciertas similitudes de los dos procesos, se discuten juntos. Los procesos de secado por aspersion y de congelación por pulverización son similares en el sentido de que ambos implican dispersar el material del núcleo en una sustancia de recubrimiento licuado y rociar o introducir la mezcla de revestimiento del núcleo en

alguna condición especial, por lo que se ve afectada la solidificación relativamente rápida del revestimiento.

La principal diferencia entre los dos métodos es la solidificación del revestimiento. La solidificación del revestimiento en caso de secado por pulverización se ve afectada por la rápida evaporación de un disolvente en el que el material de revestimiento se disuelve, mientras que en el congelamiento por pulverización se logra mediante el congelamiento térmico de un material de revestimiento fundido o solidificando un revestimiento disuelto por la introducción de la mezcla de material del núcleo de revestimiento en un no disolvente. Las limitaciones de la técnica incluyen una eficiencia de encapsulación relativamente baja y la posibilidad de pérdidas de ingredientes activos durante el almacenamiento (Laohasongkram et al., 2011; Favaro-Trindade et al., 2021).

Recubrimiento en bandeja

Se utiliza para la microencapsulación de partículas relativamente grandes de alrededor de 600 μm , se ha extendido ampliamente en la industria farmacéutica debido a que se utilizan como sistemas de liberación controladas.

En la práctica, el revestimiento se aplica como solución o como pulverización atomizada al material sólido deseado en el molde de recubrimiento (Laohasongkram et al., 2011).

Extrusión

La encapsulación por extrusión es un método simple para producir productos encapsulados altamente densos. En este proceso de coextrusión líquida, el núcleo bioactivo y el agente de recubrimiento se bombean por separado a través de un orificio concéntrico situado en la circunferencia exterior de la cabeza del extrusor.

El material del núcleo fluye a través del centro del tubo, mientras que el material de revestimiento fluye a través del tubo opuesto. Debido a que el equipo está unido a un eje giratorio, el núcleo y la matriz de la cáscara se coextruirán a medida que la cabeza gira a través de los orificios concéntricos. La fuerza centrífuga impulsa la varilla extruida hacia afuera, causando que se rompa en partículas diminutas (Bamidele & Emmambux, 2020).

Las distintas metodologías de encapsulación detalladas permiten obtener sistemas particulados con distintos tamaños promedios, dispersión de tamaños, morfologías y eficiencia de encapsulación de los PA. Esta descripción permite poner en contexto las ventajas del sistema de encapsulación propuesto mediante dispositivos microfluídicos que se describirá en el Capítulo 1 del presente trabajo de Tesis.

I.5. Mecanismos generales de liberación de activos desde los sistemas particulados

Los principales mecanismos que promueven la liberación de los PA desde los sistemas particulados se describen a continuación.

1.5.1. Disolución

La disolución puede definirse como un proceso por el cual las moléculas de un soluto (o PA) se disuelven en un solvente. En los sistemas de liberación controlada por disolución (Figura 2), los PAs se recubren o encapsulan dentro de membranas poliméricas de disolución lenta (sistemas reservorios) o matrices (sistemas monolíticos), respectivamente (Adepu & Ramakrishna, 2021). El proceso de disolución de un PA implica la transferencia de moléculas de PAs desde su fase sólida al medio circundante (Devi et al., 2017).

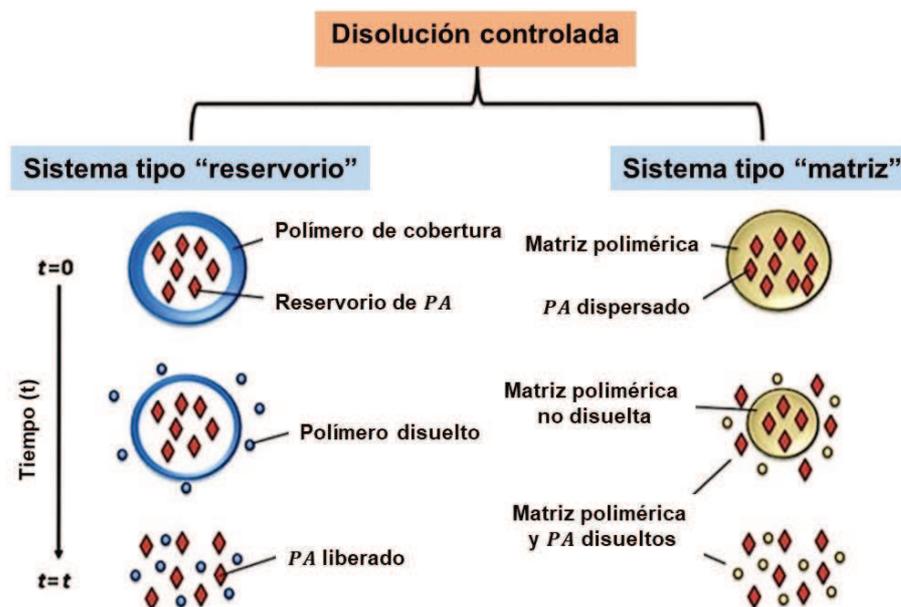


Figura 2: Esquema de liberación controlada por disolución: Sistema tipo reservorio y sistema tipo matriz (Figura modificada de Adepu & Ramakrishna, 2021).

La velocidad a la que el PAs se disuelve del sólido se puede utilizar para predecir la tasa de liberación desde el sistema. Cuanta más alta es la solubilidad, más rápida es la velocidad de disolución cuando no se involucra ninguna reacción química.

Cuando el sólido se pone en contacto con el medio de disolución a través de su superficie, las moléculas se solvatan y se remueven del sólido. Las moléculas solvatadas (soluto o PA) aumentan su concentración en el medio de disolución. Este

aumento de la concentración de soluto produce una capa límite alrededor del sólido donde el medio de disolución tiende a estar saturado y la velocidad de disolución disminuye. La eliminación de la capa límite provoca la renovación del disolvente, aumentando la velocidad de disolución. El grosor de la capa límite también es importante e inversamente proporcional a la velocidad de disolución. En consecuencia, la velocidad de disolución depende del tamaño de las partículas sólidas, la agitación, la viscosidad del medio de disolución y la temperatura (Lengyel et al., 2019).

1.5.2. Difusión

La difusión molecular a través de polímeros y membranas sintéticas es una estrategia eficiente, segura y sencilla para lograr la liberación controlada de PA. En los sistemas tipo cápsula, el propósito de la membrana o pared es mediar en la difusión del PA. Éste primero necesita difundir a lo largo del reservorio, disolver o dividir entre el fluido portador y la membrana, difundir a través de la membrana, particionarse entre la membrana y el medio de elución (externo) y, finalmente, transportarse desde la superficie del sistema. Los sistemas monolíticos se caracterizan por estar constituidos con el agente activo cargado directamente en una matriz, actuando como medio de almacenamiento y como mediador de difusión (Vijayakumar & Subramanian, 2015; Stewart et al., 2018). En la figura 3, se puede apreciar un esquema de estos sistemas.

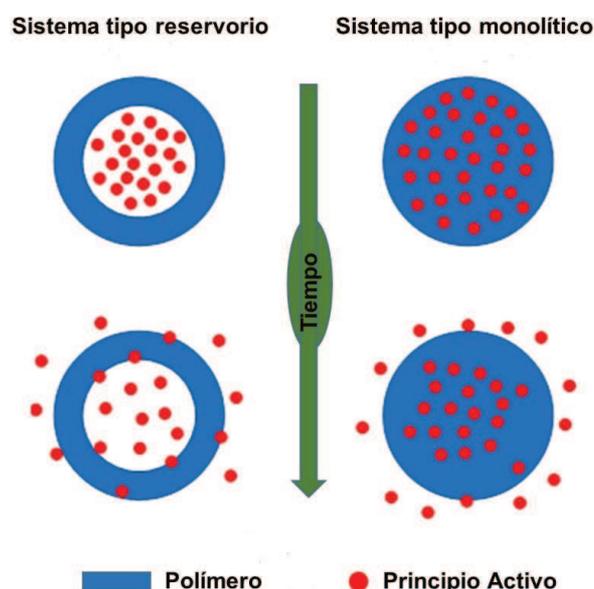


Figura 3: Esquema del proceso de difusión molecular tipo reservorio y tipo monolítico (Figura modificada de Stewart et al., 2018).

1.5.3. Ósmosis

La administración osmótica controlada se refiere al proceso de movimiento del disolvente desde una menor concentración de soluto hacia una mayor concentración de soluto (PA) a través de la membrana semipermeable. La concentración de solutos (también llamados osmolitos) y la compatibilidad termodinámica del agua con estos osmolitos determina el potencial químico, que a su vez determina el flujo de agua a través de la membrana junto con el gradiente de concentración del agua. Cuando los osmolitos son moléculas pequeñas (por ejemplo, sales), la presión osmótica se determina principalmente por la concentración de osmolitos, pero cuando los osmolitos son polímeros, la presión osmótica se determina conjuntamente por la concentración de polímeros y la compatibilidad polímero/agua.

La velocidad de flujo osmótico a través de una unidad de área de la membrana se determina por:

- * La concentración y la naturaleza de los osmolitos en ambos lados de la membrana

- * Temperatura

- * La permeabilidad hidráulica de la membrana.

El recubrimiento de PA con polímeros semipermeables también puede controlar su liberación. Cuando estas partículas se exponen al agua, el disolvente cruza los recubrimientos de polímero y disuelve el agente activo, lo que lleva a un gradiente en la concentración de soluto que impulsa aún más agua en el interior. Para acomodar esto, el recubrimiento debe expandirse y se desarrollan tensiones en la pared.

De acuerdo con la fuerza impulsora osmótica, el revestimiento se rompe y el activo se libera. Por lo tanto, utilizando diferentes espesores de recubrimiento, las partículas se pueden programar para estallar en diferentes momentos (Figura 4).

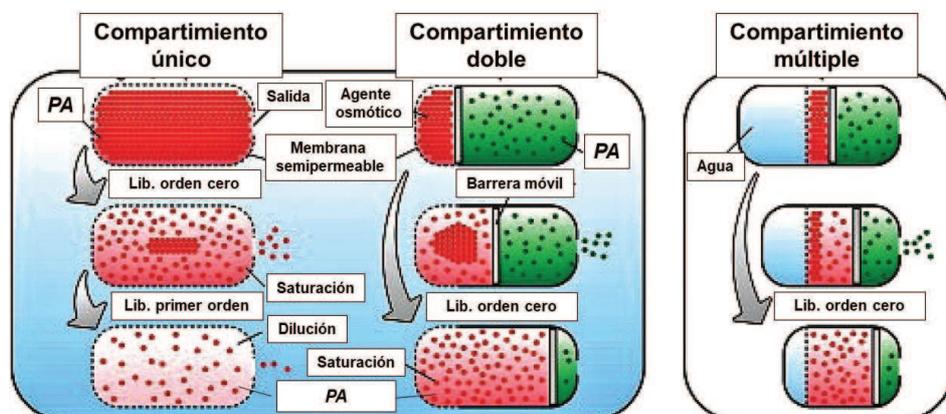


Figura 4: Esquema de sistemas osmóticos de liberación de PAs (Figura modificada de Stewart et al., 2018).

En comparación con los sistemas de liberación de activos basados en la difusión y la erosión, los sistemas osmóticos tienden a ser menos eficientes en volumen y más complejos en diseño. Sin embargo, ofrecen ciertas ventajas sobre los otros sistemas, como el aumento de la eficacia del PA, mejor administración controlada de PAs y la reducción de la frecuencia de dosificación (Majhi et al., 2020; Adepu & Ramakrishna, 2021).

1.5.4. Hinchamiento (*Swelling*)

En los sistemas de administración de medicamentos controlados por hinchazón, el PA se dispersa o disuelve en el polímero hidrofílico cuando está en un estado vítreo (duro y rígido) (Adepu & Ramakrishna, 2021). Cuando esta red polimérica está rodeada de agua se expande y se forman nuevos enlaces químicos o físicos. Esta expansión de volumen y la consecuente aparición de mayores espacios entre las cadenas poliméricas facilitan la liberación de agentes activos de estos sistemas poliméricos.

Pueden distinguirse distintos tipos de fenómeno de hinchamiento (Figura 5):

- La matriz desaparece cuando todo el polímero se hincha. En este caso, el hinchamiento es frecuentemente en el inicio de la disolución del polímero.
- A veces el hinchamiento del material es limitado y la matriz no desaparece. Este fenómeno puede ocurrir si el agua y el polímero son insuficientemente compatibles, si la longitud de la cadena del polímero es lo suficientemente grande, o si se hay enlaces químicos entre las cadenas de polímeros.

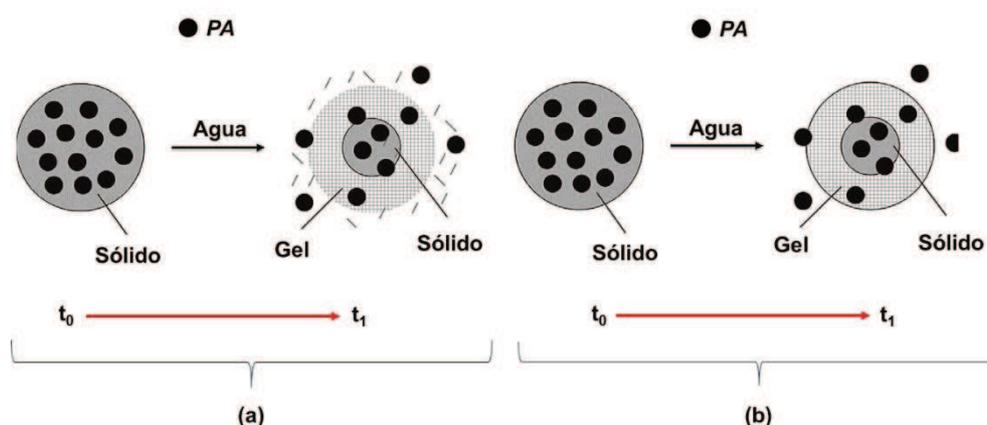


Figura 5: Esquema de sistemas de liberación de PAs por hinchamiento: (a) Todo el polímero se hincha y desaparece la matriz, (b) Hinchamiento limitado del polímero, la matriz no desaparece (Figura modificada de Von Burkersroda et al., 2002).

La hidrofilia del polímero, la presencia y cantidad de enlaces químicos entre las cadenas de polímero, el ambiente iónico y el pH determinarán el grado de hinchamiento. Los polímeros hidrofóbicos no se hinchan significativamente (Colombo et al., 2000).

1.5.5. Erosión

Algunos materiales poliméricos se elaboran para desempeñar una función más activa en el proceso de administración del PA. Estos polímeros sufren erosión cuando son expuestos a reacciones químicas, liberando el PA, dando lugar a dos categorías generales de sistemas:

- (1) Sistemas de inmovilización física: el PA está inmovilizado físicamente por la red polimérica, y se libera después de la erosión de la red. Estos sistemas también se denominan erosionables o biodegradables.
- (2) Sistemas de inmovilización química: cuando el PA está químicamente ligado a la estructura polimérica o es en sí mismo parte de la estructura, el sistema está formado por inmovilización química.

Las ventajas de un sistema erosionable son evidentes, ya que el sistema desaparecerá en el sitio después de ser administrado. La liberación de PA de estos sistemas se rige principalmente por la cinética de degradación, que es específica para cada sistema.

Hay dos tipos de comportamiento en sistemas erosionables: la erosión superficial y la erosión *bulk*. La erosión superficial ocurre cuando la invasión de agua es lenta o la hidrólisis es rápida. Cuando el polímero es hidrofóbico, sus enlaces químicos susceptibles a la hidrólisis están protegidos de la exposición al agua en el interior del sistema polimérico. La hidrólisis acompañada de la liberación del PA solo se produce en o cerca de la superficie. La erosión superficial conduce a la reducción de las dimensiones del sistema con el tiempo. La erosión superficial pura es casi imposible de lograr, y la difusión del PA fuera de una matriz puede ocurrir antes de la erosión. La hidrólisis de los enlaces es la principal forma en que se produce la erosión polimérica, y también puede ser catalizada por ácido o base. El esquema de liberación puede observarse en la Figura 6.

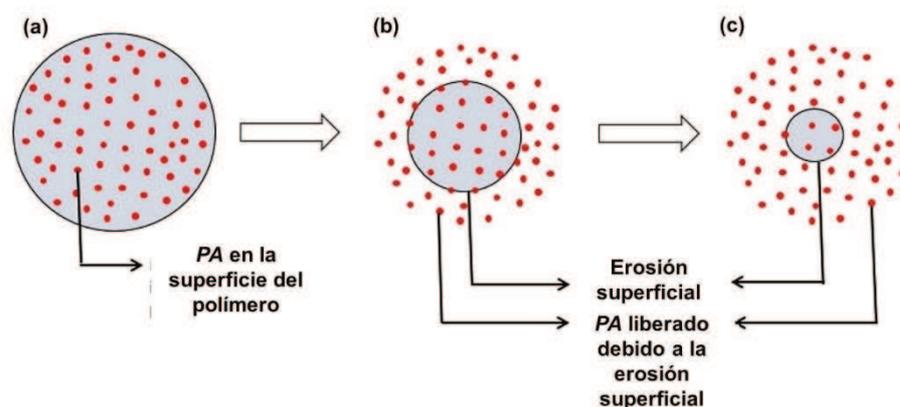


Figura 6: Esquema de etapas de erosión de la superficie del sistema: (a) PA atrapado en las capas externas del sistema comienza a liberarse en los medios circundantes después de la erosión de la superficie del sistema; (b) El PA restante queda atrapado en el sistema de administración, que reduce su tamaño a medida que avanza el tiempo; (c) Erosión polimérica de la superficie hacia el interior, lo que finalmente resulta en la liberación de todo el PA. (Figura modificada de [Adepu & Ramakrishna, 2021](#)).

En la erosión *bulk* el medio circundante (agua) invade el sistema más rápidamente que lo que ocurre la hidrólisis, las escisiones de la cadena se inician por todas partes. Se caracteriza inicialmente por una hidrólisis muy lenta, y las escisiones iniciales pueden dotar a las cadenas de suficiente movilidad que migran y forman cristalitos, que son menos susceptibles a la hidrólisis. Después de que se haya producido un grado determinado de hidrólisis, el proceso puede acelerarse. La formación de cadenas cortas puede conducir a una pérdida general de polímero y a un aumento de la concentración de agua por difusión y/o ósmosis.

En la erosión *bulk* se distinguen varias etapas (Figura 7):

- a) El PA se libera de la superficie del sistema o de los poros que están conectados a la superficie.
- b) Etapa latente en la que se produce una pequeña degradación del polímero, y el PA restante queda atrapado.
- c) El PA atrapado se libera rápidamente cuando el polímero se desintegra.

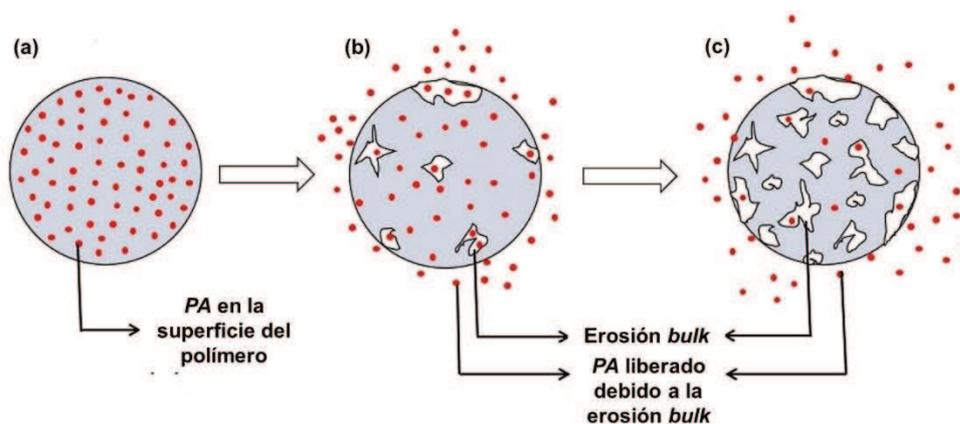


Figura 7: Representación esquemática de las etapas involucradas en la erosión *bulk*: (a) El PA en la superficie del polímero comienza a liberarse; (b) etapa latente de liberación; (c) desintegración de polímeros y liberación rápida del PA (Figura modificada de [Adepu & Ramakrishna, 2021](#)).

La liberación de PA debido al fenómeno de erosión puede ser debido al pH, a hidrólisis enzimática u otras condiciones fisicoquímicas que generen la degradación de cada polímero que se utilice como matriz encapsulante.

Es relevante mencionar que en la mayoría de las aplicaciones los mecanismos de liberación que ocurren son combinados, ocurriendo en forma simultánea varios de los mecanismos mencionados ([Peanparkdee et al., 2016](#)).

1.6. Morfología y tamaño de partículas. Influencia en aplicaciones.

Las características básicas de las partículas (microcápsulas/microesferas) incluyen su morfología, distribución de tamaño, relación PA/pared (microcápsulas) y constitución de la matriz (microesferas). Desde el punto de vista de la fabricación, estos criterios proporcionan los medios para ajustar el rendimiento de microcápsulas/microesferas y el subsecuente comportamiento de liberación. En la práctica, se producen una amplia variedad de estructuras intermedias, dependiendo de la naturaleza de los materiales de partida y los detalles del proceso de fabricación (Figura 8).

El efecto del tamaño de partícula en el rendimiento de encapsulación de la microcápsula/microesfera se puede entender en términos de dos criterios interrelacionados, a saber, la superficie y el espesor de la capa/pared o la constitución de la matriz polimérica. Con un peso de muestra constante, las microcápsulas/microesferas más pequeñas tienen una superficie más grande y, por lo tanto, una difusión más rápida (menor retención) de PA.

Otro parámetro importante en el desempeño de las microcápsulas/microesferas es la naturaleza del polímero (o matriz), y especialmente su compatibilidad con el PA. En general, los residuos anfífilicos en el polímero mejoran la miscibilidad del PA y facilitan la formación de microcápsulas/microesferas.

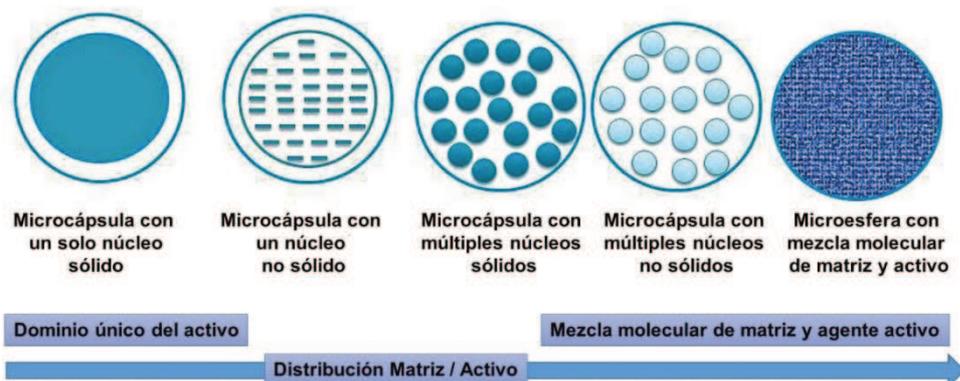


Figura 8: Esquema de diversas morfologías de microcápsulas y microesferas para encapsular PAs (Figura modificada de [Birnbbaum & Brannon-Peppas, 2004](#)).

Además de las micro/nano cápsulas y micro/nano esferas, cuyo núcleo se encuentra confinado en una matriz de recubrimiento, pueden presentarse otros sistemas de encapsulación. Estos se componen principalmente de sustancias orgánicas relacionadas como lípidos, proteínas y carbohidratos, y donde, las nanopartículas generadas pueden ser líquidas, semisólidas o sólidas a temperatura ambiente (Figura 9).

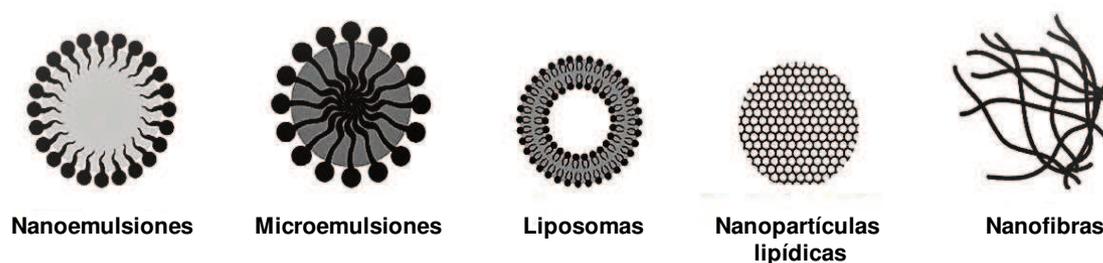


Figura 9: Esquema de diversas formas de encapsular PAs (Figura modificada de [Ruiz-Rico et al., 2018](#)).

Los sistemas mencionados presentan múltiples y variadas aplicaciones en alimentos, fármacos, cosméticos, nutracéuticos, etc. Su utilización está en constante evolución, debido a su potencialidad como portadores y liberadores de PAs ([McClements y Xiao, 2017](#)).

Por último, en cuando a la distribución de tamaño, como la velocidad de liberación depende del área superficial de las partículas, la polidispersidad influye fuertemente a la hora de lograr un sistema con velocidad de liberación controlada. Cuanto más polidispersas en tamaño sean las partículas menos precisión se logrará en el diseño del sistema de liberación del PA (Berchane et al., 2007; Busatto et al., 2018).

1.7. Interacciones entre proteínas y polisacáridos

Las estructuras basadas en interacciones entre proteínas y polisacáridos se consideran eficaces para diseñar sistemas particulados para la liberación de activos. Existe una tendencia a utilizar nano/micropartículas de proteínas y polisacáridos estructuradas covalentemente o electrostáticamente, combinando los beneficios de ambos biopolímeros (Assadpour et al, 2020; Bassijeh et al., 2020; Zhao et al., 2021).

Una estrategia utilizada para construir un sistema proteína/polisacárido es la complejación electrostática, mezclando ambos biopolímeros en condiciones adecuadas. En comparación con las micro/nano partículas obtenidas solamente con proteínas, las formadas electrostáticamente como un complejo de ambos biopolímeros aumentan la estabilidad a largo plazo y la resistencia a agentes desfavorables como, por ejemplo, temperaturas extremas, concentraciones iónicas elevadas, etc.

En los complejos proteína/polisacáridos unidos covalentemente se fortalece la integridad del sistema desarrollado (Zhao et al., 2021) y su síntesis dependerá de diferentes factores:

1.7.1. Naturaleza de los biopolímeros utilizados

La naturaleza de los biopolímeros involucrados es de suma importancia y la selección de combinaciones adecuadas es importante para obtener sistemas particulados con especificidad de tamaño, hidrofiliidad y carga eléctrica, características determinantes tanto para la estabilidad coloidal como para patrones de liberación de los activos encapsulados.

Entre las proteínas, las de conformación abierta presentan menos inconvenientes para la asociación a polisacáridos que las globulares.

La estructura molecular de polisacáridos también afecta la fuerza de las interacciones. La mayoría de los polisacáridos son aniónicos, con la excepción del quitosano que es catiónico. El uso de polielectrolitos débiles con bajas densidades de carga lineal (pectina, goma xantana, carboximetilcelulosa y goma guar), así como polielectrolitos fuertes (quitosano y carragenato) permite regular la formación de la

estructura y crear matrices diferentes para diferentes aplicaciones ([Weiss et al., 2019](#); [Gentile et al., 2020](#)).

1.7.2. pH y fuerza iónica

Las propiedades de los sistemas compuestos por proteínas y polisacáridos basados en interacciones electrostáticas dependen del pH y la fuerza iónica, ya que estos factores condicionan la existencia de cargas opuestas en los biopolímeros que reaccionan.

Para la complejación iónica, tanto la proteína como el polisacárido deben presentar cargas opuestas. Ambas macromoléculas tienen un punto isoeléctrico (pI), además, en el pI también puede haber regiones de la proteína que están cargadas positiva o negativamente, posibilitando la interacción con un polisacárido iónico.

Normalmente, los complejos proteína/polisacárido están formados por un polisacárido aniónico en combinación con una proteína de carga positiva, pero también es posible la situación opuesta ([Evans et al., 2013](#); [Gaber et al., 2018](#)).

La fuerza iónica del medio también influye significativamente en las interacciones del tipo electrostáticas, apantallando las cargas eléctricas que intervienen en las interacciones antes mencionadas ([Gentile et al., 2020](#)). Por lo tanto, el ajuste adecuado del pH y de la fuerza iónica es crucial, así como el conocimiento de las propiedades catiónicas/aniónicas de los biopolímeros utilizados.

1.7.3. Temperatura

La temperatura puede afectar la complejación causada por las interacciones electrostáticas. Las interacciones hidrofóbicas son mayores a una temperatura más alta debido a la mayor exposición de los sitios de interacción por cambios conformacionales inducidos por el calor a los biopolímeros. Por el contrario, el enlace de hidrógeno se favorece a bajas temperaturas ([Setiowati et al., 2020](#)).

1.7.4. Relaciones de mezcla y concentración

Para cada mezcla de biopolímeros siempre existe una concentración y una relación de mezcla óptima para obtener interacciones estables ([Warnakulasuriya & Nickerson, 2018](#)) y la mezcla de estos biopolímeros puede formar un sistema monofásico o bifásico, según la naturaleza de los biopolímeros implicados en la composición de la solución (Figura 10). En un sistema de una fase, los dos biopolímeros pueden existir como moléculas individuales o como complejos solubles que se distribuyen uniformemente en todo el sistema. En un sistema de dos fases, la separación

de fase puede ocurrir a través de dos mecanismos fisicoquímicos diferentes: la separación asociativa o segregativa (McClements, 2006; Schmitt y Turgeon, 2011; Semenova, 2017; Souza et al., 2018).

En la separación asociativa, hay una atracción fuerte entre los biopolímeros diferentes que hace que se asocien entre sí. El sistema de dos fases resultante consiste en una fase rica en biopolímeros y una fase con ausencia de ambos biopolímeros. La fase rica en biopolímeros puede ser un coacervado o un precipitado, dependiendo de la fuerza de la atracción y la naturaleza de los polímeros involucrados (de Kruif et al. 2004; McClements, 2006; Schmitt y Turgeon, 2011).

En la separación segregativa, hay una repulsión relativamente fuerte entre los dos tipos diferentes de biopolímeros, es decir, hay una energía libre de mezcla positiva (desfavorable). El origen molecular del fenómeno suele ser un efecto de exclusión estérico. Este tipo de separación de fase a menudo ocurre cuando uno o ambos biopolímeros no están cargados, o cuando ambos biopolímeros tienen cargas eléctricas similares. A concentraciones de biopolímeros suficientemente bajas, los dos biopolímeros se mezclan íntimamente y forman una solución monofásica, pero una vez que la concentración de biopolímero supera un cierto nivel se produce una separación de fase siendo una de las fases rica en un tipo de biopolímero y agotado en el otro tipo, y viceversa (Tolstoguzov 1991; Cooper et al. 2005; McClements, 2006).

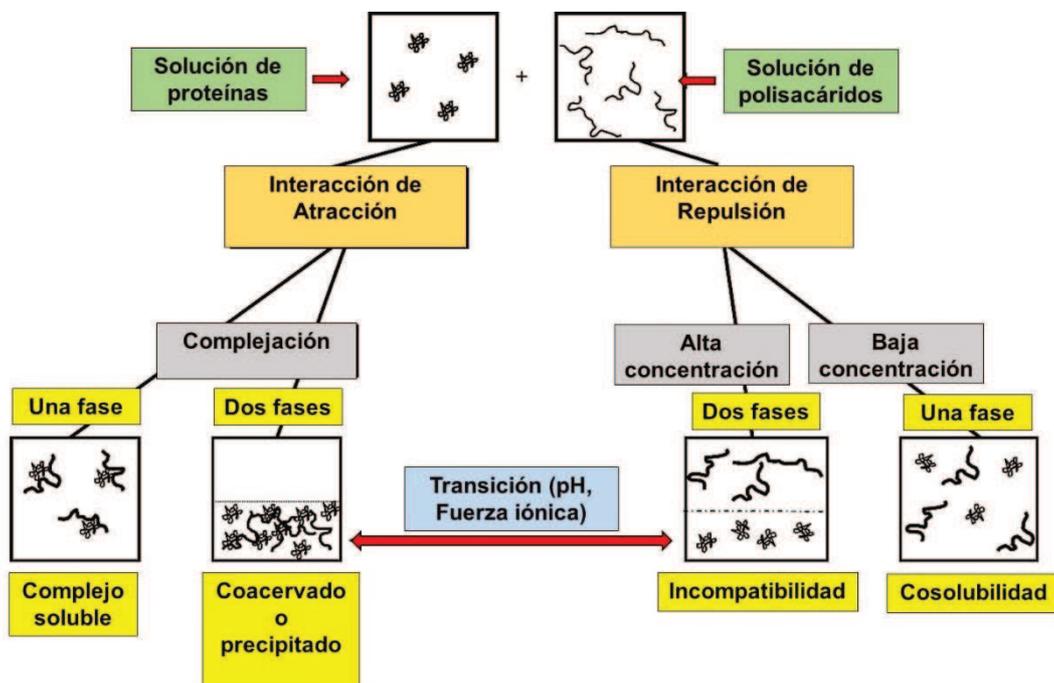


Figura 10: Representación esquemática de los tipos de arreglos estructurales que pueden ocurrir cuando las proteínas y los polisacáridos se mezclan (adaptada de McClements, 2006).

I.8. Sistemas microfluídicos para liberación controlada de activos

I.8.1. Breve historia de la microfluídica y conceptos básicos asociados al flujo en microcanales

En los últimos años se han hecho progresos considerables en el campo de la miniaturización. Ahora es efectivamente posible miniaturizar hasta tamaños submicrométricos todo tipo de sistemas, como, por ejemplo, mecánicos, fluídicos, electromecánicos o térmicos. En la década de 1980, estos logros dieron lugar a un nuevo campo conocido como MEMS (sistemas microelectrónicos-mecánicos). Más tarde, en la década de 1990, este dominio se diversificó considerablemente, con dispositivos MEMS que se fabricaron para aplicaciones químicas, biológicas y biomédicas. Estos sistemas empleaban flujos de fluidos que funcionaban en condiciones inusuales e inexploradas, lo que naturalmente condujo a la necesidad de crear una nueva disciplina que se llamó microfluídica (Mans et al., 1990; Tabeling, 2005).

La microfluídica se conoce generalmente como la ciencia y la tecnología que se ocupa de los flujos de fluidos en microcanales, generalmente en el rango de 1-1000 μm . Los procesos microfluídicos se distinguen por la capacidad para manejar y controlar cantidades muy pequeñas de líquido, desde microlitros (10^{-6} L) a picolitros (10^{-12} L) en un sistema bien definido.

Dentro de los microcanales se producen fenómenos físicos que adquieren relevancia a tal punto que son los que gobiernan el comportamiento de flujo, a diferencia de lo que sucede en los flujos macroscópicos en donde estos fenómenos resultan despreciables. En tal sentido, para comprender y predecir el comportamiento de flujo en los sistemas microfluídicos resulta necesario entender la física en la microescala.

Uno de los números adimensionales más útiles para caracterizar el flujo dentro de un microcanal es el **número de Reynolds (Re)**, el cual representa la relación entre la fuerza inercial y la fuerza viscosa:

$$Re = \frac{\rho d u}{\mu} \quad (1)$$

donde μ es la viscosidad dinámica del fluido [$\text{Pa}\cdot\text{s}$], ρ es la densidad [$\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$], d es la longitud característica [m], y u es la velocidad media aparente del fluido [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$]. La longitud característica, también conocida como diámetro, o diámetro hidráulico se puede derivar para cada forma de canal. Para canales de flujo con área de sección transversal no circular, d se define como:

$$d = \frac{4A}{D_w} \quad (2)$$

Donde A es la sección transversal del canal [m^2] y D_w es el perímetro mojado del canal [m].

Prácticamente, Re describe la preeminencia relativa de las fuerzas inerciales sobre las fuerzas viscosas. En un canal microfluídico con una escala de longitud pequeña (por ejemplo entre 0.1-1 mm) y flujos bajos ($0.1-10 \text{ mm s}^{-1}$), el Re suele oscilar entre 10^{-6} y 100, aunque a menudo en el orden de 1. Esto significa que las fuerzas viscosas dominan.

Para los flujos en escala macroscópica es comúnmente aceptado que un flujo es laminar si su $Re < 2000$. En el flujo laminar, las líneas de corriente son paralelas y se pueden pensar como capas que se deslizan una a lo largo de la otra. Una de las características más notables de la microfluídica es que el flujo es siempre laminar. Por lo tanto, la mezcla entre dos fluidos miscibles diferentes se producirá a través de la difusión molecular o la advección (Peng y Peterson, 1995; Tabeling, 2005; Stone, 2007; Zhang et al., 2016).

I.8.2. Beneficios en la reducción del tamaño y la automatización

Conceptualmente, la idea de la microfluídica es que los fluidos pueden ser manipulados con precisión utilizando dispositivos de microescala, comúnmente conocidos como sistemas de análisis total miniaturizados (μTAS) (Manz et al., 1990) o tecnologías *lab-on-a-chip* (LoC). Desde un punto de vista tecnológico, la tecnología LoC ofrece muchos beneficios en comparación con los sistemas convencionales a mayor escala:

- ✓ La miniaturización de dispositivos aumenta la portabilidad, permite mediciones in situ y desarrollo de sistemas de punto de atención.
- ✓ Consumo mínimo de fluidos, ideal para manipular muestras y reactivos costosos y difíciles de obtener.
- ✓ Reducción de la producción de residuos, haciéndolos amigables con el medio ambiente.
- ✓ Reducción del consumo de energía.
- ✓ Capacidad para realizar análisis de alto rendimiento procesando varios ensayos en paralelo.

- ✓ Reacción rápida y análisis rápido, permitiendo obtener los resultados en segundos o minutos, en lugar de horas o días.
- ✓ Sensibilidad/precisión mejorada.
- ✓ Procesamiento versátil y controlable de los sistemas microfluídicos a dimensiones desde micrómetros hasta nanómetros.
- ✓ Materiales de construcción ampliamente aplicables, incluido el plástico, para producir sistemas microfluídicos a un costo unitario muy bajo, permitiendo que sean desechables y evitando cualquier tipo de contaminación cruzada ([Haeberle & Zengerle, 2007](#); [Ríos et al., 2010](#)).

Los dispositivos tienen dimensiones que van desde micrómetros a milímetros, con la necesidad en muchos casos, de adaptar tecnologías utilizadas en equipos de mayores dimensiones para esta tecnología. De todas formas, varias plataformas tecnológicas y sus componentes escalables están disponibles para la manipulación de fluidos a escala de los microlitros, y para cada plataforma ha habido cierto éxito en la fabricación de sistemas integrados con válvulas, sensores y actuadores para el análisis biológico, químico y físico.

I.8.3. Motivación de estudio: generación microfluídica de micropartículas para vehiculizar activos con funciones biológicas

La microfluídica, en contraposición a las metodologías clásicas para obtener micropartículas, permite a través de microdispositivos generar partículas monodispersas, de tamaño bien controlado, de pocos micrones de diámetro, y, además, ofrece la posibilidad de funcionalizar las partículas modificando su forma, su compartimentalización, y hasta su microestructura ([Kim et al., 2014](#)). Esta posibilidad ha sido muy explorada últimamente, debido a dos motivaciones principales: la síntesis de nuevos materiales para farmacología, cosmética, medicina y alimentos ([Duncanson et al., 2012](#)), y la utilización de las microgotas como micro-reactores en sí mismos ([Günther & Jensen, 2006](#)). El aspecto que tienen en común estas aplicaciones es que las microgotas permiten confinar y aislar especies químicas en un ambiente donde la difusión, el mezclado y las cinéticas de reacción pueden manipularse muy eficientemente.

Motiva este trabajo doctoral, la posibilidad de diseñar y construir dispositivos simples para la obtención controlada de micropartículas, capaces de vehiculizar activos en sistemas funcionalizados aplicables en diversos campos científicos y tecnológicos. Así como la posibilidad de desarrollar los mismos, en laboratorios convencionales, sin

la necesidad de uso de salas limpias, con la consiguiente posibilidad de rápido prototipado y bajo costo de construcción.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Desarrollar y generar partículas micrométricas funcionalizadas para vehicular principios activos (vitaminas, hormonas, antibióticos, proteínas, células) de interés en biotecnología, medicina, tecnología alimentaria y farmacología.

II.2. Objetivos específicos

- Diseñar y construir dispositivos de microfluídica para la producción de microgotas.
- Generar micropartículas monodispersas y de tamaño controlado.
- Caracterizar las micropartículas y validarlas como vehiculizadores de principios activos con funciones biológicas.

CAPÍTULO 1

DISEÑO, FABRICACIÓN Y PUESTA A PUNTO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS PARA LA GENERACIÓN DE MICROPARTÍCULAS.

1.1. Introducción

En los últimos años, las industrias alimenticia, biotecnológica y farmacéutica se han centrado en el desarrollo de productos con compuestos bioactivos para mejorar sus propiedades, cubrir déficits o tratar patologías específicas. Estas aplicaciones representan un gran desafío para los tecnólogos y científicos, dado que los PAs que se agreguen deben permanecer biodisponibles luego de su ingestión o administración, por lo que deben proveerse mecanismos para su protección y posterior liberación controlada. Como se describió en la introducción, una de las estrategias tecnológicas más aceptadas actualmente es la encapsulación de PAs en diferentes sistemas emulsionables (microgotas) o particulados en diversas matrices poliméricas (cápsulas, partículas, etc.). En este contexto, la microfluídica se posiciona como una alternativa tecnológica para generar micro/nano partículas que encapsulen PAs mediante la manipulación de fluidos en dispositivos microfluídicos (Tabeling, 2005; Whitesides, 2006; Shi, 2010; Lee et al., 2018). En el presente capítulo se presenta una breve introducción de conceptos teóricos y prácticos vinculados al diseño de dispositivos microfluídicos para la generación de microgotas. Asimismo, se describen los dispositivos diseñados y explorados para su utilización en las aplicaciones propuestas en este trabajo de tesis.

1.1.1. Fundamentos de la generación de microgotas

Cuando se intenta hacer circular fluidos inmiscibles por microcanales la fuerza más importante en juego es la tensión interfacial, la cual, determina el comportamiento de la interfaz. Así, cuando dos fluidos inmiscibles entran en contacto en un canal en una situación dinámica, el sistema se inestabiliza y evoluciona formando estructuras globulares, idealmente esféricas, las cuales minimizan la energía interfacial, donde uno de los fluidos se rompe para formar una fase discreta o dispersa (FD) y el otro una fase continua (FC), lo cual persiste mientras se agregue trabajo mecánico al sistema. En efecto, con el sistema estanco, las gotas rápidamente coalescen y se regresa a la situación de las fases separadas. Para inhibir el proceso de coalescencia, es forzoso agregar un tensioactivo que favorezca la generación de interfaces y permita la estabilización de las microgotas como entidades discretas de un líquido dentro de otro. De esta forma, la generación de flujos bifásicos en sistemas microfluídicos se utiliza a menudo para obtener emulsiones monodispersas que pueden ser de aceite en agua (O/W) o de agua en aceite (W/O).

Uno de los números adimensionales más importantes para describir a este tipo de sistemas es el **número capilar (Ca)**, que mide la importancia relativa entre tensiones viscosas e interfaciales:

$$Ca = \frac{\eta v}{\gamma} \quad (3)$$

Donde v es la velocidad característica del fluido [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$], η es la viscosidad [$\text{Pa}\cdot\text{s}$] de la FC, y γ es la tensión interfacial [$\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$]. Particularmente, para la generación de microgotas en microfluídica y a velocidades de flujo accesibles usando bombas de jeringa, los números Ca se extienden típicamente en el rango de 10^{-3} a 10^1 (Christopher & Anna, 2007; Berthier & Brakke, 2012).

La generación de microgotas consiste en hacer coincidir dos fluidos inmiscibles en un determinado confinamiento geométrico, cuyas secciones características están en el rango de 20-200 μm . El mecanismo de formación de la gota depende de la competencia entre la tensión impuesta por el flujo de la FC y la tensión interfacial, e involucra un conjunto de problemas fluidodinámicos relativamente complejos. Desde este punto de vista, se obtienen diferentes regímenes de flujos, dependiendo del valor del Ca (compresión, goteo, coflujo), las viscosidades, los caudales, las dimensiones y juntas de los microcanales (Para nuestro trabajo de Tesis, con énfasis en junta T y cruz) (Christopher & Anna, 2007; Baroud et al., 2010; Mashaghi et al., 2016; Anna, 2016; Sattari et al., 2020).

Después de la formación de gotas, se pueden observar dos patrones principales de flujo en el canal, el flujo segmentado y el flujo de gota (Xu et al., 2006; Sattari et al., 2020). El primero se produce cuando los caudales de las fases dispersa y continua son comparables, o cuando el ancho del canal por donde confluye la FD es mayor o igual al ancho del canal por donde confluye la FC. Cada fase forma segmentos discretos que ocupan toda la sección transversal del canal. A medida que el caudal de la FC aumenta, o que el ancho del canal de la FC es mayor que el ancho del canal de la FD, el volumen de las gotas disminuye, y el patrón de flujo en el canal principal pasa del flujo segmentado al flujo de gotas, donde las gotas ya no ocupan toda la sección transversal del canal (Xu et al., 2006).

Como se mencionó, dependiendo del tipo de junta se pueden obtener diferentes patrones de flujo. Para juntas del tipo “cruz”, para un Ca bajo (< 1), se pueden observar tres patrones típicos de flujo (Figura 11), donde las gotas se forman:

- en la junta (a)

- en la corriente descendente de la junta (b), formando un hilo que se vuelve inestable después de una distancia de flujo laminar
- como flujos paralelos estables (c), donde los flujos entran formando un co-flujo en paralelo a la corriente descendente sin segmentarse.

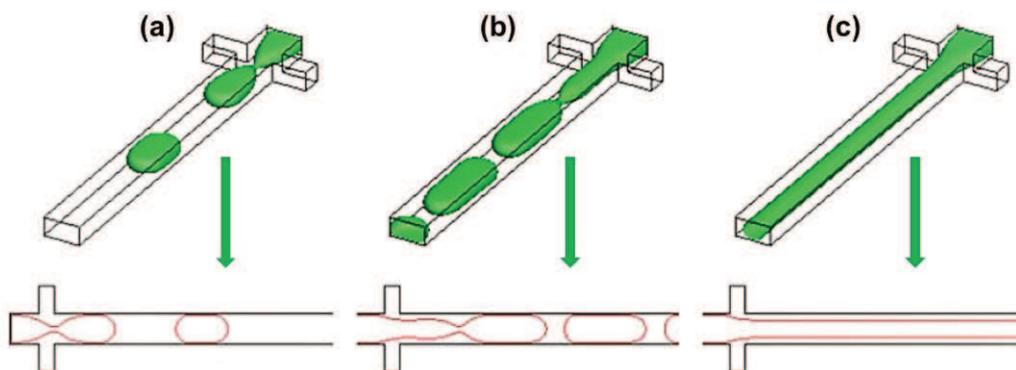


Figura 11: Patrones de flujos típicos en juntas “cruz” (Figura modificada de Liu & Zhang, 2011).

Para el caso de juntas de tipo T, donde cada canal porta fluidos de fases diferentes y las tensiones de corte de un fluido sobre el otro producen la ruptura, la gota emerge del canal lateral y se deforma antes del desprendimiento, pudiéndose observar distintos patrones de flujo: laminar, compresión, goteo, chorro (Figura 12). En los regímenes de compresión y goteo, la formación de la gota comienza en la intersección de la junta T. La diferencia, es que, en el régimen de compresión, la gota incipiente bloquea el canal completamente antes de que se separe del flujo dispersivo, mientras que en el régimen de goteo hay una brecha entre la gota incipiente y la pared de canal opuesto donde la fase continua todavía puede fluir a través. En el régimen de chorro, la formación de gotas comienza corriente abajo desde la unión en T con un filamento de fase dispersa cerca de la pared que conecta la gota a la entrada (De Menech et al., 2008). La división entre diferentes patrones de flujo se hace sobre la base del Ca .

Se puede observar que al establecer un valor fijo de flujo de la FD y aumentar el flujo de la FC (o aumentar Ca), el patrón de flujo transita de laminar a uno de compresión, luego a uno goteo y finalmente a uno de chorro. El flujo laminar inicial y el de chorro final, también necesitan un flujo de FD relativamente grande. Todos los cambios anteriores son consistentes con cambios originados en la FD, a bajos Ca cuando el flujo de la FC aumenta (Bai et al., 2016).

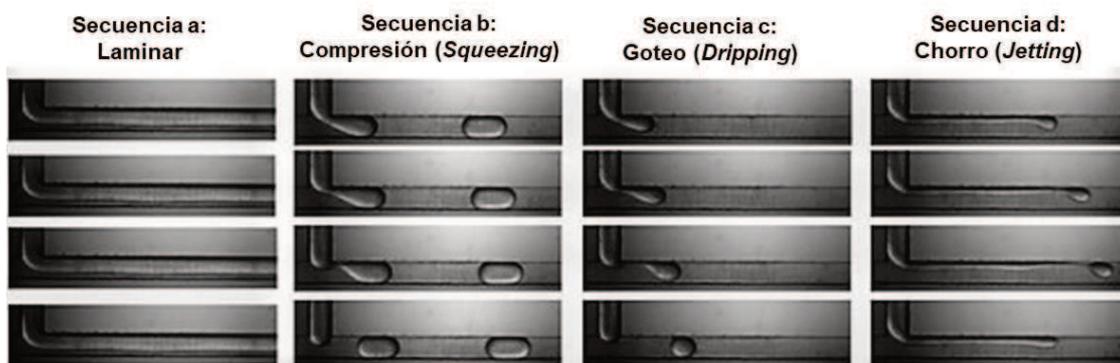


Figura 12: Patrones de flujo de generación de gotas en junta T: (a) Laminar, (b) Compresión (*Squeezing*), (c) Goteo (*Dripping*), (d) Chorro (*Jetting*) (Figura modificada de Bai et al., 2016).

Para ambos tipos de juntas, la transición del patrón de flujo se verá afectada principalmente por el número capilar y las relaciones de caudales de FD a FC.

Un valor bajo de Ca será indicativo de que las tensiones debidas a la tensión interfacial son fuertes en comparación con las tensiones viscosas. Las gotas que fluyen bajo tal condición casi minimizan su superficie produciendo extremos esféricos. En la situación opuesta de alto Ca , dominan los efectos viscosos y se pueden observar grandes deformaciones de las gotas y formas asimétricas (Zhang et al., 2016). Debido a las características de los fenómenos que se desarrollan en un microcanal, influenciadas no solo por las condiciones, composición y propiedades de los fluidos actuantes como FD y FC sino también por la geometría del canal, en este trabajo de Tesis, seleccionamos solamente dos configuraciones de dispositivos, la junta T y la junta Cruz, para analizar los posibles mecanismos de generación de gotas.

Microcanales en forma de cruz: las fases confluyen de manera ortogonal y el flujo elongacional produce adelgazamiento de la corriente central hasta que la misma se segmenta en gotas que fluyen agua abajo (Figura 13).

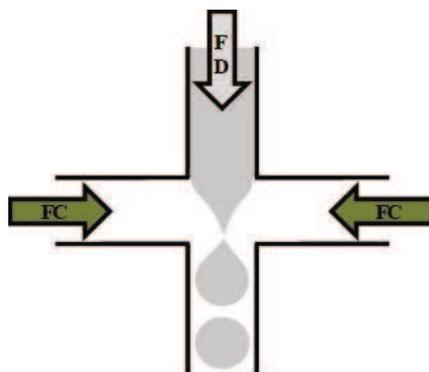


Figura 13: Esquema de la junta tipo “Cruz” para la generación microfluidica de gotas.

Microcanales en forma de T: cada canal porta fluidos de fases diferentes, y las tensiones de corte de un fluido sobre el otro producen segmentación de la corriente que ingresa por el canal transversal, lo cual resulta en la formación de microgotas que se desplazan en la corriente de la FC (Figura 14).

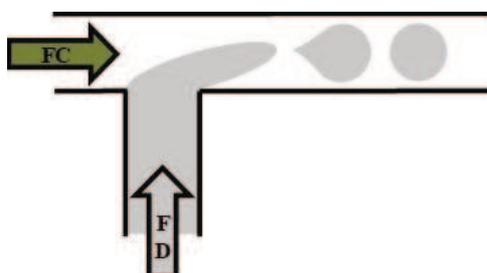


Figura 14: Esquema de juntura tipo “T” para la generación microfluídica de gotas.

Dependiendo de la composición de las fases FD y FC, este tipo de dispositivos permite obtener una diversidad de sistemas. Para ello, se utilizan generalmente canales hidrofóbicos para emulsiones W/O, mientras que se utilizan canales hidrofílicos para obtener emulsiones O/W (Zhao & Middelberg, 2011).

Las microgotas generadas pueden ser utilizadas para solubilizar y proteger fármacos y nutrientes, dirigir drogas o agentes de contraste hacia órganos o tejidos específicos, encapsular células, entre otras aplicaciones (Huang et al., 2006; Xue et al., 2015). Dependiendo del diseño particular, se generan diferentes problemas a resolver ya sea de índole fisicoquímico y/o fluidodinámico.

Desde el punto de vista fluidodinámico, los dispositivos microfluídicos, a través del control de diversos parámetros (material y tamaño de los microcanales, caudales de ambas fases, viscosidad de las FD y FC, etc.) permiten obtener microgotas de tamaño controlado, regular y constante en el tiempo (Garstecki et al., 2006; Christopher & Anna, 2007; Khan et al., 2013).

1.1.2. Fabricación de dispositivos microfluídicos: Materiales y métodos.

Uno de los principales desafíos para la fabricación de microdispositivos tiene su origen en la necesidad de crear estructuras precisas y altamente funcionalizadas que posean microcanales tridimensionales. A lo que debe agregarse la potencial reducción de costo de fabricación, el consumo de reactivos, el tiempo de análisis, el aumento de eficiencia y la portabilidad del dispositivo (Gale et al, 2018; Convery & Gadegaard, 2019). Todo ello ha convertido a la microfabricación en un área importante de

investigación para distintas aplicaciones microfluídicas (Brecher et al., 2015; Catarino et al., 2017).

Los sustratos típicos incluyen vidrio (Hwang et al., 2019), silicio (Nielsen et al., 2019), metales (James et al., 2020), polímeros (Sticker et al., 2020) y cerámica (Malecha et al., 2019), pero la diversidad y la calidad de los materiales están aumentando continuamente en función de las necesidades y principalmente de las ventajas y desventajas de su empleo (Niculescu et al., 2021). Los primeros dispositivos microfluídicos típicamente utilizaban silicio, cuarzo o materiales de vidrio a los que se sometía a procesos de microfabricación, grabado y de deposición mediante métodos químicos. Sin embargo, estos enfoques tradicionales de microfabricación presentan varios aspectos negativos:

- ✓ El costo del sustrato por unidad de área es alto.
- ✓ El proceso es largo y costoso. Por lo general, se requieren pasos iterativos para la limpieza, el estampado, el grabado y la deposición.
- ✓ Estos procesos se suelen llevar a cabo en un entorno de sala limpia.
- ✓ El perfil acabado es limitado, con canales poco profundos o circulares, debido a las características del proceso de grabado.
- ✓ Algunas propiedades físicas de los materiales tradicionales no son deseables. Las biomoléculas, por ejemplo, tienden a adherirse a una superficie de silicio. El tratamiento químico previo puede prevenir el problema de adherencia, pero el riesgo de contaminación es mayor. El silicio tampoco es un aislante eléctrico y puede plantear problemas para algunos sistemas de bombeo como el electro-osmótico. Además, el silicio tampoco es transparente y, por lo tanto, no es adecuado para la detección óptica. El cuarzo y el vidrio requieren altas temperaturas y tensiones para la unión, lo que puede ser problemático para la fabricación de dispositivos (Boswell et al., 2018).

En general, el costo de producción y algunas limitaciones físicas de los materiales plantean dificultades para su amplio uso en aplicaciones de dispositivos microfluídicos. Es por esto que desde hace tiempo se ha centrado la atención en los polímeros como materiales de fabricación para dispositivos microfluídicos debido a sus características únicas:

- ✓ Son relativamente baratos en comparación con el silicio. Esta característica es especialmente importante para la producción en masa o el uso desechable en aplicaciones biomédicas.
- ✓ Disponen de una amplia gama de propiedades de material para adaptarse a las necesidades de los procesos y dispositivos.

- ✓ Pueden ofrecer buena transparencia óptica, aislamiento eléctrico o buena permeabilidad a los gases, lo que es importante para las algunas aplicaciones (Waldbauer et al., 2011; Scott & Ali, 2021).

Los polímeros se clasifican en términos de la química de los monómeros, pero también es posible una clasificación física en tres categorías que dependen de la medida en que los polímeros cambien de forma cuando se exponen al calor: termoestables, termoplásticos y elastómeros. Si las cadenas de polímero están altamente interconectadas, entonces la red es estable con la temperatura y el material se clasifica como un termoestable (ej. SU-8). En el caso de los termoplásticos, las cadenas de polímero no están entrecruzadas, por lo que son capaces de moverse dentro del material, especialmente a temperaturas elevadas. Los polímeros termoplásticos se ablandan cuando el material se calienta por encima de la temperatura de transición vítrea, el punto donde los polímeros se vuelven similares al caucho y son deformables, lo que los hace adecuados para ser moldeados con moldeo por inyección o estampado en caliente. Los polímeros termoplásticos se pueden clasificar como cristalinos u amorfos, teniendo el primero un rango de transición vítrea estrecho y el segundo un rango amplio.

Los elastómeros son polímeros débilmente entrecruzados que cambian su forma bajo fuerza externa y regresan a la forma original después de que se elimina la fuerza. En este caso, la transición vítrea está por debajo de la temperatura de funcionamiento y por lo tanto son similares al caucho y pueden deformarse sin presión excesiva, lo que los hace ideales para la implementación de microválvulas y microbombas (Scott & Ali, 2021).

En la actualidad hay una amplia variedad de polímeros que se utilizan para fabricar micro dispositivos de laboratorio, de acuerdo a las propiedades deseadas. Entre los más comunes se destacan el poli-dimetilsiloxano (PDMS), poli metacrilato de metilo (PMMA), polietileno de alta densidad, polietileno de baja densidad, poliamida 6 y el fotorresistente a base de epoxi SU-8 (Pinto et al., 2014; Lim et al., 2015; Catarino et al., 2017). También se pueden citar otros polímeros tales como policarbonato, poliestireno, cloruro de polivinilo, poliimida y la familia de los polímeros cíclicos de olefina (Squires & Quake, 2005; Baroud et al., 2010). El PDMS y el PMMA han sido ampliamente utilizados para micro sistemas porque tienen bajo costo, son transparentes y su flexibilidad permite la integración de actuadores elastoméricos y elementos ópticos en los dispositivos diseñados (Wong & Ho, 2009; Scholten & Meng, 2015). El SU-8 también ha ganado importancia principalmente debido a su uso como material para moldes. Su fotosensibilidad permite obtener estructuras de cualquier forma y tamaño (Pinto et al.,

2014; Lim et al., 2015). En este trabajo de Tesis se utilizó el termoplástico PMMA para el desarrollo de los distintos prototipos.

La fabricación de microcanales involucra una amplia gama de técnicas, que fueron adaptadas de otras aplicaciones o desarrolladas para este fin, evolucionando desde la microelectrónica (Jain et al., 2022). Las técnicas para la fabricación de microcanales se seleccionan teniendo en cuenta el material de fabricación y aplicación a la que se destinará; entre los métodos más utilizados, se pueden describir en forma general los siguientes:

Métodos mecánicos

Dentro de las técnicas mecánicas, unas de las más utilizadas son el estampado en caliente (Schift et al., 2000; Jáuregui et al., 2010) y el moldeo por inyección, donde los moldes que crean las microestructuras se calientan a una temperatura superior a la temperatura de transición vítrea de los polímeros y, por lo tanto, los polímeros se pueden inyectar en los moldes. A medida que el polímero se solidifica en el molde se contrae significativamente, por lo que se tiene que suministrar al molde una masa fundida adicional para compensar la contracción (Huang & Lin, 2017; Zhang et al., 2017). El moldeo por inyección de piezas de polímero con características a microescala ha dado muy buenos resultados en aplicaciones como partes médicas, electrónicas, ópticas, dispositivos microfluídicos, entre otros (Hong et al., 2020).

Métodos químicos

Las técnicas químicas más utilizadas son el grabado húmedo, seco, el mecanizado por descarga electroquímica y la litografía. Generalmente se utilizan para el grabado de canales en sustratos como cerámica, vidrio y silicio, mediante la remoción o deposición de material sobre ellos (Elvira et al., 2022). El grabado húmedo utiliza para la remoción de material ácidos fuertes (fluorhídrico) y permite grabar muchas obleas simultáneamente, pero esto es una limitación por tratarse de sustancias altamente corrosivas y riesgosas para su manipulación. El grabado en seco (grabado reactivo de iones) permite la creación de perfiles de canales más precisos utilizando para remover el material un bombardeo iónico direccionado. Se utiliza comúnmente para sustratos transparentes.

El mecanizado por descarga electroquímica es un proceso de fabricación no convencional que utiliza una chispa generada electroquímicamente y la alta temperatura de ella elimina el material no deseado ya sea térmica o químicamente (Hwang et al., 2019).

La litografía es una de las técnicas de fabricación de microcanales más utilizadas e incluye técnicas como la fotolitografía, la litografía de haz de electrones, la litografía de haz de iones, la litografía blanda, la litografía de nanoimpresión y la litografía de rayos X. La técnica de fotolitografía en forma general implica la generación de una máscara (típicamente una capa de patrón de cromo en una placa de vidrio) que cubre el sustrato (como silicio, vidrio o GaAs) con polímero fotorresistente. Se irradia luz ultravioleta a través de la máscara sobre el polímero fotorresistente, lo que origina que se transfiera el patrón de la máscara a la capa fotorresistente sobre el sustrato generando un molde o un sello con un patrón de relieve. Si bien la técnica es muy utilizada para la generación de dispositivos, presenta inconvenientes: control limitado sobre las propiedades de la superficie (incapacidad para grabar en superficies curvas), largo tiempo desde el diseño hasta el prototipo y la necesidad de fabricación en salas limpias (Ziaie et al., 2004; Pal & Sato, 2009). La litografía suave es la técnica de litografía más utilizada, sobre todo con polímeros elastoméricos. Estos, son fundidos y curados sobre un sello (oblea) de silicio positivo. Después del curado el polímero se retira del sello (Qin et al., 2010; Rodrigue et al., 2015; Catarino et al., 2017; Geng et al., 2020; Matsumoto et al., 2020; Mondal et al., 2020; Liu et al., 2021). Esta técnica de fabricación también requiere de su ejecución en salas limpias.

Micromecanizado basado en láser

El micromecanizado láser es ampliamente utilizado para fabricar microcanales precisos. Esta técnica se puede utilizar para corte, perforación, mecanizado y grabado, obteniéndose una buena terminación y cortes precisos en comparación con otros métodos, pudiéndose adaptar a una amplia gama de materiales, desde aleaciones metálicas hasta materiales no metálicos y materiales compuestos, especialmente polímeros (Dubey & Yadava, 2008; Mushtaq et al., 2020). La velocidad y potencia del láser, tipo y presión de gas de asistencia, espesor y tipo de lámina del polímero, así como el modo de funcionamiento (onda continua o modo pulsado) son los parámetros que deben controlarse, ya que juegan un papel importante en el tamaño y la profundidad de los canales microfluídicos y en el corte de los sustratos (Choudhury, 2010; Ahmed et al., 2016). Si la potencia del láser es muy baja y la velocidad es rápida, daría lugar a un grabado superficial. Mientras que, si la potencia se mantiene alta y la velocidad del láser es lenta, el láser cortaría a través del material. Por lo tanto, se deben elegir los ajustes de potencia y velocidad óptimos con respecto al espesor de los materiales (Benton et al., 2019; Singh et al., 2020).

El principio básico del micromecanizado laser es la ablación (Becker & Gärtner, 2000). En relación a este proceso, en forma general, cuando un haz concentrado de radiación láser incide sobre una superficie, los electrones presentes en el sustrato son excitados por los fotones láser generando calor. Los efectos de calentamiento provocan la fusión o vaporización del material, resultando en la eliminación de materiales macroscópicos del sustrato (Prakash & Kumar, 2015; Hoffman, 2015; Ahmed et al., 2016).

La calidad de la resolución final dependerá no sólo de propiedades del material tratado (conductividad térmica, coeficiente de absorción, reflectancia), sino también de aquellas inherentes al laser, como monocromaticidad, direccionalidad del haz, longitud de onda, frecuencia de repetición. El efecto directo del punto focal del láser sobre la velocidad de grabado, la redeposición de los residuos y las microestructuras formadas en la superficie de la muestra, serán funcionales a los parámetros mencionados (Wang et al., 2008).

En este trabajo de Tesis se eligió la técnica de micromecanizado por ablación laser, debido a que esta metodología permite la fabricación de dispositivos microfluídicos en laboratorios convencionales, evitando el uso de salas limpias y reduciendo significativamente los costos de fabricación. Asimismo, la practicidad y bajo costo del método, permite una más rápida optimización de los procesos de generación de microgotas mediante un rediseño iterativo de prototipos.

1.1.3. Sistemas de bombeo

El sistema de bombeo es esencial para controlar el flujo y manipular los fluidos a través de los microcanales del dispositivo microfluídico. Los sistemas de generación de flujo pueden dividirse en dos grandes grupos: sistemas de generación de flujo pasivo y sistemas activos (Han, W. & Chen, X., 2021). Los sistemas pasivos basan su funcionamiento en el flujo de los fluidos a través de los canales del dispositivo bajo la acción de fuerzas tales como la gravitacional, capilar, osmótica, tensión superficial, succión al vacío o la presión. Estos sistemas no requieren de piezas mecánicas complejas, por lo que pueden emplearse para aplicaciones microfluídicas portátiles y de bajo costo (Zhu, P., & Wang, L., 2017; Xu et al., 2020).

Los sistemas activos se basan en bombas de jeringa automáticas, microbombas, válvulas electromagnéticas y magnéticas, bombas de vacío, fuerzas térmicas e interacciones electrocinéticas. Los métodos de bombeo activo son más complicados, pero se han vuelto más ampliamente utilizados debido a que durante los últimos años se ha logrado un control de flujo continuo más preciso (Lake et al., 2017). La versatilidad

de los sistemas microfluídicos autónomos se puede aumentar mediante el uso de elementos mecánicos miniaturizados adicionales integrados en el dispositivo, lo que permite experimentos multi-etapa altamente controlados que no se pueden lograr con sistemas pasivos y dispositivos manuales (Zhou et al., 2016; Iakovlev et al., 2022).

En este trabajo de Tesis se utilizaron bombas de infusión de jeringa, lo cual permitió controlar el flujo de fluidos de manera externa al dispositivo (componente independiente), con poca necesidad de intervenciones del analista, con un buen rendimiento y resultando muy económico.

1.1.4. Conectores

Al considerar la forma en que se conectará el dispositivo microfluídico a otros dispositivos externos, se deben tener en cuenta otros aspectos, como:

- ✓ A qué dispositivos se conectará.
- ✓ Las entradas y salidas de fluidos posicionadas en un plano o perpendicular al dispositivo.
- ✓ Si es de aplicación específico.
- ✓ Área ocupada por conexiones.
- ✓ Proceso de fabricación (Si es un conector estándar o hecho en función de la aplicación).
- ✓ Tolerancia a la presión y a la temperatura a la que se someterá por el paso de fluidos.
- ✓ Compatibilidad entre materiales utilizados.
- ✓ Volumen muerto generado en las conexiones.
- ✓ Esterilidad.
- ✓ Permeabilidad.
- ✓ Tipo de muestra a circular por las conexiones de entrada y salida.
- ✓ Precio.

Las interconexiones microfluídicas necesitan proporcionar una baja caída de presión y volumen muerto y un sello hermético, junto con un funcionamiento confiable bajo usos múltiples (Perozziello et al., 2016). La adopción de un diámetro de entrada de tamaño estándar facilita la interconexión con otras plataformas que utilizan el mismo tipo de conectores, así como la conectividad con la mayoría de los equipos externos como dispositivos HPLC y espectrómetros de masas (Kirby & Wheeler, 2013) o espectrofotómetros Raman (Perozziello et al., 2016), así como bombas de jeringa.

1.2. Objetivos parciales

Los objetivos planteados para este capítulo son:

Objetivo 1: Diseñar y construir dispositivos microfluídicos para la producción de microgotas.

Objetivo 2: Generar microgotas y micropartículas monodispersas y de tamaño controlado.

1.3. Materiales y métodos

1.3.1. Construcción de dispositivos microfluídicos

Para construir los dispositivos microfluídicos se utilizaron placas de PMMA cristalino (Acrílicos Norglas, Santiago, Chile). Se trabajó con placas con un espesor de 4 mm con las cuales se confeccionaron dispositivos con láminas superpuestas, como se describirá en detalle a continuación.

El corte de placas de PMMA (parte superior e inferior) se realizó utilizando una plataforma láser de CO₂ ULTRA X6000 (PLS Platform, Universal Laser System, Scottsdale, EE. UU.). Los parámetros establecidos para realizar el corte fueron 120 W de potencia y velocidad de posicionamiento del haz láser de 20 m.min⁻¹. Se diseñaron prototipos de dispositivos con dos configuraciones para generación de microgotas: juntura en forma de cruz y juntura en forma de T. Para ello, se obtuvieron placas de 30 mm de ancho y 80 mm de largo para chips con juntura en cruz y placas de 40 mm de ancho y 70 mm de largo para chips con juntura “T”.

Luego de obtenidas las placas, en la placa inferior de los respectivos prototipos se gravaron los canales mediante ablación, utilizando una potencia de 68 W y velocidad de posicionamiento del haz láser de 40 m.min⁻¹. Luego de la juntura, el canal se continuó en forma de serpentina para aumentar su longitud, permitiendo la estabilización de la gota ya formada antes de alcanzar el ducto de salida. El ancho del canal se determinó mediante microscopía óptica (DM750, Leica Microsystems, Heerbrugg, Suiza) con cámara digital ICC50W integrada, midiendo en diferentes zonas del dispositivo y obteniendo un valor promedio.

En la placa superior se realizaron perforaciones mediante frezado para insertar los conectores de entrada y salida en los que se colocan las mangueras para la inyección de los fluidos. Las longitudes de los microcanales y sus configuraciones se pueden observar en los planos diseñados para cada dispositivo (Figuras 15 y 16).

Seguidamente, las placas de PMMA se unieron térmicamente. Para ello, se calentaron, induciendo la formación de entrecruzamientos entre las macromoléculas para generar una unión permanente (Bamshad et al., 2016; Liga et al., 2016).

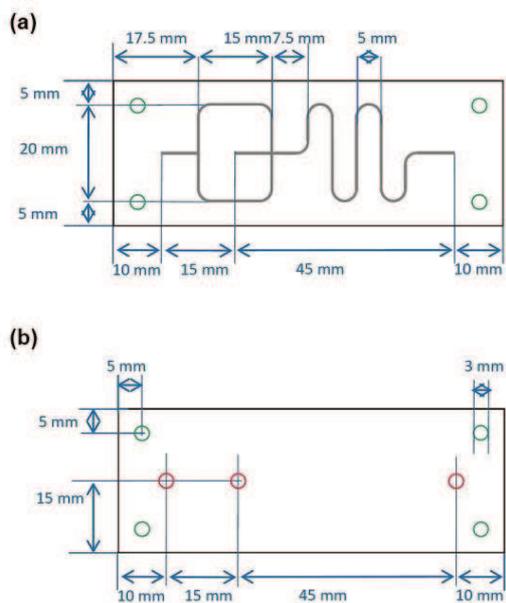


Figura 15: Diseño del dispositivo con junta en cruz utilizado para el control computarizado del láser. (a) Placa inferior. (b) Placa superior.

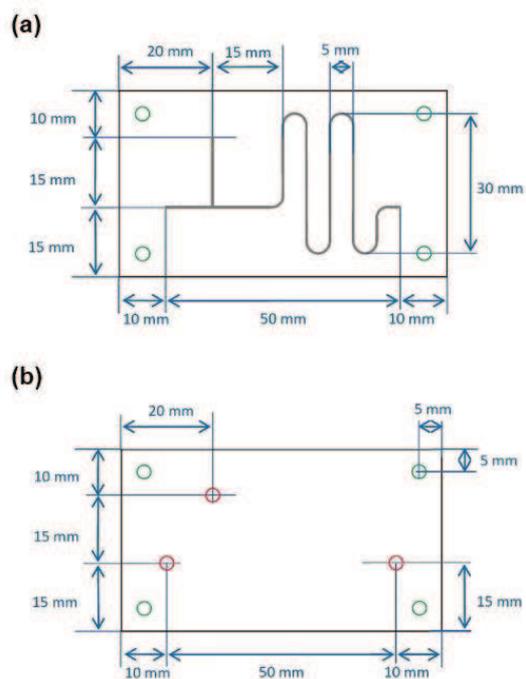


Figura 16: Diseño del dispositivo con junta en “T” utilizado para el control computarizado del láser. (a) Placa inferior. (b) Placa superior.

Previo al proceso de unión de ambas placas se realizó un protocolo de limpieza con agua ultrapura para eliminar todas las impurezas provenientes tanto del proceso de ablación láser como del fresado mecánico, dejándose escurrir a temperatura ambiente. Posteriormente, las superficies de PMMA se mojaron con etanol 99% (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina.), se ensamblaron y prensaron con pinzas tipo Binder clip de 25 mm (SIFAP, Buenos Aires, Argentina). Luego, el dispositivo se puso en un horno precalentado (Yamato, Modelo ADP310C, Santa Clara, EE.UU.). Se ensayaron diferentes condiciones, hasta obtener las condiciones óptimas de 75 °C durante 10 min. Una vez concluido este tiempo, se retiró el dispositivo del horno, dejándose enfriar a temperatura ambiente. Para finalizar, se retiraron las pinzas para equilibrar la presión sobre las placas y se ajustaron los conectores con rosca M5, quedando el dispositivo listo para su uso.

1.3.2. Ensayos de funcionamiento de los dispositivos

Para realizar las pruebas de concepto de los dispositivos diseñados, se decidió trabajar con una FC de aceite de oliva y una FD de soluciones de alginato sódico.

Para la preparación de las soluciones, se utilizó alginato sódico de baja viscosidad Kelgin® LV (Kelco, Atlanta, USA). Se dispersó la cantidad necesaria de alginato sódico bajo agitación constante a 25 °C en agua ultrapura. Una vez finalizado este procedimiento la solución resultante se mantuvo bajo agitación durante 30 min. para garantizar disolución completa. Unos minutos antes de finalizar el tiempo establecido, se agregó azida sódica en una concentración final de 0.02 % p/v para prevenir de la degradación microbiana. Las soluciones resultantes se dejaron reposar toda la noche en heladera. Al día siguiente, se volvieron a atemperar a 25 °C antes de usar. Las concentraciones de alginato sódico analizadas fueron 1.0, 1.5 y 2.0 % p/v. Asimismo, se prepararon soluciones de cloruro de calcio dihidrato (Anedra, Buenos Aires, Argentina) en una concentración de 20 % p/v mediante disolución de la sal en agua ultrapura. Esta solución se utilizó para inducir la gelificación externa de la FD una vez formadas las microgotas como se describirá a continuación.

1.3.3. Optimización de regímenes de flujo para la obtención de microgotas

La Figura 17 muestra el sistema completo. Los dispositivos microfluídicos fabricados se alimentaron con jeringas plásticas descartables de 10mL (Coronet, Jiangsu Medical Equipment Co, China) accionadas por bombas de infusión continua (Modelo PC11UBT, Apema, Villa Domínico, Argentina). En una de las jeringas se cargó solución de alginato sódico (FD) y en la otra, aceite de oliva comercial (FC). Se

exploraron diferentes regímenes de flujo fijando caudales en el rango de $0.1 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ a $4.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, para ambas fases. En cada prueba se evaluó el mecanismo de formación de las microgotas y la estabilidad del flujo continuo.

Las microgotas generadas se recolectaron en la solución de cloruro de calcio dihidrato 20 % p/v con agitación mecánica moderada utilizando un agitador magnético (IKA C-MAG HS7 digital, Staufen, Germany). Las micropartículas obtenidas luego de la gelificación externa se caracterizaron con un microscopio óptico Leica DM750 con cámara digital integrada Leica ICC50W (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suiza).

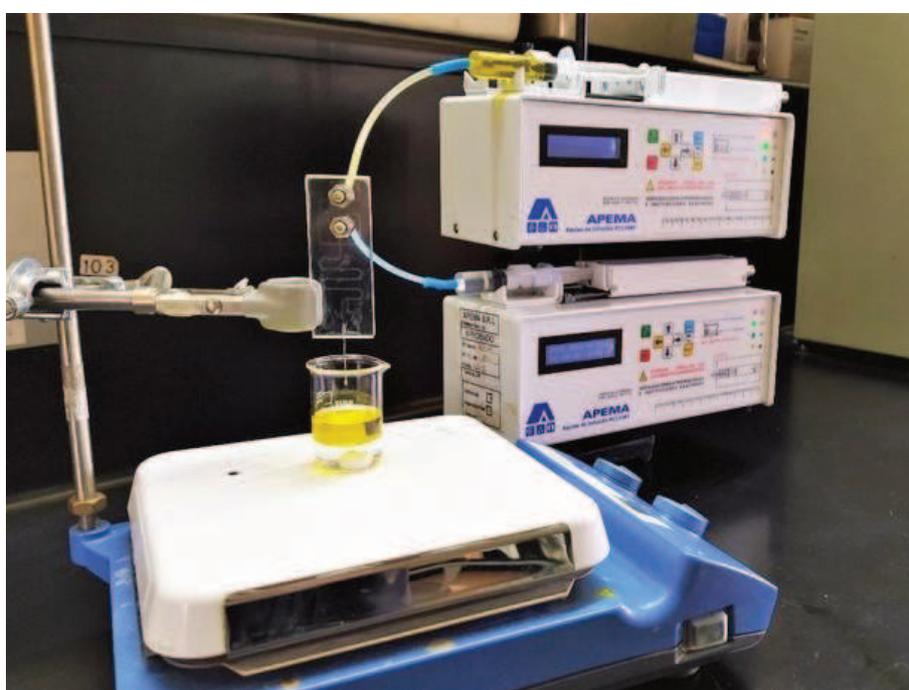


Figura 17: Dispositivo completo para la obtención de micropartículas.

1.4. Resultados y discusión.

La Figura 18 muestra los prototipos de dispositivos fabricados. Mediante la puesta a punto de la metodología descrita en la sección 1.3.1, se obtuvieron prototipos con microcanales con ancho promedio de $360 \mu\text{m}$ (Se asumió sección de los canales cuadrada). Asimismo, se logró un pegado homogéneo dejando los microcanales bien definidos, lo que permitió la generación de flujos laminares sin perturbaciones.

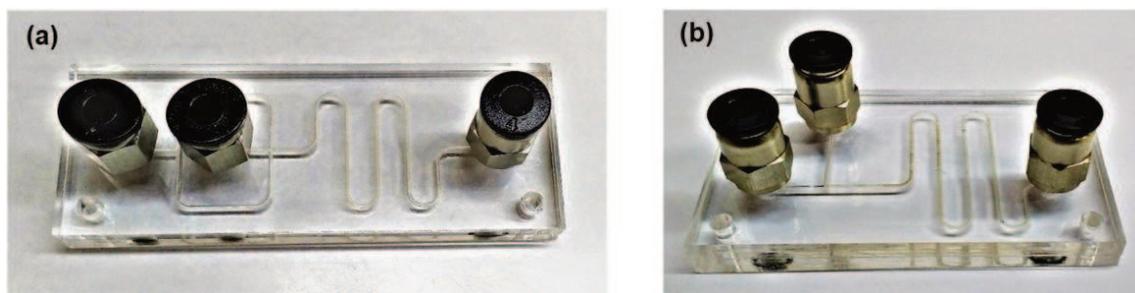


Figura 18: Diferentes prototipos de dispositivos microfluídicos fabricados y probados. (a) Dispositivo con juntura “Cruz” y conectores de entrada y salida con roscas M5; (b) Dispositivo con juntura “T” y conectores de entrada y salida con roscas M5.

Para determinar las condiciones operativas más favorables, se exploraron diferentes relaciones de flujo entre la FC y la FD. Después de explorar diferentes condiciones en ambos prototipos de dispositivos, se seleccionó la solución de alginato de sodio 1.5 % p/v como concentración óptima para conformar la fase dispersa. Utilizando concentraciones menores, no se lograron formaciones de gotas homogéneas y con concentraciones superiores, ocurrían gelificaciones indeseadas dentro de los microcanales provocando obstrucciones.

Determinación de condiciones operativas para dispositivo con juntura cruz y T

En la Figura 19, se muestra en un dispositivo con juntura “Cruz”, el efecto sobre la formación de gotas cuando se varía el caudal de la FD de $0.1 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ a $4.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, para un caudal constante de la FC de $3.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, utilizando una solución de 1.5 % p/v de alginato de sodio. Las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio USB enfocando la zona del dispositivo donde se produce la formación de la microgota.

El efecto de la variación de los caudales de la FD para un caudal fijo de FC, se observa claramente en la secuencia de imágenes de la Figura 19.

En la Figura 19a y 19b se observa que para $0.1 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ de FD y $0.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente, el flujo elongacional produce la segmentación de la corriente central. A mayores caudales de la FD, el fenómeno de formación de gotas se dificulta, comenzándose a observar la formación de un co-flujo continuo de la misma sin que se produzca la ruptura, Figuras 19c, 19d, 19e y 19f. Por lo que, para estas relaciones de caudales, la relación óptima se verifica para un caudal de FC de $3.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ y FD de $0.1 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ a $0.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$.

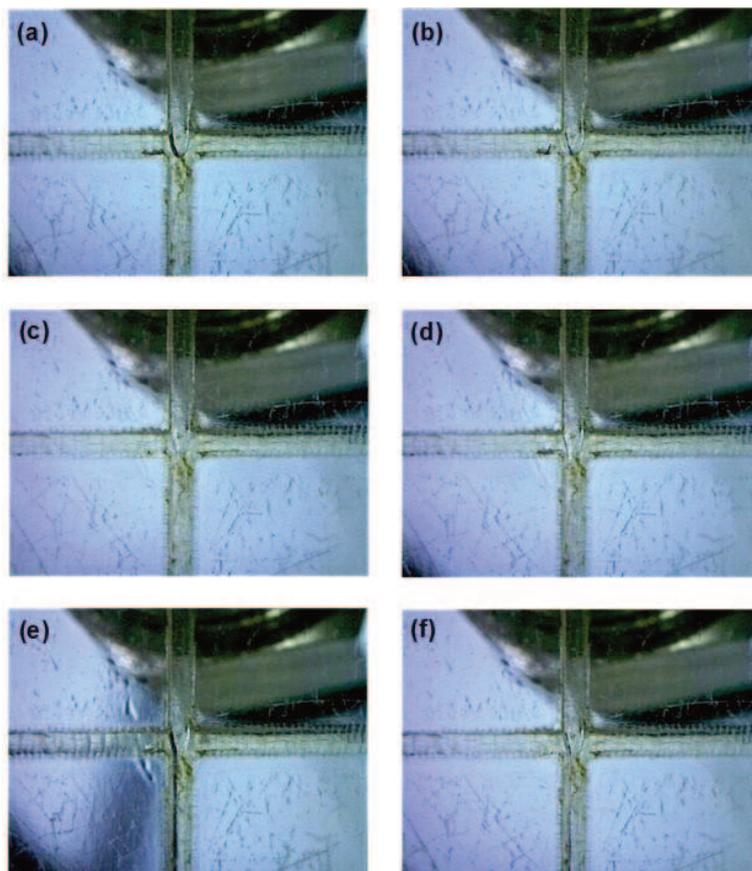


Figura 19: Efecto de la variación de flujo de la FD a flujo constante de FC (3.5 mL.h^{-1}) en la formación de gotas (a) 0.1 mL.h^{-1} , (b) 0.5 mL.h^{-1} , (c) 1.0 mL.h^{-1} , (d) 2.0 mL.h^{-1} , (e) 3.5 mL.h^{-1} , (f) 4.0 mL.h^{-1} . Imágenes obtenidas con microscopio USB.

El efecto de la variación de los caudales de la FD para un caudal fijo de FC, se observa claramente en la secuencia de imágenes de la Figura 19.

El mismo razonamiento de trabajo se utilizó para evaluar el efecto sobre la formación de microgotas cuando se mantiene constante el caudal de la FD se varía el caudal de la FC en el rango comprendido entre 0.1 mL.h^{-1} a 4.0 mL.h^{-1} . En la Figura 20 se evidencia el comportamiento de las fases a medida que se varía la relación de caudales.

Los resultados obtenidos muestran que la mejor relación de caudales para formar las microgotas se evidencia cuando se opera a FD 0.1 mL.h^{-1} y FC de 3.5 mL.h^{-1} .

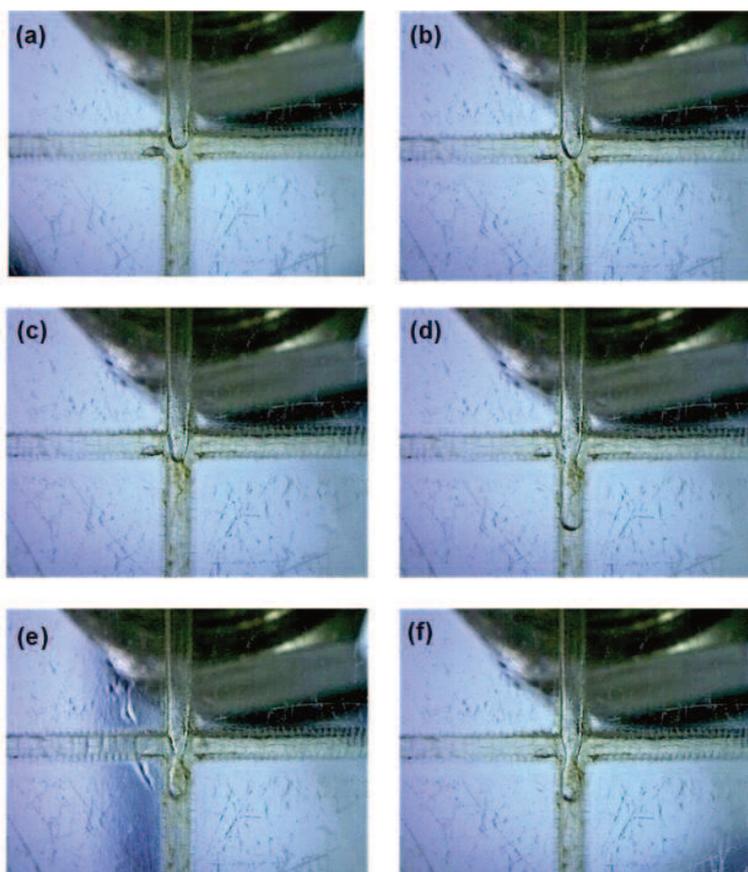


Figura 20: Efecto de la variación de flujo de la FC a flujo constante de FD (0.1 mL/h) en la formación de gotas (a) 0.1 mL.h^{-1} , (b) 0.5 mL.h^{-1} , (c) 1.0 mL.h^{-1} , (d) 2.0 mL.h^{-1} , (e) 3.5 mL.h^{-1} , (f) 4.0 mL.h^{-1} . Imágenes obtenidas con microscopio USB.

En la Figura 21 se muestra el funcionamiento del dispositivo con junta cruz para estas condiciones específicas de trabajo. Se observó estabilidad de flujo del sistema, facilitando su puesta en régimen y mantenimiento del funcionamiento.

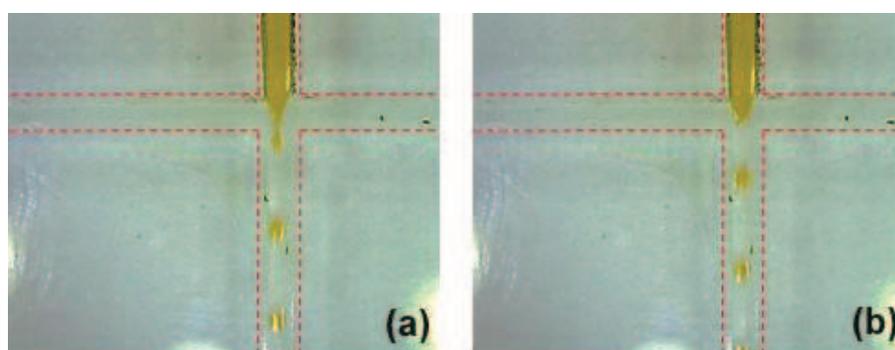


Figura 21: Comportamiento del dispositivo con junta “Cruz” en condiciones de trabajo. (a) Elongación de FD en la junta. (b) Ruptura de la FD y formación de la microgota. Las líneas cortadas delimitan los bordes del canal. Se adicionó colorante AO a la FD para lograr una mejor visualización de las microgotas.

Este resultado es alentador, dado que la estabilidad del flujo obtenido en este tipo de sistemas es uno de los mayores desafíos a superar para un adecuado diseño metodológico que permita una futura aplicación y escalado de estas tecnologías para producciones a nivel industrial.

Debido a que se observó que el impacto del goteo sobre la solución de cloruro de calcio producía cierta deformación en las microgotas previo a la formación de micropartículas por acción del ion calcio, se decidió colocar una cánula a la salida del dispositivo de manera de sumergirla en la solución de recolección permitiendo una liberación más suave. Así, las partículas obtenidas resultaron homodispersas, con buena esfericidad y con tamaños comprendidos en los 200 y 300 μm (Figura 22).

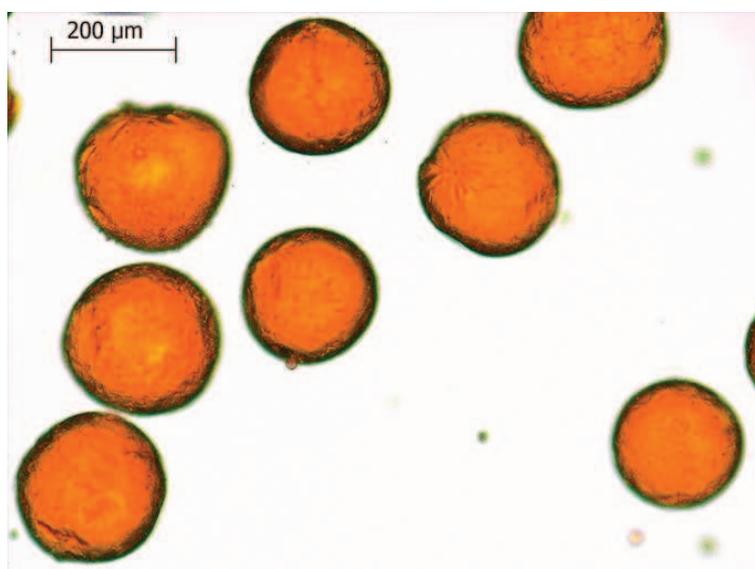


Figura 22: Micropartículas de alginato sódico obtenidas por gelificación externa utilizando un dispositivo microfluídico con juntura “cruz”. Se adicionó a la FD colorante AO para lograr una mejor visualización de las microgotas.

En la Figura 23, se muestra en un dispositivo con juntura “T”, sobre el que se realizan los ensayos de optimización de relaciones de caudales, evaluando el efecto sobre la formación de gotas cuando se varía el caudal de la FD (solución de 1.5 % p/v de alginato de sodio) de $4.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ a $0.1 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, para un caudal constante de la FC de $3.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$.

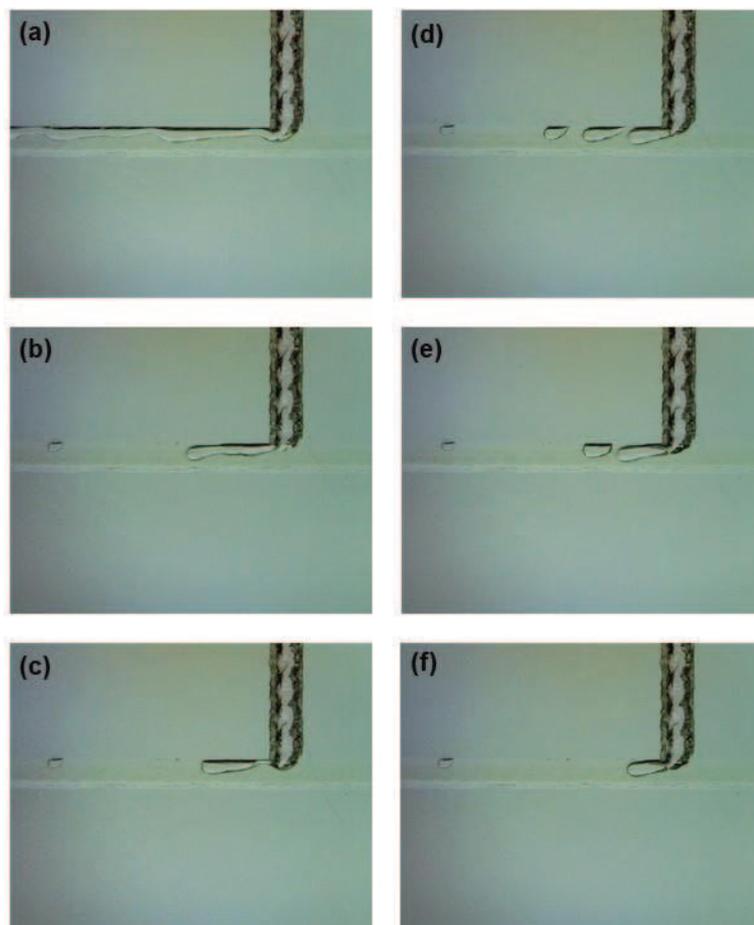


Figura 23: Efecto de la variación de flujo de la FD a flujo constante de FC (3.5 mL.h^{-1}) en la formación de gotas (a) 0.1 mL.h^{-1} , (b) 0.5 mL.h^{-1} , (c) 1.0 mL.h^{-1} , (d) 2.0 mL.h^{-1} , (e) 3.5 mL.h^{-1} , (f) 4.0 mL.h^{-1} . Imágenes obtenidas con microscopio USB.

Se puede apreciar en la Figura 23a un efecto no deseado en el canal, ya que la FD se adhiere a las paredes. Esta situación no debería suceder ya que el PMMA se caracteriza por sus propiedades hidrofóbicas. Este efecto se pudo corregir variando la relación de caudales de las fases, hasta originar el desprendimiento de pequeños volúmenes de FD, donde, la dinámica de los fluidos generaba microgotas de tamaño variable que inestabilizaban el sistema (Figura 23b y 23c). En la Figura 23d se observa el sistema en régimen de generación de microgotas, para una relación de caudal de FC/FD igual a 3.5. Para una relación de caudales de 7, se observó la formación de gotas, pero no se mantenía una generación constante (Figura 23e). Para relaciones de caudales superiores ya no se generaban microgotas (Figura 23f). Por lo que el sistema bajo estas condiciones se estabilizaba en un rango acotado de relaciones de caudales.

El mismo razonamiento de trabajo se utilizó para evaluar el efecto sobre la formación de microgotas cuando se mantiene constante el flujo de la FD y se varía el

caudal de la FC en el rango comprendido entre $4.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ a $0.1 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$. En la Figura 24 se evidencia el comportamiento de las fases a medida que se varía la relación de flujos.

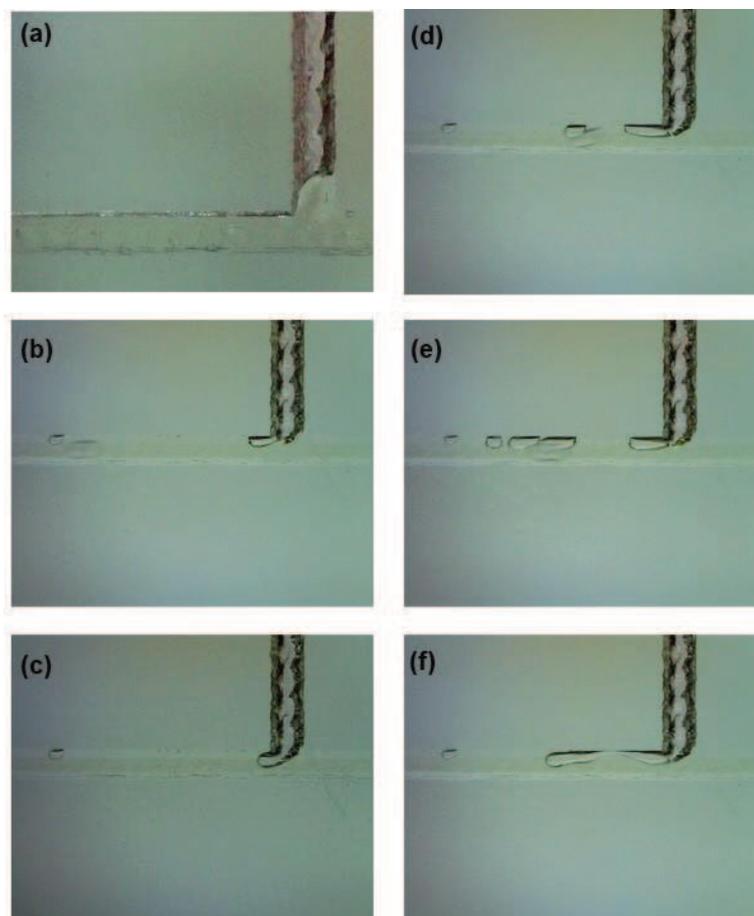


Figura 24: Efecto de la variación de flujo de la FC a flujo constante de FD (0.1 mL/h) en la formación de gotas (a) $4.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, (b) $3.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, (c) $2.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, (d) $1.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, (e) $0.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, (f) $0.1 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$. Imágenes obtenidas con microscopio USB.

En la Figura 24a se observa que cuando el flujo de la FC es de $4.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ ingresa al canal portador de la FD, impidiendo que esta circule. A medida que la relación de flujos va variando conforme a la reducción del correspondiente a la FC, la FD comienza a elongarse en el canal por el que circula la FC, pero sin producirse su ruptura para formar la microgota (Figura 24b y 24c). Recién se observa ruptura y formación de microgotas cuando se da una relación de caudales de FD/FC de 0.2 (Figura 24d) y de formación continua cuando la relación es de 1 (Figura 24e). Para otra relación, la FD comienza a elongarse nuevamente, posiblemente debido a su carácter viscoelástico, con lo que el sistema sale de régimen de generación de microgotas (Figura 24f).

Las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio USB enfocando la zona del dispositivo donde se produce la formación de la microgota.

En la figura 25 a y 25b, se muestra la generación de microgotas en las mejores condiciones de trabajo para caudales de $1.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ FD y $3.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ FC.

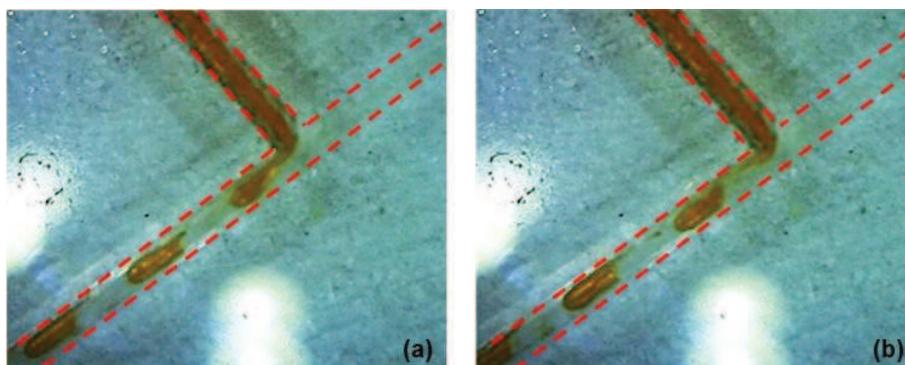


Figura 25: Comportamiento del dispositivo con juntura “T” para FD $1.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ y FC $3.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$. (a) Elongación de FD en la juntura. (b) Ruptura de la FD y formación de la microgota. Las líneas cortadas delimitan los bordes del canal. Se adicionó a la FD colorante amarillo ocaso para lograr una mejor visualización de las microgotas.

Las micropartículas obtenidas presentaron variabilidad de tamaños y gran polidispersidad. Asimismo, se evidenció una pequeña deformación con pérdida de esfericidad luego de someterse a la gelificación externa con agitación (Figura. 26).

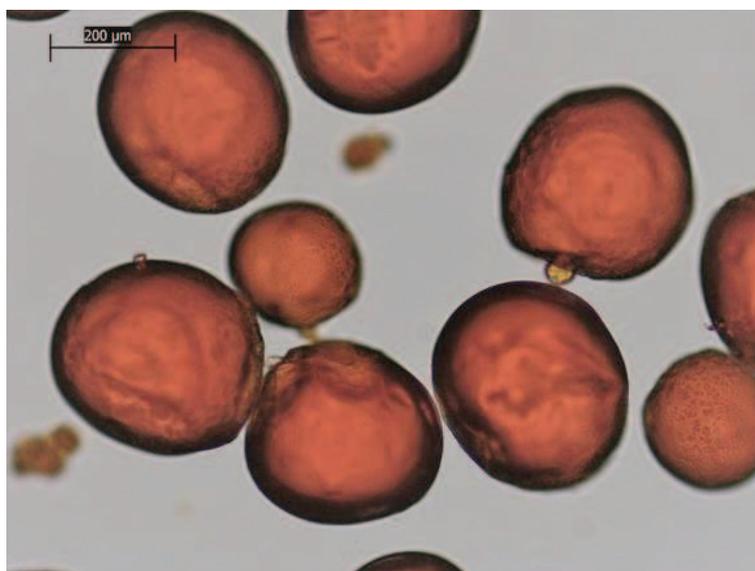


Figura 26: Micropartículas de alginato sódico obtenidas por gelificación externa utilizando un dispositivo microfluídico con juntura “T”. Se adicionó a la FD colorante AO a la FD para lograr una mejor visualización de las microgotas.

Con ambos dispositivos propuestos se lograron obtener microgotas y posteriormente micropartículas, luego del proceso de gelificación externa con solución de cloruro de calcio 20 % p/v. Posiblemente, el carácter no Newtoniano de la solución de alginato sódico, hizo que se observaran diferentes fenómenos en las etapas de deformación, ruptura y posterior liberación de las gotas de la juntura donde se generaban. Debido a este carácter no-Newtoniano pseudoplástico de las soluciones poliméricas, la variación del caudal de la FD conlleva a un cambio en la viscosidad de la solución. Para ambos dispositivos ensayados, el valor del Número Capilar (Ca) resultó de 0.018 ($Ca \ll 1$) (flujo de la FC de $3.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, un valor de viscosidad de $81 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ para aceite de oliva a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y sección de canal de $1.29 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2$). Por lo que se evidencia que las fuerzas viscosas predominan sobre las fuerzas interfaciales y en la juntura el efecto fue muy notable. Es así, que se observaron muchas diferencias en el trabajo con ambos prototipos, en referencia al control del régimen de funcionamiento del sistema reaccionante, dispersidad de tamaño y características morfológicas de las microgotas/micropartículas. El dispositivo con juntura cruz resultó más versátil, pudiéndose mantener en régimen de trabajo continuo de forma más controlada y las propiedades reológicas de la solución de alginato, incluyendo la viscosidad intrínseca de la solución polimérica, fueron un aspecto importante a considerar. Tanto el peso molecular del polímero como su concentración en la solución afectaron la dinámica del proceso de ruptura y formación de microgotas (Christanti & Walker, 2001; Christanti & Walker, 2002). Para el caso de los fluidos poliméricos, el estudio de estos fenómenos fundamentales está emergiendo en la literatura y ciertamente merece más investigación (Wong et al., 2017).

1.5. Conclusiones parciales

A partir de los estudios descritos en este capítulo, relacionados a la fabricación de dispositivos microfluídicos para la generación de micropartículas, se arribó a las conclusiones que se detallan a continuación:

- (i) Los dispositivos se diseñaron y construyeron íntegramente en laboratorios convencionales, sin la necesidad de uso de salas limpias, posibilitando un mayor acceso de estas tecnologías para su uso en los sectores académicos e industriales.
- (ii) Los materiales utilizados fueron adquiridos en su totalidad en comercios locales.
- (iii) La producción de dispositivos en PMMA micromaquinado posibilita la reducción de costos y disminuye tiempos de prueba en comparación con otros métodos de fabricación.

(iv) Las pruebas de concepto realizadas, utilizando una solución polimérica previamente estudiada como FD, permitieron evaluar los dispositivos bajo distintas relaciones de flujos entre fases con el fin de obtener microgotas, habiéndose encontrado condiciones operativas muy estables

(v) El dispositivo con juntura en “cruz” mostró una mayor estabilidad de flujo, facilitando su puesta en régimen y mantenimiento del funcionamiento durante varias horas en forma continua. El dispositivo con juntura T presentó problemas de puesta en régimen, debido, sobre todo, a la adherencia de la FD a las paredes del canal que ocasionó obstrucciones.

(vi) Ajustando variables operacionales tanto microfluídicas como químicas se logró obtener con el dispositivo de juntura cruz, micropartículas con un tamaño comprendido entre 200-300 μm , homodispersas y con muy buena esfericidad.

CAPÍTULO 2

GENERACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE CLARA DE HUEVO/K-CARRAGENATO CON DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS

2.1. Introducción

Como se detalló en la introducción general de esta tesis, la interacción específica entre proteínas y polisacáridos puede utilizarse para la obtención de micropartículas encapsulantes, transformándolas en portadores de PAs (Davidov-Pardo et al., 2015; De Souza Simões et al., 2017; Semenova, 2017).

En el presente capítulo se presenta una metodología para la obtención de micropartículas compuestas por una mezcla de clara de huevo (EW) y k-carragenato (CG) mediante la utilización de dispositivos microfluídicos. Se hace una breve introducción de conceptos teóricos relativos a los biopolímeros utilizados como matriz constitutiva de las micropartículas. Luego, se describe la metodología microfluídica propuesta para generación de micropartículas y encapsulación de un PA hidrofílico modelo. Finalmente, se presentan las experiencias realizadas para evaluar la capacidad de liberación del activo encapsulado en un medio acuoso.

2.1.1. Conceptos generales asociados a proteínas constitutivas del huevo de gallina

El huevo de gallina (*Gallus gallus domesticus*) es uno de los alimentos necesarios para equilibrar los requisitos dietarios del cuerpo humano y una rica fuente de proteínas con un alto valor biológico. Proporciona una combinación equilibrada y única de nutrientes como ácidos grasos insaturados esenciales (ácido oleico y ácido linoleico), hierro, fosfato, oligoelementos y vitaminas liposolubles para personas de todas las edades (Huopalahti et al., 2007; Asghar & Abbas, 2012), por lo que es considerado por tecnólogos y nutricionistas como el alimento perfecto de la naturaleza.

2.1.2. Estructura general del huevo

La estructura del huevo, puede describirse en forma general como integrada por tres componentes principales: cáscara, clara (EW) y yema.

La cáscara presenta una estructura semipermeable porosa, compuesta principalmente por carbonato de calcio (94%) (Chambers et al., 2017). Entre sus funciones más importantes se puede mencionar que: actúa como barrera protectora hacia el entorno, controla el flujo de agua y gas durante el desarrollo embrionario y el balance en la proporción de calcio para el desarrollo del pollito después de que se hayan agotado las reservas de la yema (Belitz et al., 2009).

La EW es una fuente natural de proteínas de alta calidad, en forma de complejos de glicoproteínas, rica en aminoácidos esenciales, que forma un sistema coloidal específico, el cual contiene numerosos grupos de polipéptidos. Es un fluido no-

Newtoniano pseudoplástico. El pH de la EW del huevo recién puesto es de 7.6-7.9 y puede aumentar hasta valores de 9.4 a 9.7, dependiendo de la temperatura, la cantidad de dióxido de carbono en el medio ambiente y del grado de sellado de la cáscara que permita la difusión del dióxido de carbono a través de ella (Mine, 1995; Hammershøj et al., 2002; Nys et al., 2004).

La yema es también un fluido no-Newtoniano pseudoplástico. Su pH es 6.0, aunque puede aumentar ligeramente durante un almacenamiento prolongado (Nys et al., 2004). Es fuente de antioxidantes, aminoácidos aromáticos, carotenoides, vitaminas, fosfolípidos y proteínas, que no sólo proporcionan valor nutricional, sino también actúan a favor de la salud propiciando múltiples beneficios mediante su ingestión (Song & Kerver, 2000; Singh et al., 2012; Lesnierowski & Stangierski, 2018).

Según algunos autores, la distribución porcentual promedio de las estructuras mencionadas, comprende a la yema en el centro (30%) rodeada de EW (60%) y ambas, encerradas por membranas dentro de la cáscara (10%) (Nys et al., 2004; Belitz et al., 2009; Chambers et al., 2017).

2.1.3. Proteínas mayoritarias presentes en la EW

Dado que en este trabajo de Tesis se utiliza la EW como componente de la FD, se presentan en la tabla 1 las proteínas predominantes en su constitución porcentual y sus puntos isoeléctricos.

Tabla 1: Composición porcentual de la EW y puntos isoeléctricos de las proteínas principales.

Proteína	Porcentaje (%)	Punto isoeléctrico
Ovoalbúmina	54	4.5
Ovotransferrina	12	6.1
Ovomucoide	11	4.1
Ovomucina	3.5	4.5-5.0
Lisozima	3.5	10.7

A continuación, se describen algunas características relevantes de estas proteínas, tanto desde el punto de vista tecnofuncional como fisiológico (Jin et al., 2022; Sun et al., 2022).

Ovoalbúmina

Es una fosfoglicoproteína monomérica con un peso molecular de 44.5 kDa. Es la única proteína de la EW que contiene grupos sulfhidrilos libres (Mine, 1995) y

aproximadamente el 5% de ella existe en la S-forma, mientras que, más del 50% de la ovoalbúmina se convierte en forma irreversible a la especie S durante el almacenamiento. Un pH de alrededor de 9.2 y una temperatura alta (85 a 95 °C) aumentan la tasa de conversión (Donovan & Mapes, 1976).

La mayoría de las propiedades de la ovoalbúmina y la S-ovoalbúmina son idénticas. Las diferencias entre estas proteínas se presentan sólo en condiciones de desnaturalización. La S-ovoalbúmina es una forma más estable al calor, con un marcado aumento en la temperatura de desnaturalización. La temperatura de desnaturalización de la ovoalbúmina es de 81.6 a 84.5 °C, mientras que para la S-ovoalbúmina es de 89.0 a 92.5°C. Es por esto que las temperaturas de coagulación de la EW fresca y alterada por almacenamiento difieren en 10 °C (Donovan & Mapes, 1976; Hammershøj et al., 2002; Shinohara et al., 2007).

El tratamiento térmico de la EW por encima de la temperatura de desnaturalización expone los aminoácidos no polares y que contienen sulfhidrilo de las proteínas de la EW, permitiendo interacciones hidrofóbicas y disulfuro. La formación de tales interacciones y enlaces conduce a la formación de un hidrogel viscoelástico fuerte (Weijers et al., 2006; Raikos et al., 2007; Zhu & Wang, 2017).

Ovotransferrina (Conalbúmina)

Es una glicoproteína monomérica perteneciente a la familia de las transferrinas con un peso molecular de 76 kDa y consiste en una cadena de péptidos que contiene una unidad de oligosacáridos hecha de cuatro manosas y ocho residuos de N-acetilglucosamina (Belitz et al., 2009).

Se conocen cuatro tipos principales de transferrina de unión al hierro: transferrina sanguínea (serotransferrina); lactotransferrina de leche (lactoferrina); melanotransferrina asociada a la membrana y ovotransferrina de EW (Crichton et al., 1990). Aunque estos cuatro tipos de transferrina tienen funciones fisiológicas distintas, todas sirven para controlar los niveles de hierro en los fluidos biológicos y, por lo tanto, poseen características conservadas. La producción de ovotransferrina en los huevos está bajo el control de hormonas esteroideas (estrógenos, progestinas, glucocorticoides y andrógenos), que proporcionan una secreción de ovotransferrina de alto nivel en la EW durante su biosíntesis.

Ovomucoide

Es una proteína altamente glicosilada con un peso molecular de 28 kDa, pero la banda en SDS-PAGE aparece entre 30 a 40 kDa. Ovomucoide es conocida como un

inhibidor de la tripsina secretora pancreática, tiene un sitio reactivo putativo para la inhibición de la serina proteasas y se considera un alérgeno alimentario importante en EW.

Cada molécula de ovomucoide se une a una molécula de tripsina y la estructura tridimensional se asegura con 3 enlaces disulfuro en ella (Abeyrathne et al., 2013; Erwanto & Sukarno, 2023).

Ovomucina

Es una glicoproteína sulfatada, caracterizada por un alto peso molecular (PM = 5.5-8.3.10³ kDA) y una estructura de subunidades (Sato & Kato, 1980; Itoh et al., 1987; Belitz et al., 2009). Estas subunidades tienen diferentes composiciones de aminoácidos y diferentes cantidades de carbohidratos (Watanabe et a., 2004), lo que origina una estructura macromolecular altamente polimerizada como la de las mucinas de mamíferos (Gallagher & Corfield, 1978), que se apoya firmemente con la participación de puentes disulfuro entre ellas (Geng et al., 2017).

Lisozima

Es una enzima que puede hidrolizar el enlace β entre el ácido N-acetilneuramínico y la N-acetilglucosamina en la pared celular bacteriana (Huopalahti et al., 2007); es por esto que recibe el nombre de N-acetil-hidrolasa-murámica y posee lisina y leucina en el enlace N-N y C-terminal, respectivamente. El peso molecular de la lisozima es de 14.4 kDa y consiste en una sola cadena polipeptídica con 129 aminoácidos.

Se han encontrado muchas formas de lisozima, pero la lisozima del huevo es la más soluble y estable entre ellas. En la naturaleza se encuentra como un monómero, pero ocasionalmente está presente como un dímero con más estabilidad térmica. Se considera una proteína básica fuerte en la EW (Huopalahti et al., 2007). La lisozima tiene 4 puentes de disulfuro que conducen a una alta estabilidad térmica. Tiene tendencia a unirse a proteínas con carga negativa como la ovomucina de la EW (Wan et al., 2006; Zhao et al., 2021).

2.1.4. Propiedades tecnofuncionales asociadas a las proteínas de EW

La compleja composición del huevo presenta características particulares en cada una de sus fracciones asociadas a su carácter multifuncional. La desnaturalización de proteínas globulares bajo condiciones variables puede conducir a una gran variedad de propiedades tales como solubilización, coagulación, gelificación, emulsificación, unión

al agua y capacidad de formación de espumas, que intervienen favorablemente en la constitución de distintos sistemas involucrados en la industria alimenticia, farmacéutica y biotecnológica (Zhu et al., 2018). En especial, la capacidad de gelificación de la EW se emplea cada vez más para modificar la consistencia y las propiedades texturales de los sistemas alimentarios, y para diseñar matrices con la capacidad de transportar y liberar ingredientes o principios bioactivos (Campbell et al., 2003; Liu et al., 2017a; Zhu et al., 2018; Razi et al., 2023).

Un gel es una forma intermedia entre líquido y sólido. Las moléculas poliméricas pueden enlazarse entre sí y formar una red intermolecular en el medio líquido. El medio líquido, que es comúnmente agua, afecta la naturaleza y las fuerzas intermoleculares del gel formado y mantiene la integridad de la red polimérica (Alleoni, 2006). La red formada puede mantener el agua y evitar pérdidas. La estructura macromolecular, la capacidad de inmovilizar el agua, la textura y las propiedades reológicas son algunos de los parámetros más importantes que pueden describir la calidad del gel (Alleoni, 2006). El gel de EW es un tipo de hidrogel en el que la agregación de proteínas desnaturalizadas por calor forma una estructura de red (Campbell et al., 2003). Las interacciones no covalentes (es decir, enlaces electrostáticos, hidrofóbicos e hidrógeno) y la agregación de proteínas mediada por enlaces intermoleculares son comunes en este proceso (Nojima & Iyoda, 2018). Durante la formación del gel, las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas y la formación de enlaces disulfuro intermoleculares tienen un papel esencial en las propiedades finales del gel (Khemakhem et al., 2019). Las fuerzas atractivas y repulsivas de las moléculas de proteína tienen un efecto significativo en la integridad física de estos geles. La red 3D no se puede formar en presencia de fuerzas repulsivas predominantes, mientras que el agua se expulsa de la matriz cuando las fuerzas atractivas son elevadas. Varios parámetros como el pH de la solución, la concentración de proteínas, la presencia de electrolitos y carbohidratos, y su concentración influyen en la naturaleza y las propiedades del gel (Alleoni, 2006; Razi et al., 2018).

2.1.5. Propiedades benéficas para la salud de distintos constituyentes del huevo

El huevo contiene componentes de los que se han reportado asociaciones a propiedades benéficas para la salud, como la presencia de ácidos grasos esenciales, antioxidantes, micronutrientes, carotenoides y proteínas funcionales.

Los ácidos grasos esenciales componentes de los fosfolípidos de cadena larga, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico aportan flexibilidad a las membranas celulares y reducen los niveles de colesterol en el plasma

(Seuss-Baum & Nau, 2011). Es así que se han reportado asociaciones positivas entre el estrés oxidativo y la incidencia de enfermedades crónicas, como el cáncer y las enfermedades cardíacas (Lesnierowski & Stangierski, 2018).

Los antioxidantes incluyen: selenio, que actúa para reducir el estrés oxidativo de los radicales libres que promueven enfermedades cardíacas; en la yema de huevo, los carotenoides, como la luteína y la zeaxantina, juegan un papel en la prevención de cataratas y degeneración macular relacionada con la edad (Superti et al., 2007).

Se destaca también la presencia de vitaminas liposolubles: A, D, E y K, y vitaminas hidrosolubles del grupo B, minerales relevantes como calcio, hierro, magnesio, fósforo, sodio y zinc (Superti et al., 2007).

Entre las proteínas de la EW se han reportado en forma creciente estudios que permitieron establecer distintas funciones bioactivas de las mismas. Se ha encontrado que la hidrólisis enzimática de la ovoalbúmina utilizando proteasas gastrointestinales mejora su actividad antihipertensiva, antimicrobiana contra algunos microorganismos (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Candida albicans*) y antioxidante (Fujita et al., 1995; Pellegrini et al., 2004; Yu et al., 2014; Liu et al., 2018).

La ovotransferrina se identificó como el factor clave para limitar el crecimiento bacteriano en la EW (Alderton et al., 1946) y estudios posteriores lo ratificaron en pruebas con diferentes especies, como *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Proteus melanovogenes* y *Aerobacter cloacae* (Garibaldi, 1960).

Varios estudios han demostrado que la ovomucina y sus péptidos poseen buenas actividades antibacterianas, antiinflamatorias y antioxidantes en estudios realizados *in vitro* (Sun et al., 2016; Abeyrathne et al., 2016). Pueden participar y mediar en la regulación de diversas funciones celulares, estimular la proliferación de macrófagos y linfocitos (Tanizaki et al., 1997), promover la síntesis de citoquinas como la interleucina, factor de necrosis tumoral, e interferón, afectando así al sistema inmunitario e inhibiendo la formación de tumores (Shan et al., 2014). Además, la ovomucina también puede reducir el nivel de colesterol sérico (Omana et al., 2010).

Para ovomucoide se reporta actividad como agente antimicrobiano e inmunomodulador y los péptidos derivados de ovomucoides usando pepsina mostraron actividad de unión a Inmunoglobulina E y retención de sus actividades inhibitoras de la tripsina (Kovacs-Nolan et al., 2000). También se ha reportado que ovomucoide no perdió su inmunoreactividad incluso después de la hidrólisis usando pepsina, pero se desconoce el papel de los carbohidratos en esta inmunoreactividad (Matsuda et al., 1985) y que puede ser usado para controlar a *Streptomyces erythraeus*. Incluso la

proteína se considera como un inhibidor de la tripsina, que es una propiedad negativa de la proteína, tiene la capacidad de controlar microorganismos. Por lo tanto, se puede utilizar como agente antimicrobiano especialmente para los alimentos (Nagata & Yoshida, 1984).

La lisozima de EW es una de las proteínas alimentarias más utilizada en la industria para diferentes fines por su demostrada actividad antibacteriana frente a bacterias gram-positivas y su actividad antiviral. Es utilizada en la industria farmacéutica, alimentaria, en veterinaria, en medicina y en la industria cosmética. Muchas modificaciones de la proteína permiten ampliar su espectro antibacteriano logrando así afectar a bacterias gram-negativas. Se ha demostrado que el tratamiento térmico de la proteína a pH 6.0 potencia su actividad antibacteriana. Los mismos resultados se han conseguido con modificaciones químicas reduciendo sus puentes disulfuro, con modificaciones genéticas e hidrólisis enzimática (Abeyrathne et al., 2013). También se han descrito otras actividades de la lisozima de huevo como la antioxidante (Liu et al., 2006), antiheparínica (Mega & Hase, 1994), antifúngica, capacidad fusogénica con fosfolípidos y potenciación del efecto de antibióticos (Ibrahim et al., 2001).

Las aplicaciones industriales de las proteínas de la EW así como sus enzimas hidrolizadas, están en una etapa de constante expansión, investigación y desarrollo (Abeyrathne et al., 2013) y tienen un alto potencial para ser utilizados en las industrias farmacéutica, nutracéutica y alimentaria.

2.1.6. Conceptos generales asociados a carragenatos.

Los carragenatos son polisacáridos que se obtienen de ciertas algas rojas de la clase Rhodophyceae y pertenecen a la familia de los galactanos sulfatados lineales hidrofílicos.

Se componen principalmente de residuos de D-galactosa distribuidos alternativamente en unidades de 3 enlaces β -D-galactopyranosa y 4 enlaces α -D-galactopyranosa, formando unidades repetitivas (Van De Velde et al., 2002a; Campo et al., 2009). Se clasifican según el grado de sustitución que se produce en sus grupos hidroxilos libres y ellas, son generalmente la adición de sulfato de éster o la presencia del 3,6-anhídrido en el residuo de 4 enlaces de α -D-galactopyranosa (Campo et al., 2009).

Además de D-galactosa y 3,6-anhidro-D-galactosa como principales residuos de azúcar y sulfato como principal sustituyente, otros residuos de carbohidratos pueden estar presentes en preparados de carragenatos, como glucosa, xilosa y ácido urónico,

así como también algunos sustituyentes, como éteres metílicos y grupos de piruvato (Li et al., 2014).

Estos polisacáridos se dividen tradicionalmente en seis formas básicas: Iota (ι), Kappa (κ), Lambda (λ), Mu (μ), Nu (η) y Theta (θ). Estos nombres no reflejan estructuras químicas definitivas, sino solo diferencias generales en la composición y el grado de sulfatación en lugares específicos del polímero.

Las principales diferencias que influyen en las propiedades del tipo de carragenato, son el número y la posición de los ésteres sulfatados, así como el contenido de 3,6-anhidro-galactosa (3,6-AG). Por ejemplo, se reportó que los niveles más altos de sulfato de éster resultaron en una temperatura de solubilidad más baja y una menor fuerza de gel (Necas & Bartosikova, 2013).

La reactividad química de los carragenatos se debe principalmente a sus grupos del sulfato del éster medio que son fuertemente aniónicos, siendo comparables al sulfato inorgánico en este aspecto. El ácido libre es inestable, y los carragenatos comerciales están disponibles como sales estables de potasio, sodio y calcio o, más comúnmente, como una mezcla de estos. Los cationes asociados junto con la conformación de las unidades de azúcar en la cadena polimérica, determinan las propiedades físicas de los carragenatos y su funcionalidad, depende en gran medida de sus propiedades reológicas.

Como polímeros lineales, solubles en agua, típicamente forman soluciones acuosas altamente viscosas. La viscosidad depende de la concentración, la temperatura, la presencia de otros solutos, el tipo de carragenato y su peso molecular. La viscosidad aumenta casi exponencialmente con la concentración y disminuye con la temperatura, siendo este un comportamiento típico de polímeros lineales con carga, o polielectrolitos. Sin embargo, el aumento de la viscosidad puede ocurrir por dos mecanismos diferentes:

- (i) interacción entre las cadenas lineales, con una disminución del espacio libre o aumento del volumen excluido
- (ii) formación de un gel físico causado por "reticulación" entre cadenas.

En el primer caso, el aumento de la concentración macromolecular permite una interacción importante entre las cadenas y la presencia de sales, puede disminuir la viscosidad mediante la reducción de la repulsión electrostática entre los grupos de sulfato. Este segundo mecanismo es típico para el carragenato.

Los carragenatos son susceptibles a la despolimerización a través de la hidrólisis catalizada por ácido. A altas temperaturas y pH bajo esto puede llevar rápidamente a la pérdida completa de funcionalidad (Necas & Bartosikova, 2013).

κ -carragenato

En este trabajo de Tesis se utiliza κ -carragenato (CG) como componente de la matriz formadora de micropartículas. Actualmente existe un creciente interés por la utilización del CG en diferentes aplicaciones farmacéuticas, cosméticas, alimenticias y biotecnológicas no sólo por sus propiedades tecnofuncionales como agente espesante, viscosificante y gelificante (Weinbreck et al., 2004; Li et al., 2014; Souza et al., 2018), sino también, a la atribución de propiedades anticoagulantes, anticancerígenas, antihiperlipídicas, inmunomoduladoras y antioxidantes (Wijesekara et al., 2011; Xu et al., 2012; Wang et al., 2014; Shi et al., 2017; Genicot et al., 2018; Frediansyah, 2021; Ali et al., 2021).

En la Figura 27 se muestra la estructura química del CG, en función de sus unidades repetitivas de D-galactosa-4-sulfato y 3,6-anhidro-D-galactosa (Sankalia et al., 2006). Típicamente, el CG comercial contiene aproximadamente 25 % de sulfato de éster y 34% de 3,6-anhidro-D-galactosa (Nanaki et al., 2010).

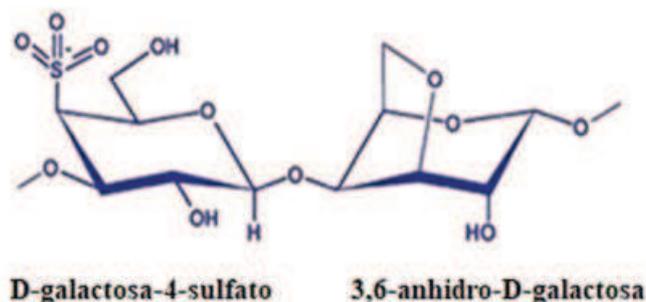


Figura 27: Estructura química del CG. Representación esquemática de unidades repetitivas de D-galactosa-4-sulfato y 3,6-anhidro-D-galactosa (Figura modificada de Sankalia et al., 2006)

2.1.7. Soluciones compuestas por EW y CG

Como se describió en la introducción general, la mezcla de proteínas y polisacáridos, que constituyen la EW y el CG en soluciones acuosas puede generar varios estados dependiendo de las interacciones polímero-polímero y disolvente-polímero. En este trabajo se realiza un análisis de estas mezclas encontrando condiciones que permiten mantener a estos biopolímeros en forma co-soluble (Souza et al., 2018).

Recientemente, se han realizado estudios de interacciones entre proteínas de EW y CG evaluando distintas relaciones de concentración para la formación de complejos (Sánchez-Gimeno et al., 2006; Souza et al., 2018; Mao et al., 2023), así como

la influencia que revisten parámetros como el pH, fuerza iónica y temperatura en la formación y fuerza de sus geles, debido a la importancia para su utilización tanto en sistemas alimenticios como biotecnológicos. Los autores evidenciaron cambios importantes en la viscosidad, elasticidad, fluidez y estabilidad de sus geles, dependiendo de las relaciones de los biopolímeros utilizadas y las condiciones experimentales, lo que amplía su espectro de propiedades tecnofuncionales y convierte a estas mezclas en potenciales sistemas portadores de PAs (Mao et al., 2023).

Los carragenatos y en especial CG, se utilizan cada vez mas para reducir la cantidad de transformaciones polimórficas en tabletas, para producir sistemas de liberación controlada y para lograr interacciones con medicamentos para sistemas de liberación modificada. Debido a su alta capacidad para adsorber agua, CG puede mejorar la disolución de fármacos y aumentar así su biodisponibilidad, debido a que poseen muchos grupos de formación de enlaces de hidrógeno como los grupos hidroxilo y sulfato. Asimismo, su interacción con la mucosa (mucoadherencia) favorece el tiempo de permanencia en el intestino y la absorción (Peppas & Huang, 2004; Zhang et al., 2016; Yermak et al., 2020). Estos polímeros mucoadhesivos forman redes hidrofílicas que contienen numerosos grupos funcionales polares interactuando con la mucosa no solo a través de entrecruzamientos físicos, sino también a través de enlaces químicos secundarios, lo que resulta en la formación de redes débilmente entrelazadas.

En referencia a la EW, comparada con otras fuentes de proteínas, muestra un excelente valor nutricional, digestibilidad, autoensamblaje y propiedades anfífilas, atribuidas principalmente a la ovoalbúmina, el componente principal de la EW que contiene un 55 % de aminoácidos hidrofóbicos (Chang et al., 2019). Como resultado, la EW puede interactuar fácilmente con moléculas hidrofóbicas y servir como portadores, proporcionando así protección contra la degradación y mejorando la solubilidad en el agua.

En la absorción de sustancias terapéuticas, nutrientes, fármacos, electrolitos y vitaminas, el intestino delgado desempeña un papel crucial (Seidner et al., 2013) y poder llegar a él, implica lograr soportar y pasar el medio gástrico (estómago) para mejorar el tiempo de retención y la absorción del PA (Dos Santos et al., 2021).

En comparación con las micropartículas hechas solo con proteínas, las formuladas con polisacáridos pueden ser más estables a factores como pH, fuerza iónica, temperatura y más homogéneas, debido a la agregación restringida durante la fabricación y las fuerzas de repulsión adicionales entre los dos tipos diferentes de polímeros (McClements, 2006; He et al., 2021).

En este contexto, en este trabajo de Tesis se desarrolló una mezcla de EW y CG donde los biopolímeros se mantuvieron en forma co-soluble, permitiendo solubilizar el principio activo y con una viscosidad adecuada para el flujo en los microcanales y formación de la gota en la juntura en cruz del dispositivo microfluídico.

2.2. Objetivos parciales

Los objetivos planteados para este capítulo son:

Objetivo 1: Desarrollar una metodología para la obtención de micropartículas a partir de una FD compuesta por una mezcla EW/CG y FC de aceite de oliva comercial, mediante la utilización de dispositivos microfluídicos.

Objetivo 2: Analizar la capacidad de encapsulación del proceso utilizando activo hidrofílico modelo.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Materiales

Las láminas transparentes de PMMA se adquirieron de un proveedor local (Acrimev, Santa Fe, Argentina). Para su corte y grabado se utilizó una plataforma PLS láser de CO_2 para aplicaciones de fabricación (Universal Laser System, Scottsdale, EE.UU.). Se utilizó etanol 99% (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina) para la unión de las placas de PMMA.

Se utilizaron accesorios de inserción con rosca M5 y tubería OD de 4 mm (Festo, Martínez, Argentina) como conectores en la entrada/salida del dispositivo. Se utilizó aceite de oliva de calidad alimentaria (Olivi Hnos., Mendoza, Argentina) como FC. Se adquirieron huevos de gallina frescos en un mercado local.

El CG (Tipo I, 80 % kappa y 20 % lambda carragenato) se obtuvo de Sigma Chemicals (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). El colorante sintético amarillo ocaso (Sensient Food Colors Latin America, Lerma de Villada, México) fue utilizado como activo modelo hidrofílico. Se preparó una solución acuosa de glutaraldehído (GTA) 0.1% v/v (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) la cual se utilizó como agente de entrecruzamiento.

2.3.2. Fabricación del dispositivo microfluídico

El dispositivo microfluídico se construyó utilizando los procedimientos ([Bamshad et al., 2016](#); [Liga et al., 2016](#)), materiales y accesorios descriptos en el Capítulo.1, inciso

3.3.1. Se utilizó un dispositivo en el cual se grabaron sobre la placa de PMMA utilizada como base los microcanales, confluyendo en una juntura “Cruz” seguidos de una serpentina (Figura 28a). El grabado láser produjo perfiles trapezoidales (Hong et al., 2010; Liu et al., 2017b), con un ancho medio de $360\ \mu\text{m}$ y una altura similar, siendo ambos uniformes a lo largo de todo el dispositivo.

Las dimensiones de las placas base y superior, así como las longitudes de microcanales y serpentinatas se describen en el Capítulo 1, inciso 1.3.1. También se esquematiza en la Figura 28b el fenómeno de formación de gotas en la juntura en cruz.

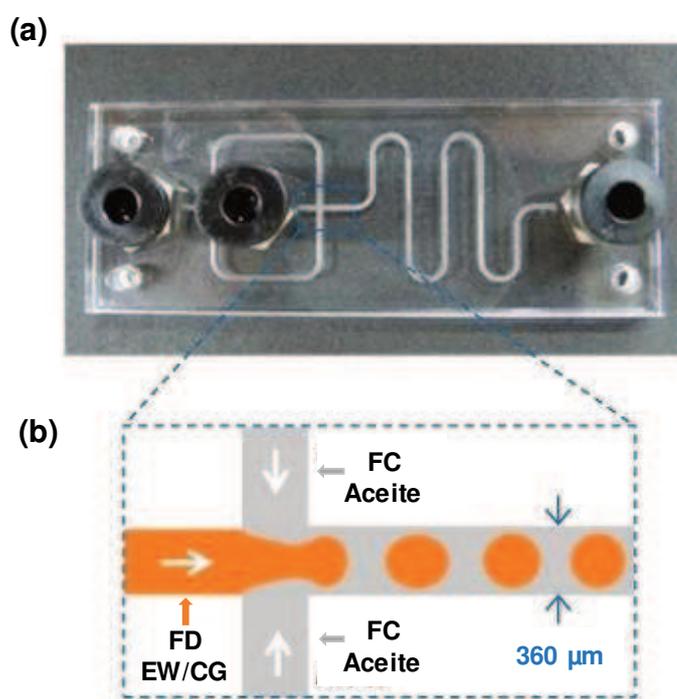


Figura 28: (a) Imagen del dispositivo real con los adaptadores de entrada y salida. (b) Esquema de generación de gota en la juntura en cruz.

2.3.3. Preparación de la FD

Los huevos de gallina (*Gallus gallus domesticus*) se rompieron a mano y la clara de huevo (EW) se separó cuidadosamente para evitar su contaminación. La EW se filtró con gasa estéril (Figura 29a), mientras el filtrado recogido (Figura 29b), se agitó suavemente para obtener una mezcla homogénea.



Figura 29: (a) Filtrado de clara de huevo. (b) Recolección de clara de huevo filtrada.

La concentración de proteínas del filtrado de EW fue del 9.24% determinada por el método micro-Kjeldahl (Digestor automático Modelo 430, unidad de destilación modelo 322, unidad de control modelo 342, Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suiza).

El pH de la solución EW fue de 9.1, medido con un pH-metro (Hanna Instruments S.L., Eibar, España).

Se preparó una solución de CG de concentración 0.15% p/v, para lo cual, el polvo seco se dispersó lentamente en agua ultrapura a temperatura ambiente y luego se sometió a una agitación magnética durante 40 minutos para su completa disolución.

Las soluciones de EW y CG se mezclaron en una proporción de 1:1 y se agregaron 30 mg del colorante AO. La solución resultante se homogeneizó por agitación magnética durante 40 minutos.

Debido a que las interacciones electrostáticas entre macromoléculas con carga opuesta (proteínas de EW y polisacárido) tienen un profundo impacto en la estructura, viscosidad y estabilidad de las soluciones, se varió pH de la solución mediante adición de ácido clorhídrico 0.1 mol.L⁻¹ y se analizó la estabilidad coloidal en forma visual.

2.3.4. Caracterización de la FD y la FC

Se midió la viscosidad de los fluidos utilizados como FD y FC (soluciones EW-CG y aceite de oliva comercial) con un reómetro Haake Rheo Stress RS80 (Haake Instruments Inc., Paramus, NJ, EE.UU.), utilizando una celda cono-plato (diámetro de 60 mm, ángulo de 1°). Se realizó un barrido a velocidad de deformación entre 30-1000 s⁻¹. Estas determinaciones se realizaron a 25 °C y por duplicado.

2.3.5. Generación de micropartículas

Los fluidos utilizados para la generación de gotas se introdujeron en el dispositivo microfluídico mediante la utilización de bombas de jeringa, de manera de poder controlar exactamente los caudales de trabajo. La FD (mezcla EW-CG y colorante AO) se inyectó en el canal medio, mientras que la fase continua (aceite) se inyectó en el canal transversal, llegando desde ambos lados a la juntura en cruz. No se añadió surfactante. Los caudales de la FD (mezcla EW-CG) y la FC se fijaron en $0.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ y $3.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente. Antes de comenzar con la recolección de micropartículas se esperó un tiempo de estabilización del flujo dentro del dispositivo de al menos 3 minutos.

2.3.6. Curado de micropartículas

Para obtener micropartículas resistentes a la dilución, cizallamiento y manipulación posterior, se exploraron dos tipos de métodos de entrecruzamiento de los biopolímeros: (i) adición de 0.1% v/v de GTA a las mezclas EW-CG antes de la generación de gotitas (curado químico) y (ii) irradiación de micropartículas (recogidas en tubos de vidrio) en horno microondas (BGH, Modelo B330DSS, Río Grande, Argentina), a 900 W durante 15 s (curado físico).

Tanto en métodos químicos como físicos, se obtuvieron micropartículas sólidas suspendidas en la FC. Dado que toda la FD se impulsó para formar micropartículas en el dispositivo microfluídico, la eficiencia de encapsulación se consideró del 100 %.

2.3.7. Medición del tamaño de las micropartículas

Para caracterizar las micropartículas se utilizó un microscopio óptico (DM750, Leica Microsystems, Heerbrugg, Suiza) con una cámara digital integrada ICC50W. Se midió el diámetro de las micropartículas individuales, luego se calculó el tamaño promedio y la desviación estándar. Se midieron 100 (cien) micropartículas por muestra para proporcionar valores estadísticos confiables.

2.3.8. Análisis de estabilidad de partículas y retención de colorante

Se obtuvo una cantidad de micropartículas correspondiente a 1.0 mL de FD utilizando el dispositivo microfluídico aplicando los caudales antes mencionados. Posteriormente, se añadió aceite de oliva para llevar el volumen a 5.0 mL y la suspensión se agitó a mano durante unos segundos.

Para detectar la posible liberación del activo desde las partículas hacia el aceite, se midió la absorbancia del aceite, utilizando un espectrofotómetro (Spectronic Genesis

5, Milton Roy, Nueva York, EE.UU.) a una longitud de onda de 480 nm (Apéndice 2), en intervalos de tiempo fijos durante 30 días.

2.3.9. Estudio de liberación del principio activo hidrofílico

Se obtuvo una cantidad de micropartículas correspondiente a 1.0 mL de FD utilizando el dispositivo microfluídico aplicando los caudales antes mencionados. Posteriormente, se eliminó el aceite y se añadieron 8.0 mL de agua desionizada (pH = 6.1); luego se agitó la suspensión suavemente durante unos segundos. La adición de agua se tomó como el inicio de la liberación del activo.

Se extrajeron de la suspensión 1.5 mL de la fase acuosa, a intervalos de tiempo predefinidos, y se analizó la liberación acumulada de activo mediante espectrofotometría a 480 nm (Apéndice 2). El volumen extraído se sustituyó por agua ultrapura. La liberación del colorante se evaluó durante 80 horas. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, con micropartículas recién obtenidas.

2.4. Resultados y discusión

2.4.1. Mezcla de proteína-polisacárido

La Figura 30 ilustra la estabilidad coloidal de la solución EW-CG a diferentes pH. Se observa que sólo la solución con pH 9.3 es homogénea, lo que demuestra que los biopolímeros son co-solubles. A este valor de pH, las proteínas EW y el CG están fuertemente cargadas, aunque la lisozima permanece parcialmente protonada (el pH de la solución está por debajo del punto isoeléctrico de esta proteína) lo que lleva a una interacción electrostática débil con CG, formando complejos solubles. En los pHs inferiores, las mezclas muestran separación de fases.

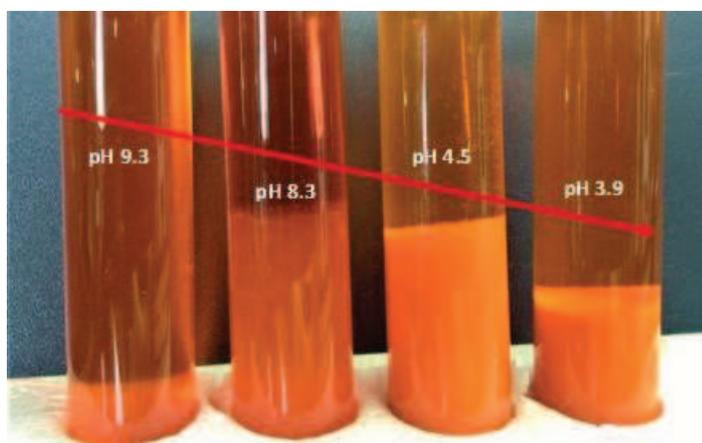


Figura 30: Estado coloidal de la solución EW-CG evaluada a diferentes pHs.

Cuando el pH de la solución disminuye, las proteínas de EW debido a su naturaleza de polianfolito, cambian su estado de carga exponiendo grupos más positivos. En consecuencia, el aumento de interacciones atractivas proteína-proteína y proteína-polisacárido conducen a la formación de complejos insolubles o coacervados, lo que conduce a la separación de fases (De Kruif et al., 2004; Schmitt y Turgeon, 2011; Souza et al., 2018).

En virtud de los resultados obtenidos se decidió utilizar como FD para la generación de micropartículas la mezcla de EW-CG con pH 9.3.

El aceite de oliva, utilizado como FC, presentó carácter newtoniano, con una viscosidad igual a 81 mPa.s. Mientras que la solución de EW-CG, utilizada como FD, presentó un carácter no-newtoniano pseudoplástico. En el Apéndice 1 se muestra el resultado de las determinaciones reológicas.

2.4.2. Generación microfluídica de partículas proteína-polisacárido

En la Figura 31 se muestra el proceso de generación de microgotas. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio USB (SRATE, Nanyang, China). En este régimen dinámico de fluidos (Caudal de FD = 0.5 mL.h⁻¹ y FC = 3.5 mL.h⁻¹), la tasa de producción de microgotas estuvo comprendida dentro de un rango de 10-20 gotas por segundo. La formación de gotas en la juntura en cruz se rige por el desequilibrio entre las fuerzas hidrodinámicas de compresión que deforman el chorro y las fuerzas de tensión superficial de restauración que minimizan el área interfacial. Por lo tanto, el tamaño de las gotas resultantes depende en gran medida de las relaciones de caudales, la tensión interfacial y la relación de viscosidad de los fluidos (Christopher y Anna, 2007; Boruah y Dimitrakopoulos, 2015).

En la juntura, los flujos de intersección actúan como una constricción y la gota en desarrollo se comprime mientras gana más material (Figura 31a). La gota finalmente se separa y fluye hacia el exterior de la unión (Figura 31b). Las gotas resultaron con una muy buena simetría esférica cuando se recogieron en la salida del dispositivo (Figura 31c). La tensión superficial predomina sobre las fuerzas de cizallamiento en la microescala.

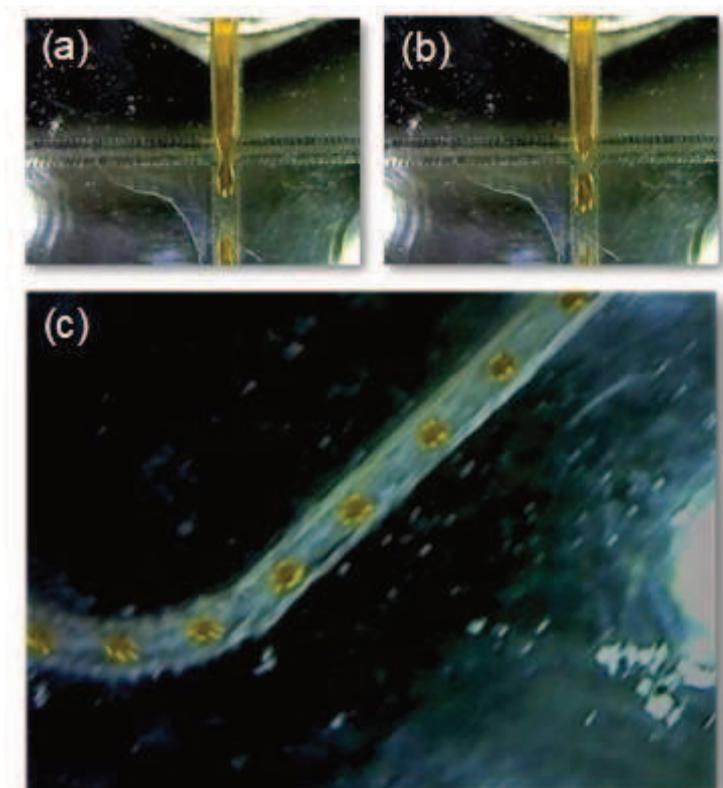


Figura 31: Imágenes instantáneas de la formación de las gotitas en la junta en cruz. (a) Llenado y elongación de la FD. (b) Formación de la microgota. (c) Microgotas fluyendo por el microcanal.

Se calculó, para los caudales de trabajo propuestos, viscosidad del aceite de oliva y la sección del canal, el número capilar (Ca), resultando del orden ≈ 0.01 . Las gotas obtenidas bajo este régimen de flujo tuvieron tamaños de alrededor de $200 \mu\text{m}$, siendo más pequeñas que el tamaño de la sección transversal del microcanal ($360 \mu\text{m}$).

El régimen de flujo aplicado a la generación de partículas se seleccionó después de explorar la generación de gotas en una amplia gama de caudales: de $0.1 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ a $1.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ para la FD y de $2.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ a $4.0 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ para FC.

Como ya se mencionó en la sección 3.3.2., al igual que lo ocurrido al utilizar soluciones de alginato sódico, el carácter no-Newtoniano de la FD de EW-CG produjo una variedad de fenómenos en las etapas de deformación y formación de las gotas.

Para el caso de los fluidos poliméricos, el estudio de estos fenómenos fundamentales apenas está emergiendo en la literatura (Wong et al., 2017) y ciertamente merece más investigación. A los efectos de este trabajo, hemos elegido un régimen que garantiza una generación de gotas reproducible y conduce al tamaño de partículas deseado ($200\text{-}300 \mu\text{m}$).

En cuanto a la viscosidad de la mezcla de polímero, cabe mencionar que también se exploraron varias concentraciones de CG antes de elegir 0.15 % p/v como óptimo. Se observó que el uso de soluciones más concentradas dificultaba el manejo y control del dispositivo microfluídico, provocando la obstrucción de los microcanales debido al aumento de viscosidad de las soluciones. Mientras que, con menores concentraciones de CG, las gotas generadas mostraban alta deformabilidad, desintegración y coalescencia fuera del dispositivo.

La concentración de EW se mantuvo constante en los ensayos, ya que se deriva de la materia prima de la clara de huevo sin ningún tipo de modificación.

2.4.3. Tamaño de las partículas y distribución del tamaño de las partículas

La Figura 32 muestra imágenes obtenidas por microscopía óptica (10x) y distribución de tamaño de las partículas curadas con GTA 0.1 % v/v. Las partículas recién obtenidas mostraron forma esférica con superficies lisas (Figura 32a) y la distribución del tamaño reveló que resultaron altamente monodispersas, con un diámetro medio de 203 μm (Figura 32b).

Después de 30 días de almacenamiento en la fase continua, las partículas conservaron su estructura esférica y suave en su superficie; el colorante se mostró uniformemente distribuido dentro de las partículas, pero se observó una ligera hinchazón (Figuras 32c y 32d).

La Figura 32e, muestra que las partículas se volvieron translúcidas después de 80 horas de liberación del colorante en agua. Algunas burbujas de aire también se observan en la imagen, las cuales provienen de la agitación durante el experimento de liberación.

En la Figura 32f se observa que las partículas exhibieron un aumento en el tamaño promedio y presentaron una distribución de tamaño más amplia. La hinchazón de la matriz polimérica se debió probablemente al agua capturada de la solución durante el ensayo de liberación.

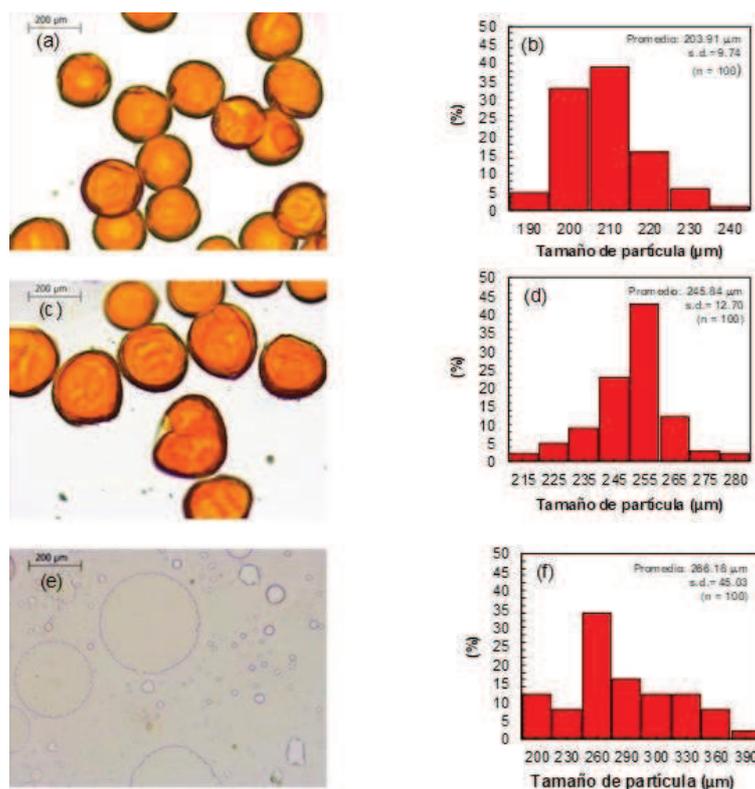


Figura 32: Partículas tratadas con GTA 0.1 % v/v. Partículas recién obtenidas (a); Distribución de tamaños de partículas recién obtenidas (b); Partículas después de 30 días de almacenamiento en la fase continua (c); Distribución de tamaños de partículas después de 30 días de almacenamiento (d); Partículas después de 80 horas de liberación (e); Distribución de tamaños de partículas después de 80 horas de liberación (f).

Las imágenes obtenidas con microscopía óptica de las partículas curadas por irradiación con microondas y las distribuciones de tamaño se muestran en la Figura 33. En este caso, también se observó alta monodispersidad, con un diámetro medio de 212 μm (Figuras 33a y 33b). Después de 30 días de almacenamiento en la fase de aceite, las partículas se mostraban ligeramente deformadas e hinchadas (Figuras 33c y 33d). Los fragmentos observados en la Figura 33a y principalmente en la Figura 33c presumiblemente provienen de algún grado de degradación después de los tratamientos con microondas. La Figura 33e muestra las partículas después de 80 horas de liberación del activo hidrofílico en agua.

Se observa que casi todo el activo fue liberado, mientras que las partículas mantuvieron la forma y la suavidad de la superficie. En cambio, la Figura 33f muestra que las partículas tienen un tamaño promedio incrementado y una distribución de tamaño más amplia, similar al caso de las partículas tratadas químicamente con GTA.

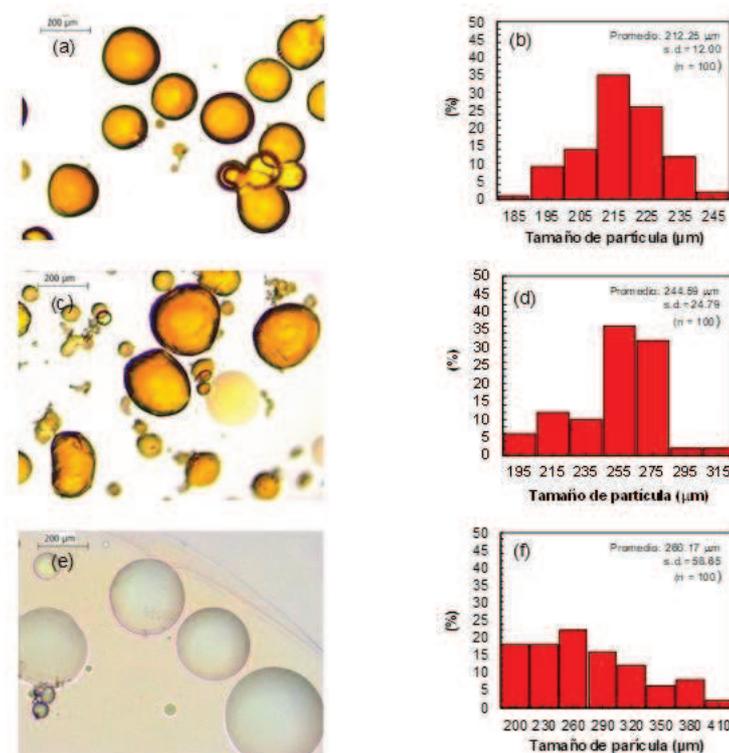


Figura 33: Partículas tratadas con microondas. Partículas recién obtenidas (a); Distribución de tamaños de partículas recién obtenidas (b); Partículas después de 30 días de almacenamiento en la fase continua (c); Distribución de tamaños de partículas después de 30 días de almacenamiento (d); Partículas después de 80 horas de liberación (e); Distribución de tamaños de partículas después de 80 horas de liberación (f).

2.4.4. Análisis de liberación del principio activo hidrofílico

Se evaluó la capacidad de las partículas para retener el PA encapsulado mientras se encuentran suspendidas en el medio oleoso (FC). Esta propiedad fue monitoreada durante 30 días, como se describe en el apartado 2.3.8. La absorbancia del aceite de la suspensión se mantuvo casi constante durante el período evaluado. Los resultados indican que se liberó menos del 1% del PA, lo que significaría que las partículas, podrían retener completamente el PA durante un tiempo largo estando suspendidas en la FC. La curva de calibración utilizada para el cálculo de las concentraciones se presenta en Apéndice 2 (Figura A2.2).

La Figura 34 presenta la liberación porcentual acumulada de colorante (PA) desde las partículas hacia la fase acuosa en función del tiempo. La curva de calibración utilizada para el cálculo de las concentraciones se presenta en el Apéndice 2 (Figura A2.3).

El perfil de liberación de las micropartículas tratadas con GTA 0.1 % v/v presentó una fase inicial de liberación brusca (*burts release*), donde más del 50 % del PA se liberó

durante la primera hora. Luego, la pendiente de la curva disminuye y alcanza un máximo (76 %) a las 5 horas aproximadamente; seguidamente, la cantidad de PA liberado se mantuvo constante durante el resto del experimento. La liberación brusca (*bursts release*) indica que el PA está atrapado en la matriz EW-CG y, debido a su naturaleza hidrofílica, se difunde rápidamente al medio acuoso.

El perfil de liberación de las micropartículas sometidas a irradiación por microondas fue bastante diferente, ya que el PA se liberó gradualmente durante las 80 horas. Solo el 35 % del mismo se liberó durante las primeras 5 horas, y el máximo (95 %) se alcanza después de las 50 horas. La curva de liberación tiene una buena correlación con la raíz cuadrada del tiempo, lo que indica una difusión tipo Fickiana.

Es evidente que los métodos de entrecruzamiento aplicados produjeron microestructuras específicas en cada caso, que impactan en la difusividad del PA a través de la matriz polimérica. Esta característica muestra un gran potencial para ajustar diferentes cinéticas de liberación para aplicaciones específicas. Además, cabe prever que la combinación de métodos químicos y físicos podría ofrecer nuevas posibilidades para el desarrollo de micropartículas transporte y la liberación de PAs hidrofílicos.

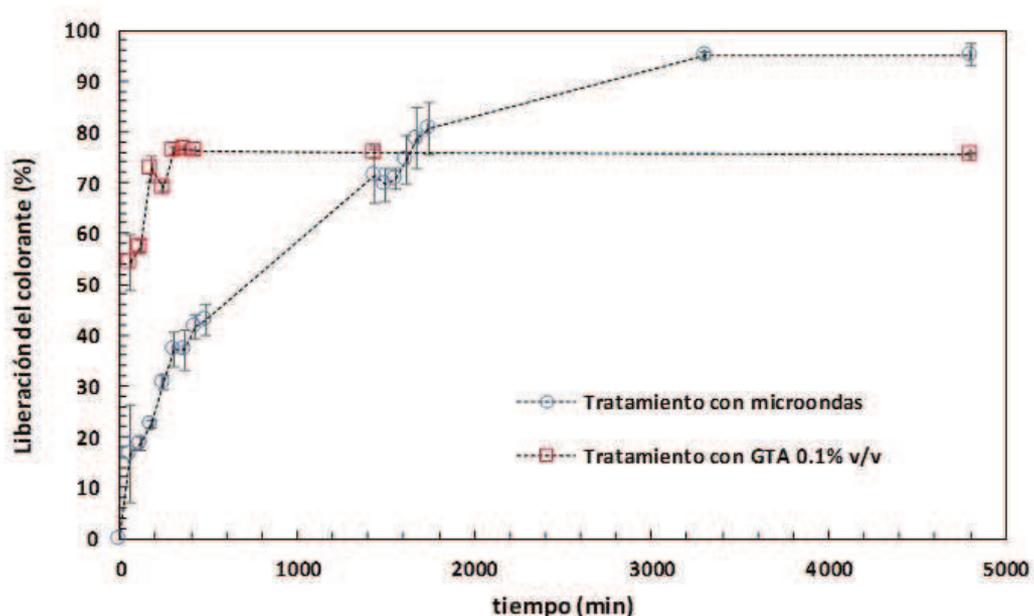


Figura 34: Perfiles de liberación de las partículas tratadas con microondas y con GTA 0.1 % v/v.

2.5. Conclusiones parciales

El dispositivo de PMMA resultó fácil de operar y resultó adecuado para la generación de micropartículas, pudiéndose limpiar y reutilizar sistemáticamente.

Además, el material totalmente transparente permitió obtener imágenes directas a tiempo real del proceso de generación de partículas.

Las micropartículas generadas con una matriz híbrida (proteína/polisacárido) presentaron varias ventajas:

- (i) No fue necesario ningún surfactante, ni para la generación de las gotas, ni para el almacenamiento y posterior manipulación; es sabido que evitar los aditivos es muy deseable en muchas formulaciones.
- (ii) Las micropartículas fueron estables durante varios meses, conservando completamente el activo hidrofílico encapsulado en medio oleoso y liberándolo gradualmente en medio acuoso.
- (iii) Se encapsuló todo el PA añadido a las partículas, siendo éste un beneficio complementario del proceso de generación por microfluídica.
- (iv) Se pueden obtener diferentes cinéticas de liberación según el método de entrecruzamiento utilizado (químico y/o físico), que ofrece un gran potencial para diseñar micropartículas para aplicaciones de liberación controlada en formulaciones alimentarias, nutricionales y farmacológicas.
- (v) El comportamiento de la mezcla de biopolímeros junto con la dinámica de fluidos complejos desarrollados en los microcanales conduce a fenómenos ricos aún por explorar.

CAPÍTULO 3

APLICACIÓN FARMACOLÓGICA DE LAS MICROPARTÍCULAS: ENCAPSULACIÓN DE ISONIAZIDA

3.1. Introducción

En este capítulo se describe la aplicación de la metodología de generación microfluídica de micropartículas para la encapsulación de isoniazida (INH), antibiótico utilizado para el tratamiento de la tuberculosis. Cuando se desarrollan este tipo de tecnologías, además del estudio del proceso de encapsulación propiamente dicho, es importante un posterior análisis de la capacidad de la matriz para liberar el PA, la citotoxicidad en la vía de administración y la conservación de la actividad del compuesto una vez liberado. En este trabajo de Tesis también se abordan estos aspectos.

3.1.1. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una infección bacteriana causada por el *Mycobacterium tuberculosis* (MT). A pesar de ser una enfermedad milenaria, continúa siendo una de las afecciones más extendidas y mortales (Barberis et al., 2017; Rossi et al., 2019).

En algunos países, se administra el bacilo de Calmette y Guérin (vacuna BCG) a bebés o niños pequeños para prevenir la tuberculosis. La vacuna previene la tuberculosis fuera de los pulmones, pero no en los pulmones. Las personas con infección por tuberculosis latente no se sienten enfermas ni son contagiosas. Solo un pequeño porcentaje de estas enfermará y tendrá síntomas. En las últimas décadas, determinadas afecciones como diabetes, sistema inmune debilitado por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), malnutrición y consumo de tabaco han aumentado la prevalencia de la enfermedad. A diferencia de la infección por tuberculosis, cuando una persona contrae la enfermedad, presentará síntomas que pueden ser leves durante muchos meses, por lo que es fácil transmitir la TB a otras personas sin saberlo (OMS, 2022).

El MT ingresa al pulmón humano a través de la inhalación de pequeñas gotitas portadoras de bacilos (1-5 μm) que pueden depositarse en el espacio alveolar. Los macrófagos alveolares (MA) proporcionan la primera línea de defensa contra la infección pulmonar, en virtud de su actividad de destrucción bacteriana intracelular y posterior presentación de antígenos a los linfocitos. Sin embargo, en el caso de las infecciones por micobacterias, los MA no cumplen su función inmunológica y representan el entorno donde las micobacterias sobreviven, residen y proliferan (Rossi et al., 2019).

En 2022, 202 países y territorios con más del 99 % de la población mundial y casos de TB, informaron datos. Este Informe mundial sobre TB de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (OMS, 2022) proporciona una evaluación completa y actualizada de la epidemia de TB y de los progresos en su prevención, diagnóstico y tratamiento de la

enfermedad. Entre los resultados de este informe, basado principalmente en datos recopilados de los ministerios nacionales de salud, se resume la siguiente información:

- La TB sigue siendo una de las enfermedades infecciosas con mayor mortalidad del mundo. La pandemia de COVID-19 y las desigualdades socioeconómicas, han revertido años de progreso en la lucha contra la TB.
- A nivel mundial, en 2021, se estimaron que 10.6 millones de personas enfermaron de TB y 1.6 millones fallecieron por esta causa; de ellas, 187.000 presentaban co-infección con el VIH.
- En América central y latina, en 2021, se estimaron 309.000 casos de TB y se notificaron 215.116 (70 %).
- Las muertes estimadas para la región antes mencionada fueron 32.000, de las cuales el 11 % correspondieron a co-infecciones por TB y VIH.

Los medicamentos para el tratamiento de la TB se dividen en agentes de primera línea tales como isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida, administrados por vía oral durante largos períodos, de hasta 6 a 8 meses; y medicamentos de segunda línea como aminoglucósidos y fluoroquinolonas, en su mayoría administrados por vía intravenosa o intramuscular ([Muttill et al., 2009](#)).

Los tratamientos a largo plazo, con medicamentos que causan fuertes efectos secundarios pueden inducir interrupciones de la terapia, lo que tiene consecuencias negativas más allá de la salud del paciente, en particular el riesgo de aparición de bacterias multirresistentes. Por lo tanto, es deseable disminuir la concentración del fármaco y el número de dosis ([Hegde et al., 2021](#)). Para minimizar esta situación, la OMS y la Unión Internacional contra la Tuberculosis y las Enfermedades Pulmonares han recomendado que los medicamentos antituberculosos se deben tomar en combinación.

Actualmente, los protocolos de tratamiento para la TB se basan en la asociación de fármacos para evitar la selección de cepas de MT resistentes y la necesidad de tratamientos prolongados para eliminar a todos los bacilos en sus diferentes fases de crecimiento. Es por ello, que varios desafíos, como la biodisponibilidad oral, los efectos adversos relacionados con la dosis y la toxicidad de los medicamentos fuera del sitio de acción, deben estudiarse al momento de considerar un tratamiento.

Una de las combinaciones de medicamentos de primera línea más utilizadas es la de rifampicina (RIF) con isoniazida (INH). Sin embargo, se ha reportado que, en medio ácido, RIF se hidroliza a 3-formil rifamicina SV (3FRSV) y esta acción se acelera en presencia de INH, porque este fármaco interfiere con 3FRSV produciendo isonicotínil hidrazona. Ambos derivados de RIF presentan baja solubilidad y absorción en el tracto

gastrointestinal, lo que afecta su eficacia anti-TB (Gürsoy et al., 2004; Hedge et al., 2021; Singh, Mariappan, Sankar, Sarda & Singh, 2001). Por lo tanto, en la formulación de la combinación de dosis fijas de dos fármacos, RIF e INH deben compartimentarse para preservar la estabilidad de RIF. Por ejemplo, si sólo uno de los antibióticos se encapsula, el medicamento no encapsulado puede ser absorbido primeramente en el estómago y el otro puede ser liberado más tarde en el íleon. Como INH se protona en medios ácidos ($pK_a = 2$), el fármaco apenas penetra a través de la mucosa del estómago mientras que puede ser absorbido posteriormente en el intestino delgado (Mwila & Walker, 2020). Por lo tanto, una estrategia prometedora es encapsular INH en un sistema que retenga al fármaco en el estómago y lo entregue luego en el íleon, de modo que la RIF podría ser liberada en el estómago en ausencia de INH.

Vale la pena señalar que, aparte de las formulaciones microparticuladas, otros enfoques para encapsular INH están actualmente en estudio, como micelas (Rani et al., 2018; Sheth, Tiwari & Bahadur, 2018), liposomas (Gürsoy, Kut & Özkirimli, 2004; Nkanga, Krause, Noundou & Walker, 2017) y nanopartículas (Booyesen et al., 2013; Mukhtar et al., 2020; Shrimal, Jadeja & Patel, 2020).

En este contexto, en este trabajo de Tesis se explora la encapsulación de INH en un sistema microparticulado destinado a alcanzar: (i) buenos niveles de carga del fármaco, (ii) liberación sostenida en medio hidrofílico, y (iii) Liberación de INH preferentemente en condiciones de pH similares a las encontradas en el íleon.

3.2. Objetivos parciales

Objetivo 1: Encapsular INH mediante la aplicación de la metodología microfluídica desarrollada previamente y evaluar su liberación en condiciones de pH compatibles con la vía gastrointestinal.

Objetivo 2: Evaluar la citotoxicidad y conservación de la actividad antibacteriana de la INH liberada desde las micropartículas.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Materiales

Se utilizó aceite de oliva de calidad alimentaria (Olivi Hnos., Mendoza, Argentina) como FC. Para las formulaciones de la FD se adquirieron huevos de gallina frescos en un mercado local, se utilizó CG (Tipo I, 80 % kappa y 20 % lambda carragenato) marca Sigma Chemicals (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) y alginato sódico de baja viscosidad

Kelgin® LV (Kelco, Atlanta, USA). Como agentes entrecruzante y surfactante se utilizaron cloruro de calcio (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina) y alcohol polivinílico (PVA) (SERQUIN, San Martín, Buenos Aires, Argentina), respectivamente. Para estos estudios se utilizaron estándares analíticos de INH y RIF (Sigma-Aldrich, India).

3.3.2. Dispositivos microfluídicos

Para la encapsulación de INH se utilizaron dos dispositivos microfluídicos, uno con junta en simple cruz y otro con junta en doble cruz. Los dispositivos se diseñaron y fabricaron siguiendo la metodología propuesta en el Capítulo 1, inciso 1.3.1. Las dimensiones del dispositivo en simple cruz se detallaron en el Capítulo 1, inciso 1.3.1. Las dimensiones del dispositivo con doble cruz, se presentan la Figura 35.

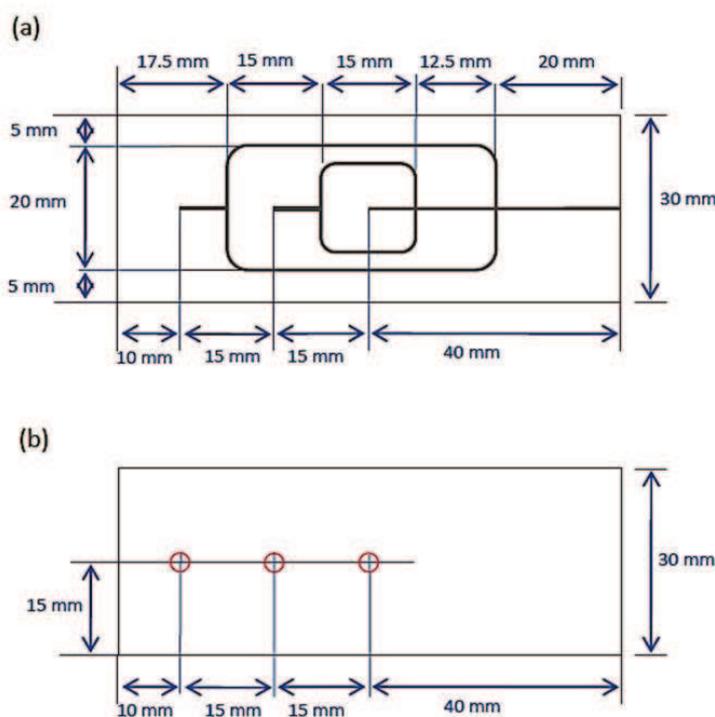


Figura 35: Diseño del dispositivo con junta doble cruz utilizado para el control computarizado del láser. (a) Placa inferior. (b) Placa superior.

3.3.3. Preparación de las soluciones

Para la encapsulación de INH se generaron dos tipos de partículas, utilizando dos FD distintas. Para la generación de micropartículas utilizando el dispositivo con junta en doble cruz se utilizó una FD compuesta de una solución de alginato sódico 2 % p/v. Para la generación de micropartículas utilizando el dispositivo con junta en simple cruz

se utilizó una FD compuesta EW/CG descrita en Capítulo 2, inciso 2.3.3. Para ambos ensayos de generación de micropartículas con INH se adicionaron 0.03 g de INH a 15 mL de FD, y una solución con el rol de agente entrecruzante y surfactante (FES) formada por cloruro de calcio 2 % p/v disuelto en solución de PVA 2 % p/v (Akbari et al., 2017).

3.3.4. Generación de micropartículas

La generación de micropartículas con INH utilizando el dispositivo con juntura en doble cruz se desarrolló considerando que la misma posibilita el agregado en la segunda intersección de una nueva fase. Se evaluó un sistema de trabajo conformado por una FD compuesta de una solución acuosa de alginato sódico 2 % p/v, la FC de aceite de oliva y una fase con el rol de agente entrecruzante y surfactante (FES) (Akbari et al., 2017).

Las fases fueron infundidas al dispositivo a través de 3 bombas de jeringa (Modelo PC11UBT, Apema, Villa Domínico, Argentina), controlando de esta manera, tres caudales diferentes: FD, fase FES y la FC. La Figura 36 muestra el dispositivo y un esquema con el detalle de la circulación de las distintas fases. En la primera juntura (1) se inyectó la FD por el canal del medio, mientras que la FC (aceite) se inyectó en el canal transversal, llegando desde ambos lados a la juntura en cruz. La fase FES se adicionó por el canal transversal de la segunda juntura en cruz (2), interceptando las microgotas generadas en la primera juntura, las cuales, continuaron por el canal para ser recolectadas.

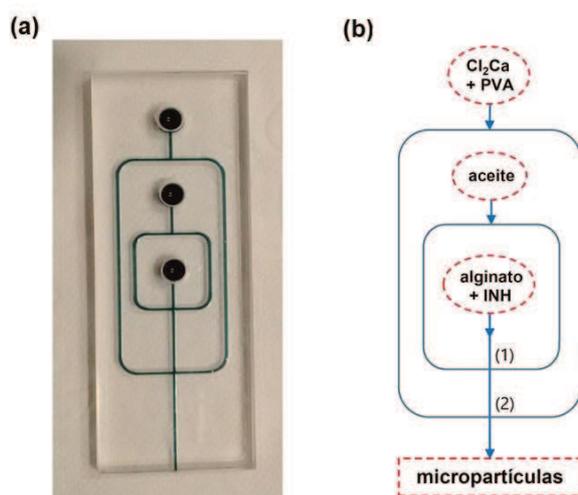


Figura 36: (a) Fotografía de dispositivo con juntura en doble cruz en PMMA. (b) Representación esquemática de las fases interactuantes en el dispositivo para obtener las micropartículas cargadas con INH

Con estas composiciones de fases, se evaluaron distintos rangos de caudales de trabajo: de 0.1 a 1.0 mL.h⁻¹ para la FD, 0.1 a 2.0 mL.h⁻¹ para FES y 2.5 a 4.0 mL.h⁻¹ para la fase FC. Los caudales óptimos resultaron: 0,5 mL.h⁻¹ para la FD, 3,0 mL.h⁻¹ para la FC y 1,0 mL.h⁻¹ para la FES. Aplicando otras relaciones de caudales, se producían obstrucciones en los canales o no se generaban microgotas. Con las condiciones elegidas se generaron micropartículas y el sistema permaneció estable.

Las condiciones operativas del sistema microfluídico y la preparación de la FD de EW/CG utilizando el dispositivo con junta en simple cruz fueron descritas en el Capítulo 2, incisos 2.3.2, 2.3.3 y 2.3.5. Todos los ensayos se hicieron a temperatura ambiente controlada de 25 °C.

3.3.5. Curado de micropartículas

La utilización del dispositivo con junta en doble cruz permitió que las partículas generadas gelifiquen dentro del dispositivo antes de ser recolectadas.

Las micropartículas con INH en la FD compuesta por EW/CG luego de recolectadas fueron tratadas aplicando irradiación en horno microondas (BGH, Modelo B330DSS, Río Grande, Argentina) aplicando dos potencias de: 270 W y 900 W, durante 15 s.

3.3.6. Caracterización de micropartículas

El tamaño y la morfología de las micropartículas, fueron determinados por microscopía óptica con un microscopio Leica DM750 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suiza) con cámara digital integrada ICC50W. Se midió el diámetro de las micropartículas individuales, luego se calculó el tamaño promedio y la desviación estándar. Se midieron 100 (cien) micropartículas por muestra para proporcionar valores estadísticos confiables. Todos los experimentos se hicieron por duplicado.

La FD compuesta por EW/CG con INH fue caracterizada mediante espectroscopía infrarroja (IR). Para ello, las partículas fueron acondicionadas antes de los experimentos IR para eliminar residuos de aceite y agua. Las partículas se lavaron suavemente dos veces con cloruro de metileno y se dejaron secar (temperatura ambiente). Posteriormente, el material fue congelado a -80 °C y liofilizado durante 24 horas a 0.014 mbar de presión en un secador de laboratorio (Cryodos 80, Telstar Industrial S.L., Terrassa, España). Se mezcló 1-2 mg de muestra con bromuro de potasio (100 mg) y se comprimió para obtener pastillas. Los espectros IR se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro Shimadzu FTIR-8001 PC (Shimadzu Corporation,

Kyoto, Japón) en el rango de número de onda de 4000-400 cm^{-1} (resolución espectral: 4 cm^{-1} , número de escaneos: 40).

3.3.7. Ensayos de liberación

Las micropartículas fueron sometidas a ensayos de liberación, con el objetivo principal de estudiar el efecto del pH en la liberación de INH. Para ello, se seleccionaron soluciones *buffers* utilizadas frecuentemente en estudios in vitro de fármacos (Khatak et al., 2020; Tabriz et al., 2021), para imitar condiciones de pH del estómago y del íleon. Las partículas recién obtenidas fueron recogidas en viales para su posterior utilización. La FC (aceite) se eliminó cuidadosamente utilizando una micropipeta.

Se añadieron 5.0 mL de medio de liberación (CINa 0.05 mol.L^{-1} , pH 1.6) (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina) a 0.5 mL de FD. Los viales se mantuvieron a 37 °C en un agitador orbital a 150 rpm. En tiempos preseleccionados, se tomaron alícuotas libres de micropartículas (0.5 mL) a las que se les cuantificó el contenido de INH. Se añadió un volumen igual de medio fresco para mantener constante la FD. Luego de 2 horas, todo el volumen de solución salina se retiró suavemente y se volvió a colocar la misma cantidad (5.0 mL) de buffer Tris-HCl (0.1 mol.L^{-1} , pH 7) (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina). La liberación se analizó durante 24 horas. La cuantificación de INH se realizó por RP-HPLC (Prominence Series 20A, Shimadzu, Kyoto, Japón), utilizando un detector UV con arreglo de diodos (UV-Vis detector SPD-20A, Kyoto, Japón). Las condiciones cromatográficas y la curva de calibración utilizadas, se detallan en el Apéndice 3.

3.3.8. Ensayo de estabilidad de RIF en presencia de INH

Se obtuvieron micropartículas de INH utilizando EW/CG como FD aplicando las condiciones microfluídicas y tratamiento de irradiación por microondas ya detallados. La recolección se llevó a cabo durante 2 horas para obtener 1.0 mL de FD. Posteriormente, se retiró el aceite utilizando micropipeta. Se llevó a volumen final de 5 mL con solución buffer de pH 1.6 conteniendo RIF en una concentración de 9.63 ppm. Luego de transcurridas 2 horas, se cuantificó la RIF en la solución buffer por método de absorbancia UV a una $\lambda = 471 \text{ nm}$ utilizando un espectrofómetro UV/vis Shimadzu 2401PC (Apéndice 3). Se determinó el porcentaje de RIF remanente en la solución buffer para las distintas situaciones: Partículas conteniendo INH tratadas a 900 W, partículas conteniendo INH tratadas a 270 W y solución *buffer* conteniendo INH y RIF disueltas (no encapsuladas).

3.3.9. Evaluación de actividad antibacteriana de micropartículas de EW/CG con INH encapsulada

Se realizó una evaluación de la actividad antibacteriana frente a MT a los efectos de evaluar si la INH liberada desde las micropartículas conserva su actividad. Se realizaron pruebas en cultivos de MT. Estas experiencias se llevaron a cabo en los laboratorios del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de la ciudad de Santa Fe, siguiendo las estrictas normas de bioseguridad necesarias.

Se realizó un cultivo de suspensión de bacterias MT (ATCC 27294) con una turbidez comparable con Mc Farland 0.5. Luego, esta suspensión bacteriana se transfirió a la superficie de placas de Petri con medio de cultivo Agar Middlebrook 7H10 utilizando un hisopo de algodón estéril. Se perforaron pozos de 12 mm de diámetro en el medio con un *tip* estéril retirando luego con el mismo *tip* el medio sólido.

Se depositaron 100 μL de suspensión de micropartículas en cada pozo. Para esto, se recolectó el volumen requerido de micropartículas y se retiró el aceite de la FD. La concentración de INH en las micropartículas fue de 200 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Esta concentración se encuentra por encima de la concentración inhibitoria mínima de INH en solución acuosa (Hegde et al., 2021). De esta forma, se garantiza que en caso de no detectar actividad antibacteriana se descarte que pueda deberse a baja concentración de antibiótico en el medio de cultivo. Las muestras así sembradas se incubaron en estufa a 37 °C hasta observar crecimiento. Finalmente, las placas se fotografiaron tapadas en flujo laminar resguardando la bioseguridad.

Se sembraron 6 placas realizando tres pozos en cada una de ellas (triplicado):

- 1- Micropartículas con método de curado 900 W de potencia, 15s + INH
- 2- Micropartículas con método de curado 900 W de potencia, 15 s
- 3- Micropartículas con método de curado 270 W de potencia, 15 s + INH
- 4- Micropartículas con método de curado 270 W de potencia, 15 s
- 5- INH en solución acuosa
- 6- Control de crecimiento de MT. En esta placa no se realizaron pozos.

3.3.10. Evaluación de citotoxicidad celular de células Caco-2 ante micropartículas de EW/CG con INH

La viabilidad celular se define como el número de células sanas presentes en un cultivo celular en condiciones normales de crecimiento y la proliferación de células, es un indicador vital para determinar o conocer los mecanismos de acción de ciertos genes, proteínas y vías involucradas en la supervivencia o muerte celular después de la exposición a agentes tóxicos. Existen varios tipos de ensayos de proliferación y

citotoxicidad celular y los mismos se usan normalmente para evaluar la seguridad de nuevos fármacos con el fin de detectar si las moléculas de prueba tienen efectos sobre la proliferación celular o muestran efectos citotóxicos directos (Adam et al., 2016).

La evaluación del efecto citotóxico o anti proliferativo de las micropartículas con INH encapsulada se realizó mediante la evaluación de la viabilidad y proliferación de la línea celular Caco-2, células de adenocarcinoma de colon humano (ATCC, HTB-37). Para ello, se empleó el kit Cell Titer 96™ Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega), el cual se compone de dos reactivos: MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] en una concentración de 2 mg.mL⁻¹ y metasulfato de fenazina (PMS) en una concentración de 0,92 mg.mL⁻¹. Estos ensayos fueron optimizados y realizados en el laboratorio de Cultivos de Células del Centro Biotecnológico del Litoral, FBCB-UNL, siguiendo la metodología propuesta por Cano-Sancho (Cano-Sancho et al., 2015) con algunas modificaciones.

Mediante este método colorimétrico se mide la proliferación celular, poniendo en evidencia la presencia de enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas y cuya actividad se relaciona en forma directa con la cantidad de células viables presentes en el cultivo. Las enzimas deshidrogenasas catalizan la biorreducción del MTS en un cromógeno soluble (azul de formazán) que absorbe a una $\lambda = 490$ nm. El PMS actúa como dador de electrones en la reacción de óxido-reducción. La cantidad de producto generado es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas en el cultivo.

El protocolo empleado se detalla a continuación. En placas estériles de fondo plano de 48 pocillos se sembraron, en cada pocillo, 200 μ L de una suspensión celular de 4.10^5 cél.mL⁻¹, incubándose durante 24 horas en estufa gaseada a 37 °C. Posteriormente, se removió el medio de cultivo de cada pocillo y en su lugar se colocaron 500 μ L de diferentes diluciones de micropartículas.

Para construir la curva de viabilidad de células en presencia de micropartículas cargadas con INH se realizaron diluciones a partir de micropartículas con una concentración de INH de 2000 μ g.mL⁻¹ para obtener concentraciones por encima de la concentración inhibitoria mínima (CIM) (Hegde et al., 2021) y que incluyan a la concentración seleccionada para los estudios de actividad antibacteriana. En la Tabla 2 se presentan las diluciones y concentraciones analizadas para cada caso. Para cada dilución se recolectó en tubos *ependorfs* el volumen correspondiente de partículas teniendo en cuenta el caudal de la FD y estimando el tiempo de recolección necesario para obtener cada volumen. Luego, se retiró el aceite de la FC y se agregó la cantidad

de buffer necesaria para cada dilución. Se ensayaron 3 réplicas de cada dilución, en ambos ensayos.

Para cada ensayo se incluyó un control negativo de 100 μL de partículas sin agente encapsulado diluidas con 400 μL de medio de cultivo, un control de crecimiento celular en condiciones normales de cultivo (100 % viabilidad) y un control positivo de Estaurosporina (STP, 250 nM) que causa un 50 % de citotoxicidad en 24 horas a células Caco-2 (previamente puesto a punto en el laboratorio). Luego de la adición de todas las muestras, las placas se incubaron nuevamente por 24 horas en estufa gaseada a 37 °C.

Tabla 2: Volúmenes de micropartículas, volúmenes de medio de dilución y concentraciones resultantes seleccionadas para el ensayo de citotoxicidad de células Caco-2 ante micropartículas con INH.

Volumen de micropartículas (μL)	Volumen de medio (μL)	Concentración resultante de INH ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
100	400	400
42	458	168
25	475	100
10	490	40

Para revelar el ensayo, se lavaron todos los pocillos con 1X PBS, se adicionaron 200 μL de medio de cultivo fresco y, posteriormente, se agregaron 40 μL por pocillo del reactivo de color, preparado en el momento mezclando 1 mL de solución de MTS con 50 μL de solución de PMS por cada placa. Se incubó durante 3 horas a 37 °C en estufa gaseada. La absorbancia del cromógeno se midió a una $\lambda = 492$ nm contra lectura de fondo de placa a $\lambda = 690$ nm. Las mediciones efectuadas a longitudes de onda entre 630-700 nm ayudan a eliminar el ruido de fondo dado por restos celulares y por la presencia de componentes capaces de generar absorbancia no específica. Se calculó el porcentaje de viabilidad celular utilizando el valor de absorbancia del control negativo como 100 % de viabilidad celular.

3.4. Resultados y discusión

3.4.1. Generación de micropartículas con INH encapsulada

La encapsulación de INH utilizando el dispositivo con juntura en doble cruz permitió generar las microgotas de alginato cargadas con el PA. La adición de una nueva

zona de contacto (segunda cruz) por donde se circuló la fase FES resultó ventajosa dado que la posibilidad de entrecruzamiento dentro del dispositivo permitió obtener partículas homodispersas y estables, sin observarse coalescencia en el medio de recolección. En la Figura 37 se presentan imágenes de las partículas de alginato obtenidas tomadas por microscopía óptica. Se observaron morfologías con simetría esférica, con un diámetro medio de 315 μm y distribución de tamaño homodisperso.

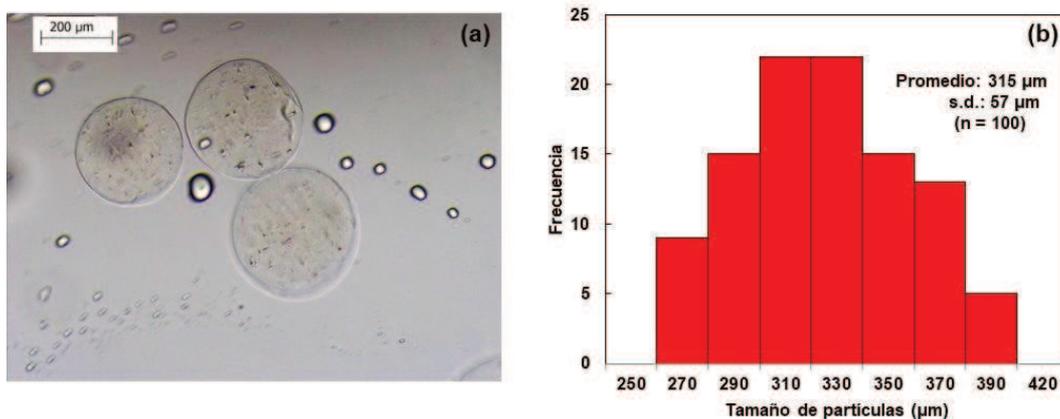


Figura 37: (a) Imágenes de micropartículas de alginato sódico cargadas con INH obtenidas por microscopía óptica, (b) Histograma de distribución de diámetros de partículas.

Si bien la obtención de micropartículas fue exitosa, al realizar los ensayos de liberación se observó que prácticamente la totalidad ($\sim 95\%$) de la INH se liberó durante los primeros minutos de ensayo. Podría inferirse que, en estas condiciones fisicoquímicas, este PA se retiene débilmente dentro de la matriz de alginato y se libera rápidamente a la fase acuosa. Por lo tanto, se concluye que, si bien la metodología de síntesis de micropartículas resultó exitosa, podría ser adecuada para encapsular otro PA, pero no lo es para encapsular INH.

En función de estos resultados, se procedió a explorar otro sistema de encapsulación para INH. Se cambió la FD por una solución de EW/CG utilizando el dispositivo microfluídico con junta en simple cruz y la metodología de curado de micropartículas por irradiación de MW.

La Figura 38 muestra imágenes de microscopía USB de la formación de las microgotas en la unión transversal a distintos tiempos (Figura 38b) y microgotas generadas en el puerto de salida del dispositivo microfluídico (Figura 38c). Los caudales de las FD y FC fueron $0.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ y $3.5 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente. En este régimen dinámico de fluidos, la velocidad de producción fue de aproximadamente 2 gotas por

segundo. El régimen fue seleccionado después de explorar la generación de gotas en una amplia gama de condiciones operativas.

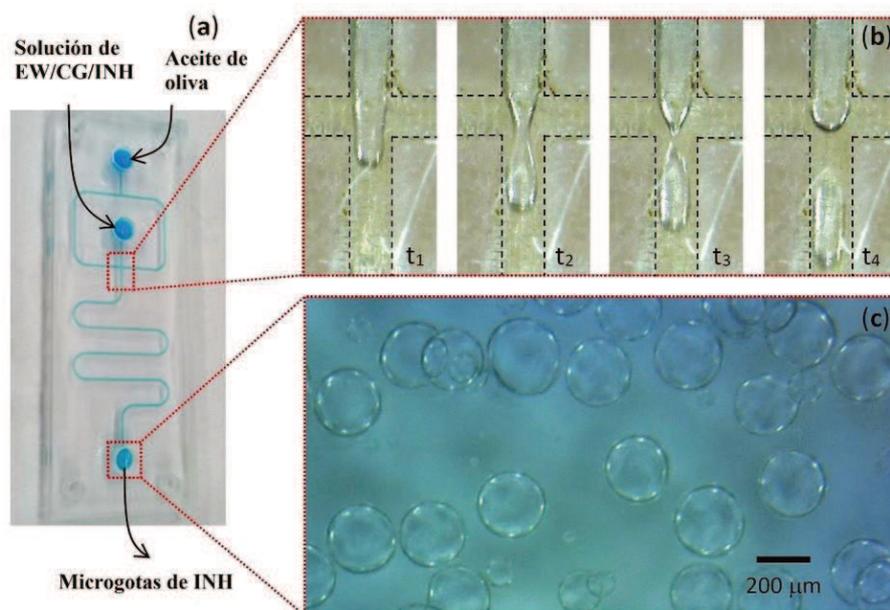


Figura 38: (a) Fotografía del dispositivo de PMMA lleno de una solución acuosa coloreada para representar la red fluídica. (b) Fotografías instantáneas que muestran los diferentes pasos de formación de gotas en función del tiempo en la unión transversal: llenado (t_1); escotadura (t_2); desprendimiento (t_3); reinicio el ciclo (t_4). Las imágenes se presentan como fueron adquiridas, sin edición que no sea recortar en los bordes; las líneas discontinuas se incluyeron para una mejor demarcación de las paredes del microcanal. (c) Imagen del microscopio USB de microgotas recién obtenidas

La formación de gotas está gobernada por fuerzas hidrodinámicas que deforman el jet de fluido y por las fuerzas de tensión superficial que minimizan el área interfacial. En la intersección de canales, la gota en desarrollo es elongada mientras gana material, se adelgaza formando un cuello y finalmente se separa aguas abajo (Figura 38b). Las gotitas se vuelven perfectamente esféricas cuando no están confinadas en los microcanales, como se observa en la salida del dispositivo microfluídico (Figura 38c).

Las microgotas recogidas fueron curadas por MW (270 W y 900 W, durante 15 s), generándose micropartículas sólidas suspendidas en la fase oleosa. Las micropartículas sedimentaron en reposo en la FC, mostrando gran estabilidad contra la floculación, incluso después de 30 días de almacenamiento. Dado que toda la fase acuosa (FD, mezcla EW/CG/INH) inyectada al dispositivo microfluídico finalmente formó micropartículas, y la solubilidad de INH en aceite es muy baja ($\log P = 0.64$) (Brennan

et al., 2008), la eficiencia de encapsulación se consideró del 100 %. La alta hidrofiliidad de INH asegura que su pasaje a la fase oleosa (durante la generación, manipulación o almacenamiento de micropartículas) sea despreciable, lo que evidencia que las moléculas de INH se retienen en las micropartículas y se liberan solo cuando son expuestas al contacto con los *buffers* de liberación.

La Figura 39a presenta una imagen de microscopía óptica de una sola micropartícula. La superficie de la partícula muestra diferentes dominios de textura, como resultado de la complejación de proteínas y polisacáridos. En la Figura 39b se muestra una imagen más detallada de la microestructura, donde se distinguen claramente áreas con diferente rugosidad.

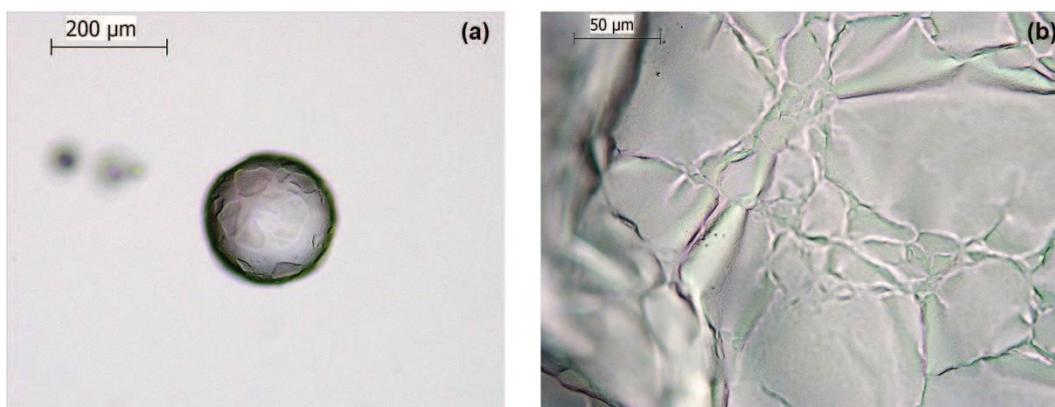


Figura 39: Caracterización por microscopía óptica de micropartículas de EW/CG cargadas con INH a diferentes aumentos. (a) Micropartícula única observada en 10X. (b) Topología de la superficie de la micropartícula observada a 40X.

En la condición de pH seleccionada para formular la FD, las interacciones electrostáticas débiles entre las proteínas de la EW y el CG conducen a la formación de complejos solubles (Marengo et al., 2019). La irradiación con MW mejora la complejación, ya que las proteínas globulares se desnaturalizan y exponen los grupos funcionales de los aminoácidos (ocultos en el núcleo de la conformación nativa) para formar enlaces cruzados covalentes (Cortés-Morales et al., 2021).

Las moléculas de INH se dispersan uniformemente en la matriz, donde las interacciones electrostáticas entre las proteínas y los polisacáridos estabilizan la encapsulación. Es importante señalar que se espera que las moléculas de INH se dispersen uniformemente en la matriz porque se disuelven previamente en la solución polimérica utilizada para elaborar las micropartículas cargadas con este PA (inciso 2.3.3). Posteriormente, las microgotas se forman a partir de esta solución precursora utilizando el método microfluídico y luego se curan para formar micropartículas.

En la Figura 40 se muestran imágenes de las partículas obtenidas, tomadas por microscopía óptica y los respectivos gráficos de distribución de tamaño. Se observan partículas de forma esférica y altamente homodispersas. En la Figura 40a se muestran las micropartículas recién obtenidas sin tratamiento de curado, en Figura 40c curadas a 270 W y en Figura 40e curadas a 900 W.

Los histogramas de distribución de tamaño (Figuras 40b, 40d y 40f) revelaron que el tratamiento con MW no afectó la microestructura de las partículas, ya que se midieron diámetros medios similares en todos los casos. De hecho, la irradiación con MW resulta una excelente alternativa para inducir el entrecruzamiento en la mezcla de biopolímeros, evitando así la adición de sustancias químicas que podrían interferir con el compuesto activo.

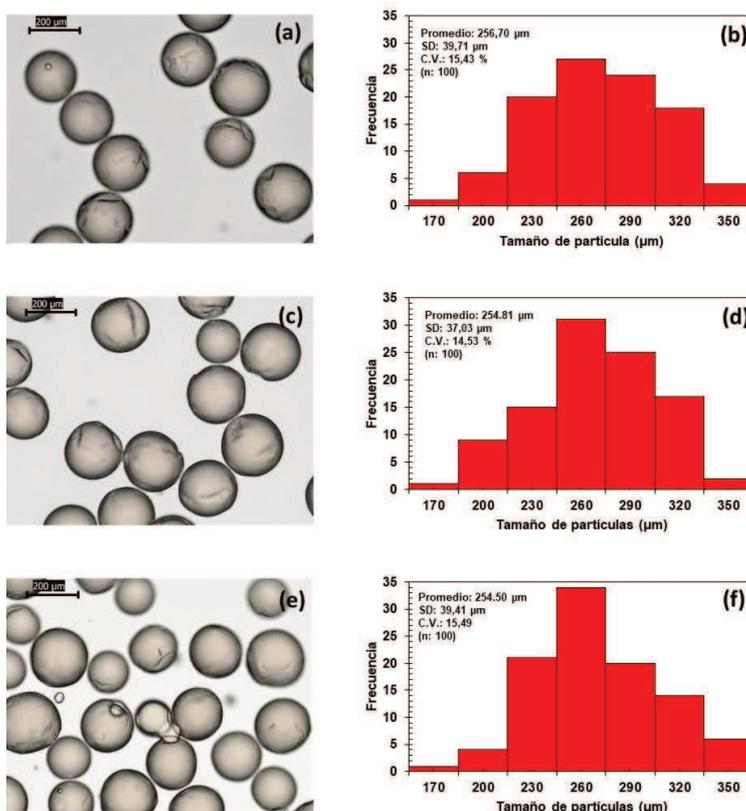


Figura 40: Imágenes de microscopía óptica con 10X de aumento: (a) partículas de EW/CG cargadas con INH recién obtenidas (c) partículas entrecruzadas por radiación MW a 270 W durante 15 s, y (e) a 900 W durante 15 s. Histogramas de distribución de tamaño (b), (d) y (f) correspondientes a las partículas que figuran en (a), (c) y (e), respectivamente.

3.4.2. Espectroscopía IR de partículas de EW/CG con INH encapsulada

Las mediciones de espectroscopía IR se realizaron para obtener conocimientos sobre las interacciones entre los componentes moleculares que forman las micropartículas. Figura 41a muestra los espectros típicos de los compuestos individuales, EW, CG e INH. Para EW, los picos en 3296, 3076 y 2935 cm^{-1} se debieron al estiramiento CH y NH de Amida A y B. Los picos en 1655 y 1541 cm^{-1} correspondieron a Amida I (C = O estiramiento) y Amida II (flexión NH, estiramiento CN), respectivamente. En la región entre 1450 y 1240 cm^{-1} , se observaron los picos (1450, 1396, 1313 y 1240 cm^{-1}) de la Amida III (flexión NH, estiramiento CN) (Thiyagarajan et al., 2018). Figura 41a también muestra el espectro de CG. Los picos en 3445 y 2910 cm^{-1} se debieron al estiramiento de OH y CH y el pico en 1647 cm^{-1} correspondió al agua unida al polímero. Las señales del grupo éster sulfato (SO, O = S = O, COS) se observaron en 1456, 1375, 1265, 847 y 704 cm^{-1} . El pico a 1070 cm^{-1} correspondió al enlace glicosídico y a 927 cm^{-1} al grupo éter en 3,6-anhidrogalactosa (Sen & Erboz, 2010). Finalmente, la especificación de INH también estuvo de acuerdo con los resultados previamente reportados por Diniz (Diniz et al., 2018). En las regiones 3447-3017 cm^{-1} y 1600-1550 cm^{-1} , respectivamente, se observaron estiramientos de NH y flexión de NH asociados a las aminas primarias y secundarias. El pico a 1666 cm^{-1} se debió al grupo carbonilo de la amida y a 1337 cm^{-1} correspondió al estiramiento del CN del anillo piridina.

La Figura 41b muestra los espectros de partículas no tratadas, partículas tratadas con MW a 270 W para 15 s y partículas tratadas con MW a 900 W para 15 s. Las señales de INH no pudieron ser identificadas. Este resultado puede explicarse teniendo en cuenta el tamaño y la relación de masa de los componentes de la formulación. En cuanto al tamaño, las moléculas del polímero y la proteína son mucho más grandes que la del antibiótico. Además, la cantidad de EW y CG es mayor que la cantidad de INH. Sin embargo, los tres espectros parecen ser bastante similares, y solo se pueden observar pequeñas diferencias entre ellos. En comparación con EW y CG (Figura 41a), los espectros de la mezcla presentaron tres picos notables a 2926, 2854 y 1746 cm^{-1} que no pueden atribuirse ni a la proteína ni al polímero. Probablemente, estos cambios se deben a la formación de ésteres de carragenato (C = O, 1746 cm^{-1}) o la aparición de la reacción de Maillard entre el grupo carbonilo en la galactosa de estos ésteres y aminoácidos de EW (Mao et al., 2018). La intensidad de los tres picos aumentó de muestras correspondientes a partículas no tratadas a muestras correspondientes a partículas tratadas con MW a 900 W durante 15 s (por ej. a 2926 cm^{-1} , del 25,6 % al 38,9 %).

Se observaron otros cambios menores en la región entre 1460 y 1080 cm^{-1} ; por ejemplo, los picos se trasladaron a números de onda más bajos (1095 cm^{-1} en partículas no tratadas se trasladó a 1084 cm^{-1} en partículas tratadas con MW a 900 W durante 15 s). Finalmente, las interacciones entre las moléculas pueden ser atribuidas a la formación de ésteres, reacción de Maillard, creación de enlaces de hidrógeno, o una combinación de estos mecanismos.

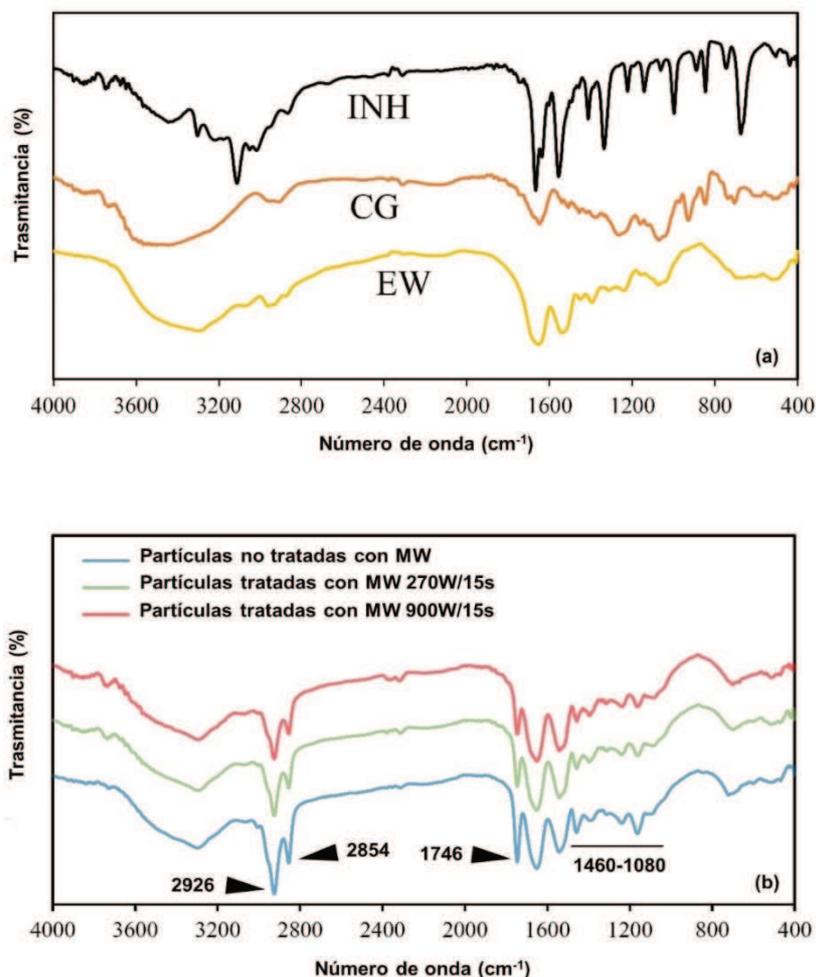


Figura 41: Espectros FTIR de: (a) soluciones individuales EW, CG e INH; (b) micropartículas EW/CG/INH bajo tratamiento de curado con MW a 270 W/15 s y 900 W/15 s.

3.4.3. Liberación de INH

La Figura 42 muestra los resultados del ensayo de liberación de INH de micropartículas de EW/CG a 37 °C con agitación orbital. Se observaron perfiles de liberación similares en ambas condiciones de curado; sin embargo, las partículas tratadas a 900 W liberaron menor cantidad de INH desde el comienzo del ensayo. No se observó liberación súbita (*burst-release*) en ninguna experiencia.

Durante las dos primeras horas a pH 1.6, se observaron liberaciones de ~ 35 % y ~ 22 % de partículas tratadas a 270 W y 900 W, respectivamente. Claramente, a medida que aumenta la potencia de irradiación, aumenta la desnaturalización de proteínas y el entrecruzamiento, disminuyendo la velocidad de liberación. Estos resultados son satisfactorios, dado que muestran que la INH se liberó en bajas cantidades en condiciones de pH y de tiempo de residencia característicos del estómago.

Cuando se sustituyó la solución *buffer* de pH 1.6 por la solución *buffer* de pH 7, se produjo un cambio súbito de las pendientes de la curva, y luego los perfiles de liberación siguieron tendencias similares. Luego de 24 horas, ambos sistemas mostraron una meseta de liberación máxima. Las partículas tratadas a 270 W liberaron alrededor del 83% del fármaco, mientras que las tratadas a 900 W liberaron alrededor del 65%. Por lo tanto, el método de curado propuesto permite diseñar sistemas con velocidades de liberación ajustables, que podrían iterarse para la búsqueda de una liberación de INH óptima.

Para obtener mayor información sobre el mecanismo de liberación de INH a partir de micropartículas EW/CG, se estudiaron los resultados experimentales de las primeras 6.5 horas del ensayo utilizando los siguientes modelos cinéticos (Higuchi, 1963; Korsmeyer et al., 1983; Gouda et al., 2017; Wu et al., 2019):

$$\ln(Q_0 - Q) = \ln Q_0 - k_1 t \quad (4)$$

$$Q/Q_0 = k_H t^{1/2} \quad (5)$$

$$Q/Q_0 = k_p t^n \quad (6)$$

En todos los casos, Q/Q_0 representa la fracción acumulada de INH liberada a tiempo t , y k_i son las respectivas constantes cinéticas. En particular, la Ec. (4) representa el modelo de primer orden, la Ec. (5) es el modelo de Higuchi, y la Ec. (6) es el modelo de Korsmeyer-Peppas. El último modelo se usa comúnmente para describir la liberación de fármacos de una matriz polimérica, donde el exponente de difusión (n) caracteriza el mecanismo de liberación (Korsmeyer et al., 1983). Los ajustes realizados a los datos experimentales (Ec. 6) se presentan en el inserto de la Figura 42. Los valores de los parámetros de ajuste se indican en la Tabla 3 donde se incluye el error porcentual de ajuste para cada modelo cinético (ε %).

El modelo de Higuchi (Higuchi, 1963) presentó los mayores valores de $\varepsilon\%$. Dado que este modelo concibe un proceso puramente difusivo (raíz cuadrada del tiempo), el resultado indica que el sistema estudiado implicaría un mecanismo de liberación adicional. Además, los valores de $\varepsilon\%$ para la Ec. (5) son mayores para la liberación a pH 1.6 que para pH 7, lo que indica que un mecanismo adicional juega un papel importante en las condiciones de pH más bajas. Por otra parte, los valores $\varepsilon\%$ más bajos de la Tabla 3 se obtuvieron con el modelo de primer orden, donde la velocidad de liberación es directamente proporcional a la concentración del PA restante en la partícula.

Considerando k_1 , se podría inferir que la velocidad de liberación de partículas tratadas a 900 W resultó 52 % menor a pH 1.6 y 61 % menor a pH 7 que las tratadas a 270 W, respectivamente. Esta información resulta útil para optimizar los perfiles de liberación mediante el control de las condiciones de curado.

En el modelo Korsmeyer-Peppas, k_p proporciona información sobre las características estructurales de las micropartículas. Los valores de k_p resultantes en la Tabla 3 indican que la liberación fue más rápida a pH 7 que a pH 1.6 en ambas condiciones de curado, y que las partículas curadas a 270 W suministraron la INH más rápido que las partículas curadas a 900 W.

Tabla 3: Valores promedio de parámetros de los modelos de primer orden (Ec. (4)), Higuchi (Ec. (5)) y Korsmeyer-Peppas (Ec. (6)) y error porcentual de ajuste ($\varepsilon\%$) aplicados a ensayos de liberación de INH desde micropartículas de EW/CG.

MW (W)	pH	Primer orden		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
		$k_1(h^{-1})$	$\varepsilon(\%)$	$k_H(h^{-0.5})$	$\varepsilon(\%)$	$k_p(h^{-n})$	$n(-)$	$\varepsilon(\%)$
270	1.6	0.25	0.014	0.23	3.6	0.24	0.70	1.3
270	7.0	0.18	0.082	0.27	0.35	0.32	0.39	0.05
900	1.6	0.13	0.001	0.12	2.9	0.13	0.72	0.12
900	7.0	0.11	0.024	0.18	0.44	0.20	0.44	0.09

También en este modelo, el exponente n está relacionado con el mecanismo de liberación de fármacos: $n < 0.5$ indica que la liberación es controlada por un proceso Fickiano, ya que la velocidad de difusión es mucho menor que la velocidad de relajación de la pared de la micropartícula, y $0.5 < n < 1$ (difusión no-Fickiana) ocurre cuando la liberación se controla por difusión y relajación de la pared (Langer & Peppas, 1981; Korsmeyer et al., 1983). Por lo tanto, los valores de n descritos en la Tabla 3 sugieren

que la liberación de INH siguió una difusión no-Fickiana a pH 1.6 y luego una difusión Fickiana a pH 7. Estos resultados concuerdan con los resultados arrojados por el modelo de Higuchi ($n = 0.5$) el cual no ajusta los datos experimentales al pH más bajo.

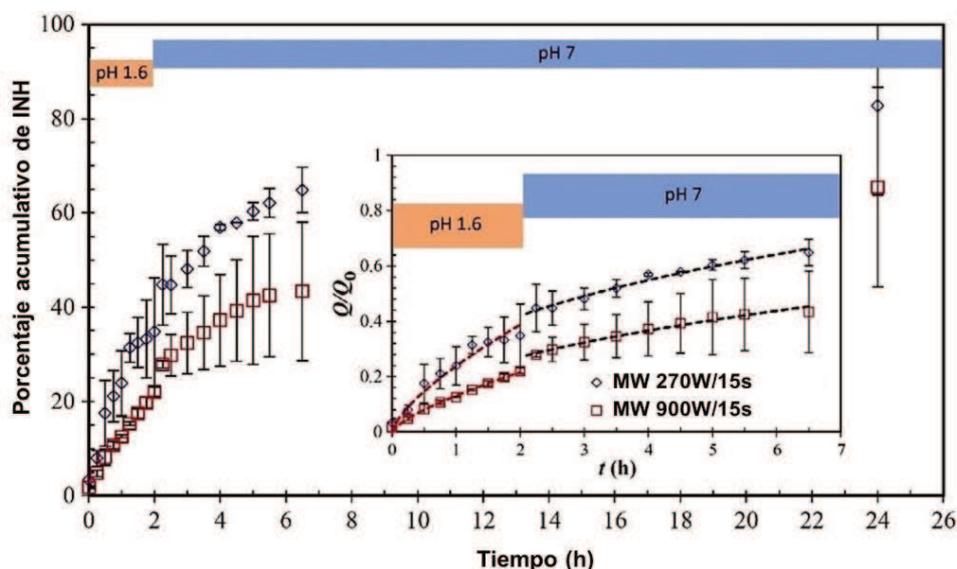


Figura 42: Ensayo de liberación in vitro: Porcentaje acumulado de INH suministrado por las micropartículas EW/CG a 37 °C en solución buffer de NaCl 0,05 mol.L⁻¹, pH 1,6 (primeras 2 h) y solución buffer Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹, pH 7 (las siguientes 22 h). El recuadro muestra un ejemplo del procedimiento de ajuste utilizado para obtener los parámetros del modelo cinético. Los símbolos son datos experimentales (primeras 6,5 h del experimento) y las líneas representan las curvas de ajuste de la Ec. (6), con los valores de los parámetros indicados en tabla 4.

3.4.4. Ensayo de estabilidad de RIF en presencia de INH

La Tabla 4 resume los resultados obtenidos de cuantificación de RIF por método de absorbancia UV a una $\lambda = 471\text{nm}$, según se describió en el inciso 3.3.8.

Tabla 4: Porcentaje de RIF en medio con pH 1.6.

% de RIF			
Partículas (900W + INH)-RIF	Partículas (270W + INH)-RIF	INH +RIF (sin partículas)	RIF
77.11	73.83	59.93	67.4

Se observa una menor degradación de la RIF en las experiencias donde la INH se encuentra encapsulada. En tal sentido, se corroboraría que la encapsulación de una de las drogas (INH) impide la interacción inmediata entre ellas y retrasa la degradación de RIF. La degradación de RIF fue menor en el sistema de partículas tratadas con MW a 900 W potencia. En concomitancia con lo observado en los perfiles de liberación de INH,

parecería que al ocurrir una liberación más lenta de INH en el sistema de partículas tratadas con 900 W de potencia también ocurre una menor degradación de la RIF.

3.4.5. Evaluación de actividad antibacteriana de INH

En la Figura 43 se muestran imágenes de las placas de Petri correspondientes a los ensayos de actividad antibacteriana.

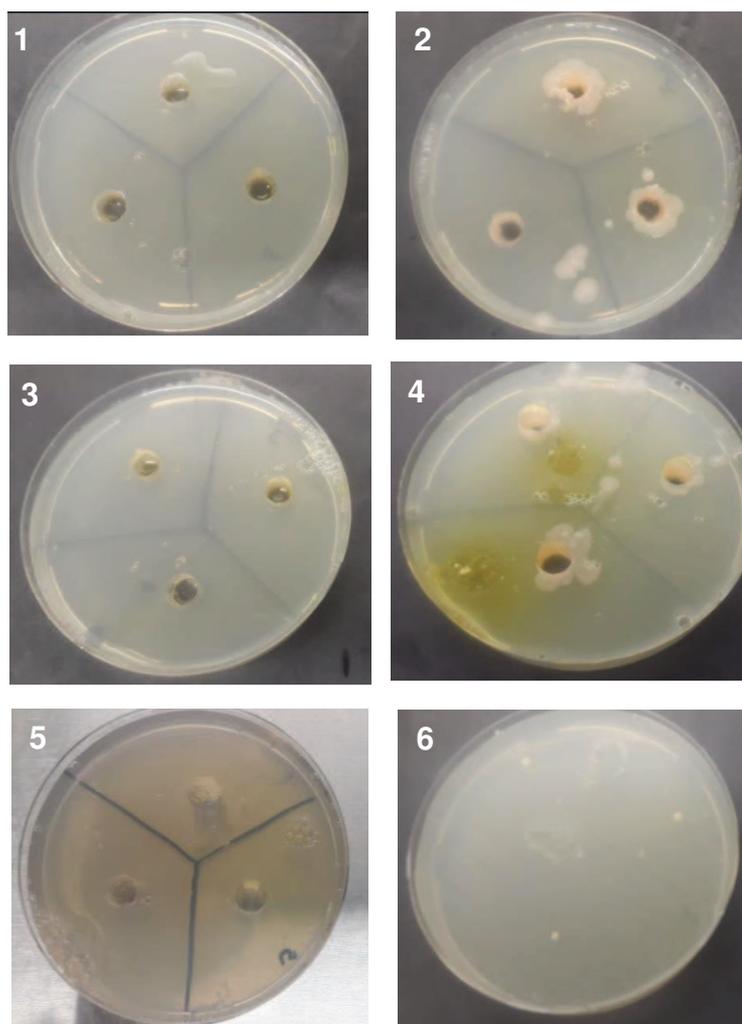


Figura 43: Imágenes de placas de Petri de ensayos de actividad antibacteriana (*M. tuberculosis*, ATCC 27294) de INH encapsulada en micropartículas de EW/CG. (1) Micropartículas con método de curado 900 W de potencia, 15 s + INH, (2) Micropartículas con método de curado 900 W de potencia, 15 s, (3) Micropartículas con método de curado 270 W de potencia, 15 s +INH, (4) Micropartículas con método de curado 270 W de potencia, 15 s, (5) INH en solución acuosa, (6) Control de crecimiento de MT.

Se observó que en las experiencias donde se sembraron micropartículas con INH encapsulada no hubo crecimiento bacteriano (placas 1 y 3). Mientras que en las

experiencias donde se sembraron micropartículas sin INH encapsulada sí hubo crecimiento (placas 2 y 4). El efecto antibacteriano fue positivo en ambas formulaciones de micropartículas, tanto en las tratadas con 900 W de potencia como en las tratadas con 270 W. Asimismo, se corroboró el efecto inhibitor de la INH en solución (placa 5) y el crecimiento favorable del MT en ausencia de antibiótico (placa 6). El mayor crecimiento alrededor de los pozos de las placas 2 y 4 podría deberse a que como las suspensiones de micropartículas poseen restos de aceite de oliva éste podría actuar como factor de crecimiento bacteriano. En la placa 4 se observa una pequeña contaminación fúngica la cual no interfiere en la visualización de los resultados.

3.4.6. Evaluación de citotoxicidad celular de células Caco-2 ante micropartículas con INH encapsulada

En la Figura 44 se presentan los resultados de viabilidad de línea celular Caco-2 en presencia de micropartículas cargadas con INH. Se observó que la viabilidad disminuyó progresivamente hasta 55 % a la máxima concentración ensayada de 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. De acuerdo con la norma ISO 10993-5:2009, cuando un agente causa una reducción en la viabilidad celular mayor al 30 % se considera citotóxico. Si bien se necesitaría un estudio más exhaustivo de viabilidad celular en presencia de INH, con los resultados obtenidos hasta el momento se podría concluir que formulaciones de INH menores a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ podrían utilizarse de forma segura ya que causan una reducción de la viabilidad celular menor al 30 %.

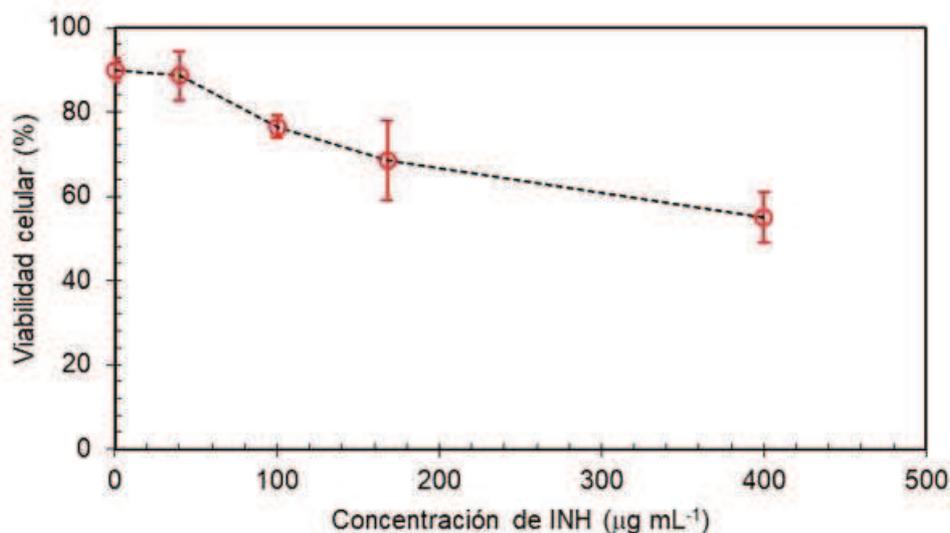


Figura 44: Viabilidad de línea celular Caco-2 en presencia de micropartículas cargadas con concentraciones crecientes de INH.

Otro de los resultados de interés de este ensayo es el que indicaría que las micropartículas sin INH presentan muy baja, o casi nula, citotoxicidad. Si bien se observó una disminución promedio de la viabilidad de aproximadamente el 10 %, esto podría deberse al propio error experimental.

3.5. Conclusiones parciales

Los resultados presentados en este capítulo muestran que las micropartículas obtenidas con la metodología microfluídica desarrollada permitieron encapsular INH.

Las conclusiones más relevantes obtenidas a través de este estudio evidenciaron que:

- (i) El prototipo de dispositivo con junta en doble cruz permitió la obtención de micropartículas de alginato sódico homodispersas y con buena esfericidad, capaces de encapsular INH, pero con baja retención del PA en los ensayos simulando condiciones de pH gastrointestinal.
- (ii) La encapsulación de INH en partículas compuestas por EW/CG utilizando el dispositivo con junta en simple cruz permitió obtener micropartículas esféricas, monodispersas y altamente estables, capaces de retener el PA. El sistema de curado por irradiación por MW permitió modificar los perfiles de liberación que fueron progresivos.
- (iii) El análisis de los perfiles de liberación con modelos teóricos simples permitió concluir que la liberación es del tipo no-Fickiana a pH 1.6 probablemente debida a la combinación de efectos difusivos y de relajación de la matriz que conforma las micropartículas, continuando luego con una difusión Fickiana a pH 7.
- (iv) El ensayo de estabilidad de RIF en presencia de INH mostró que la degradación de RIF fue menor en los sistemas donde la INH se encontró encapsulada.
- (v) La evaluación de actividad antibacteriana mostró que la INH encapsulada conserva su actividad luego de ser liberada desde las micropartículas.
- (vi) Los ensayos de evaluación de citotoxicidad celular sobre línea celular Caco-2 ante micropartículas con INH mostraron que se podrían utilizar de forma segura formulaciones con este PA en concentraciones menores a $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ya que causan una reducción de la viabilidad celular inferior al 30 %.

CAPÍTULO 4

APLICACIÓN NUTRICIONAL DE LAS MICROPARTÍCULAS: ENCAPSULACIÓN DE HEMOGLOBINA EN POLVO COMO FUENTE DE HIERRO HEMÍNICO.

4.1. Introducción

En este capítulo se describe la aplicación de la metodología de generación microfluídica de micropartículas para la encapsulación de hemoglobina (Hmg) en polvo como fuente de hierro hemínico (FeH), utilizado para el tratamiento de la anemia ferropénica. La metodología de análisis realizada sigue la secuencia ya descrita en el Capítulo 3 para la encapsulación de INH. Inicialmente se estudia el proceso de encapsulación propiamente dicho, seguido de la capacidad de la matriz para liberar hierro. Además, se evalúa la citotoxicidad y la permeabilidad biológica del hierro liberado.

4.1.1. Déficit de hierro

La anemia es una afección de salud muy común. Según la OMS, la prevalencia de anemia depende de los grupos étnicos y la ubicación geográfica, pero se estima que el 50% de estos casos se deben a la deficiencia de hierro (Span et al., 2016). Entre las principales causas de su deficiencia, pueden mencionarse la insuficiente cantidad de hierro y sus reservas en el organismo, la pérdida de sangre como causa de algún tipo de hemorragia (menstrual, tracto gastrointestinal, lesiones) y la disminución de la absorción de hierro en el tubo digestivo (biodisponibilidad) (Span et al., 2016; Skolmowska & Głabska, 2019; Piskin et al., 2022).

Un metabolismo saludable del hierro es importante, ya que el hierro es el principal mineral involucrado en el transporte de oxígeno, la síntesis de ADN, y el crecimiento y supervivencia celular (Span et al. 2016; Maas et al., 2023). La homeostasis del hierro se regula principalmente por absorción intestinal, teniendo en cuenta que la absorción de este mineral tiene lugar predominantemente en el duodeno y el yeyuno superior por parte de los enterocitos. Esta absorción es regulada por la hormona hepcidina que se produce en los hepatocitos y se une a la ferroportina, proteína transportadora de hierro que traslada hierro desde los enterocitos duodenales hacia la circulación (Fuqua et al., 2012).

La deficiencia de hierro evoluciona en forma general, según distintos estadios. En el primer estadio, el requerimiento de hierro supera la ingesta, lo que causa depleción progresiva de los depósitos de hierro de la médula ósea. A medida que disminuyen los depósitos, aumenta en compensación la absorción de hierro de la dieta. Durante estadios más tardíos, la deficiencia altera la síntesis de eritrocitos, y la consecuencia final es la anemia (Ganz & Nemeth, 2012).

La patología suele desarrollarse lentamente, porque puede pasar mucho tiempo hasta que las reservas de hierro se agoten en el organismo y la médula ósea produzca

menos glóbulos rojos y a su vez, sean de menor tamaño. Su evolución será más rápida cuando se manifieste un desequilibrio entre la proporción de hierro ingerido y su reserva en el organismo, las necesidades de micronutrientes esenciales para el proceso de eritropoyesis (cobre, vitamina B12, ácido fólico), las pérdidas corporales y el balance hormonal. La ausencia de estos micronutrientes y hormonas hace que la producción de glóbulos rojos sea inferior a la necesaria o que estén deformados y sean incapaces de transportar correctamente el oxígeno (Ganz & Nemeth, 2012; Günther, 2023). Como consecuencia, puede generar fatiga excesiva en adultos, retraso del crecimiento y desarrollo en niños y disminución de la capacidad de aprendizaje en adolescentes (Domellöf et al., 2014; Bailey et al., 2015).

La anemia ferropénica mantiene su importancia como patología, por ser una de las deficiencias nutricionales con incidencia directa en lactantes y mujeres gestantes (Domellöf et al., 2014; Galicia et al., 2016; Benson et al., 2022; Igbinosa et al., 2022). En nuestro país, desde hace algunos años, existen dos leyes que tienden a subsanar, al menos en parte, el déficit de hierro de la población, sea a través de programas nacionales o simplemente, a través del suministro a la población de alimentos de consumo masivo como lo expuesto en las normativas tales como la ley 25459 que establece la fortificación de leche entera o la ley 25630 donde se establecen condiciones de adición de hierro a la harina de trigo, ácido fólico, tiamina, riboflavina y niacina en proporciones específicas. Si bien existen todas estas alternativas para disminuir la incidencia de anemias a través de la ingesta de productos fortificados o suplementos dietarios conteniendo hierro (Vatandoust & Diosady, 2022), en muchos casos, no se evidencian los resultados esperados (Churio et al., 2018).

Otro de los factores de importancia que inciden en el fracaso de distintas estrategias para afrontar esta patología, es la interrupción de las terapias de suplementación debido a características organolépticas de los productos formulados con hierro (Larson et al., 2021; Vatandoust & Diosady, 2022), trastornos gastrointestinales y baja biodisponibilidad asociada a la ingesta junto con otros alimentos (Piskin et al., 2022), incluso casos de intolerancia al hierro (Culeddu et al., 2022; Maas et al., 2023).

Hay dos formas de hierro dietético, el hierro no hemínico (FeNH) que está presente en las verduras y los granos, y el hierro hemínico (FeH) que se encuentra predominantemente en la carne roja en forma de Hmg y mioglobina (Miret et al., 2010). Se sabe que, aunque la prevalencia del FeNH es superior a FeH, este último se absorbe hasta un 30 % más eficazmente (Villarroel et al., 2011).

Debido a que los suplementos de FeNH son relativamente baratos y fáciles de producir, la industria farmacéutica ha desarrollado varias formulaciones orales a base de sales de hierro como sulfato ferroso. Sin embargo, estas formulaciones se asocian con diversos efectos secundarios, como trastornos gastrointestinales que probablemente, son causados por la cantidad redundante de hierro en los preparados que permanecen sin absorber en el colon (Kalinowski & Richardson, 2005). En consecuencia, hay una necesidad urgente de preparaciones orales más avanzadas con mayor biodisponibilidad y menos efectos secundarios.

El FeH es una forma orgánica de hierro presente en la molécula de porfirina de la Hmg o mioglobina y derivado mayoritariamente de fuentes de alimentos animales, siendo el de mejor disponibilidad y absorbido sin sufrir modificaciones y sin interactuar con otros componentes de la dieta (Valenzuela et al., 2009; Buzala et al., 2016; Skolmowska & Głabska, 2018).

A diferencia del hierro no hemínico que es absorbido por los enterocitos a través del transportador de metal divalente 1 (DMT1), el mecanismo de absorción exacto para el hierro hemínico sigue siendo un tema de debate. Sin embargo, es generalmente aceptado que el grupo hemo se une a la membrana del borde del cepillo de los enterocitos del duodeno y es transportado posteriormente por un transportador diferente como hierro no hemínico a través de la membrana celular al citoplasma (Shayeghi et al., 2005; Korolnek & Hamza, 2014).

Los principales factores para el desarrollo de nuevas terapias orales de hierro serían la mejora de la estabilidad, biodisponibilidad y solubilidad del suplemento de hierro (Hunter et al., 2012). La tecnología de encapsulación ha mejorado sustancialmente varios de los problemas mencionados, reduciendo la posibilidad de que ocurran reacciones de precipitación y quelación con otros componentes de la dieta en el tracto gastrointestinal (Span et al., 2016; Vatandoust & Diosady, 2022).

En este trabajo de Tesis se estudió la encapsulación de Hmg bovina en polvo como fuente de FeH.

4.2. Objetivos parciales

Objetivo 1: Encapsular Hmg en polvo como fuente de hierro hemínico y evaluar su liberación en condiciones de pH compatibles con la vía gastrointestinal.

Objetivo 2: Evaluar la citotoxicidad y la permeabilidad biológica de hierro liberado desde las micropartículas.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Materiales

Se utilizó aceite de oliva de calidad alimentaria (Olivi Hnos., Mendoza, Argentina) como FC. Para la formulación de la FD se adquirieron huevos de gallina frescos en un mercado local, se utilizó CG (Tipo I, 80% kappa y 20% lambda carragenato) marca Sigma Chemicals (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

La Hmg en polvo bovina como fuente de FeH fue provista por la empresa Yeruva S.A. (Esperanza, Argentina). Este producto se obtuvo a partir de sangre entera fresca proveniente de la faena de bovinos, sometida a un proceso de centrifugación para separar el plasma y posterior secado por el método spray de la fase no plasmática. El producto resultante se constituye de un valor mayor a 90% de proteína (según ficha técnica del fabricante), siendo apto de utilizar como potencial complemento proteico y de FeH. El contenido de hierro de la Hmg en polvo fue cuantificado por el Servicio Centralizado de Grandes Instrumentos (SECEGRIN)-CCT Conicet-Santa Fe, mediante la técnica de absorción atómica por atomización de llama con un Espectrómetro Perkin Elmer PinAAcle 900T. Se obtuvo un valor de 2.39 mg/g de hierro por gramo de polvo de Hmg.

4.3.2. Dispositivo microfluídico

Para este estudio se utilizó el dispositivo en simple cruz descrito en el Capítulo 1, inciso 1.3.1.

4.3.3. Preparación de la FD

Para la encapsulación de Hmg se utilizó la FD compuesta EW/CG cuya metodología de preparación fue descrita en Capítulo 2, sección 2.3.3. Una vez preparada esta mezcla biopolimérica se adicionaron 0.75 g de Hmg en polvo a 15 mL de FD.

4.3.4. Generación de micropartículas

Los caudales aplicados al del sistema microfluídico para obtener micropartículas con Hmg encapsulada fueron 3.5 mL.h⁻¹ para la FC y 0.5 mL.h⁻¹ para la FD. Todos los ensayos se hicieron a temperatura ambiente controlada de 25 °C.

4.3.5. Curado de micropartículas

Las micropartículas de EW/CG con Hmg luego de recolectadas fueron tratadas aplicando irradiación en horno microondas (BGH, Modelo B330DSS, Río Grande, Argentina) aplicando una potencia de 900 W, durante 15 s.

4.3.6. Caracterización de micropartículas

El tamaño y la morfología de las micropartículas, fue determinado por microscopía óptica con un microscopio Leica DM750 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suiza) con cámara digital integrada ICC50W. Se midió el diámetro de las micropartículas individuales, luego se calculó el tamaño promedio y la desviación estándar. Se midieron cien micropartículas por muestra para proporcionar valores estadísticos confiables. Todos los experimentos se hicieron por duplicado.

4.3.7. Ensayos de liberación

Para la evaluación de la liberación de hierro desde las micropartículas con Hmg encapsulada, primeramente, se evaluó la posible liberación de hierro desde las micropartículas hacia la FC. Para ello, se tomó una alícuota de la mezcla con micropartículas y de FC, con una cantidad de micropartículas correspondientes a 1.0 mL de la mezcla FD. Se llevó a un volumen final de 5.0 mL con aceite de oliva y se extrajeron alícuotas de 1.0 mL de aceite a intervalos de tiempo predefinidos, abarcando un tiempo total de 48 horas. Estas muestras de FC se trataron por digestión con microondas en un digestor Milestone START D, como etapa preparativa para la realización de los ensayos de absorción atómica.

El contenido de hierro liberado hacia la FC fue analizado por absorción atómica por atomización de llama en un espectrómetro Perkin Elmer PinAAcle 900T. Se empleó el método de curva de calibrado con estándares acuosos certificados. El límite de detección fue de $0.01 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ y el de cuantificación de $0.03 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. Estas determinaciones se realizaron por duplicado, con micropartículas recién obtenidas, por parte del Servicio Centralizado de Grandes Instrumentos (SECEGRIN)-CCT Conicet-Santa Fe.

Para evaluar la liberación de hierro desde las micropartículas hacia el medio de liberación se retiró la FC y se añadieron 5.0 mL de medio de liberación ($\text{CINa } 0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 1.6) (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina) a 1.5 mL de FD. Se tomó mayor volumen de FD (en comparación con los ensayos de liberación de INH) para aumentar la sensibilidad del proceso de cuantificación de hierro. Luego de 2 horas, todo el volumen de solución salina se retiró suavemente y se volvió a colocar la misma cantidad (5.0 mL) de buffer Tris-HCl ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7) (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina). La liberación

se analizó durante 72 horas. La suspensión se sometió a agitación orbital a 150 r.p.m., a 37 °C. A intervalos de tiempo predefinidos, se extrajeron 1.5 mL de la fase acuosa de la suspensión y se analizó la liberación acumulativa de hierro mediante el método colorimétrico directo para la determinación de hierro (Fer-color AA, Wiener Laboratorios S.A.I.C., Rosario, Argentina). La metodología para cuantificación se presenta en el Apéndice 4.

4.3.8. Evaluación de citotoxicidad celular de células Caco-2 ante micropartículas con Hmg encapsulada

La evaluación del efecto citotóxico o anti proliferativo de las micropartículas con Hmg encapsulada se realizó mediante la evaluación de la viabilidad y proliferación de la línea celular Caco-2, células de adenocarcinoma de colon humano (ATCC, HTB-37). Los fundamentos de esta técnica fueron detallados en el Capítulo 3. Para ello, se empleó el kit Cell Titer 96TM AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega), el cual se compone de dos reactivos: MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium)] en una concentración de 2 mg.mL⁻¹ y metasulfato de fenazina (PMS) en una concentración de 0,92 mg.mL⁻¹. Estos ensayos fueron optimizados y realizados en el laboratorio de Cultivos de Células del Centro Biotecnológico del Litoral, FBCB-UNL, siguiendo la metodología propuesta por Cano-Sancho (Cano-Sancho et al., 2015) con algunas modificaciones.

Para construir la curva de viabilidad de células en presencia de micropartículas cargadas con Hmg se realizaron diluciones a partir de micropartículas con una concentración de hierro de 1500 µM, de manera de abarcar concentraciones similares a las ensayadas (Span et al., 2016). En la Tabla 5 se presentan las diluciones y concentraciones analizadas. Para cada dilución se recolectó en tubos *ependorfs* el volumen correspondiente de partículas teniendo en cuenta el caudal de la FD y estimando el tiempo de recolección necesario para obtener cada volumen. Luego, se retiró el aceite de la FC y se agregó la cantidad de buffer necesaria para cada dilución. Se ensayaron 3 réplicas de cada dilución, en ambos ensayos.

Para cada ensayo se incluyó un control negativo de 100 µL de partículas sin agente encapsulado diluidas con 400 µL de medio de cultivo, un control de crecimiento celular en condiciones normales de cultivo (100 % viabilidad) y un control positivo de Estaurosporina (STP, 250 nM) que causa un 50 % de citotoxicidad en 24 horas a células Caco-2 (previamente puesto a punto en el laboratorio). Luego de la adición de todas las muestras, las placas se incubaron nuevamente por 24 horas en estufa gaseada a 37 °C.

Tabla 5: Volúmenes de micropartículas, volúmenes de medio de dilución y concentraciones resultantes seleccionadas para el ensayo de citotoxicidad de células Caco-2 ante micropartículas con Hmg.

Volumen de micropartículas (µL)	Volumen de medio (µL)	Concentración resultante de Fe (µM)
100	400	300
70	430	214
50	450	150
35	465	107

Para revelar el ensayo, se lavaron todos los pocillos con 1X PBS, se adicionaron 200 µL de medio de cultivo fresco y, posteriormente, se agregaron 40 µL por pocillo del reactivo de color, preparado en el momento mezclando 1 mL de solución de MTS con 50 µL de solución de PMS por cada placa. Se incubó durante 3 horas a 37 °C en estufa gaseada. La absorbancia del cromógeno se midió a una $\lambda = 492$ nm contra lectura de fondo de placa a $\lambda = 690$ nm. Las mediciones efectuadas a longitudes de onda entre 630-700 nm ayudan a eliminar el ruido de fondo dado por restos celulares y por la presencia de componentes capaces de generar absorbancia no específica. Se calculó el porcentaje de viabilidad celular utilizando el valor de absorbancia del control negativo como 100 % de viabilidad celular.

4.3.9. Evaluación de la permeabilidad biológica de hierro encapsulado en membranas de células Caco-2.

La absorción de un PA administrado por vía oral depende principalmente del mecanismo de liberación del PA, así como de su solubilidad y permeabilidad a través de la mucosa intestinal. Empleando un cultivo in vitro de células, se han desarrollado ensayos que imitan estrechamente las condiciones de absorción de la mucosa humana, permitiendo el reemplazo de animales de experimentación. La superficie intestinal se biomimetiza empleando una monocapa de células Caco-2 (células de adenocarcinoma de colon humano) sobre una membrana semipermeable. Para determinar la permeabilidad del hierro a través de la mucosa intestinal se realizó un ensayo de permeabilidad en células Caco-2.

Para medir las concentraciones de hierro permeadas a través de la monocapa celular se colocó una solución de hierro sobre la cámara apical de la membrana. Luego de incubada por 24 horas, la fracción permeada se recolectó de la cámara basolateral

de la membrana (Figura 38) para su posterior cuantificación. Estos ensayos fueron optimizados y realizados en el laboratorio de Cultivos de Células del Centro Biotecnológico del Litoral, FBCB-UNL, siguiendo la metodología propuesta por Hubatsch (Hubatsch et al., 2007) con algunas modificaciones.

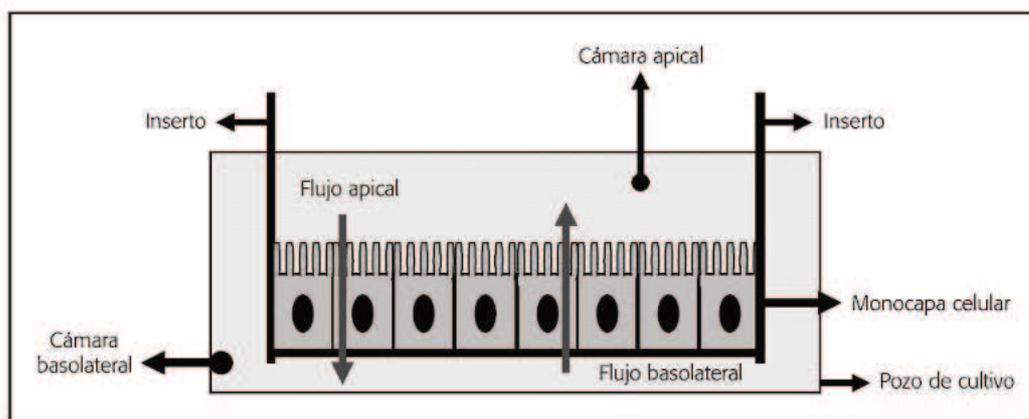


Figura 45: Esquema de una monocapa celular sobre un inserto de membrana PC en un pocillo de una placa de cultivo (Figura modificada de Abecia et al., 2009).

La monocapa celular se obtuvo mediante plaqueo de 500 μL de una suspensión celular de $3 \cdot 10^5 \text{ cél. mL}^{-1}$ en pocillos con inserto de membrana de policarbonato de 0.4 μm (Jet Biofil, Guangzhou, China). Se sembraron 3 pocillos en la cámara apical de una placa de 12 pocillos. En la cámara basolateral se colocaron 1.5 mL del mismo medio de cultivo con el que se preparó la suspensión celular (DMEM + 10 % SFB + Pen/Strep). El medio de ambas cámaras se cambió cada 48 h durante 20 días para lograr una monocapa celular íntegra.

Los ensayos de permeabilidad se realizaron siempre entre los días 21 y 25 desde el día que se cultivaron las células. Para cada ensayo, se retiró el medio de ambas cámaras (basolateral y apical), los insertos con la monocapa celular se cambiaron a una nueva placa de 12 pocillos, se le agregó buffer HBSS atemperado a 37 °C (Gibco, 14025, EEUU) y se llevó nuevamente a estufa gaseada a 37 °C por unos 10-15 min.

Una vez obtenidas las monocapas se adicionaron 500 μL de una solución con hierro liberado desde micropartículas, por triplicado, directamente a la cámara apical de cada inserto, luego se incubaron durante toda la noche en estufa a 37 °C / 5% CO_2 con agitación lenta (100 r.p.m.). Al día siguiente se recolectó todo el volumen correspondiente a las muestras presentes en la cámara basolateral, se rotularon y se conservaron a -20 °C para su posterior análisis.

La solución aplicada en la cámara apical se obtuvo mediante un ensayo de liberación de hierro a partir de micropartículas con Hmg encapsulada durante 72 horas, reproduciendo el mismo protocolo descrito en el inciso 3.3.6. La única diferencia fue que se utilizó buffer HBSS (Solución salina equilibrada de Hanks, Thermo Fisher Scientific Inc., EEUU) como medio de liberación. Resulta relevante mencionar que se realizaron ensayos previos adicionando en la cámara apical micropartículas con Hmg encapsulada, sin lograr obtener resultados favorables. Probablemente, dado que el tiempo de incubación del ensayo es 24 horas, la cantidad de hierro liberado resultó muy baja y por ello no se detectó presencia de hierro en el permeado presente en la cámara basolateral.

El hierro presente en el permeado se cuantificó utilizando el reactivo Fer-color AA de Wiener lab (Wiener laboratorios S.A.I.C, Rosario, Argentina) cuyo principio de detección se describe en el Apéndice 4.

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Generación de micropartículas con Hmg en polvo encapsulada.

En la Figura 46 se presentan imágenes de las micropartículas obtenidas. Las microgotas generadas se curaron por MW utilizando una potencia de 900 W durante 15 s. Las micropartículas obtenidas resultaron homodispersas, con buena esfericidad y un diámetro promedio de 203 μm .

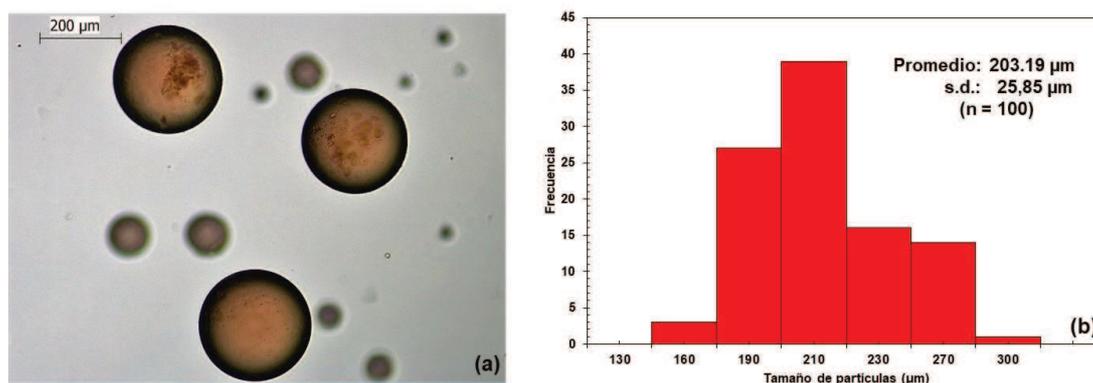


Figura 46: (a) Micropartículas de EW/CG con Hmg encapsulada obtenidas después del proceso de irradiación MW. (b) Histograma de distribución de tamaño de micropartículas.

No se detectó por ensayos de absorción atómica en estudios realizados por el Servicio Centralizado de Grandes Instrumentos (SECEGRIN)-CCT Conicet, migración de hierro hacia la FC. Estos resultados fueron auspiciosos, dado que indicarían que las

partículas podrían retener completamente el PA estando suspendidas en la FC. Podría pensarse en un sistema de suplemento nutricional colocando tanto la FC como la FD dentro de cápsulas blandas de uso farmacéutico.

4.4.2. Liberación de hierro

La Figura 47 presenta la liberación porcentual acumulada de hierro desde las micropartículas hacia las soluciones *buffers* en función del tiempo. Durante las primeras 2 horas donde las partículas estuvieron expuestas al *buffer* de pH 1.6 se produjo una liberación de 6 % del hierro encapsulado. Luego del cambio de *buffer*, el hierro continuó liberándose progresivamente hasta aproximadamente las 7 horas alcanzando valores de 17 %. Luego, la pendiente de la curva disminuyó y alcanzó un máximo de 24 % a las 72 horas, aproximadamente.

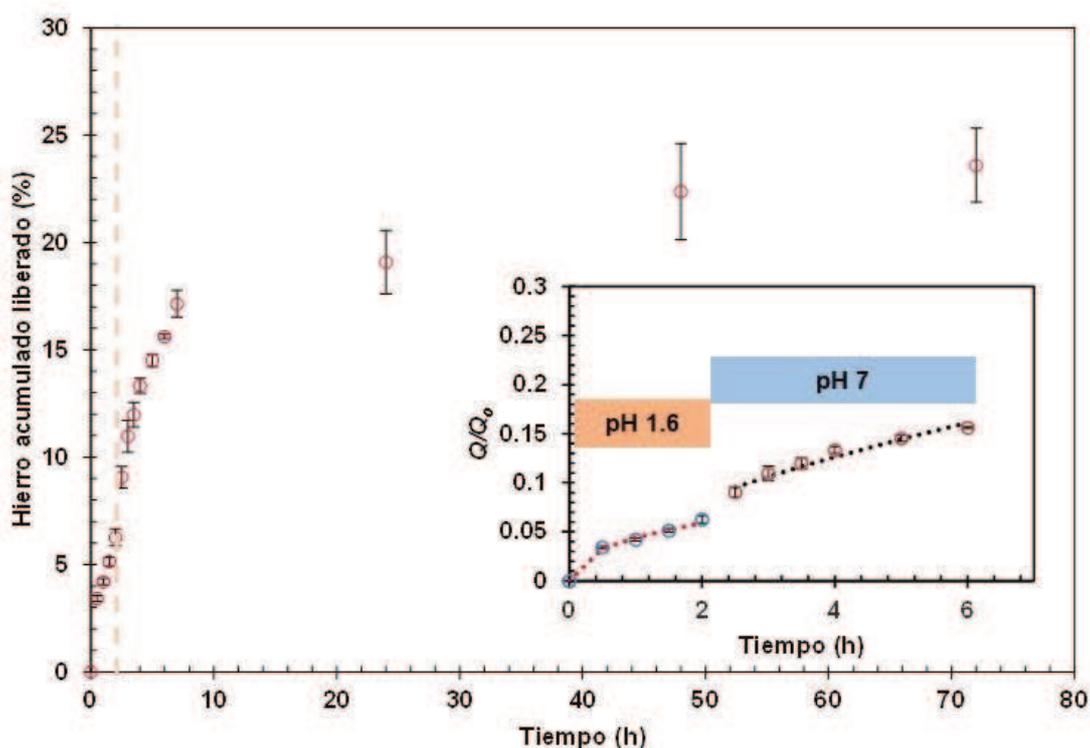


Figura 47: Ensayo de liberación in vitro: Porcentaje acumulativo de hierro suministrado por las micropartículas EW/CG a 37 °C en solución *buffer* de NaCl 0,05 mol.L⁻¹, pH 1,6 (primeras 2 h) y solución *buffer* Tris-HCl 0,1 mol.L⁻¹, pH 7 (las siguientes 70 h). El recuadro muestra un ejemplo del procedimiento de ajuste utilizado para obtener los parámetros del modelo cinético. Los símbolos son datos experimentales (primeras 6 horas del experimento) y las líneas representan las curvas de ajuste de la Ec. (6), con los valores de los parámetros indicados en tabla 6

Estos resultados muestran que la liberación de hierro desde las micropartículas es baja. Probablemente, el sistema de encapsulación podría mejorarse modificando el proceso de curado, bajando la potencia de irradiación por MW logrando una matriz biopolimérica con menor grado de entrecruzamiento que facilite la liberación. Asimismo, resulta relevante mencionar que se analizó la liberación durante 72 horas dado que como los biopolímeros que conforman las micropartículas presentan muco-adhesión (Yermak et al. 2020), esto permitiría pensar que el tiempo de residencia en la zona de absorción intestinal podría extenderse.

Para obtener mayor información sobre el mecanismo de liberación de hierro, se estudiaron los resultados experimentales de las primeras 6 horas del ensayo utilizando los modelos cinéticos antes reportados en Capítulo 3, inciso 3.4.3, en las Ecs. 4, 5 y 6 (Higuchi, 1963; Korsmeyer et al., 1983; Gouda et al., 2017; Wu et al., 2019). En la Tabla 6 se presentan los valores de los parámetros de ajuste obtenidos.

Tabla 6: Valores promedio de parámetros de los modelos de primer orden (Ec. (4)), Higuchi (Ec. (5)) y Korsmeyer-Peppas (Ec. (6)) y error porcentual de ajuste ($\varepsilon\%$) aplicados a ensayos de liberación de hierro desde micropartículas de EW/CG.

pH	Primer orden		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	$k_1(h^{-1})$	$\varepsilon(\%)$	$k_H(h^{-0.5})$	$\varepsilon(\%)$	$k_p(h^{-n})$	$n(-)$	$\varepsilon(\%)$
1.6	$3.5 \cdot 10^{-2}$	$4.6 \cdot 10^{-4}$	$4.4 \cdot 10^{-2}$	$3.9 \cdot 10^{-1}$	$4.4 \cdot 10^{-2}$	0.42	$2.5 \cdot 10^{-1}$
7.0	$3.2 \cdot 10^{-2}$	$1.4 \cdot 10^{-3}$	$6.4 \cdot 10^{-2}$	$5.5 \cdot 10^{-2}$	$5.5 \cdot 10^{-2}$	0.60	$1.3 \cdot 10^{-1}$

Los mejores ajustes resultaron con el modelo de primer orden, donde la velocidad de liberación es directamente proporcional a la concentración del PA restante en la partícula. Estos resultados permitirían inferir que se podría mejorar la liberación de hierro aumentando la cantidad de Hmg encapsulada, pero también, debería mejorarse la interacción del PA con la matriz polimérica y el grado de entrecruzamiento de esta, que da una mayor o menor resistencia al transporte de moléculas hacia el exterior (Lo cual se refleja en el valor de k_1). Esto resulta un desafío experimental, dado que al aumentar la cantidad de Hmg en polvo disuelta en la FD la viscosidad de esta fase aumenta sustancialmente, siendo éste un parámetro crítico para el funcionamiento del sistema microfluídico. No obstante, un estudio experimental más detallado permitiría mejorar este aspecto. La información obtenida del resto de los parámetros de ajuste sugiere que el mecanismo de liberación sería predominantemente difusivo, mostrado por el buen

ajuste que presentó el modelo de Higuchi y los valores de los parámetros n del modelo de Korsmeyer-Peppas.

4.4.3. Evaluación de citotoxicidad celular de células Caco-2 ante micropartículas con Hmg encapsulada

En la Figura 48 se presentan los resultados de viabilidad de línea celular Caco-2 en presencia de micropartículas cargadas con Hmg bovina. Se observó que la viabilidad se mantuvo aproximadamente constante entorno al 100 % teniendo en cuenta la variabilidad propia de la técnica. Estos resultados son esperables dado que tanto el material encapsulante como el agente encapsulado son de grado alimenticio. A través de este ensayo también se pudo corroborar que las micropartículas sin agente encapsulado presentaron citotoxicidad nula (100 % de viabilidad).

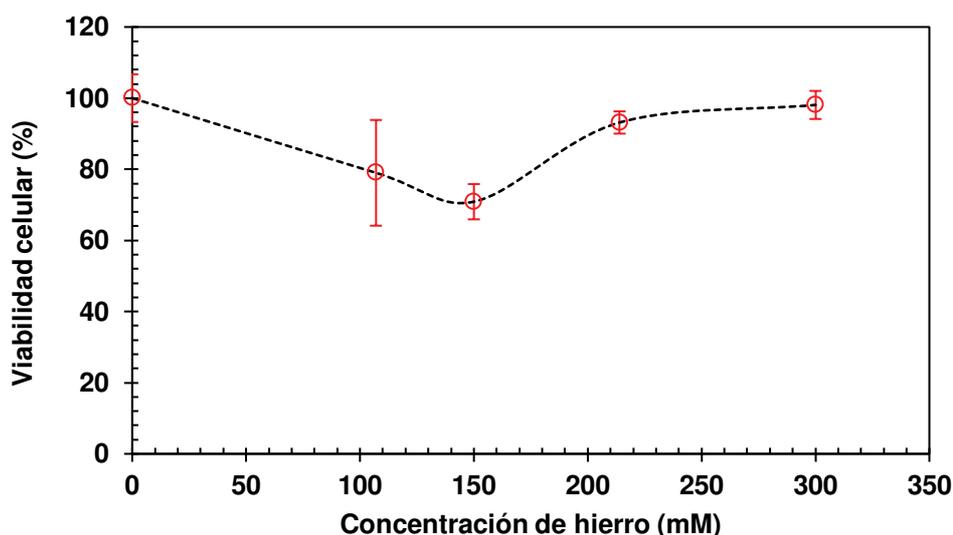


Figura 48: Viabilidad de línea celular Caco-2 en presencia de micropartículas cargadas con concentraciones crecientes de Hmg bobina.

4.4.4. Evaluación de la permeabilidad biológica de hierro en membranas de células Caco-2

La concentración de hierro en el medio de liberación luego de 72 horas fue $10356 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($185.44 \mu\text{M}$), equivalente a 28.87 % de liberación. Estos resultados fueron muy similares a los obtenidos en los ensayos de liberación reportados previamente en el inciso 4.4.2. Asimismo, esta concentración se encuentra comprendida en el rango de concentraciones evaluadas en los ensayos de citotoxicidad.

En el ensayo de permeabilidad celular llevado a cabo, se obtuvo una concentración de hierro de $1200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el permeado celular, indicando que durante el período de 24 horas, 11.6 % del hierro logró permear exitosamente a través de la monocapa celular. Estos resultados muestran que parte del hierro encapsulado y luego liberado desde las micropartículas puede ser permeado a través de la mucosa intestinal para luego ser utilizado por las células. Si bien estos resultados no fueron cuantitativamente favorables, se espera que, si estas formulaciones logran optimizarse para obtener una mayor liberación de hierro, la captación celular de este mineral aumentaría también. Asimismo, un mayor tiempo de exposición en la zona apical también podría aumentar la permeabilidad (considerar que el ensayo experimental contempla un período de incubación de 24 horas). En tal sentido, la mucoadhesión de estos sistemas microparticulados compuestos por proteínas y polisacáridos podrían mejorar este tiempo de exposición (Yermak et al. 2020).

4.5. Conclusiones parciales

Los resultados presentados en este capítulo muestran que las micropartículas obtenidas con la metodología microfluídica desarrollada permitieron encapsular Hmg en polvo como fuente de FeH. Las conclusiones más relevantes obtenidas a través de este estudio expusieron que:

- (i) Se logró encapsular Hmg en polvo utilizando la FD compuesta de EW/CG y dispositivo con junta en simple cruz. Se obtuvieron micropartículas con alta esfericidad y homodispersidad que cargaron y retuvieron el PA.
- (ii) El ensayo de liberación permitió evaluar la capacidad del sistema para retener el PA y liberarlo en condiciones de pH gastrointestinales simuladas, aunque en un bajo porcentaje. El mecanismo de liberación sería predominantemente difusivo.
- (iii) El ensayo de viabilidad de micropartículas cargadas con Hmg sobre línea celular Caco-2 mostró que la viabilidad se mantuvo aproximadamente constante entorno al 100 %.
- (iv) El ensayo de permeabilidad celular en línea celular Caco-2 mostró que parte del hierro encapsulado y luego liberado desde las micropartículas puede ser permeado a través de la mucosa intestinal para luego ser utilizado por las células, aunque de una manera poco eficiente.

CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo de Tesis doctoral se logró evidenciar la capacidad y versatilidad de la técnica microfluídica, enfocada a la generación de micropartículas capaces de encapsular y vehiculizar PAs de interés para industrias de base farmacéutica, alimenticia y biotecnológica. Para lograr este objetivo, se diseñaron y construyeron dispositivos en material polimérico (PMMA), utilizando la técnica de ablación láser para el grabado de microcanales. Todas las etapas involucradas se realizaron en laboratorios convencionales sin la necesidad de utilización de salas limpias. Este proceso de trabajo, asociado a la accesibilidad del material polimérico para fabricación de dispositivos, posibilitó la concreción de rápidas modificaciones en el prototipado de los mismos y reducción de costos operativos. Se evaluaron configuraciones de junturas (T, simple y doble cruz) que permitieron estudiar sistemas de trabajo de características distintas. Los dispositivos pudieron operarse de manera sencilla y el accionamiento e interacción de los fluidos componentes de las fases se logró mediante el uso de bombas de infusión de jeringas.

Se evaluó conceptualmente la potencialidad de los prototipos diseñados y fabricados para generar microgotas y micropartículas en un sistema modelo de encapsulación. El estudio involucró la optimización de distintas etapas analíticas (generación de microgotas y micropartículas, curado químico y físico, estabilidad y liberación), utilizando como PA modelo el colorante AO, una FD compuesta de una solución biopolimérica de EW/CG, una FC de aceite de oliva comercial y un dispositivo microfluídico de juntura simple cruz. Los resultados obtenidos con este sistema de trabajo, mostraron entre sus aspectos más relevantes, que en ninguna etapa involucrada fue necesario agregar ningún surfactante, ni para la generación de las gotas, ni para el almacenamiento y posterior manipulación. Esto es muy importante si se piensa en la utilización de micropartículas en distintas formulaciones, dado que no se agrega ningún tipo de aditivos, sumado además, a los beneficios para la salud asociados al aceite de oliva. Las micropartículas obtenidas fueron estables durante varios meses, conservando completamente el PA encapsulado estando suspendidas en el medio oleoso y liberándolo gradualmente en medio acuoso con diferentes cinéticas, según la metodología de entrecruzamiento utilizada (química y/o física). Este resultado, adicionado a que se encapsuló todo el PA, como beneficio añadido del proceso de generación por microfluídica, ofrece un gran potencial para diseñar micropartículas para aplicaciones de liberación controlada.

Los resultados y posibles adaptaciones surgidas del análisis del sistema modelo, se implementaron para la generación de micropartículas capaces de encapsular PAs y

luego liberarlos de manera eficiente y controlada. En particular se estudiaron dos alternativas de aplicación para las micropartículas: encapsulación de INH (fármaco de primera línea para el tratamiento de TB) y encapsulación de Hmg en polvo de uso comercial como fuente de hierro. Particularmente la FD compuesta por EW/CG mostró ser eficaz para entrapar los dos PAs y el dispositivo con juntura en simple cruz, resultó el más versátil y fácil de operar.

La encapsulación de INH involucró un estudio en el que se evaluaron dos alternativas de trabajo. En la primera propuesta, se utilizó un dispositivo con juntura en doble cruz, una solución de alginato sódico (FD), una fase compuesta de cloruro de calcio y alcohol polivinílico con carácter entrecruzante y surfactante (FES) y aceite de oliva comercial (FC). Con este sistema se obtuvieron micropartículas de buena esfericidad y homodispersidad, pero con baja capacidad de liberar de manera controlada el PA. Esta situación motivó implementar una propuesta alternativa, donde se produjo el reemplazo de la FD actuante por la composición biopolimérica de EW/CG, manteniendo como FC el aceite de oliva comercial. Se cambió también el dispositivo con juntura en doble cruz a uno con juntura en simple cruz, por lo que la fase FES, también se retiró del sistema de trabajo. Se evaluó también el curado de las micropartículas obtenidas con distintas potencias de MW. Los resultados obtenidos en esta etapa de trabajo permitieron optimizar condiciones para la generación de micropartículas cargadas con el PA, y analizar el efecto de su interacción bajo distintas condiciones de estudio. Se obtuvieron micropartículas estables, homodispersas y de morfología esférica. Los ensayos de liberación mostraron que el PA permaneció en las partículas hasta que fueron expuestas a las soluciones buffers que simulan condiciones de pH gastrointestinal. En especial, las partículas irradiadas con 900 W liberaron el PA progresivamente en condiciones de pH similares a las del íleon.

El ensayo de estabilidad de RIF en presencia de INH, mostró que la encapsulación de INH disminuyó la degradación de RIF. Estos resultados abren nuevas perspectivas de investigación que permitan generar formulaciones que contengan ambos PAs. Podría pensarse en una formulación con la RIF disuelta en la fase oleosa y la INH encapsulada. O bien, una formulación que contenga a ambos PAs encapsulados en forma separada.

La INH encapsulada conservó su actividad antibacteriana ante MT luego de ser liberada desde las micropartículas. Se espera profundizar estos estudios para lograr determinar la CIM de INH encapsulada en el sistema de micropartículas propuesto.

Los ensayos de evaluación de citotoxicidad sobre línea celular Caco-2 ante micropartículas con INH, mostraron que se podrían utilizar de forma segura formulaciones con este PA en concentraciones menores a $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

La segunda aplicación propuesta involucró la encapsulación de hemoglobina en polvo para su potencial uso en suplementos nutricionales, como fuente de hierro hemínico. Fue posible encapsular Hmg en polvo utilizando FD de EW/CG y el dispositivo con junta en simple cruz, obteniéndose micropartículas con alta esfericidad y homodispersidad que cargaron y retuvieron el PA.

El ensayo de liberación permitió evaluar la capacidad del sistema para retener el PA y liberarlo al poner en contacto las micropartículas con los *buffers* en condiciones de pH gastrointestinal simuladas, aunque en un bajo porcentaje. Este resultado es alentador, dado que la encapsulación evita que el Fe reducido y soluble a pH gástrico, pueda llegar en mayor proporción al intestino. Se espera continuar con estudios de optimización para lograr una mayor liberación de Fe en *buffers* de pH 7 manteniendo una baja liberación a pH 1.6, mediante modificaciones en las concentraciones de los componentes de la FD y nuevas combinaciones de potencia de irradiación MW/t.

El ensayo de viabilidad sobre la línea celular Caco-2 ante micropartículas cargadas con Hmg mostró que la viabilidad se mantuvo aproximadamente constante entorno al 100 %.

El ensayo de permeabilidad celular en células Caco-2 mostró que parte del Fe encapsulado y luego liberado desde las micropartículas puede ser permeado a través de la mucosa intestinal para luego ser utilizado por las células. Si se lograra mejorar la liberación de Fe desde las micropartículas, probablemente, también aumentaría la captación celular de este mineral.

Los resultados obtenidos para ambas aplicaciones son muy promisorios, dejando abierta la posibilidad de seguir mejorando las formulaciones, la interacción de distintas soluciones poliméricas como medio encapsulante y la factibilidad de prototipar dispositivos con geometrías de canales adaptables para aplicaciones específicas en distintas áreas, posicionando a la técnica microfluídica, como una alternativa de vanguardia para la obtención de micropartículas de alto valor agregado con la capacidad de vehicular y liberar PAs.

Finalmente, se concluye que este estudio permitió proporcionar una plataforma para la fabricación de micropartículas poliméricas funcionales con diferentes composiciones y estructuras que pueden adaptarse al tipo de compuesto funcional encapsulado.

APÉNDICES

Apéndice 1: Determinación de viscosidades de la FC y de las FD utilizadas para la generación de micropartículas

Los ensayos se realizaron en un reómetro Haake RheoStress RS80 (Haake Instruments Inc., Paramus, NJ, U.S.A.) con geometría cono-plato de 60 mm de diámetro y 1° de ángulo del cono. Antes de realizar cada set de experiencias se evaluó la viscosidad de un estándar de 9.2 cP a 25 °C (Brookfield Engineering Laboratories Inc., Middleborough, U.S.A.) para garantizar una adecuada calibración del equipo.

Se obtuvieron curvas de fluidez de las dispersiones preparadas abarcando un rango de velocidades de corte comprendido entre 30 y 1000 s⁻¹, a una temperatura de 25 °C, por duplicado.

En la Figura A1.1 se muestran los valores obtenidos de viscosidad para aceite de oliva comercial. Se observa comportamiento Newtoniano. En la Figura A1.2 se presentan las curvas de viscosidad de soluciones de alginato con las concentraciones utilizadas para la generación de micropartículas. Se observa un comportamiento claramente No-Newtoniano. En la Figura A1.3 se presenta la viscosidad de solución acuosa de EW 50 % v/v, solución acuosa de CG 0.075 % p/v y la FD utilizada para la generación de micropartículas. Se observa que estas soluciones macromoleculares en forma separa presentan baja viscosidad y comportamiento prácticamente Newtoniano. Mientras que la mezcla presenta un marcado aumento de la viscosidad en todo el rango de velocidad de corte evaluado y un claro comportamiento pseudoplástico.

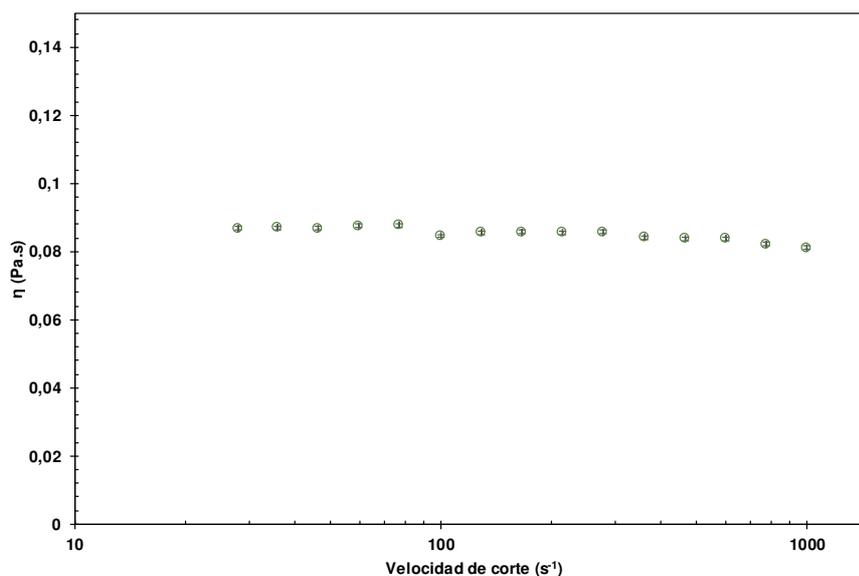


Figura A1.1: Valores promedio de viscosidad para aceite de oliva comercial. Por debajo de velocidades de corte por debajo de 200 s⁻¹ las medidas de viscosidad resultaron inestables.

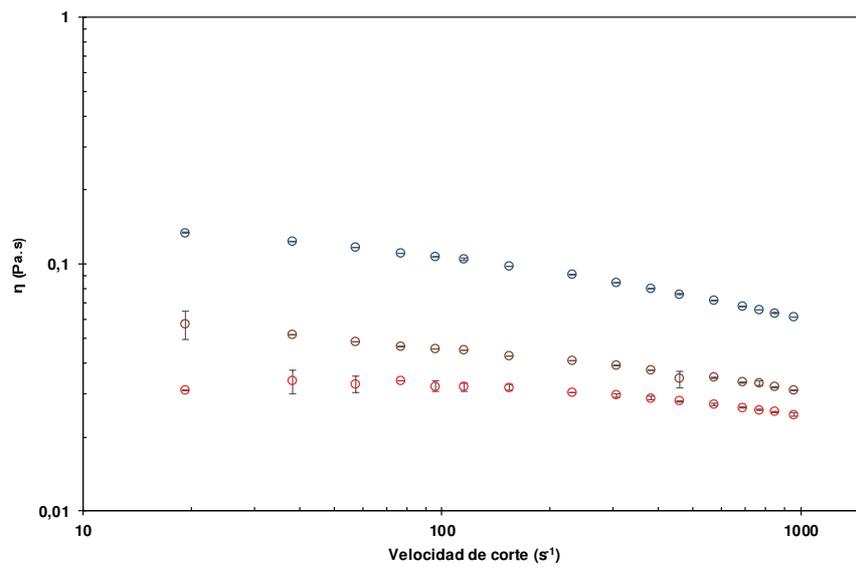


Figura A1.2: Valores promedio de viscosidad para soluciones de alginato sódico: (○) 1% m/v, (○) 1.5% m/v, (○) 2% m/v.

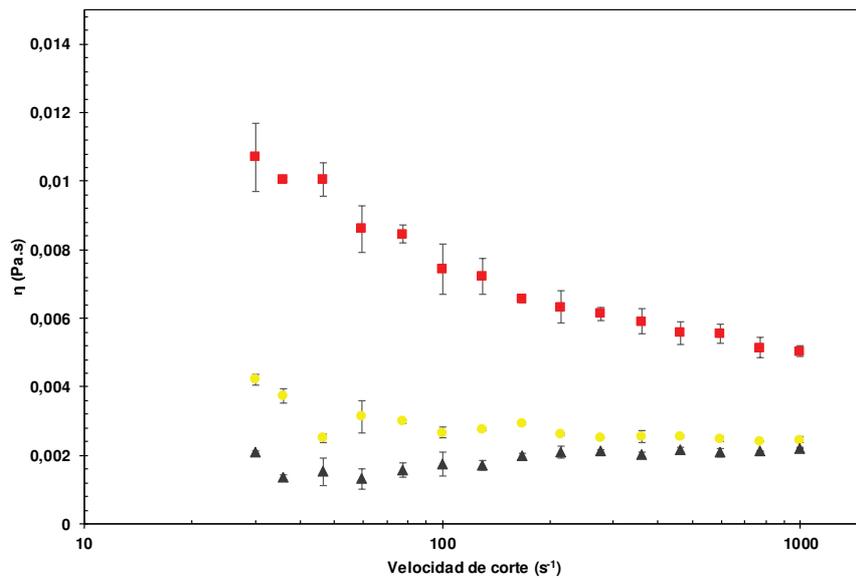


Figura A1.3: Valores promedio de viscosidad (■) FD, (●) EW 50% v/v, (▲) Solución de CG 0.015% p/v. El error informado corresponde a la desviación estándar del promedio de dos determinaciones por punto a cada velocidad de corte considerada.

Apéndice 2: Liberación de colorante amarillo ocaso en FD y en FC.

Determinación de la longitud de onda óptima de lectura para el colorante AO

Se realizaron los espectros uv-visible de la solución de colorante AO en agua y del aceite de oliva comercial. Se realizó un barrido de absorbancias entre 400 a 700 nm. Se utilizó un espectrofotómetro uv-visible Génesis 5 (Thermo Scientific, EEUU). Las muestras fueron colocadas en cubetas plásticas de paso óptico de 1 cm. De los espectros, se observa para AO se dá el máximo de absorción en $\lambda = 480$ nm y para aceite de oliva extra virgen $\lambda = 450$ nm

En función de los resultados, se eligió para los ensayos $\lambda = 450$ nm (Figura A2.1.). Esta longitud de onda permite leer las absorbancias para AO, sin interferencia del aceite de oliva.

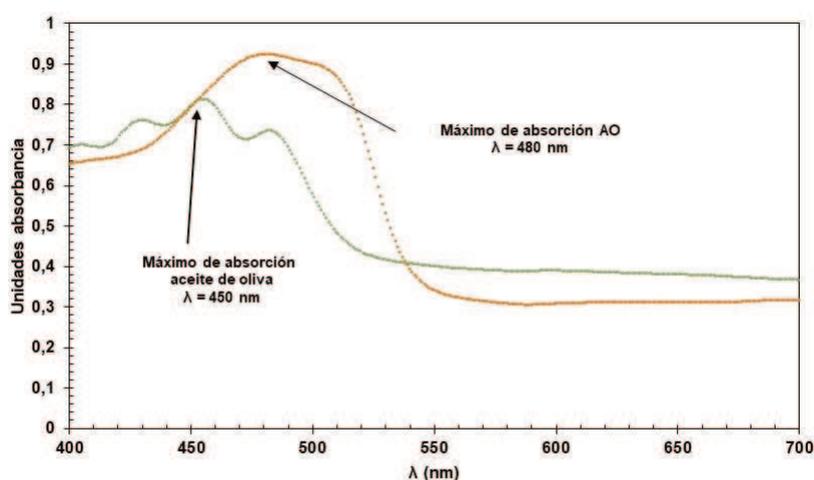


Figura A2.1.: Espectro uv-visible de aceite de oliva comercial (●) y solución de colorante AO (●) en agua.

Curva de calibración de AO en FC y FD

Para obtener la curva de calibración que permita cuantificar liberación de AO en la FC se preparó una solución madre de $0.062 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, a partir de la solución madre se hicieron diluciones para distintos niveles de concentración del AO. Las lecturas de absorbancia se hicieron a $\lambda = 480$ nm. Se utilizó como blanco de reactivo aceite de oliva comercial (Figura A2.2.).

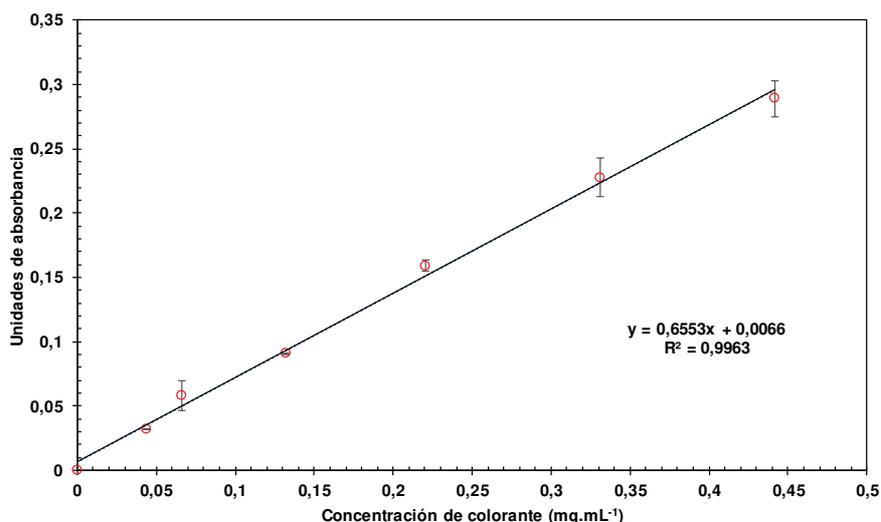


Figura A2.2.: Curva de calibración de AO en FC. El error informado corresponde a la desviación estándar del promedio de tres determinaciones por nivel de concentración.

Para la obtención de la curva de calibración para el análisis de cuantificación de AO liberado en medio acuoso (Figura A2.3.), se pesaron 0.0953 g de colorante AO y se llevaron a 50 mL con agua ultrapura en matraz ($1.906 \cdot 10^{-3} \text{ g.mL}^{-1}$). A partir de la solución madre, se realizó una dilución 1/10 y se tomó esta, como nueva solución Stock ($1.906 \cdot 10^{-4} \text{ g.mL}^{-1}$), a partir de la cual se hicieron las diluciones correspondientes sucesivas que permitieran lectura de absorbancias en el rango lineal de la ley de Beer.

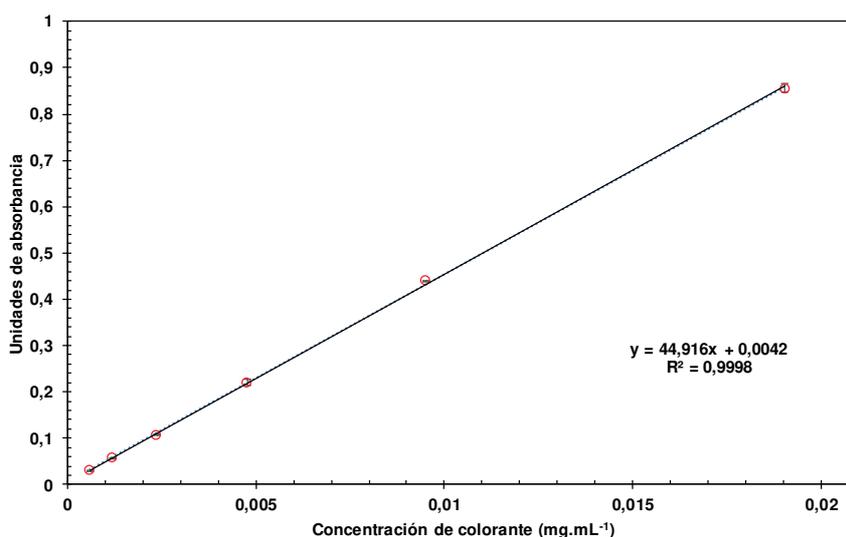


Figura A2.3.: Curva de calibración de AO en FD. El error informado corresponde a la desviación estándar del promedio de tres determinaciones por nivel de concentración.

Apéndice 3: Metodología RP-HPLC para cuantificación de INH

Las muestras obtenidas para realizar el estudio de liberación secuencial de INH se cuantificaron por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa (RP-HPLC) utilizando un Cromatógrafo SHIMADZU Prominence serie 20-A con detector UV por arreglo de diodos e inyector automático.

Para el desarrollo de la metodología HPLC, se preparó en primera instancia una solución madre de INH por disolución en agua ultra pura, con una concentración final de $300 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. A fin de verificar la linealidad del método en el rango de 0,5 a $50,0 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ se prepararon, por dilución de la solución madre en una solución buffer, soluciones de calibrado a cinco niveles de concentración, las cuales se inyectaron por triplicado (0,5, 5,0, 15, 30 y $50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de INH).

Se confeccionó la curva de calibrado utilizando las áreas de los picos de elución obtenidos por HPLC de las soluciones patrones preparadas y sus respectivas concentraciones (Figura A3.1.). Los datos experimentales se ajustaron con un modelo lineal mediante el método de cuadrados mínimos.

Las condiciones de trabajo del sistema cromatográfico se describen en la tabla A3.1:

Tabla A3.1: condiciones experimentales aplicadas para la cuantificación de INH por RP-HPLC.

Columna	Zorbax Eclipse XDB C18, 5 μm ; 250 mm x 4.6 mm
Fase móvil	Buffer fosfato/MeOH/ACN (35:45:20)
Caudal	1.0 mL/min
Temperatura de horno	30 °C
Detección	254 nm
Stop time	7 minutos
Volumen de inyección	20 μL

La ecuación de la recta de ajuste fue: $y = a + bx$, donde “y” es la respuesta correspondiente al área del pico, “a” es la ordenada al origen, “b” es la pendiente y “x” la concentración de INH expresada en $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

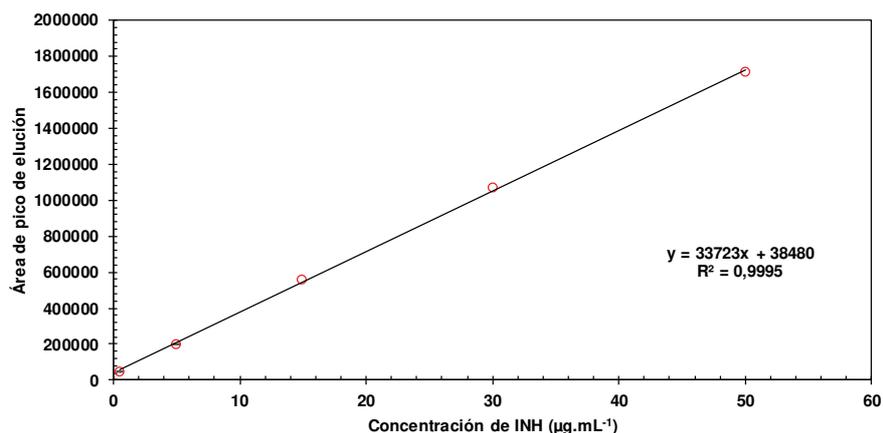


Figura A3.1.: Curva de calibración para INH por RP-HPLC. El error informado corresponde a la desviación estándar del promedio de tres determinaciones por nivel de concentración.

Curva de calibración para RIF

Se realizó una curva de calibración con 5 niveles de concentración de RIF (0,0 2,5, 5,0, 15, 30 ppm) por lectura de absorbancia a $\lambda = 471$ nm (Figura A3.2.)

Para cuantificación de RIF el procedimiento fue similar al utilizado para los ensayos de liberación. Se retiró el aceite con micropipeta y se llevó a volumen final de 5 mL con solución de ClNa pH 1.6. Luego de transcurridas 2 horas se cuantificó la RIF en la solución *buffer*. Se sacó 1 mL de la solución con el *buffer*, se colocó en la cubeta y se leyó absorbancia a $\lambda = 471$ nm. Luego, se devolvió ese mL al vial con la solución. De esta manera lo que se cuantificaba de RIF es el remanente en el vial.

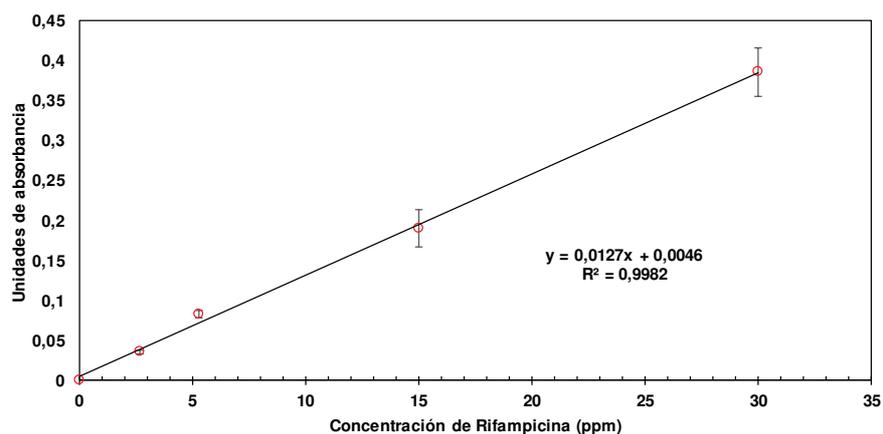


Figura A3.2.: Curva de calibración para RIF por absorbancia. El error informado corresponde a la desviación estándar del promedio de tres determinaciones por nivel de concentración.

La concentración de RIF remanente se determinó directamente utilizando la ecuación resultante de la curva de calibración.

Apéndice 4: Determinación del contenido de Fe

La cuantificación de Fe en las micropartículas cargadas con Hmg en polvo (YERUVA, Esperanza, Argentina) se realizó por medio del método colorimétrico directo para la determinación de hierro **Fer-color AA** (Wiener Laboratorios S.A.I.C., Rosario, Argentina).

El método utilizado se fundamenta en que el Fe sérico se libera de la unión con su proteína transportadora específica, la transferrina, en buffer acetato pH 4,5 y en presencia de un reductor, el ácido ascórbico. Posteriormente reacciona con el reactivo de color, piridil bis-fenil triazina sulfonato (ferrozina) dando un complejo color magenta, que se mide por espectrofotometría a 560 nm.

El kit de trabajo provee de los reactivos necesarios para la determinación, compuestos de:

Reactivo A: solución de acetato 150 mmol.L^{-1} para pH 4,5, conteniendo guanidina. Concentración final de acetato: 150 mmol.L^{-1} , pH 4.5. Concentración final de guanidina: 4.0 mol.L^{-1} .

Reactivo B: ácido ascórbico. Concentración final de ácido ascórbico: 0.03 mol.L^{-1} .

Reactivo C: solución estabilizada de ferrozina. Concentración final de ferrozina: 0.2 mmol.L^{-1} .

Standard: solución de iones Fe (III) equivalente a $100 \text{ } \mu\text{g.dL}^{-1}$.

Para llevar a cabo la determinación se siguió la siguiente secuencia de trabajo:

1°) En tres tubos marcados B (Blanco de reactivos), S (Standard) y D (Desconocido) se colocaron y mezclaron:

	B	S	D
Agua bidestilada	200 μL	-	-
Stándard	-	200 μL	-
Muestra	-	-	200 μL
Reactivo de trabajo	1 mL	1 mL	1 mL

2°) Se leyó con espectrofotómetro la absorbancia a 560 nm del tubo D, llevando a cero con agua.

3°) Se agregó 200 μL a cada uno de los tubos B, S y D

4°) se volvió a leer la absorbancia de cada tubo a los 5 minutos, llevando el equipo a cero con agua.

5°) Para calcular la cantidad de Fe, se corrigieron las lecturas de S y D restándoles los el blanco:

$$S - B = S(\text{corregida}) \quad (\text{A4.1})$$

$$D - B = D(\text{corregida}) \quad (\text{A4.2})$$

Luego se cuantifico Fe según:

$$f = \frac{100 \mu\text{g} / \text{dL}}{S(\text{corregida})} \quad (\text{A4.3})$$

$$\text{Fe}(\mu\text{g} / \text{dL}) = D(\text{corregida}) \times f \quad (\text{A4.4})$$

La reacción es lineal hasta $1000 \mu\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ y su límite de detección es $6.05 \mu\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abadi, S. S. H., Moin, A., & Veerabhadrapa, G. H. (2016). Fabricated microparticles: an innovative method to minimize the side effects of NSAIDs in arthritis. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 33 (5), 433-488. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016016624>.
- Abecia, L., McCartney, A. L., & Klinder, A. (2009). Efecto de los productos de fermentación del triptófano en la resistencia eléctrica transepitelial en un modelo in vitro de colon. En *XXXIX Jornadas de Estudio. XIII Jornadas sobre producción animal: Zaragoza. 12 y 13 de Mayo de 2009, Tomo II*, 796-798. Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario.
- Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y., & Ahn, D. U. (2013). Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents: a review. *Poultry Science*, 92 (12), 3292- 3299. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2013-03391>. PMID:24235241.
- Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y., Jo, C., Suh, J. W., & Ahn, D. U. (2016). Enzymatic hydrolysis of ovomucin and the functional and structural characteristics of peptides in the hydrolysates. *Food chemistry*, 192, 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.055>.
- Adepu, S., & Ramakrishna, S. (2021). Controlled drug delivery systems: current status and future directions. *Molecules*, 26 (19), 5905. <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>.
- Ahmed, N., Darwish, S., & Alahmari, A. M. (2016). Laser ablation and laser-hybrid ablation processes: a review. *Materials and Manufacturing Processes*, 31 (9), 1121-1142. <https://doi.org/10.1080/10426914.2015.1048359>.
- Ahmed, N., Darwish, S., Alahmari, A. M., & Shar, M. A. (2016). Micro-channels by Nd: YAG laser beam machining: fabrication, microstructures, and micro-hardness profiles. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 85 (9), 1955-1968. <https://doi.org/10.1007/s00170-015-7257-1>.
- Akhavan, S., Assadpour, E., Katouzian, I., & Jafari, S. M. (2018). Lipid nano scale cargos for the protection and delivery of food bioactive ingredients and nutraceuticals. *Trends in Food Science & Technology*, 74, 132-146. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.001>.

- Al Mughairy, B., & Al-Lawati, H. A. (2020). Recent analytical advancements in microfluidics using chemiluminescence detection systems for food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *124*, 115802. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115802>.
- Alabdeh, M., Lechevalier, V., Nau, F., Gautier, M., Cochet, M. F., Gonnet, F., Jan, S. & Baron, F. (2011). Role of incubation conditions and protein fraction on the antimicrobial activity of egg white against *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli*. *Journal of food protection*, *74* (1), 24-31. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-157>.
- Alderton, G., Ward, W. H., & Fevold, H. L. (1946). Identification of the bacteria-inhibiting, ironbinding protein of egg white as conalbumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *11*, 9-13.
- Ali, A. J., Abdulla, H. I., & Al-Nimer, M. S. (2021). The Pharmacological Effects of Kappa Carrageenan on Different Human Cell Lines and Genomic DNA: An in vitro study. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences (P-ISSN 1683-3597 E-ISSN 2521-3512)*, *30*(1), 189-195. <https://doi.org/10.31351/vol30iss1pp189-195>.
- Alleoni, A. C. C. (2006). Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Scientia Agricola*, *63*, 291-298. <https://doi.org/10.1590/s0103-90162006000300013>.
- Alu'datt, M. H., Alrosan, M., Gammoh, S., Tranchant, C. C., Alhamad, M. N., Rababah, T., Zghoul, R., Alzoubi, H., Ghatasheh, S., Ghozlan, K. & Tan, T. C. (2022). Encapsulated-based films for bioactive compounds and their application in the food industry: A roadmap for food-derived functional and healthy ingredients. *Food Bioscience*, 101971. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101971>.
- Ammar, H., Garnier, B., el Moctar, A. O., Willaime, H., Monti, F. & Peerhossaini, H. (2013). Thermal analysis of chemical reactions in microchannels using highly sensitive thin-film heat-flux microsensors. *Chemical Engineering Science*, *94*, 150-155. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.02.055>.
- Anna, S. L. (2016). Droplets and bubbles in microfluidic devices. *Annual Review of Fluid Mechanics*, *48*, 285-309. <https://doi.org/10.1146/annurev-fluid-122414-034425>.
- Anton, M. (2013). Egg yolk: structures, functionalities and processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(12), 2871-2880. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6247>.
- Arnon, Z. A., Gilead, S. & Gazit, E. (2019). Microfluidics for real-time direct monitoring of self-and co-assembly biomolecular processes. *Nanotechnology*, *30*(10), 102001. <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aaf7b1>.

- Arshady, R. (1993). *Microcapsules for food*. *Journal of Microencapsulation*, 10(4), 413-435. <https://doi.org/10.3109/02652049309015320>.
- Asghar, A., & Abbas, M. (2012). Dried egg powder utilization, a new frontier in bakery products. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 3(13), 493-505. <https://doi.org/10.5251/abjna.2012.3.12.493.505>.
- Assadpour, E., & Jafari, S. M. (2019). Nanoencapsulation: Techniques and developments for food applications. In *Nanomaterials for food applications*, 35-61. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00003-8>.
- Assadpour, E., Rostamabadi, H., & Jafari, S. M. (2020). Introduction to characterization of nanoencapsulated food ingredients. In *Characterization of nanoencapsulated food ingredients*, 1-50. Academic press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815667-4.00001-8>.
- Azizi, S., Mohamad, R., Rahim, R. A., Mohammadinejad, R., & Ariff, A. B. (2017). Hydrogel beads bio-nanocomposite based on Kappa-Carrageenan and green synthesized silver nanoparticles for biomedical applications. *International journal of biological macromolecules*, 104, 423-431. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.010>.
- Bai, L., Fu, Y., Zhao, S., & Cheng, Y. (2016). Droplet formation in a microfluidic T-junction involving highly viscous fluid systems. *Chemical Engineering Science*, 145, 141-148. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2016.02.013>.
- Bailey, R. L., West Jr, K. P., & Black, R. E. (2015). The epidemiology of global micronutrient deficiencies. *Annals of nutrition and metabolism*, 66 (Suppl. 2), 22-33. <https://doi.org/10.1159/000371618>.
- Balde, A., Kim, S. K., Benjakul, S., & Nazeer, R. A. (2022). Pulmonary drug delivery applications of natural polysaccharide polymer derived nano/micro-carrier systems: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 220, 1464-1479. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.09.116>.
- Bale, S., Khurana, A., Reddy, A. S. S., Singh, M., & Godugu, C. (2016). Overview on therapeutic applications of microparticulate drug delivery systems. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 33(4), 309-361. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016015798>.
- Bamidele, O. P., & Emmambux, M. N. (2020). Encapsulation of bioactive compounds by “extrusion” technologies: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(18), 3100-3118. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1793724>.

- Bamshad, A., Nikfarjam, A., & Khaleghi, H. (2016). A new simple and fast thermally-solvent assisted method to bond PMMA–PMMA in micro-fluidics devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 26(6), 065017. <http://iopscience.iop.org/0960-1317/26/6/065017>.
- Banerjee, A., Verma, P. R. P., & Gore, S. (2015). Controlled porosity solubility modulated osmotic pump tablets of Gliclazide. *AAPS PharmSciTech*, 16, 554-568. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0246-0>.
- Barberis, I., Bragazzi, N. L., Galluzzo, L., & Martini, M. (2017). The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 58(1), 9-12. <https://doi.org/10.15167/2421-4248/JPMH2017.58.1.728>.
- Barnes, H. A., Hutton, J. F., & Walters, K. (1989). An introduction to rheology, vol. 3 Amsterdam. The Netherlands: Elsevier Science BV. Elsevier. ISBN 0-444-87140-3.
- Barocio, M. E., Hidalgo-Vázquez, E., Kim, Y., Rodas-Zuluaga, L. I., Chen, W. N., Barceló, D., Iqbal, H.N.M., Parra-Saldivar, R. & Castillo-Zacarias, C. (2021). Portable microfluidic devices for in-field detection of pharmaceutical residues in water: Recent outcomes and current technological situation–A short review. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 3, 100069. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2020.100069>.
- Baroud, C. N., Gallaire, F., & Dangla, R. (2010). Dynamics of microfluidic droplets. *Lab on a Chip*, 10(16), 2032-2045. <https://doi.org/10.1039/C001191F>.
- Bassijeh, A., Ansari, S., & Hosseini, S. M. H. (2020). Astaxanthin encapsulation in multilayer emulsions stabilized by complex coacervates of whey protein isolate and Persian gum and its use as a natural colorant in a model beverage. *Food Research International*, 137, 109689. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109689>.
- Becker, H., & Gärtner, C. (2000). Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 21(1), 12-26. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000101\)21:1<12::AID-ELPS12>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<12::AID-ELPS12>3.0.CO;2-7).
- Belitz, H.-D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2009). Eggs. In: Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (Eds.), *Food Chemistry*, fourth ed. Springer, 546–562. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7_12.

- Benton, M., Hossan, M. R., Konari, P. R., & Gamagedara, S. (2019). Effect of process parameters and material properties on laser micromachining of microchannels. *Micromachines*, *10*(2), 123. <https://doi.org/10.3390/mi10020123>.
- Benson, A. E., Shatzel, J. J., Ryan, K. S., Hedges, M. A., Martens, K., Aslan, J. E., & Lo, J. O. (2022). The incidence, complications, and treatment of iron deficiency in pregnancy. *European Journal of Haematology*, *109*(6), 633-642. <https://doi.org/10.1111/ejh.13870>.
- Berchane, N. S., Carson, K. H., Rice-Ficht, A. C., & Andrews, M. J. (2007). Effect of mean diameter and polydispersity of PLG microspheres on drug release: Experiment and theory. *International Journal of Pharmaceutics*, *337*(1-2), 118-126. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.12.037>.
- Bernard, A., Renault, J. P., Michel, B., Bosshard, H. R., & Delamarche, E. (2000). Microcontact printing of proteins. *Advanced Materials*, *12*(14), 1067-1070. [https://doi.org/10.1002/1521-4095\(200007\)12:14<1067:AID-ADMA1067>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4095(200007)12:14<1067:AID-ADMA1067>3.0.CO;2-M)
- Berthier, J., & Brakke, K. A. (2012). *The physics of microdroplets*. Salem, Massachusetts: John Wiley & Sons.
- Birnbaum, D. T., & Brannon-Peppas, L. (2004). Microparticle drug delivery systems. In *Drug delivery systems in cancer therapy*, *133*, 117-135. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-427-6_6.
- Booth, I. R., & Stratford, M. (2003). Acidulants and low pH. In: Russell, N.J., Gould, G.W. (eds) *Food Preservatives*. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9_3
- Booth, I. R. (2007, September). The regulation of intracellular pH in bacteria. In *Novartis Foundation Symposium 221-Bacterial Responses to pH: Bacterial Responses to pH: Novartis Foundation Symposium 221*, 19-37. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470515631.ch3>.
- Boruah, N., & Dimitrakopoulos, P. (2015). Motion and deformation of a droplet in a microfluidic cross-junction. *Journal of colloid and interface science*, *453*, 216-225. <http://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.04.067>.
- Bosma, R., Devasagayam, J., Singh, A., & Collier, C. M. (2020). Microchip capillary electrophoresis dairy device using fluorescence spectroscopy for detection of ciprofloxacin in milk samples. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70566-1>.

- Boswell, B., Islam, M. N., & Davies, I. J. (2018). A review of micro-mechanical cutting. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 94, 789-806. <https://doi.org/10.1007/s00170-017-0912-y>.
- Bovšková, H., & Míková, K. (2011). Factors influencing egg white foam quality. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(4), 322-327. <https://doi.org/10.17221/435/2010-cjfs>.
- Brecher, C., Baum, C., & Bastuck, T. (2015). Comparison of roll-to-roll replication approaches for microfluidic and optical functions in lab-on-a-chip diagnostic devices. In *Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XIII*, 9320, 36-42. SPIE. <https://doi.org/10.1117/12.2077592>.
- Brennan, P. J., Young, D. B., Robertson, B. D., Andersen, P., Barry III, C. E., & Britton, W. (2008). Handbook of anti-tuberculosis agents. *Tuberculosis*, 88(2), 85-170.
- Brignone, S. G., Ravetti, S., & Palma, S. D. (2020). Microencapsulación/recubrimiento de sistemas particulados de uso farmacéutico. *Pharmaceutical Technology Sudamérica*; 165 (6) 34-43. CONICET_Digital_Nro.37fee469-d7f5-4a56-8806-c64a1524d42d_A.pdf.
- Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., & Khan, W. (2017). Liposomal formulations in clinical use: an updated review. *Pharmaceutics*, 9 (2), 12. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>.
- Burghelea, T., Segre, E., Bar-Joseph, I., Groisman, A., & Steinberg, V. (2004). Chaotic flow and efficient mixing in a microchannel with a polymer solution. *Physical Review E*, 69 (6), 066305. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.69.066305>.
- Bustillo, J. M., Howe, R. T., & Muller, R. S. (1998). Surface micromachining for microelectromechanical systems. *Proceedings of the IEEE*, 86(8), 1552-1574. <https://doi.org/10.1109/5.704260>.
- Busatto, C., Pessoa, J., Helbling, I., Luna, J., & Estenoz, D. (2018). Effect of particle size, polydispersity and polymer degradation on progesterone release from PLGA microparticles: Experimental and mathematical modeling. *International journal of pharmaceutics*, 536(1), 360-369. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.12.006>.
- Buzala, M., Slomka, A., & Janicki, B. (2016). Heme iron in meat as the main source of iron in the human diet. *Journal of Elementology*, 21(1), 303-314. <https://doi.org/10.5601/jelem.2015.20.1.850>.
- Caetano, F. R., Carneiro, E. A., Agustini, D., Figueiredo-Filho, L. C. S., Banks, C. E., Bergamini, M. F., & Marcolino-Junior, L. H. (2018). Combination of electrochemical biosensor and textile threads: A microfluidic device for phenol determination in tap water. *Biosensors and Bioelectronics*, 99, 382-388. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.07.070>.

- Campaña, A. L., Florez, S. L., Noguera, M. J., Fuentes, O. P., Ruiz Puentes, P., Cruz, J. C., & Osma, J. F. (2019). Enzyme-based electrochemical biosensors for microfluidic platforms to detect pharmaceutical residues in wastewater. *Biosensors*, 9(1), 41. <https://doi.org/10.3390/bios9010041>.
- Campbell, L., Raikos, V. & Euston, S. R. (2003). *Modification of functional properties of egg-white proteins. Nahrung/Food*, 47(6), 369–376. <https://doi.org/10.1002/food.200390084>.
- Campo, V. L., Kawano, D. F. Da Silva Jr., D.B. & Carvalho, I. (2009) Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis-A review. *Carbohydrate polymers*, 77(2), 167-180. <http://doi:10.1016/j.carbpol.2009.01.020>.
- Capretto, L., Cheng, W., Hill, M., Zhang, X. (2011). Micromixing Within Microfluidic Devices. In: Lin, B. (eds) *Microfluidics. Topics in Current Chemistry*, 304, 27-68. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/128_2011_150.
- Caramia, G., Gori, A., Valli, E., & Cerretani, L. (2012). Virgin olive oil in preventive medicine: From legend to epigenetics. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(4), 375-388. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100164>.
- Cardona, P. J. (2009). A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection*, 37, 80-86. <http://doi.org/10.1007/s15010-008-8087-y>.
- Cardona, P.J. (2017). What we have learned and what we have missed in tuberculosis pathophysiology for a new vaccine design: Searching for the “Pink Swan”. *FrontImmunol*, 8:556. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.00556>.
- Cardona, P.J. (2018). *Patogénesis de la tuberculosis y otras micobacteriosis. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 36(1), 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.10.015>.
- Catarino, S., Lima, R., & Minas, G. (2017). Smart devices: Lab-on-a-chip. In *Bioinspired Materials for Medical Applications*, 331-369. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100741-9.00012-7>.
- Chaiyasit, W., Elias, R. J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2007). *Role of Physical Structures in Bulk Oils on Lipid Oxidation. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3), 299–317. <https://doi.org/10.1080/10408390600754248>
- Chambers, J. R., Zaheer, K., Akhtar, H., & Abdel-Aal, E.S.M. (2017). Chicken Eggs. *Egg Innovations and Strategies for Improvements*, 1-9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800879-9.00001-9>.

- Chang, C., Meikle, T. G., Su, Y., Wang, X., Dekiwadia, C., Drummond, C. J., Conn, C.E. & Yang, Y. (2019). Encapsulation in egg white protein nanoparticles protects antioxidant activity of curcumin. *Food chemistry*, 280, 65-72. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.124>.
- Chang, Y., Wei, J., & Lee, C. (2020). Metamaterials—from fundamentals and MEMS tuning mechanisms to applications. *Nanophotonics*, 9(10), 3049-3070. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2020-0045>.
- Choi, A., Seo, K. D., Kim, B. C., & Kim, D. S. (2017). Recent advances in engineering microparticles and their nascent utilization in biomedical delivery and diagnostic applications. *Lab on a Chip*, 17(4), 591-613. <http://doi.org/10.1039/c6lc01023g>.
- Choudhury, I. A., & Shirley, S. (2010). Laser cutting of polymeric materials: An experimental investigation. *Optics & Laser Technology*, 42(3), 503-508. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2009.09.006>.
- Christanti, Y., & Walker, L. M. (2001). Surface tension driven jet break up of strain-hardening polymer solutions. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, 100(1-3), 9-26. [https://doi.org/10.1016/S0377-0257\(01\)00135-5](https://doi.org/10.1016/S0377-0257(01)00135-5).
- Christanti, Y., & Walker, L. M. (2002). Effect of fluid relaxation time of dilute polymer solutions on jet breakup due to a forced disturbance. *Journal of Rheology*, 46(3), 733-748. <https://doi.org/10.1122/1.1463418>.
- Christopher, G. F., & Anna, S. L. (2007). Microfluidic methods for generating continuous droplet streams. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40(19), R319. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/40/19/R01>.
- Churio, O., Pizarro, F., & Valenzuela, C. (2018). Preparation and characterization of iron-alginate beads with some types of iron used in supplementation and fortification strategies. *Food Hydrocolloids*, 74, 1-10. <http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.07.020>.
- Convery, N., & Gadegaard, N. (2019). 30 years of microfluidics. *Micro and Nano Engineering*, 2, 76-91. <https://doi.org/10.1016/j.mne.2019.01.003>.
- Cooper, C. L., Dubin, P. L., Kayitmazer, A. B., & Turksen, S. (2005). Polyelectrolyte–protein complexes. *Current opinion in colloid & interface science*, 10(1-2), 52-78. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.05.007>.
- Cooper, R. C., & Yang, H. (2019). Hydrogel-based ocular drug delivery systems: Emerging fabrication strategies, applications, and bench-to-bedside manufacturing considerations. *Journal of Controlled Release*, 306, 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.05.034>.

- Crichton, R.R. (1990). Proteins of Iron Storage and Transport. In *Advances in Protein Chemistry*; Anfinsen, C.B., Edsall, J.T., Richards, F.M., Eisenberg, D.S., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 40, 281-363 [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60288-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60288-0).
- Carpenter, C. E., & Mahoney, A. W. (1992). *Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 31(4), 333-367. <https://doi.org/10.1080/10408399209527576>.
- Colombo, P., Bettini, R., Santi, P., & Peppas, N. A. (2000). Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. *Pharmaceutical science & technology today*, 3(6), 198-204. [https://doi.org/10.1016/S1461-5347\(00\)00269-8](https://doi.org/10.1016/S1461-5347(00)00269-8).
- Culeddu, G., Su, L., Cheng, Y., Pereira, D. I., Payne, R. A., Powell, J. J., & Hughes, D. A. (2022). Novel oral iron therapy for iron deficiency anaemia: ¿How to value safety in a new drug? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 88(3), 1347-1357. <https://doi.org/10.1111/bcp.15078>.
- Da Silva, P. T., Fries, L. L. M., Menezes, C. R. de, Holkem, A. T., Schwan, C. L., Wigmann, É. F., Oliveira Bastos, J Silva, C. de B. da. (2014). *Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. Ciência Rural*, 44(7), 1304-1311. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130971>.
- Damodaran, S. (2005). Protein stabilization of emulsions and foams. *Journal of food science*, 70(3), 54-66 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07150.x>.
- Davidov-Pardo, G., Joye, I. J., & McClements, D. J. (2015). Food-grade protein-based nanoparticles and microparticles for bioactive delivery: fabrication, characterization, and utilization. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 98, 293-325. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.11.004>.
- De Kruijff, C. G., Weinbreck, F., & de Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current opinion in colloid & interface science*, 9(5), 340-349. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.09.006>.
- De Menech, M., Garstecki, P., Jousse, F., & Stone, H. A. (2008). Transition from squeezing to dripping in a microfluidic T-shaped junction. *Journal of fluid mechanics*, 595, 141-161. <https://doi.org/10.1017/S002211200700910X>.
- De Souza Simões, L., Madalena, D. A., Pinheiro, A. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Ramos, Ó. L. (2017). Micro-and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. *Advances in Colloid and Interface Science*, 243, 23-45. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.02.010>.

- Demello, A. J. (2006). Control and detection of chemical reactions in microfluidic systems. *Nature*, *442*(7101), 394-402. <https://doi.org/10.1038/nature05062>.
- Derkus, B. (2016). Applying the miniaturization technologies for biosensor design. *Biosensors and Bioelectronics*, *79*, 901-913. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.033>.
- Desai, K. G. H., & Park, H. J. (2005). Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, *22*(2), 179-192. <https://doi.org/10.1080/02652040400026533>.
- Devi, N., Sarmah, M., Khatun, B., & Maji, T. K. (2017). Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates. *Advances in colloid and interface science*, *239*, 136-145. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.05.009>.
- Dietzel, A. (2016). A brief introduction to microfluidics. *Microsystems for Pharmatechnology: Manipulation of Fluids, Particles, Droplets, and Cells*, 1-21. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26920-7_1.
- Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., Mastrocola, D., Sarker, D. K., & Pittia, P. (2010). Surface properties of phenolic compounds and their influence on the dispersion degree and oxidative stability of olive oil O/W emulsions. *Food Hydrocolloids*, *24*(6-7), 652-658. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.03.007>.
- Diniz, L. F., Souza, M. S., Carvalho, P. S., da Silva, C. C. P., D'Vries, R. F., & El-lena, J. (2018). Novel isoniazid cocrystals with aromatic carboxylic acids: Crystal engineering, spectroscopy and thermochemical investigations. *Journal of Molecular Structure*, *1153*, 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.09.115>.
- Domellöf, M., Braegger, C., Campoy, C., Colomb, V., Decsi, T., Fewtrell, M., Hojsak, I., Mihatsch, W., Molgaard, C., Shamir, R., Turck, D. & van Goudoever, J. (2014). Iron requirements of infants and toddlers. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, *58*(1), 119-129. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000206>.
- Donat-Vargas, C., Sandoval-Insausti, H., Peñalvo, J. L., Moreno Iribas, M. C., Amiano, P., Bes-Rastrollo, M., Molina-Montes, E., Moreno-Franco, B., Agudo, A., Mayo, C. L., Laclaustra, M., De La Fuente Arrillaga, C., Chirlaque Lopez, M. D., Sánchez, M-J., Martínez-Gonzalez, M. A., & Pilar, G-C. (2022). Olive oil consumption is associated with a lower risk of cardiovascular disease and stroke. *Clinical Nutrition*, *41*(1), 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.11.002>.

- Donovan, J. W. & Mapes, C. J. (1976). A differential scanning calorimetric study of conversion of ovalbumin to S-ovalbumin in eggs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27(2), 197-204. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740270220>.
- Dos Santos, A. M., Carvalho, S. G., Meneguim, A. B., Sábio, R. M., Gremião, M. P. D., & Chorilli, M. (2021). Oral delivery of micro/nanoparticulate systems based on natural polysaccharides for intestinal diseases therapy: Challenges, advances and future perspectives. *Journal of Controlled Release*, 334, 353-366. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2021.04.026>.
- Dou, M., Sanjay, S. T., Dominguez, D. C., Zhan, S., & Li, X. (2017). A paper/polymer hybrid CD-like microfluidic SpinChip integrated with DNA-functionalized graphene oxide nanosensors for multiplex qLAMP detection. *Chemical communications*, 53(79), 10886-10889. <https://doi.org/10.1039/C7CC03246C>.
- Duarte, A. R. C., Ünal, B., Mano, J. F., Reis, R. L., & Jensen, K. F. (2014). *Microfluidic Production of Perfluorocarbon-Alginate Core-Shell Microparticles for Ultrasound Therapeutic Applications*. *Langmuir*, 30(41), 12391-12399. <https://doi:10.1021/la502822v>.
- Dubey, A. K., & Yadava, V. (2008). Laser beam machining—A review. *International Journal of Machine Tools and Manufacture*, 48(6), 609-628. <https://doi.org/10.1016/j.ijmachtools.2007.10.017>.
- Dudala, S., Rao, L. T., Dubey, S. K., Javed, A., & Goel, S. (2020). Experimental characterization to fabricate CO2 laser ablated PMMA microchannel with homogeneous surface. *Materials Today: Proceedings*, 28, 804-807. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.12.302>.
- Duncanson, W. J., Lin, T., Abate, A. R., Seiffert, S., Shah, R. K., & Weitz, D. A. (2012). Microfluidic synthesis of advanced microparticles for encapsulation and controlled release. *Lab on a Chip*, 12(12), 2135-2145. <https://doi.org/10.1039/C2LC21164E>.
- Hegde, P., Helena Boshoff, H.I.M., Rusman, Y., Aragaw, W.W., Salomon, C.E., Dick, T., Aldrich, C.C. (2021). Reinvestigation of the structure-activity relationships of isoniazid. *Tuberculosis*, 129, 102100. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102100>.
- El-Sherbiny, I. M., El-Baz, N. M., & Yacoub, M. H. (2015). Inhaled nano-and microparticles for drug delivery. *Global Cardiology Science and Practice*, 2015(1), 2. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2015.2>.
- Ellis, A. & Jacquier, J. C. (2009). Manufacture of food grade κ-carrageenan microspheres. *Journal of food engineering*, 94(3-4), 316-320. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.03.030>.

- Elvira, K. S., Gielen, F., Tsai, S. S., & Nightingale, A. M. (2022). Materials and methods for droplet microfluidic device fabrication. *Lab on a Chip*, *22*(5), 859-875. <https://doi.org/10.1039/D1LC00836F>.
- Eratte, D., McKnight, S., Gengenbach, T. R., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. P. (2015). Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. *Journal of Functional Foods*, *19*, 882-892. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.037>.
- Ernsting, M. J., Murakami, M., Roy, A., & Li, S. D. (2013). Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. *Journal of controlled release*, *172*(3), 782-794. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.013>.
- Erwanto, Y. & Sukarno, A. S. (2023). Characteristics of protein and amino acid in various poultry egg white ovomucoid. *Food Science and Technology*, *43*, 1-10. <https://doi.org/10.1590/fst.101722>.
- Escombe, A. R., Oeser, C., Gilman, R. H., Navincopa, M., Ticona, E., Martínez, C., Caviedes, L., Sheen, P., Gonzalez, A., Noakes, C., Moore, D.A.J., Friedland, J.S. & Evans, C. A. (2007). The detection of airborne transmission of tuberculosis from HIV-infected patients, using an in vivo air sampling model. *Clinical Infectious Diseases*, *44*(10), 1349-1357. <http://doi.org/10.1086/515397>.
- Evans, M., Ratcliffe, I., & Williams, P. A. (2013). Emulsion stabilisation using polysaccharide–protein complexes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *18*(4), 272-282. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.04.004>.
- Farjami, T. & Madadlou, A. (2017). Fabrication methods of biopolymeric microgels and microgel-based hydrogels. *Food Hydrocolloids*, *62*, 262-272. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.017>.
- Fathi, M., Martín, A., & McClements, D. J. (2014). Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, *39* (1), 18-39. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.06.007>.
- Favaro-Trindade, C. S., de Matos Junior, F. E., Okuro, P. K., Dias-Ferreira, J., Cano, A., Severino, P., Zielińska, A. & Souto, E. B. (2021). Encapsulation of active pharmaceutical ingredients in lipid micro/nanoparticles for oral administration by spray-cooling. *Pharmaceutics*, *13*(8), 1186. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081186>.
- Frediansyah, A. (2021). The antiviral activity of iota-, kappa-, and lambda-carrageenan against COVID-19: A critical review. *Clinical Epidemiology and Global Health*, *12*, 100826. <https://doi.org/10.1016/j.cegh.2021.100826>.

- Fu, T., Wei, L., Zhu, C., & Ma, Y. (2015). Flow patterns of liquid–liquid two-phase flow in non-Newtonian fluids in rectangular microchannels. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 91, 114-120. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2015.03.020>.
- Fujita, H., Sasaki, R., & Yoshikawa, M. (1995). Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg phosphatidylcholine. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 59(12), 2344-2345. <https://doi.org/10.1271/bbb.59.2344>.
- Fuqua, B. K., Vulpe, C. D., & Anderson, G. J. (2012). Intestinal iron absorption. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26(2-3), 115-119. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2012.03.015>.
- Gaber, M., Mabrouk, M. T., Freag, M. S., Khiste, S. K., Fang, J. Y., Elkhodairy, K. A., & Elzoghby, A. O. (2018). Protein-polysaccharide nanohybrids: Hybridization techniques and drug delivery applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 133, 42-62. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.10.001>.
- Gale, B. K., Jafek, A. R., Lambert, C. J., Goenner, B. L., Moghimifam, H., Nze, U. C., & Kamarapu, S. K. (2018). A review of current methods in microfluidic device fabrication and future commercialization prospects. *Inventions*, 3(3), 60. <https://doi.org/10.3390/inventions3030060>.
- Galicia, L., Grajeda, R., & de Romaña, D. L. (2016). Nutrition situation in Latin America and the Caribbean: current scenario, past trends, and data gaps. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 40(2), 104-113. ISSN 1680-5348.
- Gallagher, J. T., & Corfield, A. P. (1978). Mucin-type glycoproteins—new perspectives on their structure and synthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 3(1), 38-41. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(78\)93387-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(78)93387-X).
- Ganz, T., & Nemeth, E. (2012). Iron metabolism: interactions with normal and disordered erythropoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(5), a011668. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011668>.
- Garibaldi, J. A. (1960). Factors in egg white which control growth of bacteria. *Journal of Food Science*, 25(3), 337-344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1960.tb00339.x>.
- Garstecki, P., Fuerstman, M. J., Stone, H. A., & Whitesides, G. M. (2006). Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction—scaling and mechanism of break-up. *Lab on a Chip*, 6(3), 437-446. <https://doi.org/10.1039/B510841A>.

- Gavahian, M., Khaneghah, A. M., Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Garcia-Mantrana, I., Collado, M. C., Meléndez-Martínez, J. C. & Barba, F. J. (2019). Health benefits of olive oil and its components: Impacts on gut microbiota antioxidant activities, and prevention of noncommunicable diseases. *Trends in food science & technology*, *88*, 220-227. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.008>.
- Geczy, R. (2020). Design and fabrication of solvent compatible polymer microfluidic chips and its application to particle production and drug delivery. Tesis doctoral para optar al título de DOCTOR OF PHILOSOPHY in THE FACULTY OF GRADUATE AND POSTDOCTORAL STUDIES (Pharmaceutical Sciences), UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (Vancouver, Canadá).
- Geng, F., Wang, J., Liu, D., Jin, Y., & Ma, M. (2017). Identification of N-glycosites in chicken egg white proteins using an omics strategy. *Journal of agricultural and food chemistry*, *65*(26), 5357-5364. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01706>.
- Geng, Z. C., Zhou, Z. F., Dai, H., & Huang, Q. A. (2020). A 2d waveguide method for lithography simulation of thick SU-8 photoresist. *Micromachines*, *11*(11), 972. <https://doi.org/10.3390/mi11110972>.
- Genicot, S., Préchoux, A., Correc, G., Kervarec, N., Simon, G., & Craigie, J. S. (2018). Carrageenans: new tools for new applications. *Blue Biotechnology: Production and Use of Marine Molecules*, *1*, 371-416. <https://doi.org/10.1002/9783527801718.ch12>.
- Gentile, L. (2020). Protein-polysaccharide interactions and aggregates in food formulations. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *48*, 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2020.03.002>.
- Ghasemi, S., Jafari, S. M., Assadpour, E., & Khomeiri, M. (2017). Production of pectin-whey protein nano-complexes as carriers of orange peel oil. *Carbohydrate Polymers*, *177*, 369-377. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.009>.
- Gkionis, L., Aojula, H., Harris, L. K., & Tirella, A. (2021). Microfluidic-assisted fabrication of phosphatidylcholine-based liposomes for controlled drug delivery of chemotherapeutics. *International journal of pharmaceutics*, *604*, 120711. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120711>.
- Gouda, R., Baishya, H., & Qing, Z. (2017). Application of mathematical models in drug release kinetics of carbidopa and levodopa ER tablets. *Journal of Developing Drugs*, *6*, 1000171. <https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000171>.
- Graber, N., Lüdi, H., & Widmer, H. M. (1990). The use of chemical sensors in industry. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *1*(1-6), 239-243. [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(90\)80208-H](https://doi.org/10.1016/0925-4005(90)80208-H).

- Grenha, A., Alves, A. D., Guerreiro, F., Pinho, J., Simões, S., Almeida, A. J., & Gaspar, M. M. (2020). Inhalable locust bean gum microparticles co-associating isoniazid and rifabutin: Therapeutic assessment in a murine model of tuberculosis infection. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 147, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.11.009>.
- Groneberg, D. A., Witt, C., Wagner, U., Chung, K. F., & Fischer, A. (2003). Fundamentals of pulmonary drug delivery. *Respiratory medicine*, 97(4), 382-387. <https://doi.org/10.1053/rmed.2002.1457>.
- Günther, A., & Jensen, K. F. (2006). Multiphase microfluidics: from flow characteristics to chemical and materials synthesis. *Lab on a Chip*, 6(12), 1487-1503. <https://doi.org/10.1039/B609851G>.
- Günther, K. (2023). Systemic Iron Homeostasis. In *Diet for Iron Deficiency: Metabolism-Bioavailability-Diagnostics* (pp. 29-40). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-65608-2_3.
- Gürsoy, A., Kut, E., & Özkırmı, S. (2004). Co-encapsulation of isoniazid and rifampicin in liposomes and characterization of liposomes by derivative spectroscopy. *International journal of pharmaceutics*, 271(1-2), 115-123. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.10.033>.
- Haag, R., & Kratz, F. (2006). Polymer therapeutics: concepts and applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(8), 1198-1215. <https://doi.org/10.1002/anie.200502113>.
- Haeberle, S., & Zengerle, R. (2007). Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications. *Lab on a Chip*, 7(9), 1094-1110. <https://doi.org/10.1039/B706364B>.
- Hafner, A., Lovrić, J., Lakoš, G. P., & Pepić, I. (2014). Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. *International journal of nanomedicine*, 9, 1005. <https://doi.org/10.2147/IJN.S55359>.
- Hamadi, D., Garnier, B., Willaime, H., Monti, F., & Peerhossaini, H. (2012). A novel thin-film temperature and heat-flux microsensor for heat transfer measurements in microchannels. *Lab on a Chip*, 12(3), 652-658. <https://doi.org/10.1039/C2LC20919E>.
- Hammershøj, M., Larsen, L. B., Andersen, A. B., & Qvist, K. B. (2002). Storage of shell eggs influences the albumen gelling properties. *LWT-Food Science and Technology*, 35(1), 62-69. <https://doi.org/10.1006/fstl.2001.0811>.
- Han, W., & Chen, X. (2021). A review on microdroplet generation in microfluidics. *Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences and Engineering*, 43(5), 247. <https://doi.org/10.1007/s40430-021-02971-0>.

- Han, X., Liu, Y., Yin, J., Yue, M., & Mu, Y. (2021). Microfluidic devices for multiplexed detection of foodborne pathogens. *Food Research International*, *143*, 110246. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110246>.
- He, W., Xiao, N., Zhao, Y., Yao, Y., Xu, M., Du, H., Wu, N., & Tu, Y. (2021). Effect of polysaccharides on the functional properties of egg white protein: A review. *Journal of Food Science*, *86*(3), 656-666. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15651>.
- Hegde, P., Helena Boshoff, H.I.M., Rusman, Y., Aragaw, W.W., Salomon, C.E., Dick, T., Aldrich, C.C. (2021). Reinvestigation of the structure-activity relationships of isoniazid. *Tuberculosis*, *129*, 102100. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2021.102100>.
- Hiidenhovi, J., Ek-Kommonen, C., Järvenpää, E., Huopalahti, R., & Ryhänen, E. L. (2016). Characterization of crude ovomucins obtained from various egg white layers. *European Food Research and Technology*, *242*(2), 233-246. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2535-6>.
- Higuchi, T. (1963). Mechanism of sustained action medication theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *52*, 1145-1149. <https://doi.org/10.1002/jps.2600521210>.
- Hoffman, J. (2015). The effect of recoil pressure in the ablation of polycrystalline graphite by a nanosecond laser pulse. *Journal of Physics D: Applied Physics*, *48*(23), 235201. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/48/23/235201>.
- Hong, J., Kim, S. K., & Cho, Y. H. (2020). Flow and solidification of semi-crystalline polymer during micro-injection molding. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, *153*, 119576. <https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2020.119576>.
- Hong, T. F., Ju, W. J., Wu, M. C., Tai, C. H., Tsai, C. H., & Fu, L. M. (2010). Rapid prototyping of PMMA microfluidic chips utilizing a CO₂ laser. *Microfluidics and nanofluidics*, *9*(6), 1125-1133. <https://doi.org/10.1007/s10404-010-0633-0>.
- Hossain, F., Follett, P., Vu, K. D., Salmieri, S., Frascini, C., Jamshidian, M., et al. (2019). Antifungal activity of combined treatments of active methylcellulose-based films containing encapsulated nanoemulsion of essential oils and γ -irradiation: In vitro and in situ evaluations. *Cellulose*, *26*(2), 1335-1354. <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2135-2>.
- Hou, X., Zhang, Y.S., Trujillo-de Santiago, G., Alvarez, M.M., Ribas, J., Jonas, S.J., Weiss P. S., Andrews, A.M., Aizenberg, J., Khademhosseini, A. (2017). Interplay between materials and microfluidics. *Nature Reviews Materials*, *2* (5), 17016. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2017.16>.

- Huang, K. S., Lai, T. H., & Lin, Y. C. (2006). Manipulating the generation of Ca-alginate microspheres using microfluidic channels as a carrier of gold nanoparticles. *Lab on a Chip*, 6(7), 954-957. <https://doi.org/10.1039/b606424h>.
- Huang, M. S., & Lin, C. Y. (2017). A novel clamping force searching method based on sensing tie-bar elongation for injection molding. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 109, 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2017.02.004>.
- Hunter, A. C., Elsom, J., Wibroe, P. P., & Moghimi, S. M. (2012). Polymeric particulate technologies for oral drug delivery and targeting: a pathophysiological perspective. *Maturitas*, 73(1), 5-18. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2012.05.014>.
- Huopalahti, R., Anton, M., López-Fandiño, R., & Schade, R. (Eds.). (2007). *Bioactive egg compounds*, 5, 293-389. Berlin: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-37885-3>.
- Hwang, J., Cho, Y. H., Park, M. S., & Kim, B. H. (2019). Microchannel fabrication on glass materials for microfluidic devices. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 20, 479-495. <https://doi.org/10.1007/s12541-019-00103-2>.
- Iakovlev, A. P., Erofeev, A. S., & Gorelkin, P. V. (2022). Novel Pumping Methods for Microfluidic Devices: A Comprehensive Review. *Biosensors*, 12(11), 956. <https://doi.org/10.3390/bios12110956>.
- Ibrahim, H. R., Matsuzaki, T., & Aoki, T. (2001). Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. *FEBS letters*, 506(1), 27-32. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02872-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02872-1).
- Igbinosa, I., Berube, C., & Lyell, D. J. (2022). Iron deficiency anemia in pregnancy. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 34(2), 69-76. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000772>.
- Ina Hubatsch, I., Ragnarsson, E.G.E., Artursson, P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, 2 (9), 2111- 2119. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.303>.
- Irimia, D., Liu, S. Y., Tharp, W. G., Samadani, A., Toner, M., & Poznansky, M. C. (2006). Microfluidic system for measuring neutrophil migratory responses to fast switches of chemical gradients. *Lab on a Chip*, 6(2), 191-198. <https://doi.org/10.1039/B511877H>.
- ISO 10993-5:2009-Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.

- Itoh, T., Miyazaki, J., Sugawara, H., & Adachi, S. (1987). Studies on the characterization of ovomucin and chalaza of the hen's egg. *Journal of Food Science*, *52*(6), 1518-1521. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb05868.x>.
- Jha, S., K Sharma, P., & Malviya, R. (2016). Liposomal drug delivery system for cancer therapy: Advancement and patents. *Recent patents on drug delivery & formulation*, *10*(3), 177-183. <https://doi.org/10.2174/1872211310666161004155757>.
- Jain, V., Patel, V. B., Singh, B., & Varade, D. (2022). Microfluidic device based molecular self-assembly structures. *Journal of Molecular Liquids*, 119760. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119760>.
- James, M., Revia, R. A., Stephen, Z., & Zhang, M. (2020). Microfluidic synthesis of iron oxide nanoparticles. *Nanomaterials*, *10*(11), 2113. <https://doi.org/10.3390/nano10112113>.
- Jáuregui, A. L., Siller, H. R., Rodríguez, C. A., & Elías-Zúñiga, A. (2010). Evaluation of micromechanical manufacturing processes for microfluidic devices. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, *48*, 963-972. <https://doi.org/10.1007/s00170-009-2326-y>.
- Jensen, M. F., Noerholm, M., Christensen, L. H., & Geschke, O. (2003). Microstructure fabrication with a CO₂ laser system: characterization and fabrication of cavities produced by raster scanning of the laser beam. *Lab on a Chip*, *3*(4), 302-307. <https://doi.org/10.1039/B308153B>.
- Jin, H., Sun, Y., Pan, J., Fang, Y., Jin, Y., & Sheng, L. (2022). Adsorption kinetics of ovalbumin and lysozyme at the air-water interface and foam properties at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, *124*, 107352. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107352>.
- Kakkar, A., Traverso, G., Farokhzad, O. C., Weissleder, R., & Langer, R. (2017). Evolution of macromolecular complexity in drug delivery systems. *Nature Reviews Chemistry*, *1*(8), 0063. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0063>.
- Kalinowski, D. S., & Richardson, D. R. (2005). The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacological reviews*, *57*(4), 547-583. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.2>.
- Kang, H., Loui, C., Clavijo, R. I., Riley, L. W., & Lu, S. (2006). Survival characteristics of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. *Epidemiology & Infection*, *134*(5), 967-976. <https://doi.org/10.1017/S0950268806006054>.
- Kanke, M., Simmons, G. H., Weiss, D. L., Bivins, B. A., & Deluca, P. P. (1980). Clearance of ¹⁴¹Ce-labeled microspheres from blood and distribution in specific organs

- following intravenous and intraarterial administration in beagle dogs. *Journal of pharmaceutical sciences*, 69(7), 755-762. <https://doi.org/10.1002/jps.2600690703>.
- Karewicz, A., Zasada, K., Bielska, D., Douglas, T. E., Jansen, J. A., Leeuwenburgh, S. C. & Nowakowska, M. (2014). Alginate-hydroxypropylcellulose hydrogel microbeads for alkaline phosphatase encapsulation. *Journal of microencapsulation*, 31(1), 68-76. <https://doi.org/10.3109/02652048.2013.805841>.
- Khan, I. U., Serra, C. A., Anton, N., & Vandamme, T. (2013). Microfluidics: a focus on improved cancer targeted drug delivery systems. *Journal of controlled release*, 172(3), 1065-1074. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.07.028>.
- Khatak, S., Mehta, M., Awasthi, R., Paudel, K. R., Singh, S. K., Gulati, M., et al. (2020). Solid lipid nanoparticles containing anti-tubercular drugs attenuate the Mycobacterium marinum infection. *Tuberculosis*, 125, Article 102008. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.102008>.
- Khemakhem, M., Attia, H., & Ayadi, M. A. (2019). The effect of pH, sucrose, salt and hydrocolloid gums on the gelling properties and water holding capacity of egg white gel. *Food Hydrocolloids*, 87, 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.07.041>.
- Kim, J. H., Jeon, T. Y., Choi, T. M., Shim, T. S., Kim, S. H., & Yang, S. M. (2014). Droplet microfluidics for producing functional microparticles. *Langmuir*, 30(6), 1473-1488. <https://doi.org/10.1021/la403220p>.
- Kim, J.H., Moon, S. H., Ahn, D. U., Paik, H. D., & Park, E. (2012). Antioxidant effects of ovotransferrin and its hydrolysates. *Poultry Science*, 91(11), 2747-2754. <https://doi:10.3382/ps.2012-02150>.
- Kirby, A. E., & Wheeler, A. R. (2013). Microfluidic origami: a new device format for in-line reaction monitoring by nanoelectrospray ionization mass spectrometry. *Lab on a Chip*, 13(13), 2533-2540. <https://doi.org/10.1039/C3LC41431K>.
- Kong, T., Wu, J., To, M., Wai Kwok Yeung, K., Cheung Shum, H., & Wang, L. (2012). Droplet based microfluidic fabrication of designer microparticles for encapsulation applications. *Biomicrofluidics*, 6(3), 034104. <https://doi.org/10.1063/1.4738586>.
- Korolnek, T., & Hamza, I. (2014). Like iron in the blood of the people: the requirement for heme trafficking in iron metabolism. *Frontiers in pharmacology*, 5, 126. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00126>.
- Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. (1983). Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International journal of pharmaceuticals*, 15(1), 25-35. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(83\)90064-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(83)90064-9).

- Kotsiri, Z., Vidic, J., & Vantarakis, A. (2022). Applications of biosensors for bacteria and virus detection in food and water—A systematic review. *Journal of environmental sciences*, *111*, 367-379. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.04.009>.
- Kovacs-Nolan, J., Zhang, J. W., Hayakawa, S., & Mine, Y. (2000). Immunochemical and structural analysis of pepsin-digested egg white ovomucoid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(12), 6261-6266. <https://doi.org/10.1021/jf000358e>.
- Kung, C. T., Gao, H., Lee, C. Y., Wang, Y. N., Dong, W., Ko, C. H., Wang, G. & Fu, L. M. (2020). Microfluidic synthesis control technology and its application in drug delivery, bioimaging, biosensing, environmental analysis and cell analysis. *Chemical Engineering Journal*, *399*, 125748. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125748>.
- Labiris, N. R., & Dolovich, M. B. (2003). Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *British journal of clinical pharmacology*, *56*(6), 588-599. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.01892.x>.
- Lake, J. R., Heyde, K. C., & Ruder, W. C. (2017). Low-cost feedback-controlled syringe pressure pumps for microfluidics applications. *PLoS One*, *12*(4), e0175089. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175089>.
- Langer, R. S., & Peppas, N. A. (1981). Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems. *Biomaterials*, *2*(4), 201-214. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(81\)90059-4](https://doi.org/10.1016/0142-9612(81)90059-4).
- Laohasongkram, K., Mahamaktudsanee, T., & Chaiwanichsiri, S. (2011). Microencapsulation of Macadamia oil by spray drying. *Procedia Food Science*, *1*, 1660–1665. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.245>.
- Larsen, D.S. (2019). The Structure and Properties of Eggs. Reference Module in Food Science, Encyclopedia of Food Chemistry, 27-32. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21686-7>
- Larson, L. M., Cyriac, S., Djimeu, E. W., Mbuya, M. N., & Neufeld, L. M. (2021). ¿Can double fortification of salt with iron and iodine reduce anemia, iron deficiency anemia, iron deficiency, iodine deficiency, and functional outcomes? Evidence of efficacy, effectiveness, and safety. *The Journal of nutrition*, *151*(Supplement_1), 15-28. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa192>.
- Lee, H. J., Choi, N., Yoon, E. S., & Cho, I. J. (2018). MEMS devices for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, *128*, 132-147. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.11.003>.

- Lengyel, M., Kállai-Szabó, N., Antal, V., Laki, A. J., & Antal, I. (2019). Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Scientia Pharmaceutica*, 87(3), 20. <https://doi.org/10.3390/scipharm87030020>.
- Lesnierowski, G. & Stangierski, J. (2018). ¿What's new in chicken egg research and technology for human health promotion? - A review. *Trends in food science & technology*, 71, 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.022>.
- Li, L., Ni, R., Shao, Y., & Mao, S. (2014). Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydrate polymers*, 103, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.008>.
- Li, C., Wang, J., Wang, Y., Gao, H., Wei, G., Huang, Y., Haijun, Y., Gan, Y., Wang, Y., Mei, L., Chen, H., Hu, H., Zhang, Z. & Jin, Y. (2019). Recent progress in drug delivery. *Acta pharmaceutica sinica B*, 9(6), 1145-1162. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.08.003>.
- Liga, A., Morton, J. A., & Kersaudy-Kerhoas, M. (2016). Safe and cost-effective rapid-prototyping of multilayer PMMA microfluidic devices. *Microfluidics and Nanofluidics*, 20(12), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10404-016-1823-1>.
- Lim, Y. C., Kouzani, A. Z., Kaynak, A., Dai, X. J., Littlefair, G., & Duan, W. (2015). A protocol for improving fabrication yield of thin SU-8 microcantilevers for use in an aptasensor. *Microsystem technologies*, 21(2), 371-380. <https://doi.org/10.1007/s00542-013-2019-1>.
- Liu, H., Zheng, F., Cao, Q., Ren, B., Zhu, L., Striker, G., & Vlassara, H. (2006). Amelioration of oxidant stress by the defensin lysozyme. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 290(5), 824-832. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00349.2005>.
- Liu, K., Xiang, J., Ai, Z., Zhang, S., Fang, Y., Chen, T., Zhou, Q., Li, S., Wang, S. & Zhang, N. (2017b). PMMA microfluidic chip fabrication using laser ablation and low temperature bonding with OCA film and LOCA. *Microsystem Technologies*, 23(6), 1937-1942. <https://doi.org/10.1007/s00542-016-2924-1>.
- Liu, X., Fang, J., Huang, S., Wu, X., Xie, X., Wang, J., Liu, F., Zhang, M., Peng, Z. & Hu, N. (2021). Tumor-on-a-chip: from bioinspired design to biomedical application. *Microsystems & Nanoengineering*, 7(1), 50. <https://doi.org/10.1038/s41378-021-00277-8>.
- Liu, Y., Huang, Q., Wang, J., Fu, F., Ren, J., & Zhao, Y. (2017). Microfluidic generation of egg-derived protein microcarriers for 3D cell culture and drug delivery. *Science Bulletin*, 62(18), 1283-1290. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2017.09.006>.

- Liu, Y., Oey, I., Bremer, P., Carne, A., & Silcock, P. (2017). Bioactive peptides derived from egg proteins: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-23. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1329704>.
- Liu, H., & Zhang, Y. (2011). Droplet formation in microfluidic cross-junctions. *Physics of Fluids*, 23(8), 082101. <https://doi.org/10.1063/1.3615643>.
- López Martínez, M. (2009). Micronanoherramientas para las ciencias de la vida. Tesis doctoral para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universitat Autònoma de Barcelona.
- Lopretti, M., Barriero, F., Fernandes, I., Damboriarena, A., Ottati, C., & Olivera, A. (2007). Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. *INNOTECH*, (2 ene-dic), 19-23. <https://doi.org/10.26461/02.06>.
- Lupo, B., Maestro, A., Gutiérrez, J. M., & González, C. (2015). Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. *Food Hydrocolloids*, 49, 25-34. <https://doi:10.1016/j.foodhyd.2015.02.023>.
- Luppi, B., Bigucci, F., Cerchiara, T., & Zecchi, V. (2010). Chitosan-based hydrogels for nasal drug delivery: from inserts to nanoparticles. *Expert opinion on drug delivery*, 7(7), 811-828. <https://doi.org/10.1517/17425247.2010.495981>.
- Ma, Y., Thiele, J., Abdelmohsen, L., Xu, J., & Huck, W. T. (2014). Biocompatible macro-initiators controlling radical retention in microfluidic on-chip photo-polymerization of water-in-oil emulsions. *Chemical Communications*, 50(1), 112-114. <https://doi.org/10.1039/C3CC46733C>.
- Ma, N., Zalwango, S., Malone, L. L., Nsereko, M., Wampande, E. M., Thiel, B. A., Okware, B., Igo Jr., R.P., Joloba, M.L., Mupere, E., Mayanja-Kizza, H., Boom, W.H. & Stein, C.M. (2014). Tuberculosis Research Unit (TBRU). Clinical and epidemiological characteristics of individuals resistant to M. tuberculosis infection in a longitudinal TB household contact study in Kampala, Uganda. *BMC infectious diseases*, 14, 1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-352>.
- Maas, L. A., Krishna, M., & Parian, A. M. (2023). Ironing it all out: a comprehensive review of iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease patients. *Digestive diseases and sciences*, 68(2), 357-369. <https://doi.org/10.1007/s10620-022-07599-1>.
- Majhi, M., Nayak, A. K., & Banerjee, A. (2020). Enhanced electro-osmotic flow of power-law fluids in hydrophilic patterned nanochannel. *Journal of Fluids Engineering*, 142(10), 1-9. <https://doi.org/10.1115/1.4047395>.

- Malecha, K., Jasińska, L., Grytsko, A., Drzozga, K., Słobodzian, P., & Cabaj, J. (2019). Monolithic microwave-microfluidic sensors made with low temperature co-fired ceramic (LTCC) technology. *Sensors*, *19*(3), 577. <https://doi.org/10.3390/s19030577>.
- Mammarella, E. J., & Rubiolo, A. C. (2003). Crosslinking kinetics of cation-hydrocolloid gels. *Chemical Engineering Journal*, *94*(1), 73-77. [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(03\)00080-9](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(03)00080-9).
- Manz, A., Graber, N., & Widmer, H. Á. (1990). Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing. *Sensors and actuators B: Chemical*, *1*(1-6), 244-248. [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(90\)80209-1](https://doi.org/10.1016/0925-4005(90)80209-1).
- Mao, L., Pan, Q., Hou, Z., Yuan, F., & Gao, Y. (2018). Development of soy protein isolate-carrageenan conjugates through maillard reaction for the microencapsulation of *Bifidobacterium longum*. *Food Hydrocolloids*, *84*, 489-497. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.037>.
- Marengo, R. C., Mengatto, L. N., Olivares, M. L., & Berli, C. L. (2021). Microfluidics-based encapsulation of isoniazid in egg white/carrageenan microparticles for sustained release. *Food Hydrocolloids for Health*, *1*, 100041. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2021.100041>.
- Marengo, R. C., Olivares, M. L., & Berli, C. L. (2019). Generation of egg white/carrageenan microparticles by droplet-based microfluidics. *Journal of Food Engineering*, *259*, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.04.019>.
- Martin, N., Li, M., & Mann, S. (2016). Selective uptake and refolding of globular proteins in coacervate microdroplets. *Langmuir*, *32*(23), 5881-5889. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01271>.
- Martos, G., Contreras, P., Molina, E., & López-Fandiño, R. (2010). Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. *Journal of Agricultural and food chemistry*, *58*(9), 5640-5648. <https://doi.org/10.1021/jf904538w>.
- Mashaghi, S., Abbaspourrad, A., Weitz, D. A., & van Oijen, A. M. (2016). *Droplet microfluidics: A tool for biology, chemistry and nanotechnology*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *82*, 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.05.019>.
- Matsuda, T., Gu, J., Tsuruta, K. & Nakamura, R. (1985). Immunoreactive glycopeptides separated from peptic hydrolysate of chicken egg white ovomucoid. *Journal of Food Science*, *50*(3), 592-594. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13751.x>.

- Matsumoto, H., Okabe, T., & Taniguchi, J. (2020). Microchannel fabrication via ultraviolet-nanoimprint lithography and electron-beam lithography using an ultraviolet-curable positive-tone electron-beam resist. *Microelectronic Engineering*, 226, 111278. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2020.111278>.
- Mazur, K., Buchner, R., Bonn, M., & Hunger, J. (2014). Hydration of sodium alginate in aqueous solution. *Macromolecules*, 47(2), 771-776. <https://doi.org/10.1021/ma4023873>.
- Mazutis, L., Vasiliauskas, R., & Weitz, D. A. (2015). Microfluidic production of alginate hydrogel particles for antibody encapsulation and release. *Macromolecular bioscience*, 15(12), 1641-1646. <https://doi:10.1002/mabi.201500226>.
- McClements, D. J. (2006). Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. *Biotechnology advances*, 24(6), 621-625. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.07.003>.
- Mega, T. & Hase, S. (1994). Conversion of egg-white lysozyme to a lectin-like protein with agglutinating activity analogous to wheat germ agglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1200(3), 331-333. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(94\)90175-9](https://doi.org/10.1016/0304-4165(94)90175-9).
- Mine, Y. (1995). Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 6(7), 225-232. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)89083-4](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)89083-4).
- Mine, Y. (2002). Recent advances in egg protein functionality in the food system. *World's Poultry Science Journal*, 58(01), 31-39. <https://doi.org/10.1079/wps20020005>.
- Miret, S., Tascioglu, S., van der Burg, M., Frenken, L., & Klaffke, W. (2010). In vitro bioavailability of iron from the heme analogue sodium iron chlorophyllin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(2), 1327-1332. <https://doi.org/10.1021/jf903177q>.
- Mishra, M. K., Dubey, V., Mishra, P. M., & Khan, I. (2019). MEMS technology: A review. *Journal of Engineering Research and Reports*, 4(1), 1-24. <https://doi.org/10.9734/jerr/2019/v4i116891>.
- Mohammadian, M., Waly, M. I., Moghadam, M., Emam-Djomeh, Z., Salami, M., & Mokhtari, H., Tavakoli, S., Safarpour, F., Kharaziha, M., Bakhsheshi-Rad, H. R., Ramakrishna, S., & Berto, F. (2021). Recent advances in chemically-modified and hybrid carrageenan-based platforms for drug delivery, wound healing, and tissue engineering. *Polymers*, 13(11), 1744. <https://doi.org/10.3390/polym13111744>.

- Mondal, B., Pati, S., & Patowari, P. K. (2020). *Fabrication of wavy micromixer using soft lithography technique. Materials Today: Proceedings, 26(2), 1271-1278.* <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.02.254>.
- Moore, G. E. (1965). Gramming more components onto integrated circuits. *Electronics, 38 (8), 114-117.*
- Moosavi-Movahedi, A. A. (2020). Nanostructured food proteins as efficient systems for the encapsulation of bioactive compounds. *Food Science and Human Wellness, 9 (3), 199-213.* <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2020.04.009>.
- Mukhtar, M., Pallagi, E., Csóka, I., Benke, E., Farkas, Á., Zeeshan, M., Kókai, D. & Ambrus, R. (2020). *Aerodynamic properties and in silico deposition of isoniazid loaded chitosan/thiolated chitosan and hyaluronic acid hybrid nanoplex DPLs as a potential TB treatment. International Journal of Biological Macromolecules, 165, 3007-3019.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.19>.
- Muttill, P., Wang, C., & Hickey, A. J. (2009). Inhaled drug delivery for tuberculosis therapy. *Pharmaceutical research, 26, 2401-2416.* <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9957-4>.
- Mushtaq, R. T., Wang, Y., Rehman, M., Khan, A. M., & Mia, M. (2020). State-of-the-art and trends in CO₂ laser cutting of polymeric materials-a review. *Materials, 13(17), 3839.* <https://doi.org/10.3390/ma13173839>.
- Mwila, C., & Walker, R. B. (2020). Improved stability of rifampicin in the presence of gastric-resistant isoniazid microspheres in acidic media. *Pharmaceutics, 12(3), 234.* <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030234>.
- Nagata, K. & Yoshida, N. (1984). Interaction between trypsin-like enzyme from *Streptomyces erythraeus* and chicken ovomucoid. *The Journal of Biochemistry, 96(4), 1041-1049.* <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134921>.
- Nkanga, C. I., Krause, R. W., Noundou, X. S., & Walker, R. B. (2017). *Preparation and characterization of isoniazid-loaded crude soybean lecithin liposomes. International Journal of Pharmaceutics, 526(1-2), 466-473.* <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.04.074>.
- Nanaki, S., Karavas, E., Kalantzi, L., & Bikiaris, D. (2010). Miscibility study of carrageenan blends and evaluation of their effectiveness as sustained release carriers. *Carbohydrate Polymers, 79(4), 1157-1167.* <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.067>.
- Nandi, G., & Sarkar, S. (2023). Plant polysaccharides-based multiple-units for oral drug delivery. In *Plant Polysaccharides as Pharmaceutical Excipients, 171-193.* Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90780-4.00005-X>.

- Necas, J., & Bartosikova, L. (2013). Carrageenan: a review. *Veterinarni medicina*, *58*(4), 187-205. <https://doi.org/10.17221/6758-VETMED>.
- Neves, M. I. L., Strieder, M. M., Prata, A. S., Silva, E. K., & Meireles, M. A. A. (2021). Xylooligosaccharides as an innovative carrier matrix of spray-dried natural blue colorant. *Food Hydrocolloids*, *121*, Article 107017. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107017>.
- Nguyen, N. T., Wereley, S. T., & Shaegh, S. A. M. (2002). *Fundamentals and Applications of Microfluidics* (Norwood, MA: Artech House).
- Niculescu, A. G., Chircov, C., Bîrcă, A. C., & Grumezescu, A. M. (2021). Fabrication and applications of microfluidic devices: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(4), 2011. <https://doi.org/10.3390/ijms22042011>.
- Nielsen, J. B., Hanson, R. L., Almughamsi, H. M., Pang, C., Fish, T. R., & Woolley, A. T. (2019). Microfluidics: innovations in materials and their fabrication and functionalization. *Analytical chemistry*, *92*(1), 150-168. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04986>.
- Nilghaz, A., & Lu, X. (2019). Detection of antibiotic residues in pork using paper-based microfluidic device coupled with filtration and concentration. *Analytica chimica acta*, *1046*, 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.09.041>.
- Nojima, T., & Iyoda, T. (2018). Egg white-based strong hydrogel via ordered protein condensation. *NPG Asia Materials*, *10*(1), 460-460. <https://doi.org/10.1038/am.2017.219>.
- Noore, S., Rastogi, N. K., O'Donnell, C., & Tiwari, B. (2021). *Novel Bioactive Extraction and Nano-Encapsulation*. *Encyclopedia*, *1*(3), 632-664. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1030052>.
- Nussinovitch, A. (1997). *Hydrocolloid applications: gum technology in the food and other industries*, 134-137. London: Blackie Academic & Professional. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6385-3>.
- Nys, Y., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J. M., & Hincke, M. T. (2004). Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *Comptes Rendus Palevol*, *3*(6-7), 549-562. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2004.08.002>.
- Omana, D. A., Wang, J., & Wu, J. (2010). Ovomucin – a glycoprotein with promising potential. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(9), 455-463. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.001>.

- Osherov, N., & Ben-Ami, R. (2016). Modulation of host angiogenesis as a microbial survival strategy and therapeutic target. *PLoS Pathogens*, *12*(4), e1005479. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005479>.
- Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food chemistry*, *272*, 494-506. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.205>.
- Pacheco-Quito, E. M., Ruiz-Caro, R., & Veiga, M. D. (2020). Carrageenan: drug delivery systems and other biomedical applications. *Marine Drugs*, *18*(11), 583. <https://doi.org/10.3390/md18110583>.
- Padan, E., Zilberstein, D., & Rottenberg, H. (1976). The proton electrochemical gradient in *Escherichia coli* cells. *European Journal of Biochemistry*, *63*(2), 533-541. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1976.tb10257.x>.
- Padan, E., Zilberstein, D., & Schuldiner, S. (1981). pH homeostasis in bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, *650*(2-3), 151-166. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(81\)90004-6](https://doi.org/10.1016/0304-4157(81)90004-6).
- Pal, P., & Sato, K. (2009). Various shapes of silicon freestanding microfluidic channels and microstructures in one-step lithography. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, *19*(5), 055003. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/19/5/055003>.
- Pal, P., Mahato, M., Kamilya, T., Tah, B., Sarkar, R., & Talapatra, G. B. (2011). Fibrillation of egg white ovalbumin: a pathway via biomineralization. *The Journal of Physical Chemistry B*, *115*(14), 4259-4265. <https://doi.org/10.1021/jp200607x>.
- Palmiter, R. D., Mulvihill, E. R., McKnight, G. S., & Senechal, A. W. (1978, January). Regulation of gene expression in the chick oviduct by steroid hormones. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *42*, 639-647. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/SQB.1978.042.01.066>.
- Pandey, G., Yadav, S. K., & Mishra, B. (2016). Preparation and characterization of isoniazid and lamivudine co-loaded polymeric microspheres. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, *44*(8), 1867-1877. <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1111229>.
- Papadimitriou, V., Tzika, E. D., Pispas, S., Sotiroudis, T. G., & Xenakis, A. (2011). *Microemulsions based on virgin olive oil: A model biomimetic system for studying native oxidative enzymatic activities*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *382*(1-3), 232-237. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.10.042>.

- Paredes, A., Asensio, C., Llabot, J., Allemandi, D., & Palma, S. (2016). Nanoencapsulation in the food industry: Manufacture, applications and characterization. *Journal of Food Bioengineering and Nanoprocessing*, 1, 56-79. ISSN: 2501 - 2568
- Păvăloiu, R. D., Sha'at, F., Neagu, G., Deaconu, M., Bubueanu, C., Albulescu, A., Sha'at, M. & Hlevca, C. (2021). Encapsulation of polyphenols from *Lycium barbarum* leaves into liposomes as a strategy to improve their delivery. *Nanomaterials*, 11(8), 1938. <https://doi.org/10.3390/nano11081938>.
- Peanparkdee, M., Iwamoto, S., & Yamauchi, R. (2016). *MICROENCAPSULATION: A REVIEW OF APPLICATIONS IN THE FOOD AND PHARMACEUTICAL INDUSTRIES*. *Reviews in Agricultural Science*, 4(0), 56-65. <https://doi.org/10.7831/ras.4.56>.
- Pellegrini, A., Hülsmeier, A. J., Hunziker, P., & Thomas, U. (2004). *Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1672(2), 76-85. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.02.010>.
- Peng, X. F. & Peterson, G. P. (1995). The effect of thermofluid and geometrical parameters on convection of liquids through rectangular microchannels. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 38(4), 755-758. [https://doi.org/10.1016/0017-9310\(95\)93010-F](https://doi.org/10.1016/0017-9310(95)93010-F).
- Peppas, N. A., & Huang, Y. (2004). Nanoscale technology of mucoadhesive interactions. *Advanced drug delivery reviews*, 56(11), 1675-1687. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.03.001>.
- Perozziello, G., Candeloro, P., De Grazia, A., Esposito, F., Allione, M., Coluccio, M. L., Tallerico, R., Valpapuram, I., Tirinato, L., Das, G., Giugni, A., Trre, B., Veltri, P., Kruhne, U., Della Valle, G. & Di Fabrizio, E. (2016). Microfluidic device for continuous single cells analysis via Raman spectroscopy enhanced by integrated plasmonic nanodimers. *Optics Express*, 24(2), 180-190. <https://doi.org/10.1364/OE.24.00A180>.
- Pinto, V., Sousa, P., Cardoso, V., & Minas, G. (2014). Optimized SU-8 processing for low-cost microstructures fabrication without cleanroom facilities, *Micromachines*, 5 (4), 738-755. <https://doi:10.3390/mi5030738>
- Piñón-Balderrama, C. I., Leyva-Porras, C., Terán-Figueroa, Y., Espinosa-Solís, V., Álvarez-Salas, C., & Saavedra-Leos, M. Z. (2020). Encapsulation of active ingredients in food industry by spray-drying and nano spray-drying technologies. *Processes*, 8(8), 889. <https://doi.org/10.3390/PR8080889>.

- Pires, A., Fortuna, A., Alves, G., & Falcão, A. (2009). ¿Intranasal drug delivery: how, why and what for? *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 12(3), 288-311. <https://doi.org/10.18433/J3NC79>.
- Piskin, E., Cianciosi, D., Gulec, S., Tomas, M., & Capanoglu, E. (2022). Iron absorption: factors, limitations, and improvement methods. *ACS omega*, 7(24), 20441-20456. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01833>.
- Polychniatou, V., & Tzia, C. (2016). *Study of the Emulsifying Ability of Olive Oil Endogenous Compounds in Co-surfactant Free Olive Oil w/o Nanoemulsions with Food Grade Non-ionic Surfactants. Food and Bioprocess Technology*, 9(5), 882-891. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1668-8>.
- Portnoy, D. A., Chen, C., & Mitchell, G. (2016). Strategies Used by Bacteria to Grow in Macrophages. *Microbiol Spectr*, 4(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mchd-0012-2015>.
- Pradhan, B., Kumar, N., Saha, S., & Roy, A. (2015). Liposome: method of preparation, advantages, evaluation and its application. *Journal of applied pharmaceutical research*, 3(3), 01-08. <https://japtronline.com/index.php/joapr/article/view/54>.
- Prakash, S. & Kumar, S. (2015). Fabrication of microchannels on transparent PMMA using CO₂ Laser (10.6 μm) for microfluidic applications: An experimental investigation. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing*, 16(2), 361-366. <https://doi.org/10.1007/s12541-015-0047-8>.
- Praveena, S. M., Rashid, M. Z. M., Nasir, F. A. M., Yee, W. S., & Aris, A. Z. (2019). Occurrence and potential human health risk of pharmaceutical residues in drinking water from Putrajaya (Malaysia). *Ecotoxicology and environmental safety*, 180, 549-556. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.051>.
- Presti, D. A., Guarepi, V., Videla, F., & Torchia, G. A. (2020). Design and implementation of an integrated optical coupler by femtosecond laser written-waveguides in LiNbO₃. *Optics and Lasers in Engineering*, 126, 105860. <https://doi.org/10.1016/j.optlaseng.2019.105860>.
- Qin, D., Xia, Y., & Whitesides, G. M. (2010). *Soft lithography for micro- and nanoscale patterning. Nature Protocols*, 5(3), 491-502. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.234>.
- Radhakant, A., Himankar, B. and Zhao, Q. (2017). Application of Mathematical Models in Drug Release Kinetics of Carbidopa and Levodopa ER Tablets. *Journal of Developing Drugs*, 6, 175. <https://doi.org/10.4172/2329-6631.1000171>.
- Raikos, V., Campbell, L., & Euston, S. R. (2007). Rheology and texture of hen's egg protein heat-set gels as affected by pH and the addition of sugar and/or salt. *Food Hydrocolloids*, 21(2), 237-244. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.03.015>.

- Rani, S., Gothwal, A., Khan, I., Pachouri, P. K., Bhaskar, N., Gupta, U. D., et al. (2018). Smartly engineered PEGylated Di-Block nanopolymeric micelles: Duo delivery of isoniazid and rifampicin against mycobacterium tuberculosis. *AAPS PharmSciTech*, 19, 3237-3248. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1151-8>.
- Raman, R. K., Thangavelu, S. A. G., Venkataraj, S., & Krishnamoorthy, A. (2021). Materials, methods and strategies for encapsulation of perovskite solar cells: from past to present. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 151, 111608. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111608>.
- Rapoport, A., & Winner, P. (2006). Nasal delivery of antimigraine drugs: clinical rationale and evidence base. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 46, 192-201. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2006.00603.x>.
- Ravi-Kumar, S., Lies, B., Zhang, X., Lyu, H., & Qin, H. (2019). Laser ablation of polymers: A review. *Polymer International*, 68(8), 1391-1401. <https://doi.org/10.1002/pi.5834>.
- Razi, S. M., Fahim, H., Amirabadi, S., & Rashidinejad, A. (2022). An overview of the functional properties of egg white proteins and their application in the food industry. *Food Hydrocolloids*, 108183. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108183>.
- Reddy, N., Reddy, R., & Jiang, Q. (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in biotechnology*, 33(6), 362-369. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008>.
- Réhault-Godbert, S., Guyot, N. & Nys, Y. (2019). The golden egg: nutritional value, bioactivities, and emerging benefits for human health. *Nutrients*, 11(3), 684. <https://doi.org/10.3390/nu11030684>.
- Ríos, Á., Zougagh, M., & Avila, M. (2012). Miniaturization through lab-on-a-chip: ¿Utopia or reality for routine laboratories? A review. *Analytica chimica acta*, 740, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.06.024>.
- Rodrigue, H., Bhandari, B., Wang, W., & Ahn, S. H. (2015). 3D soft lithography: A fabrication process for thermocurable polymers. *Journal of Materials Processing Technology*, 217, 302-309. <https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2014.11.005>.
- Rodrigues, S., Cunha, L., Rico, J., Rosa da Costa, A. M., Almeida, A. J., Faleiro, M. L., Buttini, F. & Grenha, A. (2020). Carrageenan from red algae: an application in the development of inhalable tuberculosis therapy targeting the macrophages. *Drug Delivery and Translational Research*, 10, 1675-1687. <https://doi.org/10.1007/s13346-020-00799-0>.
- Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., & Barat, J. M. (2018). Use of Nanotechnology as an Antimicrobial Tool in the Food Sector. In *Nanobiotechnology*, 413-452. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351031585>.

- Sackmann, E. K., Fulton, A. L., & Beebe, D. J. (2014). The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature*, *507*(7491), 181-189. <https://doi.org/10.1038/nature13118>.
- Sánchez-Gimeno, A. C., Vercet, A., & López-Buesa, P. (2006). Studies of ovalbumin gelation in the presence of carrageenans and after manothermosonication treatments. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *7*(4), 270-274. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.03.001>.
- Sanjay, S. T., Zhou, W., Dou, M., Tavakoli, H., Ma, L., Xu, F., & Li, X. (2018). Recent advances of controlled drug delivery using microfluidic platforms. *Advanced drug delivery reviews*, *128*, 3-28. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.013>.
- Sankalia, M. G., Mashru, R. C., Sankalia, J. M., & Sutariya, V. B. (2006). Stability improvement of alpha-amylase entrapped in kappa-carrageenan beads: physicochemical characterization and optimization using composite index. *International journal of pharmaceuticals*, *312*(1-2), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.048>.
- Sankar, R., Sharda, N., & Singh, S. (2003). Behavior of decomposition of rifampicin in the presence of isoniazid in the pH range 1-3. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *29*, 733-738. <https://doi.org/10.1081/DDC-120021772>.
- Sartipzadeh, O., Naghib, S. M., Seyfoori, A., Rahmanian, M., & Fateminia, F. S. (2020). Controllable size and form of droplets in microfluidic-assisted devices: Effects of channel geometry and fluid velocity on droplet size. *Materials Science and Engineering: C*, *109*, 110606. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110606>.
- Sato, Y., & Kato, T. (1980). Chemical composition of the chalazae and their deterioration during storage of eggs. *Poultry Science*, *59*(7), 1416-1422. <https://doi.org/10.3382/ps.0591416>.
- Sattari, A., Hanafizadeh, P., & Hoorfar, M. (2020). Multiphase flow in microfluidics: From droplets and bubbles to the encapsulated structures. *Advances in Colloid and Interface Science*, *282*, 102208. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102208>.
- Schiff, H., David, C., Gabriel, M., Gobrecht, J., Heyderman, L. J., Kaiser, W. & Scandella, L. (2000). Nanoreplication in polymers using hot embossing and injection molding. *Microelectronic Engineering*, *53*(1-4), 171-174. [https://doi.org/10.1016/s0167-9317\(00\)00289-6](https://doi.org/10.1016/s0167-9317(00)00289-6).
- Schmitt, C. & Turgeon, S. L. (2011). Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, *167*(1-2), 63-70. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.10.001>.

- Scholten, K., & Meng, E. (2015). Materials for microfabricated implantable devices: a review. *Lab on a Chip*, 15(22), 4256-4272. <http://doi:10.1039/c5lc00809c>.
- Schramm, G. (2000). A Practical Approach to Rheology and Rheometry. (R. Steinbrüggen, Trans.): Gebrueder HAAKE GmbH. *Karlsruhe (RFA)*, 18-21.
- Scott, S. M., & Ali, Z. (2021). Fabrication methods for microfluidic devices: An overview. *Micromachines*, 12(3), 319.
- Seidner, D. L., Schwartz, L. K., Winkler, M. F., Jeejeebhoy, K., Boullata, J. I., & Tappenden, K. A. (2013). Increased Intestinal Absorption in the Era of Teduglutide and Its Impact on Management Strategies in Patients With Short Bowel Syndrome–Associated Intestinal Failure. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 37(2), 201-211. <https://doi.org/10.1177/0148607112472906>.
- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G. O., Oakhill, J. S., Laftah, A. H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F.E., Hider, R.C, Frazer, D.M., Anderson, G.J., Vulpe, C.D., Simpson, R.J., & McKie, A. T. (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, 122(5), 789-801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.025>.
- Semenova, M. (2017). Protein–polysaccharide associative interactions in the design of tailor-made colloidal particles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 28, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.12.003>.
- Sen, M., & Erboz, E. N. (2010). Determination of critical gelation conditions of κ -carrageenan by viscosimetric and FT-IR analyses. *Food Research International*, 43, 1361-1364 (Ottawa, Ont.). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.021>.
- Setiowati, A. D., Wijaya, W., & Van der Meeren, P. (2020). Whey protein-polysaccharide conjugates obtained via dry heat treatment to improve the heat stability of whey protein stabilized emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 150-161. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.011>.
- Seuss-Baum, I. & Nau, F. (2011). The nutritional quality of eggs. In *Improving the safety and quality of eggs and egg products*, 201-236. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857093929.3.201>.
- Shah, R. K., Shum, H. C., Rowat, A. C., Lee, D., Agresti, J. J., Utada, A. S., Yin Chu, L., Woong Kim, J., Fernandez-Nieves, A., Martinez, C.J. & Weitz, D. A. (2008). Designer emulsions using microfluidics. *Materials Today*, 11(4), 18-27. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(08\)70053-1](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(08)70053-1).

- Shan, Y., Tang, D., Wang, R., Tu, A., Yi, Y., Wang, X., Liu, B., Zhou, Y., Huang, Q., Lü, X. (2020). Rheological and structural properties of ovomucin from chicken eggs with different interior quality. *Food Hydrocolloids*, 100, 105393. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105393>.
- Shan, Y., Xu, Q., & Ma, M. (2014). Mg²⁺ binding affects the structure and activity of ovomucin. *International journal of biological macromolecules*, 70, 230-235. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.056>.
- Sheth, U., Tiwari, S., & Bahadur, A. (2018). *Preparation and characterization of anti-tubercular drugs encapsulated in polymer micelles*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 48, 422-428. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.021>.
- Shewan, H. M. & Stokes, J. R. (2013). Review of techniques to manufacture micro-hydrogel particles for the food industry and their applications. *Journal of Food Engineering*, 119(4), 781-792. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.046>.
- Shi, J., Votruba, A. R., Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2010). Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano letters*, 10(9), 3223-3230. <https://doi.org/10.1021/nl102184c>.
- Shi, Q., Wang, A., Lu, Z., Qin, C., Hu, J., & Yin, J. (2017). Overview on the antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides from seaweeds. *Carbohydrate research*, 453, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.10.020>.
- Shinohara, H., Horiuchi, M., Sato, M., Kurisaki, J., Kusakabe, T., Koga, K., Minami, Y., Aoki, T., Kat, I. & Sugimoto, Y. (2007). Transition of ovalbumin to thermostable structure entails conformational changes involving the reactive center loop. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1770(1), 5-11. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.06.019>.
- Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 34-60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.018>.
- Shourabi, A.Y., Kashaninejad, N., Saidi, M.S. (2021). An integrated microfluidic concentration gradient generator for mechanical stimulation and drug delivery. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 6 (2) 280-290. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2021.02.009>.
- Shrimal, P., Jadeja, G., & Patel, S. (2020). A review on novel methodologies for drug nanoparticle preparation: Microfluidic approach. *Chemical Engineering Research and Design*, 153, 728-756. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.11.031>.

- Sing, C. E., & Perry, S. L. (2020). Recent progress in the science of complex coacervation. *Soft Matter*, 16(12), 2885-2914. <https://doi.org/10.1039/D0SM00001A>.
- Singh, H., Bhandari, R., & Kaur, I. P. (2013). Encapsulation of Rifampicin in a solid lipid nanoparticulate system to limit its degradation and interaction with Isoniazid at acidic pH. *International journal of pharmaceutics*, 446(1-2), 106-111. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.012>.
- Singh, S., Mariappan, T. T., Shankar, R., Sarda, N., & Singh, B. (2001). A critical review of the probable reasons for the poor variable bioavailability of rifampicin from anti-tubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solutions to the problem. *International journal of pharmaceutics*, 228(1-2), 5-17. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00754-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00754-2).
- Singh, S., Mariappan, T. T., Sharda, N., Kumar, S., & Chakraborti, A. K. (2000). The reason for an increase in decomposition of rifampicin in the presence of isoniazid under acid conditions. *Pharmacy and Pharmacology Communications*, 6(9), 405-410. <https://doi.org/10.1211/146080800128736277>.
- Singh, S. S., Khare, A., & Joshi, S. N. (2020). Fabrication of microchannel on polycarbonate below the laser ablation threshold by repeated scan via the second harmonic of Q-switched Nd: YAG laser. *Journal of Manufacturing Processes*, 55, 359-372. <https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2020.04.006>.
- Singh, V., Pathak, V., & Akhilesh, K. V. (2012). Modified or enriched eggs: A smart approach in egg industry. *American Journal of Food Technology*, 7(5), 266-277. <https://doi.org/10.3923/ajft.2012.266.277>.
- Siepmann, J., Siegel, R. A., & Rathbone, M. J. (2012). *Fundamentals and applications of controlled release drug delivery*, 3, 33-34. New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0881-9>.
- Skolmowska, D., & Głabska, D. (2019). Analysis of heme and non-heme iron intake and iron dietary sources in adolescent menstruating females in a national polish sample. *Nutrients*, 11(5), 1049. <https://doi.org/10.3390/nu11051049>.
- Slack, J. D., Kanke, M., Simmons, G. H., & Deluca, P. P. (1981). Acute hemodynamic effects and blood pool kinetics of polystyrene microspheres following intravenous administration. *Journal of pharmaceutical sciences*, 70(6), 660-664. <https://doi.org/10.1002/jps.2600700621>.
- Song, W. O. & Kerver, J. M. (2000). Nutritional contribution of eggs to American diets. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(5), 556-562. <https://doi.org/10.1080/07315724.2000.10718980>.

- Souza, C. J., Souza, C. S., Bastos, L. P. H., & Garcia-Rojas, E. E. (2018). Interpolymer complexation of egg white proteins and carrageenan: Phase behavior, thermodynamics and rheological properties. *International journal of biological macromolecules*, *109*, 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.116>.
- Span, K., Verhoef, J. J., Hunt, H., van Nostrum, C. F., Brinks, V., Schellekens, H., & Hennink, W. E. (2016). A novel oral iron-complex formulation: Encapsulation of hemin in polymeric micelles and its in vitro absorption. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *108*, 226-234. <http://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.09.002>.
- Sparks, N. H. C. (2006). The hen's egg—is its role in human nutrition changing? *World's Poultry Science Journal*, *62*(2), 308-315. <https://doi:10.1079/wps200599>.
- Squires, T. M., & Quake, S. R. (2005). Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Reviews of modern physics*, *77*(3), 977. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.77.977>.
- Stanley, N. (2011). FAO Corporate document repository. Chapter 3: Production, properties and uses of carrageenan. FMC Corporation, Marine Colloids Division 5 Maple Street, Rockland Maine 04841, USA.
- Stewart, S. A., Domínguez-Robles, J., Donnelly, R. F., & Larrañeta, E. (2018). Implantable polymeric drug delivery devices: classification, manufacture, materials, and clinical applications. *Polymers*, *10*(12), 1379. <https://doi.org/10.3390/polym10121379>.
- Sticker, D., Geczy, R., Hafeli, U. O., & Kutter, J. P. (2020). Thiol–ene based polymers as versatile materials for microfluidic devices for life sciences applications. *ACS applied materials & interfaces*, *12*(9), 10080-10095. <https://doi.org/10.1021/acsmi.9b22050>.
- Stone, H. A. (2007). Introduction to fluid dynamics for microfluidic flows. In *CMOS biotechnology* (pp. 5-30). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68913-5_2.
- Sun, J., Chang, C., Su, Y., Gu, L., Yang, Y., & Li, J. (2022). Impact of saccharides on the foam properties of egg white: Correlat on between rheological, interfacial properties and foam properties. *Food Hydrocolloids*, *122*, 107088. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107088>.

- Sun, X., Chakrabarti, S., Fang, J., Yin, Y., & Wu, J. (2016). Low-molecular-weight fractions of Alcalase hydrolyzed egg ovomucin extract exert anti-inflammatory activity in human dermal fibroblasts through the inhibition of tumor necrosis factor-mediated nuclear factor κ B pathway. *Nutrition Research*, *36*(7), 648-657. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.03.006>.
- Superti, F., Ammendolia, M. G., Berlutti, F., & Valenti, P. (2007). Ovotransferrin. In *Bioactive egg compounds* (pp. 43-50). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-37885-3_7.
- Tabeling, P. (2005). *Introduction to microfluidics*. Oxford University Press on Demand.
- Tabeling, P. (2014). Recent progress in the physics of microfluidics and related biotechnological applications. *Current opinion in biotechnology*, *25*, 129-134. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.11.009>.
- Tanizaki, H., Tanaka, H., Iwata, H., & Kato, A. (1997). Activation of macrophages by sulfated glycopeptides in ovomucin, yolk membrane, and chalazae in chicken eggs. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, *61*(11), 1883-1889. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.1883>.
- Tabriz, A. G., Nandi, U., Hurt, A. P., Hui, H. W., Karki, S., Gong, Y., Kumar, S. & Douroumis, D. (2021). 3D printed bilayer tablet with dual controlled drug release for tuberculosis treatment. *International journal of pharmaceutics*, *593*, 120147. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.120147>.
- Thiyagarajan, A., Bharti, V. K., Tyagi, S., Tyagi, P. K., Ahuja, A., Kumar, K., et al. (2018). Synthesis of non-toxic, biocompatible, and colloidal stable silver nanoparticle using egg-white protein as capping and reducing agents for sustainable antibacterial application. *RSC Advances*, *8*, 23213–23229. <https://doi.org/10.1039/c8ra03649g>.
- Timilsena, Y. P., Haque, M. A., & Adhikari, B. (2020). Encapsulation in the food industry: A brief historical overview to recent developments. *Food and Nutrition Sciences*, *11*(06), 481-508. <https://doi.org/10.4236/fns.2020.116035>.
- Tolstoguzov, V. B. (1991). Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids*, *4*(6), 429-468. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(09\)80196-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(09)80196-3).
- Tranter, H. S., & Board, R. G. (1984). The influence of incubation temperature and pH on the antimicrobial properties of hen egg albumen. *Journal of Applied Bacteriology*, *56*(1), 53-61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1984.tb04696.x>.

- Trinh, K. T. L., Le, N. X. T., & Lee, N. Y. (2021). Microfluidic-based fabrication of alginate microparticles for protein delivery and its application in the in vitro chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *66*, 102735. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102735>.
- Tu, A., Zhao, X., Shan, Y., & Lü, X. (2020). Potential role of ovomucin and its peptides in modulation of intestinal health: A review. *International journal of biological macromolecules*, *162*, 385-393. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.148>.
- Van De Velde, F., Knutsen, S.H., Usov, A.L., Rollema, H.S. & Cerezo, A.S. (2002a). ¹H and ¹³C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: Application in research and industry. *Trends in Food Science & Technology*, (13) 73-92. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00066-3).
- Van Steenberge, G., Hendrickx, N., Bosman, E., Van Erps, J., Thienpont, H., & Van Daele, P. (2006). Laser ablation of parallel optical interconnect waveguides. *IEEE Photonics Technology Letters*, *18*(9), 1106-1108. <https://doi.org/10.1109/LPT.2006.873357>.
- Waldbaur, A., Rapp, H., Länge, K., & Rapp, B. E. (2011). Let there be chip—towards rapid prototyping of microfluidic devices: one-step manufacturing processes. *Analytical Methods*, *3*(12), 2681-2716. <https://doi.org/10.1039/C1AY05253E>.
- Valenzuela, C., López de Romaña, D., Olivares, M., Morales, M. S., & Pizarro, F. (2009). Total iron and heme iron content and their distribution in beef meat and viscera. *Biological trace element research*, *132*, 103-111. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8400-3>.
- Vatandoust, A., & Diosady, L. (2022). Iron compounds and their organoleptic properties in salt fortification with iron and iodine: an overview. *Current Opinion in Food Science*, *43*, 232-236. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.12.007>.
- Villarroel, P., Flores, S., Pizarro, F., de Romana, D. L., & Arredondo, M. (2011). Effect of dietary protein on heme iron uptake by Caco-2 cells. *European journal of nutrition*, *50*, 637-643. <https://doi.org/10.1007/s00394-011-0173-8>.
- Von Burkersroda, F., Schedl, L., & Göpferich, A. (2002). Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials*, *23*(21), 4221-4231. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00170-9](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00170-9).
- Walt, D. R. (2005). Miniature analytical methods for medical diagnostics. *Science*, *308*(5719), 217-219. <https://doi.org/10.1126/science.110816>.
- Wan, Y., Lu, J., & Cui, Z. (2006). Separation of lysozyme from chicken egg white using ultrafiltration. *Separation and Purification technology*, *48*(2), 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.003>.

- Wang, C., Liu, M., Wang, Z., Li, S., Deng, Y., & He, N. (2021). Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices. *Nano Today*, 37, 101092. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101092>.
- Wang, L., Wang, X., Wu, H., & Liu, R. (2014). Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. *Marine Drugs*, 12(9), 4984-5020. <https://doi.org/10.3390/md12094984>.
- Wang, R., & Zhi, Y. (2022). Association between olive oil consumption and the risk of cardiovascular disease and stroke. *Clinical Nutrition*, 41(3), 782-783. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2022.01.014>.
- Wang, W., Mei, X., Jiang, G., Lei, S., & Yang, C. (2008). Effect of two typical focus positions on microstructure shape and morphology in femtosecond laser multi-pulse ablation of metals. *Applied Surface Science*, 255(5), 2303-2311. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2008.07.100>.
- Wang, X., Zhang, P., & Tian, L. (2021). Spatiotemporal organization of coacervate microdroplets. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 52, 101420. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2021.101420>.
- Warnakulasuriya, S. N., & Nickerson, M. T. (2018). Review on plant protein-polysaccharide complex coacervation, and the functionality and applicability of formed complexes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(15), 5559-5571. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9228>.
- Watanabe, K., Shimoyamada, M., Onizuka, T., Akiyama, H., Niwa, M., Ido, T., & Tsuge, Y. (2004). Amino acid sequence of a-subunit in hen egg white ovomucin deduced from cloned cDNA. *DNA sequence*, 15(4), 251-261. <https://doi.org/10.1080/10425170410001723921>.
- Watanabe, K., Tsuge, Y., Shimoyamada, M., Ogama, N., & Ebina, T. (1998). Antitumor effects of pronase-treated fragments, glycopeptides, from ovomucin in hen egg white in a double grafted tumor system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 3033-3038. <https://doi.org/10.1021/jf9800615>.
- Weijers, M., Van de Velde, F., Stijnmana, A., van de Pijpekampa, A., Visschersa, R.W. (2006). Structure and rheological properties of acid-induced egg white protein gels. *Food Hydrocolloids*, 20, 146-159. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.02.013>.
- <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>.

- Weinbreck, F., Nieuwenhuijse, H., Robijn, G.W., de Kruif, C.G. (2004). Complexation of whey proteins with carrageenan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3550-3555. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2016.12.003>.
- Weiss, J., Salminen, H., Moll, P., & Schmitt, C. (2019). Use of molecular interactions and mesoscopic scale transitions to modulate protein-polysaccharide structures. *Advances in Colloid and Interface Science*, 271, 101987. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.07.008>.
- Whitesides, G. M. (2006). The origins and the future of microfluidics. *Nature*, 442(7101), 368-373. <https://doi:10.1038/nature05058>.
- Wibowo, D., Zhao, C. X., & He, Y. (2019). Fluid properties and hydrodynamics of microfluidic systems. In *Microfluidics for Pharmaceutical Applications*. William Andrew Publishing, 37-77. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812659-2.00002-8>.
- Vijayakumar, V., & Subramanian, K. G. (2015). Drug carriers, polymers as: Synthesis, characterization, and in vitro evaluation. *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials; CRC Press: Boca Raton, FL, USA*, 11, 1-28. <http://doi.org/10.1081/E-EBPP-120050597>.
- Wijesekara, I., Pangestuti, R. & Kim, S.K. (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.062>.
- Wohlgemuth, R., Plazl, I., Žnidaršič-Plazl, P., Gernaey, K. V., & Woodley, J. M. (2015). Microscale technology and biocatalytic processes: opportunities and challenges for synthesis. *Trends in biotechnology*, 33(5), 302-314. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.02.010>.
- Wong, I., & Ho, C. M. (2009). Surface molecular property modifications for poly (dimethylsiloxane)(PDMS) based microfluidic devices. *Microfluidics and nanofluidics*, 7(3), 291-306. <http://link.springer.com/10.1007/s10404-009-0443-4>.
- Wong, V. L., Loizou, K., Lau, P. L., Graham, R. S., & Hewakandamby, B. N. (2017). Numerical studies of shear-thinning droplet formation in a microfluidic T-junction using two-phase level-SET method. *Chemical Engineering Science*, 174, 157-173. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.08.027>.
- Wu, I. Y., Bala, S., Skalko-Basnet, N., & di Cagno, M. P. (2019). Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing korsmeyer-peppas model to study drug release from liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 138, Article 105026. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105026>.

- Wu, J., Kong, T., Yeung, K., Shum, H., Cheung, K., Wang, L., & Tsun To, M.K. (2013). Fabrication and characterization of monodisperse PLGA–alginate core–shell microspheres with monodisperse size and homogeneous shells for controlled drug release. *Acta biomaterialia*, 9, 7410-7419. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.022>.
- Xu, J. H., Li, S. W., Tan, J., Wang, Y. J., & Luo, G. S. (2006). Preparation of highly monodisperse droplet in a T-junction microfluidic device. *AIChE journal*, 52(9), 3005-3010. <https://doi.org/10.1002/aic.10924>
- Xu, L., Wang, A., Li, X. & Oh, K. W. (2020). Passive micropumping in microfluidics for point-of-care testing. *Biomicrofluidics*, 14(3), 031503. <https://doi.org/10.1063/5.0002169>.
- Xu, L., Yao, Z., Wu, H., Wang, F., & Zhang, S. (2012). The immune regulation of κ -carrageenan oligosaccharide and its desulfated derivatives on LPS-activated microglial cells. *Neurochemistry International*, 61(5), 689-696. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.06.019>.
- Xue, P., Wu, Y., Menon, N. V., & Kang, Y. (2015). Microfluidic synthesis of monodisperse PEGDA microbeads for sustained release of 5-fluorouracil. *Microfluidics and Nanofluidics*, 18(2), 333-342. <https://doi.org/10.1007/s10404-014-1436-5>.
- Yang, D., Gao, K., Bai, Y., Lei, L., Jia, T., Yang, K., & Xue, C. (2021). Microfluidic synthesis of chitosan-coated magnetic alginate microparticles for controlled and sustained drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 639-647. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.057>.
- Yao, X., Zhang, Y., Du, L., Liu, J., & Yao, J. (2015). Review of the applications of microreactors. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, 519-539. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.03.078>.
- Yermak, I. M., Davydova, V. N., Kravchenko, A. O., Chistyulin, D. A., Pimenova, E. A., & Glazunov, V. P. (2020). Mucoadhesive properties of sulphated polysaccharides carrageenans from red seaweed families Gigartinaceae and Tichocarpaceae. *International journal of biological macromolecules*, 142, 634-642. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.005>.
- Yokota, T., Ohishi, H., & Watanabe, K. (1999). Antitumor effects of β -subunit from egg white ovomucin on xenografted sarcoma-180 cells in mice. *Food science and technology research*, 5(3), 279-283. <https://doi.org/10.3136/fstr.5.279>.

- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Chen, F., & Liu, J. (2014). Application and bioactive properties of proteins and peptides derived from hen eggs: opportunities and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*(14), 2839-2845. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6670>.
- Zhang, J., Yan, S., Yuan, D., Alici, G., Nguyen, N. T., Warkiani, M. E., & Li, W. (2016). Fundamentals and applications of inertial microfluidics: A review. *Lab on a Chip*, *16*(1), 10-34. <https://doi.org/10.1039/C5LC01159K>.
- Zhang, L., Sang, Y., Feng, J., Li, Z., & Zhao, A. (2016). Polysaccharide-based micro/nanocarriers for oral colon-targeted drug delivery. *Journal of drug targeting*, *24*(7), 579-589. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1128941>.
- Zhang, L., Zhao, G., Wang, G., Dong, G., & Wu, H. (2017). Investigation on bubble morphological evolution and plastic part surface quality of microcellular injection molding process based on a multiphase-solid coupled heat transfer model. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, *104*, 1246-1258. <https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2016.09.043>.
- Zhang, R., Hoffmann, T., & Tsotsas, E. (2020). Novel technique for coating of fine particles using fluidized bed and aerosol atomizer. *Processes*, *8*(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/pr8121525>.
- Zhang, Z., Zhang, R., Zou, L., Chen, L., Ahmed, Y., Al Bishri, W., et al. (2016). Encapsulation of curcumin in polysaccharide-based hydrogel beads: Impact of bead type on lipid digestion and curcumin bioaccessibility. *Food Hydrocolloids*, *58*, 160-170. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.036>.
- Zhao, C. X., & Middelberg, A. P. (2011). Two-phase microfluidic flows. *Chemical Engineering Science*, *66*(7), 1394-1411. doi: 10.1016/j.ces.2010.08.038. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.08.038>.
- Zhao, C., Yin, H., Yan, J., Niu, X., Qi, B., & Liu, J. (2021). Structure and acid-induced gelation properties of soy protein isolate–maltodextrin glycation conjugates with ultrasonic pretreatment. *Food Hydrocolloids*, *112*, 106278. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106278>.
- Zhao, Q., Ding, L., Xia, M., Huang, X., Isobe, K., Handa, A., & Cai, Z. (2021). Role of lysozyme on liquid egg white foaming properties: Interface behavior, physicochemical characteristics and protein structure. *Food Hydrocolloids*, *120*, 106876. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106876>.
- Zhou, C., Zhang, H., Li, Z., & Wang, W. (2016). Chemistry pumps: a review of chemically powered micropumps. *Lab on a Chip*, *16*(10), 1797-1811. <https://doi.org/10.1039/c6lc00032k>.

- Zhu, P., Kong, T., Kang, Z., Tian, X., & Wang, L. (2015). Tip-multi-breaking in capillary microfluidic devices. *Scientific reports*, 5(1), 1-8. DOI: 10.1038/srep111102.
- Zhu, P. & Wang, L. (2017). Passive and active droplet generation with microfluidics: a review. *Lab on a Chip*, 17(1), 34-75. <https://doi.org/10.1039/c6lc01018k>.
- Zhu, Y., Vanga, S. K., Wang, J., & Raghavan, V. (2018). Impact of food processing on the structural and allergenic properties of egg white. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.005>.
- Ziaie, B., Baldi, A., Lei, M., Gu, Y., & Siegel, R. A. (2004). Hard and soft micromachining for BioMEMS: review of techniques and examples of applications in microfluidics and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 56(2), 145-172. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.09.001>.