



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y TEXTIL

DESARROLLO Y MODELIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE MICROCÁPSULAS CON APLICACIONES EN BIOMEDICINA

Memoria que para optar al grado de Doctor presenta

ÉDGAR PÉREZ HERRERO

Salamanca, Junio de 2010

DR. D. MIGUEL ÁNGEL GALÁN SERRANO, Catedrático de Universidad en el Departamento de Ingeniería Química y Textil de la Universidad de Salamanca.

DRA. DÑA. EVA M. MARTÍN DEL VALLE, Profesora Titular de Universidad en el Departamento de Ingeniería Química y Textil de la Universidad de Salamanca.

INFORMAN: Que el trabajo titulado “**DESARROLLO Y MODELIZACIÓN DE UNA TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE MICROCÁPSULAS CON APLICACIONES EN BIOMEDICINA**” que para optar al Grado de Doctor en Ingeniería Química, Programa de Doctorado “*Ingeniería Química y del Medio Ambiente*”, presenta **D. ÉDGAR PÉREZ HERRERO**, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Ingeniería Química y Textil de la Universidad de Salamanca.

Considerando que constituye un trabajo de Tesis, autorizo su presentación ante la Comisión de Tercer Ciclo de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firman la presente en Salamanca a cinco de abril de dos mil diez.

Fdo.: Miguel A. Galán Serrano

Fdo.: Eva M. Martín Del Valle

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a los directores de este trabajo por su constante seguimiento, apoyo y colaboración: al Profesor Dr. D. Miguel Ángel Galán Serrano, por haberme guiado hasta este increíble mundo de la investigación, al que me gustaría dedicarme, a la Dra. Dña. Eva M. Martín Del Valle, a la que tengo que agradecer todo lo que ha hecho por mí, que ha sido mucho, en el día a día. Ambos han hecho que este trabajo se haya llevado a cabo con éxito, y han sido el motor por el que me he movido durante este periodo de mi vida. Gracias a los dos.

A todos los profesores del Departamento de Ingeniería Química y Textil, y a Belén, Julián, Manolo, y Teresa por haberme ayudado todo lo que han podido en mi trabajo. Gracias a todos.

A las Profesoras Dra. Dña. M^a Jesús Almendral Parra y Dra. Dña. M^a Carmen Izquierdo Misiego que siempre han estado a mi lado desde que inicié mis estudios en esta facultad. Gracias por todo a las dos.

Al Profesor Dr. D. Jose Angel Dominguez Pérez que siempre ha estado dispuesto a ayudarme en lo relativo a las matemáticas. Gracias.

A todos mis compañeros de laboratorio, Cristina (mi compañera y amiga), Ángel, Luismi, Elena, Cris, Mariano, Raúl, Claudio, Dieguito, Juan Manuel, Leila, Elena, Marta, Milena, Toño, Sol, Yovana y Muliye. Gracias a todos por haber hecho del laboratorio un gran lugar para trabajar.

Finalmente, a toda mi familia (en especial mis padres) y a todos mis amigos, en especial a Luisillo y Pablete, Luis, Cris y Fer, Isa, Pilar, Silvia y Jesús que siempre me han apoyado en los momentos difíciles y me han dado los ánimos para llevar a cabo este trabajo. Gracias por estar ahí. Os quiero a todos.

A mis padres, las personas más importantes de mi vida,
por estar siempre a mi lado. Os quiero.

ÍNDICES

I. TABLA DE CONTENIDOS

I. TABLA DE CONTENIDOS	III
II. INDICE DE FIGURAS	IX
III. INDICE DE TABLAS	XVII
IV. RESUMEN	XXIII
V. ABSTRACT	XXV
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. CONCEPTO E IMPORTANCIA DE LA MICROENCAPSULACIÓN	3
1.2. ANTECEDENTES RELATIVOS A LA MICROENCAPSULACIÓN.....	12
1.3. ENFOQUE, OBJETIVOS Y MOTIVACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL	18
1.3.1. Enfoque del problema de partida y objetivo global.....	18
1.3.2. Objetivos particulares por capítulos.....	23
1.4. BIBLIOGRAFÍA.....	31
2. DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE UNA NUEVA TECNICA DE GENERACION DE MICROCAPSULAS	41
2.1. PRINCIPALES MÉTODOS DE ENCAPSULACIÓN.....	41
2.1.1. Procedimientos físico-químicos:.....	41
2.1.2. Procedimientos químicos	43
2.1.3. Procedimientos mecánicos	45
2.2. ESTADO ACTUAL DE LOS PROCESOS DE GENERACIÓN DE CÁPSULAS	53
2.3. MATERIALES BIOCOMPATIBLES UTILIZADOS EN LA GENERACIÓN DE CAPSULAS	55
2.3.1. Polímeros sintéticos.....	59
2.3.2. Polímeros naturales	61
2.3.2.1. Alginato	63
2.4. ESTADO ACTUAL DE LOS MATERIALES UTILIZADOS EN LOS PROCESOS DE GENERACIÓN DE MICROCÁPSULAS	67

2.5.	DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE GENERACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS ..	69
2.5.1.	Descripción de la instalación	69
2.5.2.	Puesta en marcha de la instalación.....	76
2.6.	EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN	91
2.6.1.	Efecto de la variación del caudal de alginato sódico	93
2.6.2.	Efecto de la variación del caudal de aire	103
2.6.3.	Efecto de la variación de la viscosidad del alginato sódico	118
2.6.4.	Conclusiones.....	122
2.7.	MEJORA DE LA TÉCNICA DE GENERACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS	124
2.7.1.	Descripción de la instalación	124
2.7.2.	Caracterización de la instalación mejorada	133
2.7.2.1.	Efecto de la variación del caudal de alginato sódico	133
2.7.2.2.	Efecto de la variación del caudal de aire.....	137
2.7.2.3.	Efecto de la variación de la viscosidad del líquido.....	140
2.7.3.	Conclusiones.....	143
2.8.	BIBLIOGRAFÍA.....	144
2.9.	DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	154
3.	DESARROLLO DE UN MODELO PARA LA PREDICCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA.....	167
3.1.	MÉCANISMO O TEORÍA DE ONDAS.....	167
3.2.	DESARROLLO DE UN MODELO PARA LA PREDICCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA	173
3.2.1.	Influencia de la viscosidad del líquido, o del número de Ohnesorge, en el tamaño de partícula	173
3.2.2.	Influencia de la relación de flujos másicos de líquido y aire en el tamaño de partícula	175
3.2.3.	Influencia del número de Weber en el tamaño de partícula ...	179
3.2.4.	Modelo semi-empírico para la atomización neumática	181
3.2.5.	Comparación entre los datos experimentales del tamaño de las microcápsulas y las predicciones del modelo.....	183
3.3.	CONCLUSIONES	209

3.4.	NOMENCLATURA	210
3.5.	BIBLIOGRAFÍA.....	212
3.6.	DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	214
4.	ESTUDIO DE INESTABILIDAD PARA HOJAS LÍQUIDAS DE UN POLÍMERO PRODUCIDAS POR ATOMIZACIÓN NEUMÁTICA	225
4.1.	DEFINICIÓN Y CONCEPTO DE INESTABILIDADES.....	226
4.2.	TEORÍAS DE INESTABILIDAD.....	228
4.3.	ANTECEDENTES RELATIVOS A LA ATOMIZACIÓN POR AIRE.....	230
4.4.	PLANTEAMIENTO GENERAL DEL ANÁLISIS DE ESTABILIDAD LINEAL	234
4.4.1.	Suposiciones del modelo.....	234
4.4.2.	Ecuaciones de perturbación linealizadas.....	235
4.4.3.	Adimensionalización.....	240
4.4.4.	Condiciones de contorno	243
4.5.	PLANTEAMIENTO SIMPLIFICADO DEL ANÁLISIS DE ESTABILIDAD LINEAL..	245
4.5.1.	Suposiciones del modelo.....	245
4.5.2.	Ecuaciones de perturbación lineales adimensionalizadas	246
4.5.3.	Condiciones de contorno	247
4.5.4.	Perturbación de presión dentro de la hoja líquida	249
4.5.5.	Perturbación de presión en la superficie interior de la fase gas	253
4.5.6.	Perturbación de presión en la superficie externa de la fase gas	255
4.5.7.	Ecuación adimensional de dispersión.....	256
4.6.	ESTUDIO PARAMÉTRICO DEL MODELO DE INESTABILIDAD	258
4.6.1.	Variación del caudal de líquido.....	259
4.6.2.	Variación del caudal de aire	260
4.6.3.	Variación de la viscosidad del líquido	261
4.7.	CONCLUSIONES	263
4.8.	NOMENCLATURA	264
4.9.	BIBLIOGRAFÍA.....	266
4.10.	DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	270

5. PREDICCIÓN DEL TAMAÑO DE LAS CÁPSULAS PRODUCIDAS POR ATOMIZACIÓN NEUMÁTICA A PARTIR DEL ANÁLISIS TEMPORAL DE ESTABILIDAD	283
5.1. ATOMIZACIÓN PRIMARIA	283
5.1.1. Predicción del tamaño de gota resultante de la atomización primaria	287
5.2. ATOMIZACIÓN SECUNDARIA	294
5.2.1. Predicción del tamaño de gota resultante de la atomización secundaria.....	297
5.3. CONCLUSIONES	301
5.4. NOMENCLATURA	302
5.5. BIBLIOGRAFÍA.....	304
5.6. DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	307
6. ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA DE MATERIA EN BIOMEDICINA	311
6.1. ESTUDIO EXPERIMENTAL DE TRANSFERENCIA DE MATERIA.....	315
6.1.1. Descripción de los procedimientos utilizados en el estudio	315
6.1.2. Resultados experimentales de la transferencia de materia	321
6.2. ESTUDIO TEÓRICO DE TRANSFERENCIA DE MATERIA	335
6.2.1. Estudio teórico de transferencia de materia en discontinuo ...	335
6.2.2. Estudio teórico de transferencia de materia en continuo.....	346
6.2.2.1. Perfiles de distribución de concentración.....	353
6.3. CONCLUSIONES	364
6.4. NOMENCLATURA	366
6.5. BIBLIOGRAFÍA.....	368
6.6. DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	372
7. APLICACIÓN I: INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE PARA TERAPIA CELULAR	375
7.1. PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS	382

7.2.	VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS ENCAPSULADAS	384
7.3.	MODIFICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS	388
7.3.1.	Descripción de la generación de las microcápsulas	388
7.3.2.	Viabilidad de las células encapsuladas	391
7.4.	CONCLUSIONES	396
7.5.	BIBLIOGRAFÍA	397
7.6.	DIFUSIÓN DE RESULTADOS	401
8.	APLICACIÓN II. RECONOCIMIENTO DE PROTEÍNAS MEDIANTE CÁPSULAS DE ALGINATO-CALCIO	411
8.1.	RECONOCIMIENTO MOLECULAR	411
8.2.	RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE MACROMOLÉCULAS	421
8.3.	CALIBRACIÓN DE LA PROTEÍNA	428
8.4.	GENERACIÓN DE LAS CÁPSULAS	430
8.5.	MÉTODO PARA GENERAR LAS GOTAS	432
8.6.	ELIMINACIÓN DE LA PROTEÍNA (MOLDE O PLANTILLA)	432
8.7.	PROCESO DE RECONOCIMIENTO DE LA PROTEÍNA	439
8.8.	CONCLUSIONES	442
8.9.	BIBLIOGRAFÍA	444
8.10.	DIFUSIÓN DE RESULTADOS	454
9.	APLICACIÓN III: DESARROLLO DE FILMS BIFÁSICOS PARA UN POSIBLE TRATAMIENTO DE LA FÍSTULA BRONCOPLURAL POST- NEUMONECTOMÍA	459
9.1.	GENERACIÓN DE LOS FILMS BIFÁSICOS	467
9.1.1.	MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LA CAPA DE FIBRINA (2 mL)	467
9.1.2.	TÉCNICA DE PREPARACIÓN DE LA CAPA DE ALGINATO BÁRICO ..	467
9.1.3.	TÉCNICA PARA LA GENERACIÓN DE MICROCÁPSULAS	469
9.1.4.	TÉCNICA PARA LA GENERACIÓN DE LOS FILMS BIFÁSICOS	470
9.2.	ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR	474

9.2.1. PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS	474
9.2.2. VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS ENCAPSULADAS	476
9.3. ESTUDIOS DE LA EFICIENCIA DE LA MATRIZ BIFÁSICA EN EL TRATAMIENTO DE LA FÍSTULA BROCOPEURAL POSTNEUMONECTOMÍA.....	484
9.4. CONCLUSIONES.....	495
9.5. BIBLIOGRAFÍA.....	496
9.6. DIFUSIÓN DE RESULTADOS.....	499
10. CONCLUSIONES FINALES.	511
FINAL CONCLUSIONS	513

APÉNDICE I: MATERIALES Y MÉTODOS.

1. PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS.....	III
2. MATERIAL UTILIZADO.....	IV
3. MÉTODOS DE ANÁLISIS	VI
A) Medición del tamaño de partícula	VI
B) Análisis de la imagen.....	IX
C) Medida de la viscosidad.	XV
D) Método para determinar la viabilidad de las células inmovilizadas	XVII
E) Bibliografía	XIX

APÉNDICE II: EXPRESIONES UTILIZADAS EN EL CAPÍTULO CUATRO.

A) RELACIONES DE RECURRENCIA.....	I
B) COEFICIENTES I.....	II
C) COEFICIENTES II.....	IV

APÉNDICE III: REOLOGÍA.

APÉNDICE IV: PROGRAMAS DE MATHEMATICA®

II. INDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1:

Figura 1.1. Estructura de una cápsula	5
Figura 1.2. Representación esquemática de una estructura matricial	5
Figura 1.3. Representación esquemática de una estructura capsular o de reservorio	6
Figura 1.4. Perfil de liberación en sangre de un fármaco	8
Figura 1.5. Esquema de una microcápsula	19
Figura 1.6. Administración de las microcápsulas en animales	22

CAPÍTULO 2:

Figura 2.1. Proceso de gelificación de alginato sódico con cloruro cálcico	45
Figura 2.2. Densidad reducida frente a presión reducida	48
Figura 2.3. Ilustración esquemática de la técnica RESS	49
Figura 2.4. Ilustración esquemática de la técnica GAS	49
Figura 2.5. Ilustración esquemática de la técnica SAS.....	50
Figura 2.6. a) Ilustración esquemática de la técnica SEDS; b) Esquema de la boquilla atomizadora coaxial	51
Figura 2.7. Directrices para una selección racional del material	58
Figura 2.8. Características estructurales del alginato	64
Figura 2.9. Esquema de la instalación utilizada para la producción de las microcápsulas	50
Figura 2.10. Esquema de la boquilla neumática prefilmer	72
Figura 2.11. Funcionamiento de la tecnología de modulación por ancho de pulsos	73
Figura 2.12. Esquema del proceso de microencapsulación utilizado	75
Figura 2.13. Curva de calibración del rotámetro de líquido para 64,5 cP	77
Figura 2.14. Curva de calibración del rotámetro de líquido para 138,0 cP.....	78
Figura 2.15. Curva de calibración del rotámetro de líquido para 190,0 cP.....	78
Figura 2.16. Ejemplo de distribución de partícula con boquilla cerrada.....	82

Figura 2.17. Fotografía de las microcápsulas con boquilla cerrada.....	83
Figura 2.18. Ejemplo de distribución de partícula con boquilla abierta	85
Figura 2.19. Esquema de la disipación del aire en la boquilla neumática	86
Figura 2.20. Fotografía de las microcápsulas con la boquilla abierta	86
Figura 2.21. Distribución de partícula (boquilla abierta; viscosidad: 138 cP)...	88
Figura 2.22. Distribución de partícula (boquilla abierta; viscosidad: 190 cP)...	88
Figura 2.23. Fotografía de las microcápsulas con boquilla abierta	89
Figura 2.24. Fotografía de las microcápsulas con boquilla abierta	90
Figura 2.25. Sistema de fuerzas actuando sobre un chorro u hoja líquida moviéndose en aire	91
Figura 2.26. Esquema de la boquilla neumática prefilmer	92
Figura 2.27. Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de alginato a 64,5 cP	94
Figura 2.28. Fotografías de las microcápsulas a 64,5 cP	96
Figura 2.29. Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de alginato a 138 cP	98
Figura 2.30. Fotografías de las microcápsulas a 138 cP	99
Figura 2.31. Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de alginato a 190 cP	101
Figura 2.32. Fotografías de las microcápsulas a 190 cP	102
Figura 2.33.-2.35. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire a 64,5 cP	105
Figura 2.36. Fotografías de las microcápsulas a 64,5 cP	108
(Caudal de alginato: 0,006 L/min; Caudal de aire: 78,400 L/min).....	108
Figura 2.37.- 2.39. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire a 138 cP	111
Figura 2.40. Fotografías de las microcápsulas a 138 cP	113
(Caudal de alginato: 0,009 L/min; Caudal de aire: 124,8 L/min)	113
Figura 2.41.- 2.43. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire a 190 cP	115
Figura 2.44. Fotografías de las microcápsulas a 190 cP	117
(Caudal de alginato: 0,003 L/min; Caudal de aire: 131,1 L/min)	117

Figura 2.45.- 2.48. Variación del tamaño de las microcápsulas con la variación de la viscosidad de alginato sódico	120
Figura 2.49. Esquema de la instalación utilizada para la producción de las microcápsulas	120
Figura 2.50. Detalle del armario neumático	127
Figura 2.51. Esquema de la boquilla neumática prefilmer	129
Figura 2.52. Funcionamiento de la tecnología de modulación por ancho de pulsos	130
Figura 2.53. Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de líquido	135
Figura 2.54. Ejemplo de distribución de partícula.....	135
Figura 2.55. Fotografía de las cápsulas.....	136
Figura 2.56. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire	138
Figura 2.57. Ejemplo de distribución de partícula.....	138
Figura 2.58. Fotografía de las cápsulas.....	139
Figura 2.59. Variación del tamaño de las cápsulas con la viscosidad del líquido	141
Figura 2.60. Ejemplo de distribución de partícula.....	142
Figura 2.61. Fotografía de las cápsulas.....	143

CAPÍTULO 3:

Figura 3.1. Desintegración de una lámina líquida	168
Figura 3.2. Sistema de fuerzas actuando en una hoja de líquido moviéndose en aire.....	168
Figura 3.3. Influencia del número de Ohnesorge en el tamaño de partícula..	174
Figura 3.4. Dependencia exponencial del número de Ohnesorge con el SMD	175
Figura 3.5. Influencia de la relación de flujos másicos de líquido y aire en el tamaño de partícula	177
Figura 3.6. Variación del SMD con el número de Weber	180

Figura 3.7. Influencia del número de Weber en el tamaño de partícula de las cápsulas	181
Figura 3.8.- 3.19. Tamaño de partícula: valores teóricos frente a valores experimentales	186

CAPÍTULO 4:

Figura 4.1. Hoja anular de líquido viscoso sujeta a corrientes de aire.....	235
Figura 4.2. Descripción esquemática de los modos en los que se desarrollan las ondas superficiales	237
Figura 4.3. Parámetros adimensionales utilizados en la adimensionalización.....	240
Figura 4.4. Hoja anular de líquido viscoso sujeta a perturbaciones axi-simétricas	245
Figura 4.5.- 4.7. Diagramas de dispersión	259

CAPÍTULO 5:

Figura 5.1.- 5.3. Comparación entre el tamaño final teórico y experimental	298
--	-----

CAPÍTULO 6:

Figura 6.1. Simulación del transporte de fármacos en tejidos vivos	312
Figura 6.2. Estructura de la rodamina B	313
Figura 6.3. Estructura química de la rodamina B isotiocianato (a) y de la RBID (b)	313
Figura 6.4. Calibración de RBID con peso molecular de 10 KDa	315
Figura 6.5. Calibración de RBID con peso molecular de 40 KDa	316
Figura 6.6. Calibración de RBID con peso molecular de 70 KDa	316
Figura 6.7. Instalación utilizada para simular la transferencia de materia en discontinuo	317

Figura 6.9. Comparación de los perfiles de liberación de los dos sistemas considerados	321
Figura 6.10. Liberación acumulada en el proceso discontinuo para los tres pesos moleculares de RBID y para las dos concentraciones de alginato.....	322
Figura 6.11a. Liberación acumulada en el proceso continuo para los tres pesos moleculares de RBID (Concentración alginato: 1,2 % en peso)	323
Figura 6.11 b. Liberación acumulada en el proceso continuo para los tres pesos moleculares de RBID (Concentración alginato: 3,0 % en peso)	324
Figura 6.12. Interacciones electrostáticas entre la RBID y el alginato	327
Figure 6.13. Simulación de la conformación de las moléculas de RBID en las capsulas	328
Figure 6.14. Variacion de la concentración con el tiempo en el proceso en continuo (Concentracion alginato: 1,2 % wt.)	329
Figure 6.15. Variacion de la concentración con el tiempo en el proceso en continuo (Concentracion alginato: 3,0 % wt.)	330
Figura 6.16. Analogía entre las moléculas de RBID y las Glicoproteínas	332
Figura 6.17. Condiciones iniciales y evolución del sistema con el tiempo.....	336
Figura 6.18a. Perfiles de liberación acumulada teóricos y experimentales ...	339
Figura 6.18b. Perfiles de liberación acumulada teóricos y experimentales ...	340
Figura 6.19. Esquema del sistema de coordinadas y dirección del flujo del proceso	348
Figura 6.20.- 6.26. Perfiles de distribución de concentración.....	348

CAPÍTULO 7:

Figura 7.1. Esquema de una neurona	376
Figura 7.2. Viabilidad celular para las células madre mesenquimales	384
Figura 7.3. Viabilidad celular para los monocitos inmovilizados en las microcápsulas	385
Figura 7.4. Rectas de calibrado.....	393

Figura 7.5. Viabilidad celular para los monocitos inmovilizados en las cápsulas micrométricas.....	394
Figura 7.6. Viabilidad celular para los monocitos inmovilizados en las cápsulas grandes.....	394

CAPÍTULO 8:

Figura 8.1. Curvas de calibrado del BSA.....	429
Figura 8.3. Eliminación de la proteína (90,04 %)	435
Figura 8.4. Eliminación de la proteína (87,11 %)	436
Figura 8.5. Eliminación de la proteína (100 %, agitación durante la noche) ..	437
Figura 8.6. Eliminación de la proteína (100 %, almacenaje durante 5 días) ..	438
Figura 8.7. Estudios de reconocimiento de proteína	440
Figura 8.8. Estudios de reconocimiento de proteína	441

CAPÍTULO 9:

Figura 9.1. Esquema de una microcápsula.....	462
Figura 9.2. Esquema de la estructura de un film bifásico.....	463
Figura 9.3. Microscopía electrónica de barrido donde se aprecia una matriz de fibrina sin componente celular (izquierda) y una matriz de fibrina con un fibroblasto integrado plenamente en la misma tras 21 días de cultivo (derecha)	464
Figura 9.4. Perfiles de liberación de VEGF y de FGF desde el injerto.....	465
Figura 9.5. Proceso de formación y maduración vascular	465
Figura 9.6. Dispositivo utilizado para preparar los films	469
Figura 9.7. Dispositivo utilizado para preparar las cápsulas	470
Figura 9.8. Recta de calibrado.....	478
Figura 9.9. Recta de calibrado de las células mononucleadas.....	479
Figura 9.10. Recta de calibrado para los fibroblastos	481
Figura 9.11. Viabilidad celular (monocitos)	481
Figura 9.12. Viabilidad celular (células monoclonales).....	482
Figura 9.13. Viabilidad celular (fibroblastos).....	483

Figura 9.14. Sección histológica macroscópica de un muñón bronquial correspondiente a un cerdo del grupo control	486
Figura 9.15. Sección histológica macroscópica de un muñón bronquial correspondiente a un cerdo del grupo experimental II	488
Figura 9.16. Análisis microscópico de las secciones histológicas macroscópicas para los 3 grupos experimentales a los 7 días del implante del injerto en los animales	489
Figura 9.17. Análisis microscópico de las secciones histológicas macroscópicas para los 3 grupos experimentales a los 14 días del implante del injerto en los animales	489
Figura 9.18. Análisis microscópico de las secciones histológicas macroscópicas para los 3 grupos experimentales a los 21 días del implante del injerto en los animales	490
Figura 9.19. Análisis microscópico de las secciones histológicas macroscópicas para los 3 grupos experimentales a los 28 días del implante del injerto en los animales	490
Figura 9.20. Imagen panorámica microscópica de una sección histológica de un muñón bronquial con tinción de actina (color marrón) en el grupo experimental ITC a los 7 días después del implante	492
Figura 9.21. A.- Detalle de una cápsula conteniendo FGF en el injerto (microscopía óptica); B.- Microscopía electrónica del injerto que muestra abundantes microcápsulas homogéneamente distribuidas (ver flechas)	493

APÉNDICE I:

Figura A1.1. Sistema óptico de medida de las partículas.....	VI
Figura A1.2. Diagrama de flujo del sistema de muestreo	VII
Figura A1.3. Ejemplo de una distribución del tamaño de partícula	VIII
Figura A1.4. Microscopio Leica DM1000	IX
Figura A1.5. Platina del microscopio	X
Figura A1.6. Objetivos del microscopio óptico	XII
Figura A1.7. Viscosímetro rotacional	XV

Figura A1.8. Esquema de funcionamiento de un viscosímetro rotacionalXVI

APÉNDICE III:

Figura A3.1. Formación del perfil de velocidad en estado estacionario para un fluido contenido entre dos láminas I

Figura A3.2. Esfuerzo cortante contra el gradiente de velocidad a presión y temperatura constantes..... IV

III. INDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1:

Tabla 1.1. Principales líneas celulares inmovilizadas y sus correspondientes aplicaciones terapéuticas	10
Tabla 1.2. Ensayos clínicos realizados en los últimos años con la tecnología de la microencapsulación de células.....	16

CAPÍTULO 2:

Tabla 2.1. Clasificación de los polímeros utilizados en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas	57
Tabla 2.2. Porcentajes de ácido manurónico y ácido gulurónico, y contenido de alginato para varias especies comerciales de algas pardas.....	65
Tabla 2.3. Valores de la calibración del rotámetro de líquido	77
Tabla 2.4. Experimentos preliminares realizados con la boquilla cerrada a 64,5 cP	81
Tabla 2.5. Experimentos preliminares realizados con la boquilla abierta a 64,5 cP.....	84
Tabla 2.6. Experimentos preliminares (boquilla abierta a 138 y 190 cP)	87
Tabla 2.7. Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de alginato a 64,5 cP	94
Tabla 2.8. Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de alginato a 138 cP.	98
Tabla 2.9. Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de alginato a 190 cP	100
Tabla 2.10. Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de aire, a tres caudales y una viscosidad constantes de alginato de 0,009, 0,006 y 0,003 L/min y 64,5 cP, respectivamente	104
Tabla 2.11. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire, a tres caudales y una viscosidad constantes de alginato de 0,009, 0,006 y 0,003 L/min y 138 cP, respectivamente	110

Tabla 2.12. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire, a tres caudales y una viscosidad constantes de alginato de 0,009, 0,006 y 0,003 L/min y 190 cP, respectivamente	114
Tabla 2.13. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación de la viscosidad de alginato sódico.....	119
Tabla 2.14. Datos de calibración para una viscosidad de alginato de 162,8 cP.....	132
Tabla 2.15. Datos de calibración para una viscosidad de alginato de 420,5 cP.....	132
Tabla 2.16. Datos de calibración para una viscosidad de alginato de 982,6 cP.....	132
Tabla 2.17. Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de líquido...	134
Tabla 2.18. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire.....	137
Tabla 2.19. Variación del tamaño de las cápsulas con la viscosidad del líquido.....	140

CAPÍTULO 3:

Tabla 3.1. Parámetros desconocidos para las ecuaciones 3.18, 3.19, y 3.20.....	183
Tabla 3.2.-3.7. Comparación de los valores experimentales con los valores teóricos	184

CAPÍTULO 5:

Tabla 5.1.- 5.3. Predicción del tamaño final de las gotas y de los principales parámetros implicados en el proceso de atomización primaria.....	287
---	-----

CAPÍTULO 6:

Tabla 6.1. Valores de liberación acumulada para el proceso en discontinuo	325
Tabla 6.2. Valores de liberación acumulada para el proceso en continuo.....	325

Tabla 6.3. Tabla resumen de la influencia de las interacciones electrostáticas en la liberación acumulada de RBID	331
Tabla 6.4. Valores de la liberación acumulada.....	334
Tabla 6.5. Valores del coeficiente de transferencia de materia y de la difusividad efectiva para el proceso en discontinuo	341
Tabla 6.6. Valores de los coeficientes de difusión obtenidos para la liberación de diferentes proteínas.....	343

CAPÍTULO 7:

Tabla 7.1. Datos experimentales para la obtención de la curva de calibrado	392
--	-----

CAPÍTULO 8:

Tabla 8.1. Valores volumen/concentración utilizados en el proceso de calibración	428
--	-----

CAPÍTULO 9:

Tabla 9.1.- 9.3. Datos experimentales para la elaboración de la curva de calibrado	477
--	-----

RESUMEN

IV. RESUMEN

En esta tesis doctoral se desarrolla, caracteriza y modela una nueva técnica de generación de microcápsulas. En ella se continúa con el trabajo iniciado por el Laboratorio de Encapsulación, Fluidos Supercríticos y Separación de Afinidad de la Universidad de Salamanca, dirigido por los doctores Eva M. Martín Del Valle y Miguel A. Galán Serrano, ambos con experiencia en el desarrollo de procesos de encapsulación y liberación de fármacos.

Así mismo, se pone de manifiesto la importancia de la Ingeniería Química en la Biomedicina en lo que al desarrollo de nuevas vías terapéuticas y de diagnóstico se refiere.

Este trabajo se ha llevado a cabo con la ayuda de los proyectos de investigación SA094A08 y CTQ2006-03831, y de la beca FPI concedida por la Junta de Castilla y León. Además, con la estancia de investigación de cinco meses en el Laboratorio de Biomateriales, Liberación de Fármacos, Bionanotecnología y Reconocimiento Molecular -dirigido por el Dr. Nicholas A. Peppas- en la Universidad de Texas en Austin (EEUU) se han completado los estudios iniciados en la Universidad de Salamanca.

El objetivo global de esta tesis ha sido el desarrollo, caracterización y modelado de una técnica de generación de cápsulas con tamaños comprendidos entre 20 y 50 micras. Esta técnica permitirá abordar el tratamiento y el diagnóstico de enfermedades tales como la esclerosis múltiple, la displasia broncopulmonar, el enfisema y la fibrosis pulmonares, y la neumonectomía.

Con este propósito, se ha desarrollado una técnica basada en procesos de atomización neumática para la generación de cápsulas de tamaño comprendido entre 20 y 50 micras. Esto permite su administración terapéutica a través de inyecciones Hamilton y aerosoles. El proceso se produce sin la intervención de condiciones desfavorables tales como el calentamiento o la

utilización de disolventes orgánicos. Las cápsulas han sido caracterizadas en tamaño y morfología, mediante el análisis por difracción láser, y la microscopía óptica, respectivamente. El comportamiento del sistema se estudió mediante la construcción de las curvas que describen la variación del tamaño de las cápsulas por el efecto de las variables que influyen en el proceso de atomización.

Después del desarrollo y caracterización de la técnica, ésta ha sido modelada para un mejor entendimiento del mecanismo de atomización mediante el desarrollo de un modelo semi-empírico que predice el tamaño de las cápsulas, sin necesidad de experimentar, y un modelo teórico que permite conocer el mecanismo de ruptura de la hoja líquida por la acción del aire, y a su vez predecir el tamaño final de partícula, teniendo en cuenta los mecanismos de atomización primaria y secundaria.

Con el objetivo de conocer el comportamiento de las microcápsulas en el cuerpo humano para su utilización en las aplicaciones biomédicas, se han realizado estudios de transferencia de materia en continuo y discontinuo para asegurar y conocer las condiciones de la liberación de sustancias inmovilizadas en el interior de las cápsulas.

Finalmente, la técnica desarrollada, ha sido aplicada con éxito en la inmovilización de células madre mesenquimales y monocitos con el propósito de obtener un futuro tratamiento de la esclerosis múltiple mediante terapia celular. Asimismo, se ha conseguido el reconocimiento de proteínas para un posible diagnóstico precoz de la esclerosis múltiple. Por último, se han desarrollado sistemas de liberación dual mediante films bifásicos poliméricos suturables que contienen tanto células y factores terapéuticos libres, como microcápsulas con células y factores inmovilizados en su interior, para un posible tratamiento de la fístula broncopleurales postneumonectomía.

V. ABSTRACT

This thesis, which develops, characterizes, and models a new technique to the generation of microcapsules, is part of the research developed by the Encapsulation Research Group (ERG) of the Universidad of Salamanca, directed by Eva M. Del Martin Valle, PhD and Miguel A. Galán Serrano, PhD, with extensive experience in the field of encapsulation processes and drug delivery. This thesis highlights the importance of Chemical Engineering at the Biomedicine through the development of new therapeutic treatments and diagnosis methods.

This work was carried out with the aid of the research projects SA094A08 and CTQ2006-03831 and the FPI scholarship granted by the Junta de Castilla y León. In addition, the research conducted at the University of Salamanca has been supplemented by the research carry out for five month in the laboratory of biomaterials, drug delivery, bionanotechnology and molecular recognition, directed by Nicholas A. Peppas, Sc.D, in the University of Texas at Austin, USA.

The overall aim of this thesis was the development, characterization and modeling of a technique of generation of capsules with sizes ranging from 20 to 50 microns. This technique will address treatment and diagnosis of diseases such as sclerosis multiple, bronchopulmonary dysplasia, emphysema and lung fibrosis and postpneumonectomy bronchopleural fistula.

First, it has been developed a new technique to the generation of capsules, based on pneumatic atomization process, which allows to obtain the required size capsules for administration by Hamilton injections and aerosol. Besides its small size, the capsules are generated without using drastic conditions, such as heating or the use of organic solvents. The technique developed has been characterized through analysis of the capsules with laser diffraction and optic microscopy, and the construction of the

behaviour curves, which describe the effect of variables that influence the process in the size of the capsules.

After the development and characterization of the technique, it has been modeled to better understanding of the mechanism of generation of the capsules, by developing a semi-empirical model that predicts the size of the capsules, without experimentation, and a theoretical model, which allows to understand the mechanism of liquid sheet breakup by the action of air, and predict the final size of particle, taking into account the mechanisms of primary and secondary atomization.

Furthermore, it was carried out steady and unsteady mass transfer studies with the aim of understanding the behavior of the microcapsules in the human body for the use of the capsules in future biomedical applications.

The developed technique has been successfully applied to the immobilization of mesenchymal stem cells and monocytes with the objective to achieve a future treatment of multiple sclerosis by cell therapy. In addition, we have achieved the recognition of proteins for a potential early diagnosis of the multiple sclerosis. Finally, these microcapsules have been also applied in dual-delivery systems using a new polymeric biphasic film that contain free cells, therapeutic factors, and microcapsules with immobilized cells and factors within it, for a possible treatment of postpneumectomy bronchopleural fistula.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONCEPTO E IMPORTANCIA DE LA MICROENCAPSULACIÓN

En los últimos años, el crecimiento de la industria farmacéutica y biotecnológica ha motivado un enfoque diferente en el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos. La estrecha conexión de los científicos procedentes de diversos campos, tales como la química, la biología, la medicina y la ingeniería ha llevado al descubrimiento de las bases celulares y moleculares en las que se fundamentan los procesos biológicos naturales y patológicos, abriéndose así una nueva era en la investigación de fármacos.

Las formas más comunes de administración de fármacos son las pastillas y las inyecciones. Éstas satisfacen los requerimientos en eficacia en cuanto a:

- Su introducción y eliminación en el organismo.
- Su absorción en la sangre.
- Su distribución hacia el punto específico donde es requerido.

Sin embargo, estos métodos no son adecuados para los medicamentos desarrollados en los últimos años, tales como las proteínas recombinantes (vacunas y hormonas).

La mayoría de las proteínas no pueden ser administradas por vía oral debido a los problemas relacionados con su degradación en el medio ácido del tracto gastrointestinal, siendo el modo de administración más común las inyecciones intravenosas. Estas sustancias tienen un peso molecular alto lo que puede provocar una absorción pobre en la corriente sanguínea (Dai et al., 2005). Asimismo, la mayoría tienen un tiempo de vida media corta en la corriente sanguínea, y por ello necesitan ser administradas frecuentemente en altas dosis para obtener la eficacia terapéutica deseada que puede revertir en efectos secundarios, pudiendo ser tóxicas (Dai et al., 2005).

Estas dificultades provocan la necesidad de desarrollar nuevos sistemas de administración de fármacos que permitan mantener los niveles terapéuticos sin producir los indeseables efectos secundarios.

Por todo ello, numerosos investigadores están tratando de alcanzar el desarrollo de sistemas ideales de liberación de medicamentos de alta especificidad y actividad en el lugar de aplicación, sin efectos tóxicos (Herrero et al., 2007).

En los últimos años se están desarrollando nuevos sistemas de administración de fármacos llamados vectores, entre los que destacan las microcápsulas (Dai et al., 2005). Esta forma farmacéutica permite diseñar una administración más sostenible y mejor adaptada, al aumentar la eficacia del fármaco o molécula biológicamente activa que incorporan.

La encapsulación puede definirse como el proceso por el cual se encierra material activo en una matriz, rodeada por una membrana semipermeable. Estos sistemas, que se diferencian en su morfología y estructura interna, presentan como característica común su tamaño, el cual puede ser superior o inferior a un micrómetro, denominándose microcápsulas o nanocápsulas, respectivamente. Cuando el núcleo y el recubrimiento no están realmente separados, las microcápsulas, o nanocápsulas, se denominan micropartículas, o nanopartículas (Galán et al., 2005).

De forma general, una cápsula se puede definir como una pequeña esfera rodeada por un recubrimiento homogéneo (Figura 1.1). El material encerrado en la cápsula se llama núcleo, fase interna, o encapsulado. El recubrimiento o “coating” se denomina carcasa, funda, fase externa, o membrana.

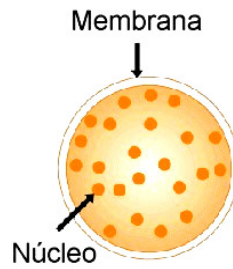


Figura 1.1. Estructura de una cápsula

El primer paso para la formación de una cápsula consiste en formar una pared alrededor del núcleo, de tal forma que el material de éste no libere. El material de la pared debe prevenir la entrada de materiales indeseables que puedan dañar el núcleo. Finalmente, es necesaria la liberación del material del núcleo en el momento apropiado y en la proporción adecuada (Galán et al., 2005).

Las cápsulas pueden presentar, de forma general, una de las siguientes estructuras (Galán et al., 2005):

- ✓ Tipo matricial: en este tipo de estructura el principio activo se encuentra muy disperso bajo la forma de diminutas partículas en el material de recubrimiento (Figura 1.2).

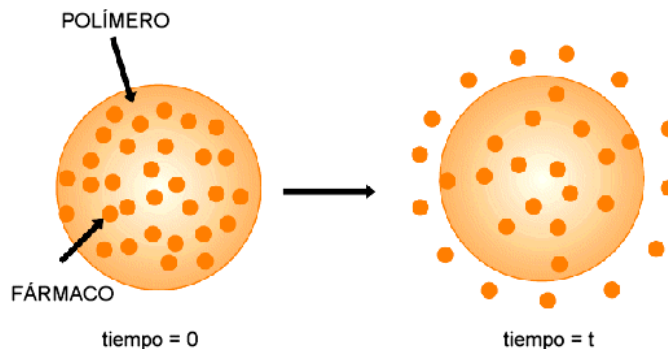


Figura 1.2. Representación esquemática de una estructura matricial

- ✓ Tipo capsular: en este caso, el principio activo se encuentra incluido en una especie de reservorio que se halla envuelto por una fina película del material de recubrimiento (Figura 1.3).

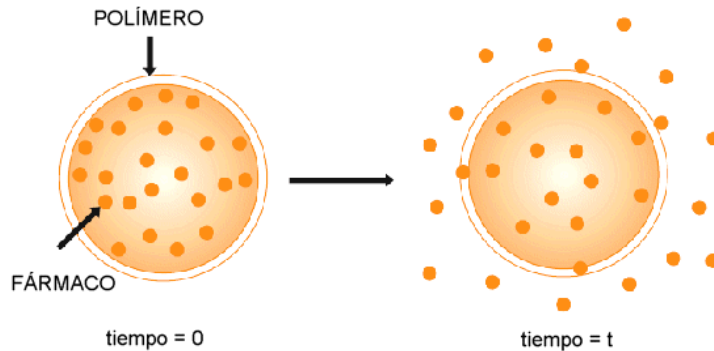


Figura 1.3. Representación esquemática de una estructura capsular o de reservorio

Además, los nuevos avances en el campo de la encapsulación han posibilitado el desarrollo de nuevas estructuras entre las que cabe destacar (Galán et al., 2005):

- El diseño de sistemas con múltiples núcleos, pudiendo ser un aplomado de diferentes tipos de cápsulas. Si el material del núcleo es un material irregular, entonces la pared seguirá el contorno de las partículas irregulares y se conseguirán soportes irregulares.
- Uno de los últimos diseños desarrollados es el de multicapas. En este caso, múltiples capas se depositan alrededor del núcleo para lograr múltiples propósitos relacionados con su fabricación, tales como el almacenaje y la liberación controlada del principio activo.

De forma general se puede afirmar que estos sistemas aportan las siguientes ventajas (Couvreur et al., 1993):

- ◆ Proteger al material activo que se pretende encapsular frente a su inactivación química, enzimática o inmunológica.
- ◆ Mejorar el transporte de la molécula biológicamente activa hasta lugares difíciles de alcanzar, así como de su penetración en la célula.
- ◆ Aumentar la especificidad de acción y la eficacia del fármaco en el blanco celular y/o molecular. Así, con dosis más pequeñas la actividad terapéutica obtenida es, al menos, idéntica y los efectos secundarios menores.
- ◆ Disminuir la toxicidad en ciertos órganos mediante la modificación de la distribución tisular de la molécula biológicamente activa que se pretende transportar.
- ◆ Prolongar el tiempo de residencia del fármaco en el organismo, así como controlar su liberación. Todo ello implica disminuir la frecuencia de tomas e, indirectamente aumentar el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.

En general, se puede concluir que las principales ventajas de las cápsulas son:

- ◆ Ofrecer una protección al material y/o fármaco encapsulado de su eventual degradación en las condiciones de almacenamiento y/o biológicas.
 - ◆ Permitir perfiles de liberación constantes en el tiempo, sin necesidad de administraciones repetidas.
-

En la Figura 1.4 se muestra el perfil de liberación de los fármacos tradicionales (pastillas e inyecciones) que aumenta después de cada administración, y decrece hasta la siguiente dosis. El punto clave en la administración de fármacos tradicional es que el nivel en sangre del agente activo debe permanecer entre un valor máximo, que representa el nivel tóxico, y un nivel mínimo, por debajo del cual el fármaco no es efectivo. En los sistemas de liberación controlada el nivel del fármaco en sangre sigue el perfil mostrado en la Figura 1.4. permaneciendo constante entre los niveles máximos y mínimos deseados, durante un largo periodo de tiempo (Del Valle, E.M. et al., 2009).

(Del Valle, E.M. et al., 2009)

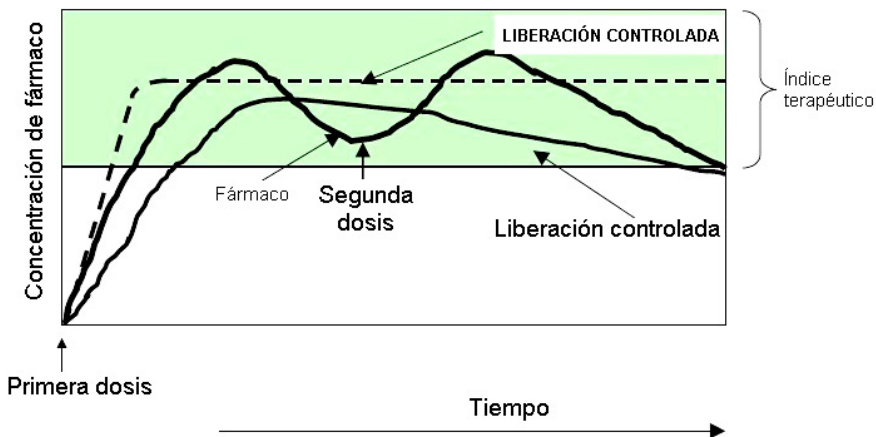


Figura 1.4. Perfil de liberación en sangre de un fármaco

Dentro de las aplicaciones de la encapsulación una de las más prometedoras es la basada en la inmovilización de las células, tejidos o enzimas en estructuras poliméricas, con el fin de sustituir parcial o totalmente tejidos u órganos dañados o disfuncionales, así como desarrollar un sistema farmacéutico que permita la liberación continua y controlada de productos terapéuticos. De esta forma, el espectro de aplicación de esta tecnología

abarca un gran número de patologías (Herrero et al., 2007; Broeckx et al., 2003):

- **Enfermedades del sistema nervioso central:** Alzheimer, Parkinson, Enfermedad de Huntington.
- **Alteraciones endocrinas:** Enanismo, Hipoparatiroidismo, etc.
- **Cáncer.**
- **Desarrollo de órganos bioartificiales:** Diabetes, cirrosis, etc.
- **Otros:** Hemofilia, anemia, etc.

En concreto, las células madre son células con capacidad de semi-renovación ilimitada y prolongada que pueden dar lugar, como mínimo, a un tipo de células hijas altamente diferenciadas. Algunas células madre son capaces de iniciar su diferenciación para dar lugar a cualquier tipo celular especializado del organismo adulto. Las células madre se encuentran en embriones y también en una gran variedad de tejidos adultos, de donde pueden ser aisladas, cultivadas, manipuladas y reimplantadas. Las células madre pueden conducir al tratamiento de importantes enfermedades, ya que pueden diferenciarse en células musculares cardíacas (infartos), neuronas (Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas), células productoras de insulina (diabetes), etc., permitiendo conseguir, al menos en modelos animales, elementos sustitutivos para los tejidos dañados (Benita, 1996).

La inclusión de células madre terapéuticamente activas en sistemas de microencapsulación, asegura tanto la protección mecánica como el inmunoaislamiento del injerto, esto es, el enmascaramiento frente a la respuesta inmune del huésped y consecuentemente su actividad a largo plazo. Además, una vez implantadas las células secretaran el producto de novo, lográndose un tratamiento más fisiológico y efectivo (Herrero et al., 2007; Galán et al., 2005; Broeckx et al., 2003).

En la Tabla 1.1. se recoge un resumen de las principales líneas celulares inmovilizadas en microcápsulas poliméricas y sus aplicaciones terapéuticas más importantes (Pedraz et al., 2004).

Tabla 1.1. Principales líneas celulares inmovilizadas y sus correspondientes aplicaciones terapéuticas

Línea celular	Aplicaciones terapéuticas
Fibroblastos	Cáncer, Enf. Metab., SNC, Enf. Genéticas
Mioblastos	Cáncer, Enf. Metab., SNC, Enf. Genéticas
Células renales	Cáncer, Hemofilia, SNC
Islotes de Langerhans	Diabetes
Células ováricas	Enfermedad de Fabry
Células paratifoideas	Hipoparatiroidismo
Hepatocitos	Transplante de hígado
Condriocitos	Regeneración de hueso y cartílago
Células de Leydig	Reemplazamiento hormonal
Células adrenales cromafines	Enfermedad de Parkinson, Dolor Crónico
Células madre	Regeneración de hueso, SNC, Enf. Endocrinas
PC12 feocromocitoma	Enfermedad de Parkinson
Mieloma	Factor de crecimiento hepático
Hibridoma	Cáncer, producción de anticuerpos
Células tumorales	Vacuna antitumoral, interleuquinas
Células de retina	Enfermedad de Parkinson
Células productoras vect. virales	Cáncer
Bacterias	Eliminación de urea

(Abreviaturas: Enf.: enfermedad; SNC: sistema nervioso central; Metabólico: Metabólicas; Vect: vectores)

Por otra parte, a diferencia de otras alternativas biomédicas actuales en estudio, como la terapia génica in vivo, la tecnología de encapsulación celular no altera el genoma del huésped, lo que ofrece unas mayores garantías para su uso clínico.

Finalmente, la gran versatilidad de esta estrategia permite que las células encapsuladas puedan emplearse tanto para tratamientos localizados (tumores sólidos), regionales (cerebro) como sistémicos (diabetes) (Angelova et al., 1999; Benita, 1996; De Vos et al., 2002; Orive et al., 2003; Orive et al., 2004; Tseng et al., 1997).

1.2. ANTECEDENTES RELATIVOS A LA MICROENCAPSULACIÓN

Un hecho destacable del proceso de microencapsulación radica en que su aplicación no se limita únicamente al campo de los medicamentos o sustancias biológicas, sino que se extiende a campos tan diversos como la alimentación, la agricultura, la industria textil, la cosmética y la construcción. De hecho, el origen de la microencapsulación data del año 1931, en el que se publicó un trabajo que describía la formación de microcápsulas de gelatina según un procedimiento que ya en aquel momento recibió la denominación de “coacervación”. Esta técnica fue objeto de múltiples variaciones durante los años 40, y su aplicación más importante fue dirigida a la encapsulación de colorantes para la elaboración del papel de calco (Benita, 1996).

Aplicaciones posteriores se centraron en el campo de la alimentación, por ejemplo para la encapsulación de aromas, vitaminas, sabores, etc., con el objetivo de (Popplewell et al., 1995):

- Impedir su pérdida, que en el caso de la encapsulación de sabores reduce su volatilidad, alargando sensiblemente la vida media del producto.
- Protegerlos de:
 - La reacción con otros compuestos presentes en el alimento.
 - La oxidación debido a la luz o al oxígeno.
 - El Calor y la humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad.
 - Los malos olores y sabores, mejorando su sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia externa.
- Obtener mejores características sensoriales y nutricionales debido a su liberación controlada.

La microencapsulación ha sido también empleada en la agricultura, especialmente para la encapsulación de pesticidas y fertilizantes (Fanger, 1974; Popplewell et al., 1995; Mathiowitz et al., 1999). Los pesticidas son encapsulados con el objetivo de ser liberados de forma controlada a lo largo del tiempo, permitiendo a los agricultores aplicar los pesticidas con menor frecuencia y minimizar la cantidad empleada.

Además de los sectores mencionados anteriormente, la industria textil hace uso de los materiales microencapsulados con el fin de mejorar las propiedades de los productos finales.

Las enormes posibilidades que surgen de la aplicación de las cápsulas en el ámbito textil han propiciado la aparición del término “textiles inteligentes” por las capacidades que es capaz de dotar a los mismos. Es posible obtener tejidos ampliamente funcionales, con características hasta ahora impensables para los mismos, derivadas de la naturaleza de los agentes contenidos en el núcleo de las microcápsulas. Algunos de los agentes inmovilizados son, entre otros, perfumes, productos terapéuticos y cosméticos (productos hidratantes, ambientadores, tonificantes), bactericidas, repelentes antimosquitos, acaricidas, combinaciones de ingredientes (perfume + bactericida), pigmentos cuyo color cambia con la temperatura (foto y termocromismo), agentes resistentes al fuego, agentes para la protección a las radiaciones ultravioleta, materiales de cambio de fase (o PCMs) para la adaptación al clima (Parys, M.C., 2006).

Las aplicaciones de la microencapsulación llegan hasta el campo de los materiales de construcción de edificios. Con esta tecnología se han conseguido mejoras en los materiales de construcción, tales como, protección contra el fuego, resistencia a las bajas temperaturas, aislamiento térmico y acústico, control de temperatura, protección contra la corrosión, etc. (Boh et al., 2008).

Sin embargo, a pesar de que la microencapsulación está siendo empleada en los campos anteriormente mencionados, la biomedicina es donde esta tecnología está teniendo una mayor relevancia y desarrollo debido a su mayor repercusión social, ya que los avances biomédicos revierten en el tratamiento de importantes enfermedades.

La idea de microencapsular medicamentos surgió a mediados de la década de los 50, cuando una compañía farmacéutica (*Smith Kline y French Ltd.*) introdujo esta tecnología con la finalidad de conseguir una liberación sostenida o prolongada en el tiempo de los medicamentos. Uno de los primeros medicamentos microencapsulados, recogidos en la bibliografía, fue la aspirina con la intención de prevenir la irritación gástrica así como conseguir una liberación controlada del fármaco. Sin embargo, aunque la aplicación de la microencapsulación al campo de los medicamentos se produjo ya avanzados los años 50, lo cierto es que su difusión fue muy rápida, llegando a ser paulatinamente una tecnología muy utilizada en la industria farmacéutica, debido a los beneficios que conlleva, al producir un tratamiento más efectivo en el tratamiento de las enfermedades (Fanger, 1974; Popplewell et al., 1995; Mathiowitz et al., 1999).

Además de la aplicación de la microencapsulación en la liberación controlada de fármacos, en las últimas décadas se están desarrollando importantes avances biotecnológicos en este campo que han permitido la sustitución y regeneración de órganos y tejidos dañados. La microencapsulación de células, dentro de membranas poliméricas, ayuda a superar las dificultades provocadas por el rechazo producido en el transplante de órganos. La membrana semipermeable evita la penetración de moléculas de alto peso molecular, tales como los anticuerpos, y otras moléculas inmunológicas activas, dentro de las cápsulas, impidiendo así el contacto con las células encapsuladas. Además, permite la entrada de nutrientes y oxígeno, y la salida

de los productos terapéuticos segregados por la células inmovilizadas (Herrero et al., 2007).

Una de los primeros ejemplos de células transplantadas en membranas inmunoprotectoras para la sustitución de órganos dañados se produjo en 1933, cuando Bisceglie inmovilizó células tumorales en una membrana polimérica y las transplantó en la cavidad abdominal de cerdos. Los resultados experimentales mostraron que las células sobrevivieron lo suficiente como para poder concluir que estas no fueron destruidas por el sistema inmunológico (Bisceglie, 1933).

Una década más tarde, Algire observó que la encapsulación de cualquier tipo de injerto, previa a su trasplante, retrasaba notablemente la aparición de una respuesta inmune de rechazo (Algire, 1943).

Treinta años después, Chang introdujo la idea de usar la encapsulación para la inmunoprotección de células transplantadas (Chang, 1964). Esto fue puesto en práctica satisfactoriamente en los años setenta y ochenta para la inmovilización de un injerto de células de islote pancreático que ayudaba en el control de glucosa en la diabetes en pequeños modelos animales (Chick et al., 1975; Lim et al., 1980).

Actualmente, el trasplante de células en membranas inmunoprotectoras está siendo objeto de estudio para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, entre las que se encuentran, la hemofilia B (Liu et al., 1993), la anemia (Koo et al., 1993), el enanismo (Chang et al., 1993), la insuficiencia renal (Cieslinski et al., 1994), la insuficiencia hepática (Uludag et al., 1993), la pituitaria (Aebischer et al., 1986), las insuficiencias del sistema nervioso central (Aebischer et al., 1994), y la diabetes mellitus (Lim et al., 1980).

Por tanto, la microencapsulación de células representa una alternativa en el desarrollo de sistemas médicos que liberen de forma controlada el producto terapéutico y un hito en el trasplante de tejidos sin el requerimiento de las dosis habituales de inmunosupresores. Los avances llevados a cabo en los

últimos años en animales de experimentación han dado lugar a un amplio número de ensayos clínicos (Pedraz et al., 2004), tal y como se resume en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Ensayos clínicos realizados en los últimos años con la tecnología de la microencapsulación de células

Autores	Año	Aplicación	Producto terapéutico
Soon Shiong et al.	1994	Diabetes	Insulina
Circe Biomedical Hepatassist®	1995	Cirrosis hepática	-
Aebischer et al.	1996	EAL	CNTF
Vitagen, Hepatix®	1996	Cirrosis hepática	-
Buschner et al.	1996	Dolor crónico	Catecolaminas
Hasse et al.	1997	Hipoparatiroidismo	Hormona paratiroidea
Lörh et al.	1999	Cáncer pancreático	Proteína CYP2B1
Bachoud-Levi et al.	2000	Enf. De Huntington	CNTF
Titan Pharmaceuticals®	2001	Parkinson	Dopamina
Neurotech®	2003	Retinitis Pigmentosa	CNTF
Calafiore et al.	2003	Diabetes	Insulina
Aebischer et al.	2004	Parkinson	GNTF
Aebischer et al.	2004	Anemia	EPO

(Abreviaturas: EAL: esclerosis amiotrófica lateral; CNTF: factor neurotrófico ciliar; Enf.: enfermedad; GNTF: factor neurotrófico derivado de células gliales; EPO: eritropoyetina.)

El interés en esta herramienta biotecnológica ha llegado también al sector industrial en el que un destacable número de compañías farmacéuticas y biotecnológicas han apostado en el empleo de sistemas de inmovilización de células para tratar patologías tan dispares como la diabetes, la retinitis pigmentosa, enfermedades del sistema nervioso central o diabetes. El avance

continuo de disciplinas científicas como la ingeniería química, la genética, la biología y la tecnología farmacéutica, pronostican que la tecnología de encapsulación de células podrá, en un futuro, ser empleada eficazmente en el tratamiento de muchas de las enfermedades con más repercusión social y económica (Pedraz et al., 2004).

1.3. ENFOQUE, OBJETIVOS Y MOTIVACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

En este apartado se describen el enfoque y el objetivo global de esta tesis doctoral. A continuación, una vez enmarcado el problema de partida, se detallarán los objetivos parciales de cada uno de los capítulos en los que se divide el trabajo de investigación.

1.3.1. Enfoque del problema de partida y objetivo global

La terapia celular es uno de los ámbitos más prometedores dentro de la biomedicina que tiene como objetivo principal reemplazar, reparar, o mejorar la función de un tejido u órgano dañado. Para asegurar el éxito de esta técnica se requiere la puesta en común de diferentes áreas de conocimiento tales como, la biología celular, la inmunología, la ingeniería de tejidos, la ingeniería química, la biología molecular, los biomateriales, la biología de trasplantes, la medicina regenerativa, y la investigación clínica. Esta disciplina puede considerarse, sin duda, como una nueva plataforma terapéutica para el tratamiento de un gran número de trastornos clínicos. (Herrero et al., 2007).

Actualmente, existen varios factores que complican el desarrollo normal de la terapia celular, siendo el más importante la protección de las células implantadas del sistema inmunitario del huésped para evitar su fagocitación.

Un posible remedio al inmuno-rechazo es la administración regular de una combinación de inmunosupresores. Sin embargo, estos compuestos generan graves efectos secundarios, tales como la aparición de infecciones oportunistas y el desarrollo de neoplasias malignas. La toxicidad directa que se deriva de estos medicamentos constituye uno de los mayores problemas que afectan a la supervivencia y a la calidad de vida del paciente, y conduce

a graves patologías como la hipertensión arterial, la hiperlipidemias, la diabetes mellitus, la insuficiencia renal irreversible y la pérdida de masa ósea (Del Castillo-Olivares, 1998; Herrero et al., 2007).

La solución a este problema puede ser la inclusión de las células terapéuticamente activas en microcápsulas con membranas semi-permeables (Figura 1.5.), que aseguran tanto la protección mecánica como el inmunoaislamiento del injerto. Es decir, la membrana protectora ayuda a evitar que se produzca la fagocitación del material terapéutico encapsulado por parte del sistema inmunitario del huésped, asegurando consecuentemente su actividad a largo plazo. Esta membrana permite la entrada de nutrientes y de oxígeno, la salida de los productos de desecho, y la de los factores terapéuticos producidos por las células que permitirán el tratamiento de la enfermedad (Angelova, 1999; Benita, 1996; De Vos et al., 2002; Orive et al., 2003; Orive et al., 2004).

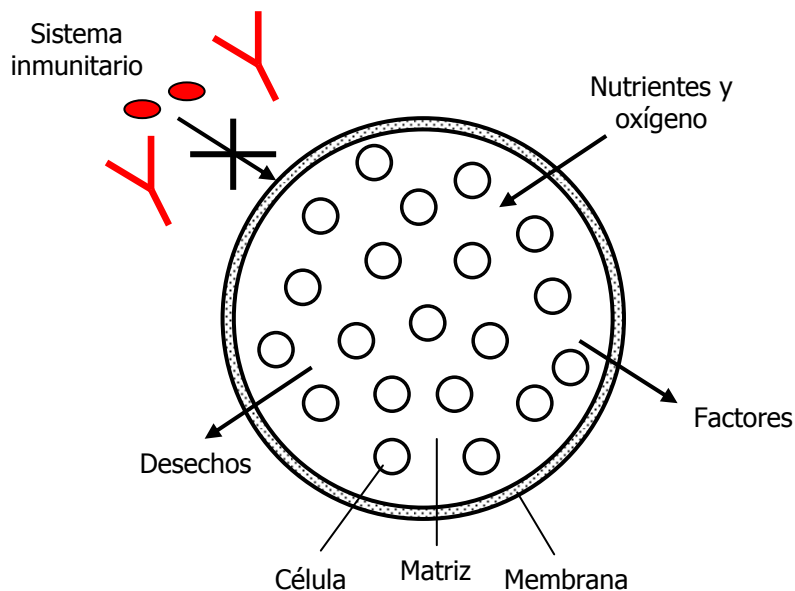


Figura 1.5. Esquema de una microcápsula

Esta tesis doctoral está incluida dentro del proyecto de ingeniería biomédica, desarrollado por el Laboratorio de Encapsulación, Fluidos Supercríticos y Separación de Afinidad de la Universidad de Salamanca, dirigido por los doctores Eva M. Martín Del Valle y Miguel A. Galán Serrano, ambos con experiencia en el desarrollo de procesos de encapsulación y liberación de fármacos.

En este proyecto existen, actualmente, dos líneas de investigación abiertas, coordinadas con diversas instituciones biomédicas de Salamanca y León, que tienen como elemento común el desarrollo de una técnica de generación de microcápsulas eficaz para el tratamiento de diversas enfermedades mediante terapia celular.

Línea de investigación 1:

En esta línea de investigación, desarrollada con la colaboración del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, y los servicios de Hematología y Patología del Hospital Universitario de Salamanca, se pretende desarrollar una técnica efectiva para la encapsulación de diferentes líneas celulares, tales como, células madre mesenquimales, células monoclonales, y monocitos. Dichas microcápsulas se emplearán en el tratamiento de:

- ✓ *La esclerosis múltiple, una enfermedad desmielinizante, neurodegenerativa, crónica y no contagiosa del sistema nervioso central.*

Teniendo en cuenta que el sistema nervioso central de un mamífero adulto es prácticamente incapaz de regenerar espontáneamente las estructuras dañadas tras una lesión, están siendo investigadas diferentes estrategias para el tratamiento de esta enfermedad, siendo el enfoque actual el trasplante de diferentes líneas celulares (células madre mesenquimales, monocitos y células monoclonales) que producen factores

tróficos terapéuticos en el lugar dañado (Genain et al., 1995; Linington et al., 1988; Pluchino et al., 2003; Weisser et al., 1998).

Por tanto, se pretende proceder a la encapsulación de células madre adultas, células monoclonales y monocitos, que produzcan los factores terapéuticos que permitan la reparación de las lesiones producidas en un modelo experimental de esclerosis múltiple.

- ✓ *Las enfermedades pulmonares generadas por la falta de formación o destrucción de los tabiques alveolares, entre las que se encuentran la displasia broncopulmonar (DBP), el enfisema y la fibrosis pulmonares.*

La reparación de procesos crónicos en el pulmón se produce generalmente por cicatrización, teniendo este órgano una capacidad regenerativa muy limitada. La regeneración alveolar por neoformación de los tabiques alveolares sería una terapia novedosa e importante, sin embargo, es difícil de conseguir en los diferentes modelos experimentales propuestos hasta el momento (Burri et al., 1974; Cegielski et al., 2004; Massaro et al., 1985; Massaro et al., 1986; Pedraz et al., 1995).

Por tanto, se pretende desarrollar un procedimiento terapéutico, basado en la administración en pulmón mediante aerosoles de microcápsulas, que contengan células madre adultas, células monoclonales y monocitos, con el propósito de inducir la retabicación pulmonar.

Así, las microcápsulas generadas por el Laboratorio de Encapsulación, Fluidos Supercríticos y Separación de Afinidad serán suministradas a los grupos colaboradores para su administración en ratas con el objetivo de conseguir modelos experimentales terapéuticos (Figura 1.6.).

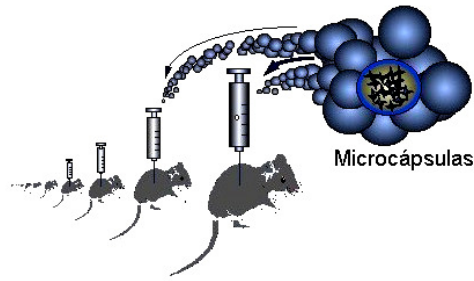


Figura 1.6. Administración de las microcápsulas en animales

Línea de investigación 2:

Esta línea de investigación está siendo desarrollada en colaboración con el Banco de Tejidos de la Fundación Clínica San Francisco de León, la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, los Servicios de Cirugía Torácica y Anatomía Patología del Hospital Universitario de Salamanca.

La neumonectomía (resección de todo un pulmón) es una técnica quirúrgica utilizada sobre todo en el tratamiento del carcinoma pulmonar, y más raramente, en el de otras patologías no tumorales, como la tuberculosis o las bronquiectasias. A pesar de una cuidadosa selección preoperatoria, los pacientes neumonectomizados en nuestro país siguen presentando tasas altas de mortalidad precoz (9,1%) y morbilidad (36,3%), siendo la fístula broncopleurales postneumonectomía (FBPN) una de las complicaciones postoperatorias más graves y difíciles de resolver (Jiménez et al., 2006).

Uno de los enfoques que ha obtenido un mayor éxito en el tratamiento de esta complicación quirúrgica es la reparación de tejidos mediante sistemas poliméricos que contienen diferentes líneas celulares (Novoa et al., 2008). Así, según los trabajos realizados hasta ahora es posible postular que la cobertura del muñón bronquial con un injerto tisular de fibroblastos (Goto et al., 1999; Yancopoulos et al., 2000), y diferentes factores terapéuticos, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Nillesen et al.,

2007) y el factor de crecimiento fibroblástico (bFGF) (Nillesen et al., 2007), reducen el riesgo de muerte pos-operativa por fístula broncopleural tardía pos-neumonectomía.

En este trabajo, se pretende desarrollar una tecnología efectiva de liberación dual mediante films bifásicos poliméricos suturables, que contengan tanto fibroblastos y factores terapéuticos como microcápsulas con células y factores inmovilizados. Para conseguir esto, primeramente se procederá a desarrollar una técnica de generación de microcápsulas que permita el desarrollo de este sistema de liberación dual.

1.3.2. Objetivos particulares por capítulos.

El objetivo principal de este trabajo es **DESARROLLAR, CARACTERIZAR Y MODELAR UNA NUEVA TÉCNICA DE GENERACIÓN DE MICROCÁPSULAS CON APLICACIÓN FINAL EN DIFERENTES CAMPOS BIOMÉDICOS**. Para ello, esta tesis doctoral se divide en ocho partes diferenciadas, pero a su vez relacionadas entre si:

- *Desarrollo y caracterización de una nueva técnica de generación de microcápsulas (capítulo 2).*

En este capítulo se realizará una exhaustiva revisión bibliográfica de los principales métodos de generación de microcápsulas existentes, después de la cual se podrá concluir que no existe una técnica descrita que permita obtener microcápsulas con un tamaño de 20-50 μm (Benita, 1996; Galán et al., 2005; Segiura et al., 2005; Senuma et al, 1999; Senuma et al., 2000; Serp et al., 2000) y sin la utilización de condiciones que podrían ser tóxicas para el material activo contenido en la matriz polimérica de la microcápsula, como por ejemplo, el contacto con un disolvente orgánico y/o calentamiento duran-

te el proceso (Benita, 1996; Burgess et al., 1987; Galán et al., 2005; Mi et al., 1999).

Por tanto, es necesario el desarrollo de una nueva técnica de generación de microencápsulas con tamaños comprendidos entre 20-50 micras, y que no dañe el material inmovilizado en las mismas, ya que se pretende tratar las siguientes patologías:

- La esclerosis múltiple mediante la administración de microcápsulas, a través de inyecciones Hamilton, en los modelos animales.
- La displasia broncopulmonar, el enfisema y la fibrosis pulmonares mediante el depósito en pulmón a través de aerosoles de microcápsulas.
- La fístula broncopleural post-neumonectomía mediante sistemas de liberación dual con microcápsulas que puedan ser inmovilizadas en films bifásicos poliméricos suturables.

Asimismo, se realizará una revisión bibliográfica de los principales materiales de encapsulación de la cual se elegirán los materiales que tengan mejores propiedades de biocompatibilidad y atoxicidad.

La técnica desarrollada estará basada en la generación de gotas a través de procesos de atomización y en su estabilización posterior mediante la reacción de gelificación iónica.

Una vez desarrollada la técnica se pasará a la caracterización de la instalación, de tal forma que se pueda conocer el efecto de las diferentes variables que afectan al proceso de generación de las microcápsulas.

Por tanto, los objetivos particulares de este capítulo son:

- Desarrollo y puesta en marcha de una técnica de producción de cápsulas con un tamaño de entre 20-50 μm basada en la generación de gotas a través de procesos de atomización neumática y su posterior estabilización mediante reacciones de gelificación iónica.
- Estudio de las variables, que afectan el proceso de atomización (caudal del líquido y del aire, y viscosidad del líquido), en el tamaño de las microcápsulas. Para ello, se construirán las curvas de comportamiento del sistema.
 - *Desarrollo de un modelo semi-empírico para la predicción del tamaño de las microcápsulas (capítulo 3).*

Una vez desarrollada y caracterizada la técnica de producción de microcápsulas es necesario desarrollar un modelo semi-empírico, a partir de los principales parámetros que influyen en el proceso (caudal de aire y líquido y viscosidad del líquido), de tal forma que se pueda predecir el tamaño de las microcápsulas sin necesidad de realizar experimentación. El modelo que se pretende desarrollar tendrá como base la teoría de ondas, que explica el mecanismo de ruptura de un chorro líquido en gotas mediante el proceso de atomización. El tamaño de las microcápsulas será expresado en términos de diferentes grupos adimensionales que influyen en el proceso de atomización. Para ello, se llevarán a cabo diferentes experimentos variando el caudal de líquido y de aire, así como la viscosidad del líquido para la obtención experimental del tamaño de partícula, que permitirá el estudio del proceso de atomización y la posterior obtención del modelo semi-empírico. Para generar el modelo, se determinará la dependencia exponencial de los números adimensionales que influyen en el proceso de atomización con el tamaño de las microcápsulas.

Los objetivos particulares de este capítulo son:

- Desarrollo de un modelo semi-empírico para predecir el tamaño de las microcápsulas producidas a partir de la teoría de ondas y de los datos experimentales obtenidos.
 - Comparación de los datos teóricos obtenidos del modelo con los datos experimentales para comprobar el ajuste de los datos al modelo propuesto.
- *Estudio de inestabilidad para hojas líquidas de un polímero producidas por atomización neumática (capítulo 4).*

Una vez desarrollada, caracterizada y modelizada la técnica para la generación de microcápsulas, es necesario estudiar y modelar la inestabilidad que provoca la ruptura de la hoja líquida del polímero en pequeñas gotas debido al proceso de atomización, para conocer mejor el comportamiento del sistema. Se quiere determinar el efecto de las diferentes variables (caudal de líquido y de aire y viscosidad del líquido) que afectan al proceso de atomización en la inestabilidad de la hoja líquida, ya que la máxima inestabilidad generará el menor tamaño de partícula.

Los objetivos particulares de este capítulo son:

- El desarrollo de un análisis de estabilidad temporal para modelar la atomización de una hoja líquida viscosa anular con componentes tangenciales, que surge de un atomizador neumático sujeto a corrientes internas y externas de aire no viscosas y con componentes tangenciales. Con este estudio se obtendrá la ecuación de dispersión adimensional que gobierna la inestabilidad del sistema.
- La obtención de las soluciones numéricas de la ecuación de dispersión bajo un amplio intervalo de condiciones de flujo.

- El comportamiento teórico predicho por el modelo de inestabilidad será comparado con los resultados experimentales obtenidos a partir de un atomizador neumático.
 - *Predicción del tamaño de cápsulas a partir del modelo de inestabilidad (capítulo 5).*

Con el análisis temporal de estabilidad desarrollado previamente se obtiene una predicción del comportamiento del sistema, sin embargo, no se obtiene una predicción del tamaño final de las microcápsulas generadas. En este apartado se pretende predecir el tamaño final de las cápsulas a partir de los dos parámetros característicos del modelo de inestabilidad, la máxima relación de crecimiento y su correspondiente número de onda más inestable, teniendo en cuenta los mecanismos de atomización primaria y secundaria.

Los objetivos particulares de este capítulo son:

- El desarrollo de una serie de ecuaciones que permitan obtener el tamaño final teórico de las cápsulas generadas según la tecnología desarrollada en el Capítulo 2, a partir de los parámetros teóricos obtenidos mediante el modelo de inestabilidad del Capítulo 4, teniendo en cuenta la atomización primaria y secundaria.
- El tamaño teórico de las cápsulas predicho será comparado con los resultados experimentales obtenidos en el Capítulo 2.
 - *Estudios de transferencia de materia (capítulo 6).*

Con el objetivo de conocer el comportamiento de las microcápsulas en el cuerpo humano para su utilización en futuras aplicaciones biomédicas, se realizarán diferentes estudios “in vitro” teóricos y experimentales de transferencia de materia. Estos se llevarán a cabo tanto en continuo como en discon-

tinuo para asegurar y conocer las condiciones de la liberación de sustancias inmovilizadas en el interior de las cápsulas a través de los poros de las mismas.

Para realizar los estudios de transferencia de materia se utilizará un método de perturbación simple mediante la encapsulación de una sustancia que se encuentra disponible en diversos pesos moleculares, la Rodamina B Iso-tiocianato Dextrano (RBID). Al ser una sustancia coloreada permite el seguimiento de su liberación empleando espectrofotometría, y al estar disponible en diversos pesos moleculares permite simular los diferentes tipos de moléculas, de diversos tamaños, que son de interés para los proyectos de investigación.

Los objetivos particulares de este capítulo son:

- Estudios de transferencia de materia “in vitro” en sistemas en continuo y discontinuo que permitan obtener los perfiles de liberación concentración - tiempo para diferentes condiciones experimentales (peso molecular de RBID y concentración de alginato).
- Desarrollo de modelos matemáticos para los sistemas estudiados que permitan predecir la transferencia de materia de microcápsulas que contienen un activo de un determinado peso molecular encapsulado. Los modelos se desarrollarán con el fin de simular el comportamiento real en el organismo humano.

➤ *Aplicación I: inmovilización de células (capítulo 7).*

En esta tesis, la técnica desarrollada se aplicará para la inmovilización de células madre mesenquimales y monocitos con el objetivo de conseguir un futuro tratamiento de la esclerosis múltiple, mediante terapia celular.

Una vez inmovilizadas las células, se procederá a determinar la viabilidad y proliferación celular dentro de las microcápsulas.

Los objetivos particulares de este capítulo son:

- Inmovilización de diferentes líneas celulares mediante la técnica desarrollada.
- Estudios de viabilidad y proliferación celular dentro de las microcápsulas.

➤ *Aplicación II: reconocimiento de proteínas (capítulo 8).*

Se pretende desarrollar una nueva técnica de reconocimiento de proteínas. El objetivo específico es producir polímeros de reconocimiento molecular que sirvan para el diagnóstico de enfermedades en aplicaciones biomédicas, así como para la detección en la industria alimentaria. En concreto, se quiere utilizar esta tecnología para el diagnóstico precoz de la esclerosis múltiple a través del reconocimiento de una proteína denominada osteopontina. Debido al elevado precio de esta proteína, se utilizará la albúmina de suero bovino, de características similares a la osteopontina, pero de precio mucho más razonable, para la simulación del proceso.

El objetivo particular de este capítulo es:

- Desarrollo de una nueva técnica de reconocimiento molecular empleando las cápsulas generadas en este trabajo, de tal forma que sea compatible con las ciencias de la vida, y pueda ser aplicada en el diagnóstico de enfermedades, entre otras aplicaciones.

- *Aplicación III: desarrollo de films bifásicos para un posible tratamiento de la fístula broncopleuraleal postneumonectomía (capítulo 9).*

La técnica desarrollada en este trabajo tiene múltiples aplicaciones. Además de la inmovilización celular y el reconocimiento molecular, estas microcápsulas se pueden aplicar en el desarrollo de sistemas de liberación dual mediante films bifásicos poliméricos suturables que contengan tanto células y factores terapéuticos libres, como microcápsulas con factores inmovilizados en su interior, para un posible tratamiento de la fístula broncopleuraleal postneumonectomía.

Los objetivos particulares de este capítulo son:

- Desarrollo de una nueva técnica de liberación dual mediante films bifásicos biocompatibles suturables con microcápsulas en su interior que puedan ser aplicados en un posible tratamiento de la fístula broncopleuraleal postneumonectomía.
- Inmovilización de células y factores de crecimiento en el nuevo sistema de liberación dual desarrollado.
- Estudios de viabilidad y proliferación celular.

1.4. BIBLIOGRAFÍA

- Aebischer, P., Rusell, P.C., Christenson, L., Panol, G., Monchik, J.M., Galletti, P.M. (1986), “A bioartificial parathyroid, Transplanting ASAIO 32, 134-137.
- Aebischer, P., Goddard, M., Signore, A.P., Timpson, R.L. (1994), “Functional recovery in hemiparkinsonian primates transplanted with polymer-encapsulated PC12 cells”, *Experimental Neurology*, **126(2)**, 151-158.
- Algire, G. H. (1943), “An adaptation of the transparent chamber technique to the mouse”, *J. Natl. Cancer Inst.*, **4**, 1-11.
- Angelova, N., Hunkeler, D. (1999), “Rationalizing the design of polymeric biomaterials”, *Trends Biotechnol.*, **17**, 409-421.
- Benita, S. (1996), “Microencapsulation methods and industrial applications”, *Marcel Dekker, New York*.
- Bisceglie, V. (1933), “Über die antineoplastische immunitat; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Huhnner-embryonen. *Ztschr*”, *Krebsforsch.* **40**, 122-140.
- Boh, B., Sumiga, B. (2008), “Microencapsulation technology and its applications in building construction materials”, *Materials and Geoenvironment*, **55(3)**, 329-344.
- Broeckx, W. A. M., Del Valle, E. M. (2003), Patent, priority Date: 01-08-2003. ”Microcapsules”. Filled number: 03254825.7, Priority country: U. S. A., owner: Procter & Gamble, Company.

- Burgess, D.J., Davis, S.S., Tomlinson, E. (1987), “Potential use of albumin microspheres as a drug delivery system. I. Preparation and in vitro release of steroids”, *Int. J. Pharm.*, **39**, 129-136.
- Burri, P.H., Dbaly, J., Webel, E.R. (1974), “The postnatal growth of the rat lung. I”, *Morphometry. Anat. Rec.*, **178**, 711-730.
- Cegielski, M., Calkosinski, I., Dziegiel, P., Zabel, M. (2004), “The search for stem cells of the epithelium in pulmonary alveoli”, *Folia Morphol.*, **63**(2), 221-223.
- Chang., T.M.S. (1964), “Semipermeable microcapsules”, *Science*, **146**, 524-525.
- Chang, P.L. Shen, N. Westcott, A.J. (1993), “Delivery of recombinant cells in vivo”, *Human Gene Therapy*, **4**, 433-440.
- Chick, W. L., Like, A.A., Lauris, V. (1975), “Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas”, *Science*. **187**, 847-848.
- Cieslinski, D.A., Humes, H.D. (1994), “Tissue engineering of a bioartificial kidney”, *Biotechnol. Bioeng.*, **43**(7), 678-681.
- Couvreur, P., Puisieux, F. (1993), “Nano- and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins”, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **10**, 141-162.
- Dai, C., Wang, B., Zhao, H. (2005), “Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system”, *Colloids Surf., B*, **41**, 117-120.

- De Vos, P., Hamel, A.F., Tatarkiewicz, K. (2002), “Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets”, *Diabetología*, **45**, 159-173.
- Del Castillo-Olivares, J.L. (1998), “Introducción al trasplante de órganos y tejidos”, *ARAN ediciones S.A.*
- Del Valle, E.M.M., Galán, M.A., Carbonell, R.G. (2009), “Drug delivery technologies: the way forward in the new decade”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **48(5)**, 2475-2486.
- Fanger, G.O. (1974), “Microencapsulation”, *Plenum Press*, New York.
- Galán, M.A., Ruiz, C.A., Del Valle, E.M. (2005), “The encapsulation art: applications and scale up”. En “Chemical Engineering: Trends and Developments (Galán et al.)”, *John Wiley & Sons*.
- Genain, C.P. Nguyen, N.H., Letvin, N.L., Pearl, R., Davis, R.L., Adelman, D.M., Lees, M.B., Linington, C., Hauser, S.L. (1995), “Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in nonhuman primate”, *J. Clin. Invest.*, **96**, 2966-2974.
- Goto, Y., Noguchi, Y., Nomura, A., Sakamoto, T., Ishii, Y., Bitoh, S., Picton, C., Fujita, Y., Watanabe, T., Hasegawa, S., Uchida, Y. (1999), “In vitro reconstitution of the tracheal epithelium”, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **20**, 312-318.
- Herrero, E.P., Del Valle, E.M., Galán, M.A. (2007), “Modelling prediction of the microcapsule size of polyelectrolyte complexes produced by atomization”, *Biotechnol. Prog.*, **23**, 940-945.

- Jiménez, M.F., Varela, G., Novoa, N., Aranda, J.L. (2006), “La lobectomía broncoplástica frente a la neumonectomía en el tratamiento del carcinoma de pulmón no microcítico”, *Arch. Bronconeumol.*, **42**, 160-164.
- Koo, J., Chang, T.M.S. (1993), “Secretion of erythropoietin from microencapsulated rat kidney cells”, *Intl. J. Artificial Organs*, **16**, 557-560.
- Lim, F., Sun, A.M. (1980), “Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas”. *Science*. **210**, 908-910.
- Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C., Vass, K., (1988), “Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein”, *Am. J. Pathol.*, **130**, 433-454.
- Liu, H.W., Ofosu, F.A., Chang, P.L. (1993), “Expression of human factor IX by microencapsulated recombinant fibroblasts”, *Hum. Gene Ther.*, **4**, 291-301.
- Massaro, G.D., Teich, N., Maxwell, S., Massaro, G.D. Whitney, P. (1985), “Postnatal development of alveoli: regulation and evidence for a critical period in rata”, *J. Clin. Invest.*, **76**, 1297-1305.
- Massaro, D., Massaro, G.D. (1986), “Dexamethasone accelerates postnatal alveolar wall thinning and alters wall composition”, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **251**, 218-224.

- Mathiowitz, E., Kreitz, M.R., Brannon-Peppas, L. (1999), “Microencapsulation”. En “Encyclopaedia of Controlled Drug Delivery (Mathiowitz, E.)”, **Volume 2**, New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Mi, F-L, Wong, T-B, Shyu, S-S, Chang, S-F (1999), “Chitosan microspheres: modification of polymeric chem-physical properties of spray-dried microspheres to control the release of antibiotic drug”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **71**, 747-759.
- Nillesen, S.T., Geutjes, P.J., Wismans, R., Schalkwijk, J., Daamen, W.F., van Kuppevelt, T.H. (2007), “Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF”, *Biomaterials*, **28**, 1123-1131.
- Novoa, N., Aranda, J.L., Jiménez, M.F., Varela, G. (2008), “Utilidad de la transposición muscular en el cierre de la fístula pleural postneumonectomía y de la toracostomía en un único tiempo quirúrgico”, *Cir. Cardiov.*, **15(2)**, 153-158.
- Orive, G., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Calafiore, R., Chang, T.M.S., De Vos, P., Hortelano, G., Hunkeler, D., Lacík, I., Shapiro, A.M.J., Pedraz, J.L. (2003), “Cell encapsulation: promise and progress”, *Nat. Med.*, **9**, 104-107.
- Orive, G., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Calafiore, R., Chang, T.M.S., De Vos, P., Hortelano, G., Hunkeler, D., Lacík, I., Shapiro, A.M.J., Pedraz, J.L. (2004), “History, challenges and promises of cell microencapsulation”, *Trends Biotechnol.*, **22**, 87-92.

- Parys, M.C. (2006), “Smart textiles using microencapsulation technology”. En “Functional coating (Ghosh, S.K.)”, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*.
- Pedraz, C., Galván, R. Lecuona, P., Garrido, E., Ludeña, M.D. (1995), “Postnatal dexamethasone treatment in newborn rats Turing prolongad high O2 exposure”. *Pediatric Research*, **38(3)**, 450-458.
- Pedraz, J.L., Orive, G., (2004), “La microencapsulación de células. ¿Una nueva alternativa terapéutica?”, *An. R. Acad. Nac. Farm.*, **70**, 777-787.
- Pluchino, S., Quattrini, A., Brambilla, E., Gritti, A., Salan, G., Dina, G., Galli, R., Del Carro, U., Amadio, S., Bergami, A., Furlan, R., Comi, G., Vescovi, A.L., Martino, G., (2003), “Injection of adult neurospheres indujces recovery in a chronic model of multiple sclerosis”, *Nature*, **422**, 688-684.
- Popplewell, L.M., Black, J.M., Norris, L.M., Porzio, M. (1995), “Encapsulation system for flavors and colors”, *Food Technol.*, **49**, 76-82.
- Segiura, S., Oda, T., Izumida, Y. Aoyagi, Y., Satake, M., Ochiai, A., Ohkohchi, N, Nakajima, M. (2005), “Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array”, *Biomaterials*, **26**, 3327-3331.
- Senuma, Y., Hilborn, J.G. (1999), “Key parameters for monodispersed polymer microspheres with spinning disk atomization”, *Mater. Res. Innovations*, **3**, 42-49.

- Senuma, Y., Lowe, C., Zweife, Y, Hilborn, J.G., Marison, I. (2000), “Alginate hydrogel microspheres and microcapsules prepared by spinning disk atomization”, *Biotechnol. Bioeng.*, **67**, 616-622.
- Serp. D., Cantana, E., Heinzen, C., von Stockar, U., Marison, I.W. (2000), “Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization”, *Biotechnol. Bioeng.*, **70**, 41-53.
- Tseng, J.L., Baetge, E.E., Zurn, A.D., Aebischer, P. (1997), “GDNF reduces drug-induced rotational behaviour after medial forebrain bundle transection by a mechanism not involving striatal dopamine”, *J. Neurosci.*, **17**, 325-333.
- Uludag, H, Sefton, M.V. (1993), Microencapsulated human hepatoma (HepG2) cells: in vivo growth and protein release, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1213-1224.
- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J. (2000), “Vascular-specific growth factors and blood vessel formation”, *Nature*, **407**, 242-248.
- Weisser, R., Wallström, E., Storch, M.K., Stefferl, A., Lorentzen, J., Lassmann, H., Linington, C., Olsson, T., (1998), “MHC Haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats”, *J. Clin. Invest.*, **6**, 1265-1273.

CAPÍTULO 2: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA TÉCNICA DE GENERACIÓN DE MICROCAPSULAS

2. DESARROLLO Y CARACTERIZACION DE UNA NUEVA TECNICA DE GENERACION DE MICROCAPSULAS

De acuerdo con lo anteriormente descrito en el capítulo introductorio (capítulo 1), es necesario encontrar una técnica que genere cápsulas con un tamaño comprendido entre 20 y 50 micras, y que no dañe el material activo inmovilizado en ellas, de forma que pueda ser utilizada en aplicaciones bio-médicas.

Para ello, se realizó primeramente una revisión bibliográfica de los principales métodos de encapsulación.

2.1. PRINCIPALES MÉTODOS DE ENCAPSULACIÓN

Son muchos los procedimientos de encapsulación existentes, pero en general estos se pueden clasificar en tres grandes grupos: físico-químicos, químicos, y mecánicos (Baxter, 1974; Benita, 1996; Galán et al., 2005; Gutcho, 1972; Gutcho, 1976; Lim, 1984; Whateley, 1992).

La selección de un procedimiento de encapsulación depende de las propiedades físicas, químicas, y biológicas, tanto de los materiales utilizados en la formación de las cápsulas, como del activo que se quiere inmovilizar. Además, es necesario tener en cuenta las propiedades finales de las cápsulas que se quieren preparar (tamaño, granulometría, estructura interna, carga en principio activo, perfil de liberación, etc.).

2.1.1. *Procedimientos físico-químicos:*

En este grupo destacan la encapsulación por coacervación, por evaporación/extracción del disolvente, y por fusión (Baxter, 1974; Benita, 1996; Galán et al., 2005; Gutcho, 1972; Gutcho, 1976; Lim, 1984; Whateley, 1992).

(i) Encapsulación por coacervación o separación de fases:

Este procedimiento consiste en disolver un polímero en un disolvente orgánico, mientras que el principio activo que se quiere encapsular se disuelve en agua. A continuación, se obtiene una emulsión por la adición de la fase acuosa a la fase orgánica. Después de esto, se induce por algún procedimiento la desolvatación del polímero, que se deposita en forma de gotículas de coacervado alrededor del principio activo que se va a encapsular.

(ii) Encapsulación por evaporación del disolvente:

En este método están incluidos todos los procesos en los que tiene lugar la eliminación del disolvente en el que está disuelto el polímero, ya sea por evaporación o por extracción de este. En todos los casos previamente tiene que formarse una emulsión que puede ser de tipo O/W o bien O/O. En ambos casos, la fase interna de la emulsión es un disolvente orgánico (O) que presenta una solubilidad limitada en la fase externa de la emulsión que puede ser agua (W) o aceite (O). Además, es fundamental la incorporación de un agente tensoactivo en la fase externa de la emulsión. Una vez formada la emulsión, se puede extraer el disolvente con otro líquido el cual es soluble en el disolvente, o evaporar el mismo para conseguir la precipitación gradual del polímero a medida que se va eliminando el disolvente, dando lugar a las cápsulas.

(iii) Encapsulación por fusión en caliente del polímero:

Esta técnica conduce a la obtención de cápsulas a partir de materiales con bajo punto de fusión (algunos lípidos como la cera de carnauba o el alcohol cetílico). El material a encapsular se disuelve o se dispersa en el excipiente fundido. Posteriormente, el conjunto se emulsiona en una fase dispersante por la cual el principio activo no tenga afinidad (agua para moléculas

lipofílicas; aceite de silicona para moléculas hidrofílicas), y finalmente, los glóbulos se solidifican por enfriamiento brusco del medio reaccionante.

2.1.2. Procedimientos químicos

En este grupo se incluyen las técnicas de preparación de partículas por reacciones de polimerización (polimerización interfacial e “in situ”) y mediante fenómenos de gelificación (Baxter, 1974; Benita, 1996; Galán et al., 2005; Gutcho, 1972; Gutcho, 1976; Lim, 1984; Whateley, 1992).

(i) Encapsulación por polimerización interfacial:

En este proceso se produce la polimerización de dos monómeros (uno soluble en aceite, y otro soluble en agua) en la interfase de dos sustancias inmiscibles, formando una membrana que dará lugar a la pared de las cápsulas. Ésta es la diferencia de este tipo de polimerización con respecto a los métodos convencionales, en donde la reacción se produce en el seno de una única fase. El proceso consiste, primeramente, en la formación de una emulsión de tipo hidrófilo en lipófilo (W/O), en la que la fase acuosa interna (W) contiene la sustancia a encapsular y uno de los monómeros, y la fase lipófila (O) dispersante está formada por un disolvente orgánico, el segundo monómero y un tensoactivo. Los monómeros difunden hacia la interfase donde reaccionarán para formar un único polímero que encapsula la fase dispersada. La separación de las cápsulas se puede llevar a cabo mediante centrifugación.

Este método se utiliza mucho en otros ámbitos; sin embargo, en el de los medicamentos o materiales biológicos su interés ha sido muy escaso.

(ii) Encapsulación por polimerización “in-situ”:

En este proceso no se añaden reactivos al material activo que conforma el núcleo de las futuras cápsulas, sino que la polimerización ocurre exclusivamente en la fase continua y en el lado de la interfase perteneciente a la misma fase. La interfase está formada por el material del núcleo y la fase continua. Inicialmente, se formará un prepolímero de bajo peso molecular, y a medida que el tiempo pase, éste irá creciendo en tamaño, depositándose en la superficie del núcleo generando la membrana sólida de las cápsulas.

(iii) Encapsulación por gelificación del material soporte:

La reacción de gelificación iónica se basa en la reacción entre un polímero cargado, que suele ser un polisacárido, con un ion de carga opuesta.

En esta técnica, el material activo a encapsular disuelto en un polímero se dispone en forma de gotas, para luego ser estabilizado mediante la reacción de gelificación iónica formando una membrana sólida, semipermeable, insoluble al agua, que confiere estabilidad al núcleo de la cápsula.

Generalmente, se recurre a la gelificación de alginato sódico (anión) con cloruro cálcico o bórico (catión). El método consiste en suspender el compuesto que se va a encapsular en una solución acuosa de alginato sódico, adicionando la mezcla mediante goteo sobre una solución acuosa de Cl_2Ca o Cl_2Ba que se encuentra sometida a una velocidad de agitación. Al entrar la gota de alginato sódico en contacto con Ca^{2+} o Ba^{2+} , se produce la gelificación instantánea de la misma, obteniéndose una membrana o cubierta de alginato cálcico o bórico que es insoluble en agua, pero semi-permeable (Figura 2.1).

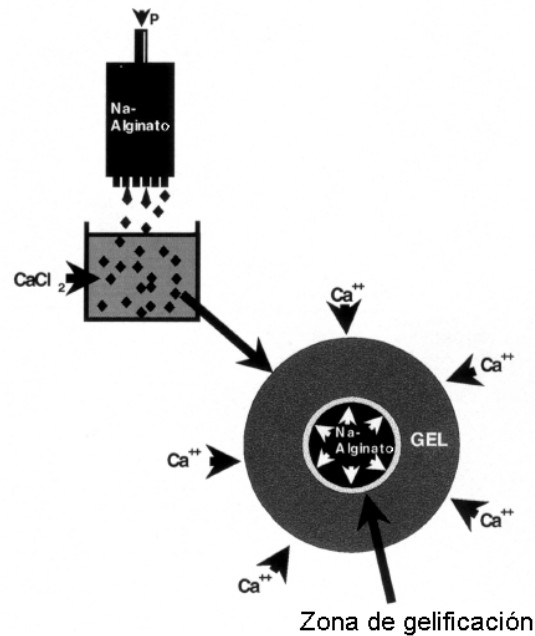


Figura 2.1. Proceso de gelificación de alginato sódico con cloruro cálcico

2.1.3. Procedimientos mecánicos

En este grupo se pueden incluir la encapsulación por atomización, mediante fluidos en condiciones supercríticas, por inyección coaxial turbulenta, y por co-extrusión (Baxter, 1974; Benita, 1996; Galán et al., 2005; Gutcho, 1972; Gutcho, 1976; Lim, 1984; Whateley, 1992). La mayor ventaja de todos estos procedimientos es el de poder ser utilizados a escala industrial.

(i) Encapsulación por atomización:

- Recubrimiento por atomización en lecho fluidizado. Las partículas de principio activo que se quieren encapsular se mantienen en suspensión en un lecho fluido dentro de una cámara con temperatura y humedad controlada, donde existe una corriente de aire ascendente a alta velocidad. La so-

lución de recubrimiento, que contiene el polímero, se atomiza dentro de la cámara y va recubriendo la superficie de las partículas de la sustancia activa. La cubierta de las cápsulas se va solidificando por la acción del aire en el propio lecho.

Esta técnica está destinada a la encapsulación de partículas sólidas (granulados y cristales) mediante la utilización de celulosas, derivados metacrílicos, etc.

- Atomización y secado ("Spray-drying"). Este procedimiento consiste en la transformación de una alimentación líquida a una forma sólida, por medio de una atomización a altas temperaturas (entre 150 y 200 °C). Es decir, un polímero disuelto en un disolvente adecuado junto con el material que se va a encapsular se pulveriza en una cámara con aire caliente a vacío. En esas condiciones, el disolvente se evapora del material de cubierta y el polímero precipita en forma de micropartículas.
- Atomización y congelación ("Spray congealing"). Este procedimiento es similar a la fusión en caliente descrita anteriormente. El material de recubrimiento se somete primeramente a un proceso de fusión. Después de esto, el material fundido, en el que va incorporado el principio activo a encapsular (disuelto o dispersado en el mismo), se pulveriza a una temperatura suficientemente elevada (como para mantener el material fundido) en una cámara donde existe una corriente de aire frío, que solidifica el material de recubrimiento alrededor del material activo a encapsular.
- Atomización por chorro anular. Esta tecnología cuenta con dos chorros concéntricos. El chorro interno contiene el material del núcleo líquido y el material a encapsular. El chorro externo contiene el material líquido de la pared o recubrimiento, generalmente fundido, que solidifica sobre el material del núcleo a la salida de la boquilla atomizadora. Esta doble

corriente de fluido rompe en gotas al salir por la boquilla atomizadora, generando las cápsulas.

- Atomización mediante discos giratorios (“Spinning disk”). Este método se fundamenta en la utilización de un disco giratorio y en el movimiento simultáneo del material del núcleo y de la membrana saliendo del disco en forma de gotas. Las cápsulas y las partículas de material de pared sobrante se recogen debajo del disco. Las cápsulas son separadas de las partículas de pared sobrantes mediante una operación de clasificación por tamaño.

(ii) Encapsulación mediante fluidos en condiciones supercríticas:

Los fluidos supercríticos (SFC) son fluidos que se encuentran a unas condiciones de presión y temperatura superiores a las de su punto crítico. La naturaleza de un fluido supercrítico se encuentra de este modo a medio camino entre un gas y un líquido. Se comporta como un gas pero con la densidad de un líquido.

Cuando el fluido se encuentra cerca del punto crítico se conoce como fluido cuasacrítico, y este tipo de fluido es muy susceptible a sufrir grandes cambios debido a pequeñas perturbaciones. Por ejemplo, como puede verse en la Figura 2.2., pequeños cambios en la presión producen grandes cambios en la densidad debido a que la pendiente de las isotérmicas es muy elevada en esa zona. Este cambio es muy importante, ya que la densidad es el parámetro que caracteriza el poder solvente: a mayor densidad mayor poder solvente.

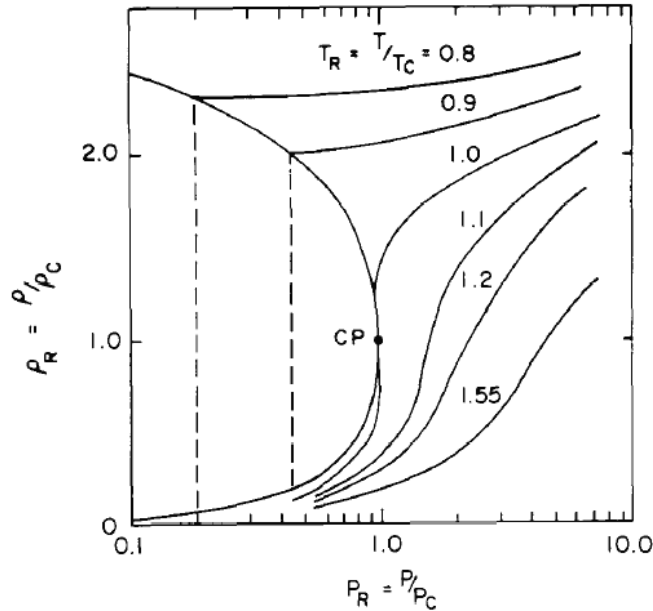


Figura 2.2. Densidad reducida frente a presión reducida

Existen diferentes técnicas para producir la encapsulación de una sustancia activa, según se utilicen los SCF como solventes (RESS) o como antisolventes (GAS, ASES y SEDS) (Rantakylä, 2004).

- **RESS (Rapid expansion from supercritical solution):** esta técnica se basa en la capacidad de los SCF para modificar su poder solvente en las inmediaciones de su punto crítico. De esta manera se puede aumentar la solubilidad del soluto en el SCF al aumentar la presión del sistema, para después, mediante una descompresión conseguir la precipitación de manera cristalina al disminuirse bruscamente su solubilidad. En este proceso, por tanto, la sustancia a encapsular se disuelve en el SCF para después ser rociada en una cámara de temperatura controlada, donde precipita debido a la descompresión que ocurre a través de la boquilla colocada en dicha cámara (Figura 2.3.). Esta disminución de presión, generada en la boquilla,

produce grandes cambios en la densidad acompañados por una pérdida del poder solvente.

(Rantakylä, 2004).

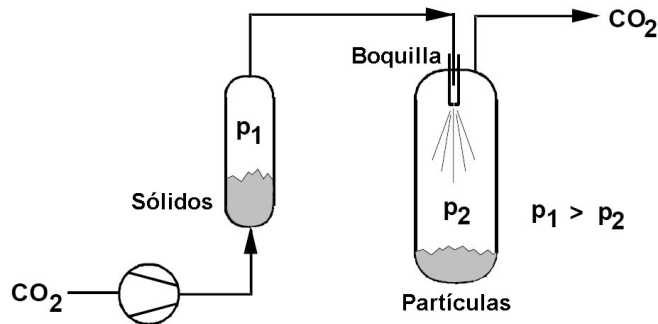


Figura 2.3. Ilustración esquemática de la técnica RESS

- **GAS (Gas antisolvent):** en este proceso a una solución de la sustancia a encapsular se le añade un SCF, que es soluble en el disolvente, pero muy poco soluble en la sustancia a encapsular, de tal forma, que se producirá un efecto de “robo” del poder solvente, induciendo, por lo tanto, una sobresaturación con la consiguiente precipitación del sólido.

(Rantakylä, 2004).

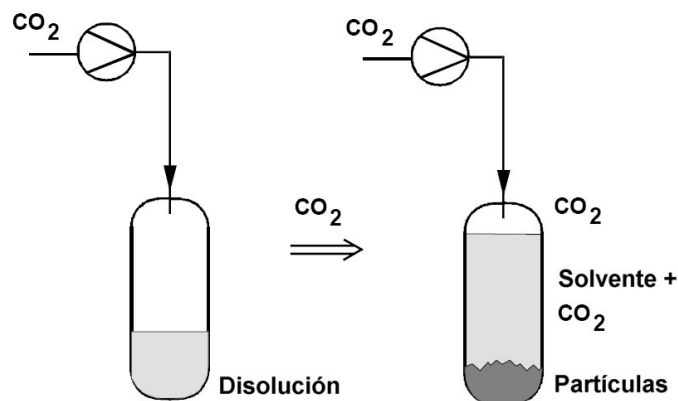


Figura 2.4. Ilustración esquemática de la técnica GAS

- SAS (Supercritical antisolvent) y SEDS (Solution enhanced dispersión supercritical fluids): son procesos semi-continuos, variación del GAS, continuando con la definición de SCF como antisolvente. En este proceso la sustancia a encapsular en disolución entra por una boquilla en una cámara con la que se introduce también un SCF. La disolución de la sustancia a encapsular es atomizada en gotas, disolviéndose en ellas el SCF provocando la pérdida de poder solvente para lograr finalmente una sobresaturación con la consecuente precipitación. Es decir, en este proceso se debe cumplir la misma condición indispensable que el GAS: el SCF debe ser poco soluble con el compuesto a micronizar y muy soluble con el disolvente. La diferencia entre SAS (Figura 2.5.) y SEDS (Figura 2.6.) es el diseño de la boquilla, siendo la del SEDS geoméricamente coaxial, existiendo una mezcla previa del SCF y la disolución, causando una mejora en el mezclado.

(Rantakylä, 2004).

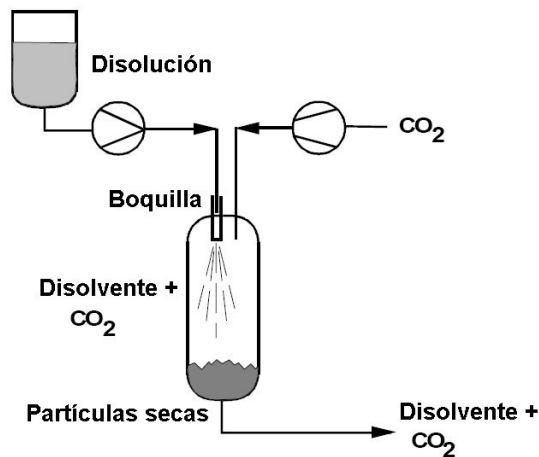


Figura 2.5. Ilustración esquemática de la técnica SAS

(Rantakylä, 2004).

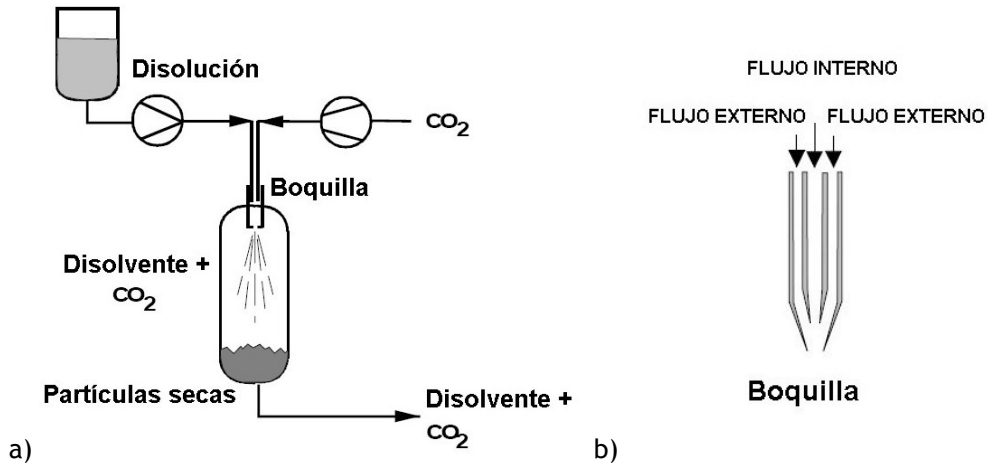


Figura 2.6. a) Ilustración esquemática de la técnica SEDS; b) Esquema de la boquilla atomizadora coaxial

(iii) Encapsulación por extrusión:

En líneas generales, la encapsulación por extrusión consiste en el paso de la sustancia a encapsular y el material de recubrimiento a través de una boquilla a alta presión.

La variante más utilizada del proceso de extrusión es el caso del proceso de co-extrusión. En esta técnica un núcleo líquido que contiene la sustancia a encapsular y los materiales de recubrimiento se bombean a través de una boquilla neumática compuesta de orificios concéntricos. El material del núcleo fluye por el orificio central, mientras que el material de recubrimiento lo hace a través del anillo exterior. Se forman gotas compuestas del material del núcleo revestido por una capa del fluido de recubrimiento. El recubrimiento puede ser estabilizado mediante una reacción química de entrecruzamiento, por enfriamiento, o por extracción del disolvente.

En concreto, existe un procedimiento llamado *encapsulación por inyección coaxial turbulenta* que se basa en la inyección coaxial a alta presión de

dos fases inmiscibles en el seno de un reactor. La primera fase contiene el polímero y el material a encapsular, disuelto en un disolvente orgánico apolar, y la segunda es una disolución acuosa de un tensioactivo. El régimen turbulento que se alcanza permite obtener una emulsión muy homogénea que, tras la evaporación del disolvente orgánico, dará lugar a las cápsulas.

2.2. ESTADO ACTUAL DE LOS PROCESOS DE GENERACIÓN DE CÁPSULAS

Los trabajos realizados hasta ahora para la generación de cápsulas implican la utilización de condiciones que podrían ser tóxicas y dañar el material inmovilizado, ya que suponen el contacto con disolventes orgánicos y/o calentamiento durante el proceso.

A continuación se describen ejemplos de procesos que no se podrían utilizar en aplicaciones biomédicas.

La encapsulación por coacervación de gelatinas implica la utilización de formaldehído o bien de calor para reticular la misma (Burgess et al., 1987a). Para la producción de microesferas de ácido poli d,l-láctico y ácido poli-D-láctico-co-glicólico por técnicas de eliminación de disolvente, se utilizan compuestos orgánicos, tales como cloruro de metileno y hexafluor acetona sesquihidratada para disolver los polímeros (Benita et al., 1984; Sato et al., 1988). En el proceso de encapsulación de esteroides se utiliza una solución de glutaraldehído y/o altas temperaturas (que puede ser de hasta 130 °C) para estabilizar las microesferas (Burgess et al., 1987b). Las cápsulas de quitosano con oxitetraciclina clorhidratada o oxitetraciclina inmovilizadas mediante procesos de pulverización y secado (spray drying) implican altas temperaturas (de entre 110°C y 180°C) para evaporar el disolvente. Si estas sustancias son encapsuladas mediante procesos de coagulación por pulverización en líquido, se utiliza anhídrido acético y calentamiento durante periodos superiores a una hora (Mi et al., 1999).

Las técnicas que no utilizan condiciones perjudiciales para el material inmovilizado, producen cápsulas, basándose principalmente en la reacción de gelificación iónica, con tamaños superiores a 300 micrómetros:

- Discos giratorios: 300 y 600 μm (Senuma et al., 1999, 2000).

- Boquillas vibratorias: 300 y 600 μm (Serp et al., 2000; Shwinger et al., 2004).
- Goteo por flujo de aire coaxial: 400-800 μm (Canaple et al., 2002; Robitaille et al., 1999; Shwinger et al., 2004).
- Tecnología JetCutter: 320-800 μm (Shwinger et al., 2004).
- Generador de impulsos electrostáticos: 320-800 μm (Orive et al., 2003; Robitaille et al., 1999).

Una nueva técnica ha conseguido reducir el diámetro de cápsulas de alginato cálcico hasta 162 μm mediante la extrusión de una solución de alginato sódico (con la sustancia a encapsular suspendida) a través de una matriz de micro-boquillas de silicona contra un flujo lateral de aceite de soja (Segiura et al., 2005).

Después de este estudio es posible concluir que hasta el momento no existe una técnica descrita que permita obtener microcápsulas uniformes con tamaños comprendidos entre 20 y 50 micras y sin la utilización de condiciones desfavorables que puedan dañar la matriz.

2.3. MATERIALES BIOCOMPATIBLES UTILIZADOS EN LA GENERACIÓN DE CAPSULAS

La técnica de preparación de las cápsulas, así como los materiales que las conforman vienen determinados por la aplicación final de las mismas. Por ello, además de la técnica de generación de las capsulas, es importante seleccionar correctamente los materiales que formarán parte de las mismas, de tal forma que se tengan buenas propiedades de biocompatibilidad y atoxicidad. Por ello, se presentará, a continuación, una revisión de los diferentes materiales biocompatibles utilizados en los procesos de encapsulación, y con ello en la generación de cápsulas.

La variedad de materiales que pueden emplearse en la generación de las microcápsulas va aumentando a medida que van surgiendo nuevos y se perfilan nuevas aplicaciones de la encapsulación

Una clasificación general de los materiales utilizados en las distintas aplicaciones de la encapsulación estaría fuera de los límites fijados para esta tesis. Por ello, se ha realizado una revisión de los más utilizados en la encapsulación dentro de los campos biomédico y farmacéutico. Actualmente, los polímeros son los compuestos que más se emplean en aplicaciones de microencapsulación.

La selección del polímero adecuado pasa por conocer sus propiedades y entender como se comporta en la superficie y en el interior de las cápsulas, de tal forma que proporcionen las propiedades químicas, interfaciales, mecánicas y biológicas deseadas. La selección del polímero, además de depender de sus propiedades físico-químicas, incluye tanto una caracterización bioquímica como tests clínicos específicos para probar su seguridad (Del Valle et al., 2009).

Las propiedades superficiales, tales como hidrofiliidad, rugosidad, cargas en superficie, tamaño de poro, etc., gobiernan la biocompatibilidad de las cápsulas con los tejidos, los órganos, y la sangre, además de influir en la

durabilidad, permeabilidad y degradabilidad de las cápsulas. Las propiedades superficiales también determinan la capacidad de absorción de agua de las cápsulas, que influye directamente en su capacidad de hinchamiento y degradación (Del Valle et al., 2009).

Por otra parte, se deben considerar propiedades de la matriz de las cápsulas, tales como su peso molecular, la solubilidad, y el modulo de compresibilidad, ya que influyen de forma directa en los sistemas de liberación controlada. Las propiedades estructurales de la matriz de las cápsulas, su morfología y su tamaño de poro son importantes para el transporte de materia hacia y desde las cápsulas (Del Valle et al., 2009).

Los polímeros más utilizados en las aplicaciones biomédicas y farmacéuticas pueden clasificarse en naturales y sintéticos, según aparece en la Tabla 2.1., sin embargo, a la hora de elegir el material adecuado, es necesario tener en cuenta la aplicación concreta en cada caso.

En la Figura 2.7. se pueden observar las directrices a seguir para una selección más racional del material a utilizar en el proceso de encapsulación.

Tabla 2.1.: Clasificación de los polímeros utilizados en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas

POLÍMEROS NATURALES	
Polímeros basados en proteínas (2)	Polisacáridos (2)
colágeno, albúmina, gelatina	agarosa, alginato (3), carragenano (8), ácido hialurónico, quitosano (3,7)
POLÍMEROS SINTÉTICOS	
Biodegradables	No-biodegradables
<i>Poliésteres (2)</i>	<i>Derivados de celulosa (7)</i>
ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polihidroxibutirato, poli(ε-caprolactona), ácido poli(β-L-málico), polidioxanona	carboximetilcelulosa, etilcelulosa, acetato de celulosa, acetato-propionato de celulosa, hidroxipropil metil celulosa
<i>Poliamidas (2)</i>	<i>Siliconas (6)</i>
poli(iminocarbonatos), poliaminoácidos	sílica coloidal, polisiloxanos
<i>Polímeros basados en el fósforo (4)</i>	<i>Polímeros acrílicos (5, 6)</i>
polifosfatos, polifosfonatos, polifosfacenos	polimetacrilatos, poli(metilmacrilato), poli hidro(etilmacrilato)
<i>Otros (1)</i>	<i>Otros (8)</i>
poli(cianoacrilatos), poliuretanos, poli(orto ésteres), polidihidropiranos, poliacetales	polivinil pirrolidona, etil vinil acetato, poloxámeros, poloxaminas

(los números en paréntesis se refieren a la selección del polímero en función de las directrices de la Figura 2.7.) (Del Valle et al., 2009)

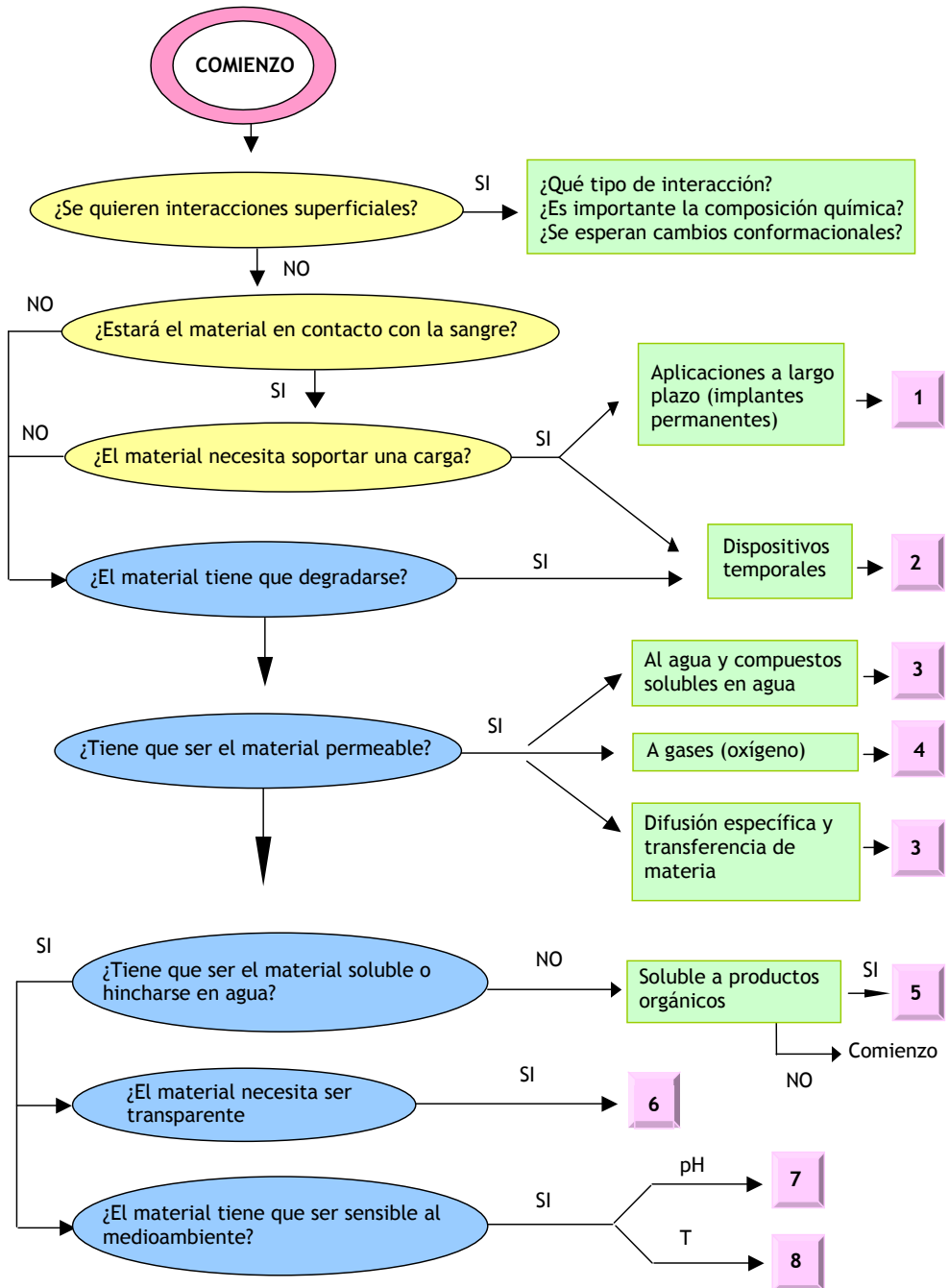


Figura 2.7. Directrices para una selección racional del material

(Del Valle et al., 2009)

2.3.1. Polímeros sintéticos

A pesar de que los polímeros sintéticos no degradables se utilizan en aplicaciones biomédicas, destacando los derivados acrílicos y celulósicos, tienen una gran desventaja, ya que se requiere cirugía para retirar estos polímeros fuera del cuerpo humano una vez que estos ya han liberado el fármaco o la sustancia biológica terapéutica. Por tanto, este tipo de polímeros solo se pueden utilizar siempre que la eliminación del implante sea sencilla (como por ejemplo un implante ocular). Sin embargo, los polímeros sintéticos degradables no requieren de cirugía para su eliminación y, por tanto, son preferibles para las aplicaciones en cuestión.

Se han sintetizado una gran variedad de polímeros biodegradables para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas. Estos polímeros han sido ampliamente aceptados ya que su biodegradabilidad se puede manipular, incorporando una gran variedad de grupos volátiles, tales como, ésteres, ortoésteres, anhídridos, carbonatos, amidas, ureas y uretanos en su cadena principal (Del Valle et al., 2009).

Uno de los sistemas más utilizados en encapsulación son los polímeros basados en poliésteres, en particular, el ácido poliláctico o PLA (conocido así por sus siglas en inglés), el ácido poliglicólico (PGA), y su copolímero, el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (Chandra y Rustgi, 1998; Griffith, 2000). Es posible alterar la cinética de biodegradación modificando la proporción de PLA y PGA en el copolímero, así como alterando su peso molecular (Pillai y Panchagnula, 2001; Kawaguchi, 2000). A pesar de que el PLGA es el polímero biodegradable más estudiado (lo demuestran las más de 500 patentes existentes sobre él), éste sufre un incremento de la acidez local durante su degradación, lo que puede provocar irritación e incluso puede ser perjudicial para la estabilidad de fármacos protéicos (Angelova y Hunkeler, 1999; Del Valle et al., 2009; Fu et al., 1999). Los poliésteres se degradan con el contacto con el agua, resultando en la ruptura hidrolítica de las uniones éster. De forma

general, los poliésteres suelen degradarse en largos periodos de tiempo, siendo esto una desventaja cuando la sustancia a liberar debe hacerlo en solo unos cuantos días o semanas (Winzenburg, 2004).

Sin embargo, los poliortoésteres (POEs), están ganando importancia, ya que la degradación puede regularse. Los POEs tienen una unión ortoéster que es sensible a los ácidos, pudiéndose acelerar la hidrólisis en ambientes ácidos, y desacelerar con un simple incremento del pH. De esta forma, con este sistema se puede regular la liberación desde días a meses, cubriendo un amplio rango de aplicaciones. Los POEs han estado en continuo desarrollo desde los años 70, habiéndose focalizado la investigación en la síntesis de estos polímeros mediante la adición de dioles a acetales de diceteno. Son únicos entre todos los polímeros biodegradables, ya que sus propiedades mecánicas pueden modificarse fácilmente escogiendo los dioles, o mezcla de éstos, apropiados en su síntesis (Chandra y Rustgi, 1998; Del Valle et al., 2009; Winzenburg, 2004).

Los polianhídridos se caracterizan por una rápida degradación seguida de una rápida erosión del material, pero al mismo tiempo pueden ser diseñados para liberar sustancias en períodos que van desde días hasta semanas seleccionando los monómeros apropiados (Angelova y Hunkeler, 1999).

Puesto que las proteínas están compuestas por aminoácidos, surgió la idea de estudiar la posible aplicación de los poliaminoácidos en el campo de la biomedicina. Estos materiales parecían prometedores, debido a la presencia de grupos laterales con grupos funcionales, que posibilitan el enlace con fármacos y agentes de entrecruzamiento que pueden modificar las propiedades físicas o mecánicas del polímero. A pesar de su aparente potencial como biomateriales, los poliaminoácidos son escasamente empleados a nivel práctico ya que la mayoría son altamente insolubles y difíciles de procesar. Además, los polímeros que contienen tres o más aminoácidos resultan anti-génicos, por lo que su aplicabilidad se ve ampliamente limitada. Los poli(imino carbonatos), que son “pseudo” poliaminoácidos, han sido sintetizados

a partir de tirosina dipéptida para superar las limitaciones de los poliaminoácidos (Mathowitz y Jacob, 1999).

2.3.2. Polímeros naturales

Los polímeros naturales son abundantes, y normalmente biodegradables, además de ofrecer excelentes propiedades de biocompatibilidad, siendo, normalmente, no tóxicos o carcinógenos. Su principal desventaja recae en el desarrollo de métodos de producción reproducibles, ya que su complejidad estructural a menudo proporciona dificultades a la hora de su modificación o purificación. Además, se producen variaciones significantes de lote en lote, debido a que la preparación de este tipo de polímeros se realiza de forma biológica mediante organismos vivos (plantas, crustaceos, etc). La mayoría de las impurezas presentes en este tipo de polímeros son originarias de su fuente biológica de extracción. Los contaminantes más comunes son proteínas, carbohidratos complejos, ácidos grasos y fosfolípidos, productos bacteriológicos, y productos secundarios, como toxinas, polifenoles, etc. (De Vos et al., 1993, Greco, 1994, Skjaek-Braek et al, 1989, Zimmermann et al., 1992). Muchos de estos compuestos manifiestan actividades biológicas, tales como, inmunoestimulación o cito-toxicidad, que podrían impedir su implantación "in vivo" (Zimmermann et al., 1992). La naturaleza de estas impurezas puede variar con el polímero, así como con el suministrador del polímero, incluso con los diferentes lotes de producción (Klöck et al., 1994; Zimmermann et al., 1992).

Se ha empleado una gran variedad de polímeros naturales, destacando, la albúmina, el ácido hialurónico y sus derivados, el alginato, y el quitosano (Ikada, 1994).

El ácido hialurónico y sus derivados son interesantes biomateriales que son utilizados en procedimientos quirúrgicos. Tienen utilidad en aplicaciones de liberación controlada de fármacos mediante administración nasal o inye-

cción (Rokkaben, 1991). Su interés como biomaterial radica en el hecho de no ser antigénico, es decir, evita que se produzcan procesos inflamatorios o de rechazo.

La quitina es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza, siendo producido por una gran variedad de animales marinos, insectos y hongos. Este material natural es el componente orgánico del esqueleto de los invertebrados, y puede ser sometido a una desacetilización para producir el quitosano, un biopolímero soluble. La velocidad de biodegradación del quitosano viene determinada por el contenido residual de acetilo, que es un parámetro fácilmente controlable. Las propiedades físicas y químicas del quitosano, tales como los enlaces de hidrógeno inter e intramoleculares, y las cargas catiónicas en medio ácido, hacen a este polímero muy atractivo para el desarrollo de productos farmacéuticos. La combinación de propiedades como la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, la baja toxicidad, la actividad antibacteriana intrínseca, la posibilidad de unión de factores de crecimiento y la posibilidad de procesado en diferentes formas, hacen que el quitosano tenga una amplia gama de posibles aplicaciones tanto en ingeniería de tejidos como en implantes ortopédicos (Di Martino, 2005). Por ejemplo, se emplea como andamios tridimensionales del tejido cartilaginoso, puesto que es un material con facilidad para formar poros (Di Martino, 2005). El quitosano se ha aplicado, fundamentalmente, en la encapsulación de principios activos, como barrera de membrana, como material para lentes de contacto, o como inhibidor de la coagulación de la sangre (Singh y Ray, 2000; Venugopal, 2009). Una gran cantidad de estudios han demostrado su efectividad como un agente que favorece los procesos de adsorción. Por otra parte, debido a sus propiedades adhesivas, el quitosano también ha recibido considerable atención como nuevo bioadhesivo en sistemas de liberación de fármacos (Filipovic, 2001). La bioadhesión a la mucosa del tracto gastrointestinal puede describirse en términos de muco-adhesión. A partir de la muco-adhesión, se puede prolongar el tiempo de residencia de los transportadores de fármacos en los sitios de absorción, con lo que es de esperarse una mejora en la

absorción de fármacos, con la combinación de mucoadhesividades y liberación de fármacos controlada (Longer, 1985; Valenta, 2001; Valenta y Janisch, 2003). Debido a que el quitosano se degrada por la acción de la flora microbiana presente en el colon, es un buen candidato para la liberación de fármacos específica.

Sin embargo, el polímero más frecuentemente utilizado en sistemas biomédicos y farmacéuticos es el alginato.

2.3.2.1. *Alginato*

Dentro del gran número de polímeros naturales y sintéticos que han sido empleados en el desarrollo de las matrices de las microcápsulas, destaca fundamentalmente el alginato que presenta las siguientes ventajas:

- a) Un ambiente acuoso relativamente inerte dentro de la matriz.
- b) Un proceso de encapsulación que ocurre a temperatura ambiente y no requiere solventes orgánicos tóxicos.
- c) Un alto grado de porosidad que permite una alta velocidad de difusión para macromoléculas.
- d) La posibilidad de controlar dicha difusión con simples procedimientos de recubrimiento o “coating”.
- e) Disolución y biodegradación del sistema bajo condiciones fisiológicas normales.

Los alginatos son las sales del ácido algínico, polisacárido lineal soluble en agua, descubierto por E.C.C. Stanford (Stanford, 1883) y obtenido a partir de algas pardas. Está constituido por dos unidades monoméricas, el ácido β -D-manurónico (**M**) y el ácido α -L-gulurónico (**G**) (ver Figura 2.8 a). Estos se agrupan en bloques de secuencias **MM**, **MG**, unidos por enlaces glucosídicos β (1-4); y bloques **GG**, **GM**, unidos por enlaces glucosídicos α (1-4).

Las regiones de bloques M corresponden a cadenas lineales, mientras que los bloques G presentan una estructura en forma de bucle (Figura 2.8 b y c). Es importante destacar que en función de los porcentajes de los bloques G y M, que varían según la procedencia de las algas de partida, así serán las características de los geles de alginatos obtenidos (Tabla 2.2.) (Grasdalen, H., 1981; Hang, A., 1959; Kirk et al., 2001; McHugh, 1987).

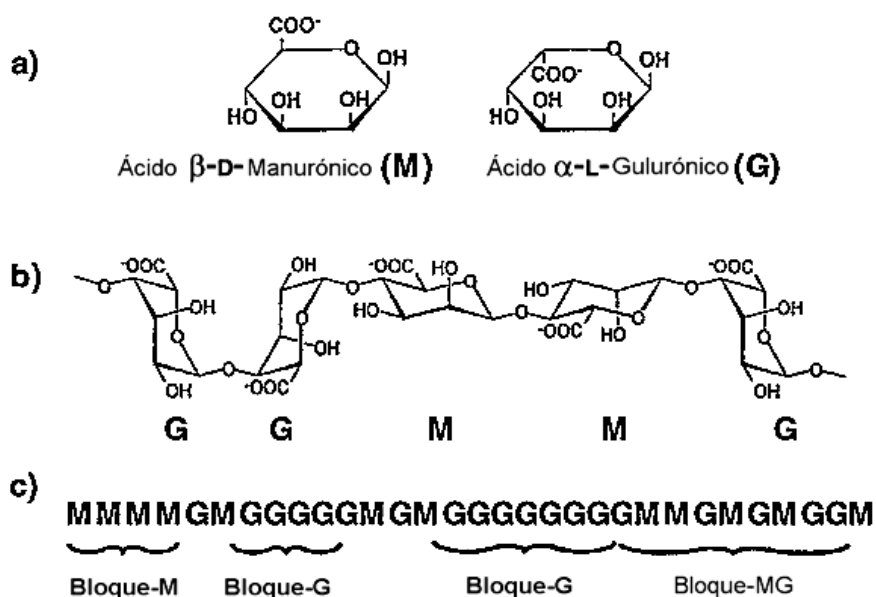


Figura 2.8. Características estructurales del alginato: (a) monómeros constituyentes del alginato, (b) conformación de cadena, (c) distribución de los bloques

Probablemente, una de las propiedades más importantes del alginato es su capacidad de formar geles (reacción de gelificación iónica). Cuando dos cadenas de bloques G se alinean se produce un hueco en forma de diamante, que tiene la dimensión ideal para acomodar en su interior un catión divalente, formándose una estructura dimérica. Éste modelo fue propuesto por Grant en 1973 (modelo de caja de huevo o “egg-box model”) para

explicar las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas (Grant et al., 1973).

Tabla 2.2.: Porcentajes de ácido manurónico y ácido gulurónico, y contenido de alginato para varias especies comerciales de algas pardas

Especie	% M	% G	Contenido de alginato de sodio (% sobre algas secas)
Laminaria hyperborea	30	70	25 - 27
Laminaria digitata	55	45	20 - 26
Macrocystis pyrifera	60	40	26
Ascophyllum nodosum	65	35	26 - 28
Lessonia nigrescens	60	40	35
Ecklonia maxima	55	45	40

(Smidsrod et al., 1996)

Además, el alginato tiene excelentes propiedades de biocompatibilidad y atoxicidad, de hecho se utiliza en la industria alimentaria como espesante, agente emulsionante y como estabilizante (Smidsrod et al., 1996).

Los alginatos están incluidos en un grupo de compuestos que son considerados como seguros para el uso humano (GRAS) por la Food and Drug Administration (FDA) (Smidsrod et al., 1996).

La biocompatibilidad de los alginatos ha sido comprobada en numerosos estudios. Así por ejemplo, la empresa Kelco Inc. realizó un estudio donde se indicó que la incorporación de alginato en la dieta de perros sabuesos, en una proporción del 5 - 15 %, durante un año, no causó efectos dañinos en los animales (Kelco Inc., 1987). Otro estudio realizado por la misma empresa indicó que la administración de 5 g/Kg. del peso corporal en ratas no causó mortalidad o signos de toxicidad en un periodo de 24 horas (Kelco Inc., 1987).

Además, se ha observado que la inyección subcutánea de ácido algínico en ratones no causa actividad cancerígena (Epstein et al., 1970). Los experimentos de toxicidad realizados en animales han mostrado que el alginato es bien tolerado en dosis de hasta 500 mg/Kg. (Dornish et al., 1996).

2.4. ESTADO ACTUAL DE LOS MATERIALES UTILIZADOS EN LOS PROCESOS DE GENERACIÓN DE MICROCÁPSULAS

En este apartado se realiza una revisión bibliográfica con los materiales más utilizados para la generación de microcápsulas con aplicación en biomedicina.

Tradicionalmente, se han utilizado microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato (APA) para la inmovilización de células, aunque también se ha dedicado mucho esfuerzo en intentar identificar sistemas alternativos de encapsulación a este sistema clásico, que aunque proporciona suficiente inmunogenicidad y mantiene la viabilidad celular, produce sin embargo, problemas asociados con el trasplante directo, que resulta en necrosis celular (Uludag et al., 2000). Otra desventaja de las microcápsulas APA es que su membrana es un complejo electrolítico débil, dando a la microcápsula unas propiedades mecánicas relativamente pobres. Por otro lado, en estos soportes cuando se realizan pruebas “in vivo” a largo plazo surgen serios problemas relativos con la viabilidad mecánica (Strand et al., 2001), que se produce por pérdidas en la membrana (Sefton et al., 2000) y por la respuesta inmune (Rihova, 2000). A estos problemas anteriormente expuestos se unen los altos costes, la inherente cito-toxicidad del PLL (De et al., 2003), y la tendencia de la cápsula a romperse en vez de deformarse como respuesta a una carga mecánica excesiva (Bartkowiak et al., 1999).

Las microcápsulas de hidroxietil metacrilato-metil metacrilato (HEMA-MMA) se han barajado durante algún tiempo como alternativa a las cápsulas APA, sin embargo la preparación de este polímero sintético puede requerir la exposición a disolventes orgánicos, así como irradiación, que no es deseable para este tipo de aplicaciones.

El quitosano es otra alternativa a las convencionales microcápsulas APA y por ello se ha estudiado para la encapsulación de fármacos (Gaserod et al., 1998; Gaserod et al., 1999; Liu et al., 2004; Zielinski et al., 1994).

Recientemente, la adición de poli(etilenglicol) (PEG) ha significado un incremento en la biocompatibilidad de las microcápsulas (Chandy et al., 1999). La adición de PEG a la membrana de quitosano mejora ligeramente la resistencia de las microcápsulas alginato-quitosano, sin embargo, reduce la resistencia de la membrana APA. La integración del PEG puede, por lo tanto, llevar a una mejora de la membrana para soportar los cambios fisiológicos del exterior, sin embargo, no mejora la resistencia mecánica de las microcápsulas (Haque et al., 2005).

Una de las mejores alternativas a los sistemas tradicionales, son las cápsulas producidas por gelificación iónica con calcio, aunque estas tienen la desventaja de ser sensibles a agentes quelantes tales como, citrato, fosfato, y lactato. Además, a largo plazo la supervivencia de las cápsulas alginato-Ca²⁺ es limitada. El bario se utiliza normalmente para aumentar la estabilidad mecánica, y la experimentación ha demostrado que incluso a bajas concentraciones de bario en la solución gelificante se consigue disminuir sustancialmente el hinchamiento o “swelling” de las cápsulas (Peirone et al., 1998; Zekorn et al., 1992). Además, la generación de cápsulas bario-alginato es una técnica simple que consiste en una encapsulación de un único paso de entrecruzamiento de alginato con bario, sin la adición de la tradicional capa permselectiva de PLL.

2.5. DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE GENERACIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS

2.5.1. Descripción de la instalación

Después de una revisión de los métodos de generación de cápsulas existentes hasta ahora, se puede concluir que no existe una técnica descrita que permita obtener microcápsulas uniformes con un tamaño en el intervalo de 20 y 50 micras y sin la utilización de condiciones que puedan dañar el material inmovilizado. Además, unas de las mejores alternativas a los sistemas tradicionales de encapsulación en sistemas biológicos y farmacéuticos, son las cápsulas poliméricas de alginato estabilizadas por gelificación iónica con cloruro de bario, que suministra una resistencia mecánica adicional. Teniendo en cuenta estas premisas, se intentó desarrollar una técnica de generación de cápsulas basada en la generación de gotas poliméricas de tamaños comprendidos entre 20 y 50 micras, estabilizadas mediante la reacción de gelificación iónica con cloruro de bario.

Uno de los primeros problemas que se encontró a la hora de desarrollar la técnica, fue cómo conseguir un tamaño de las gotas inferior a 50 μm , necesario para acometer los objetivos planteados al principio de esta tesis. Sin embargo, teniendo en cuenta el proceso de atomización, que produce gotas con tamaño inferior a 100 μm , se intentaron producir gotas con tamaños inferiores a 50 μm , mediante boquillas atomizadoras, que después se estabilizarían mediante la técnica de gelificación iónica con bario.

Con esta idea, se diseñó una instalación que permitiera la generación de gotas micrométricas, mediante el proceso de atomización, de forma totalmente controlada. La instalación consta de, una línea de aire a presión regulada por ordenador, y una boquilla neumática por succión con control electrónico. Un esquema de la instalación utilizada se muestra en la Figura 2.9.

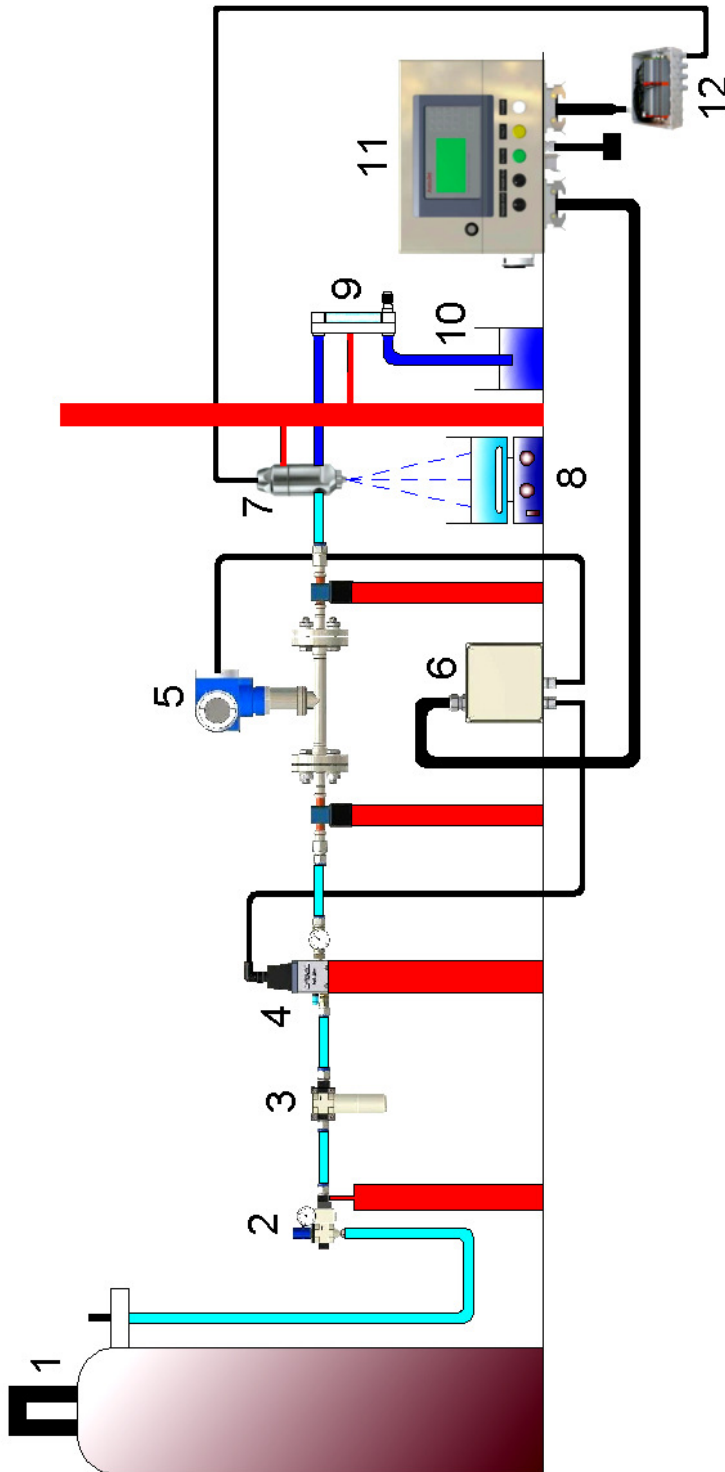


Figura 2.9. Esquema de la instalación utilizada para la producción de las microcápsulas

1.- bala de aire sintético presurizado con manómetro general; **2.-** válvula general de suministro de aire; **3.-** filtro de aire; **4.-** regulador proporcional de presión + indicador mecánico de presión; **5.-** caudalímetro másico por principio térmico; **6.-** cuadro eléctrico; **7.-** boquilla neumática; **8.-** baño gelificante de alginato sódico; **9.-** rotámetro; **10.-** solución de alginato sódico; **11.-** panel de control; **12.-** caja de conexiones.

El proceso de generación de las gotas micrométricas se puede describir de la siguiente forma: una disolución acuosa del polímero, alginato sódico, es alimentada mediante succión a una boquilla atomizadora neumática automática (7), previo paso por un caudalímetro de área variable (9) con una válvula de control, que mide y regula el caudal de polímero alimentado a la boquilla atomizadora, mediante una calibración previa.

El alginato sódico alimentado por succión a la boquilla neumática es pulverizado, por la acción de la línea de aire presurizado sobre el chorro líquido formado a la salida de la boquilla, formando las gotas.

El suministro general de aire se produce desde una bala de aire sintético a presión (1) que se introduce a la línea de aire a presión mediante una válvula general (2), pasando por un manómetro general (1) y un filtro (3). Esta línea de aire de atomización tiene un regulador proporcional de presión (4) y un caudalímetro másico por principio térmico (5), ambos conectados al panel de control (11), que permiten regular la presión y el caudal de aire de atomización de forma precisa. El regulador proporcional de presión posee un sensor interno de presión que permite obtener una retroalimentación. Además del regulador, también se dispone de un indicador mecánico de presión (4).

El panel de control regula el proceso de pulverizado en tiempo real, permitiendo el control de la boquilla neumática electrónica a través de la caja de conexiones. El software incluido en este controlador permite monitorizar de forma precisa, y ajustar de forma automática el pulverizado dependiendo de las necesidades propias del proceso. Este controlador permite ajustar de forma muy precisa los caudales de aire, al igual que sus presiones, y el tiempo de pulverizado.

La boquilla es de mezcla aire-líquido externa. Las líneas de líquido y aire de atomización son dependientes, ya que el líquido se alimenta mediante

succión, utilizando parte del aire de atomización para alimentar el líquido a la boquilla de pulverización.

La boquilla consta básicamente de un cuerpo general y diferentes combinaciones de aspersión líquido-aire que permiten conseguir diferentes patrones de pulverización: cónico, de chorro plano, etc. En concreto, se utiliza una boquilla neumática del tipo “prefilmer”, donde el líquido es dispersado en una fina hoja cónica antes de ser expuesto a corrientes de aire a alta velocidad en la parte interna y externa de la hoja anular de líquido (Figura 2.10.).

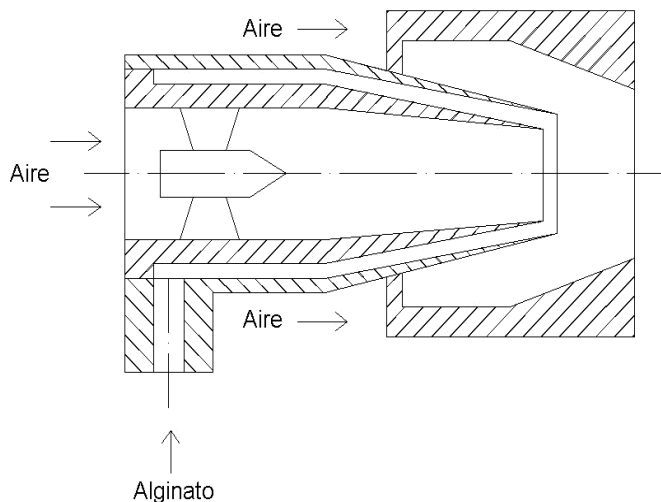


Figura 2.10. Esquema de la boquilla neumática prefilmer

La boquilla neumática permite una regulación precisa del caudal de líquido ya que se realiza de forma electrónica mediante la tecnología de modulación por ancho de pulsos (PWM: pulse width modulated). En este tipo de regulación se producen, de forma electrónica, ciclos muy rápidos de apertura y cierre de la boquilla a una frecuencia controlada (ver Figura 2.11.). La boquilla dispone de una válvula solenoide, controlada por ordenador, situada a la entrada de la boquilla que regula el flujo de líquido.

El tiempo desde una señal de apertura y la siguiente se denomina período (en la figura dos segundos). Si la boquilla está funcionando la mitad del tiempo, el ciclo será del 50 %, y se tendrá un caudal del 50 % del caudal máximo para una determinada presión. Este sistema permite la obtención de caudales muy pequeños, reduciendo de forma apreciable, el consumo del líquido que se está atomizando.

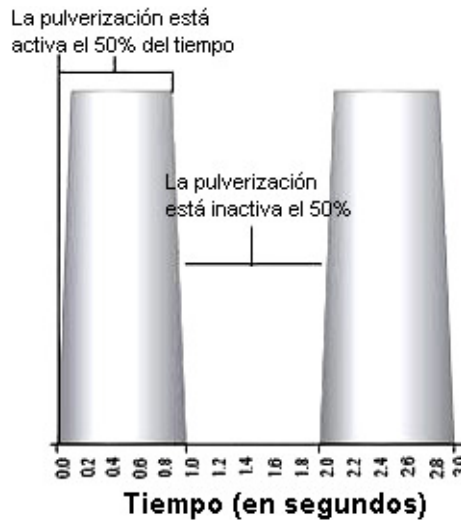


Figura 2.11. Funcionamiento de la tecnología de modulación por ancho de pulsos

Una vez generadas las gotas, éstas fueron estabilizadas mediante una reacción de gelificación iónica. Es decir, las gotas de alginato generadas por el spray fueron estabilizadas con una disolución de cloruro bórico en agitación continua situada en un cristalizador (8), que induce la gelificación iónica. La agitación de la solución gelificante tiene el único propósito de prevenir que las cápsulas formadas se aglomeren. Dicha agitación fue seleccionada a partir de experimentos previos. Para permitir que se complete en su totalidad la reacción de gelificación iónica en el cristalizador, las microcápsulas se mantuvieron cinco minutos con una agitación continua. Después de esto, se lavaron con agua destilada y se filtraron con filtros de membrana de nylon de

0,45 μm para obtener las microcápsulas libres, y parar así la reacción de gelificación iónica. Finalmente, las microcápsulas se mantuvieron en agua destilada para evitar un proceso de hinchamiento o encogimiento, para su posterior análisis de tamaño e imagen en un analizador del tamaño de partículas y un microscopio óptico, respectivamente.

Al entrar una gota de alginato sódico en contacto con los cationes Ba^{2+} , se produce la estabilización instantánea de la misma por gelificación iónica, obteniéndose una membrana semi-permeable o cubierta de la microcápsula alrededor de la matriz polimérica. Un esquema del proceso de estabilización de las gotas poliméricas puede observarse en la Figura 2.12.

Por tanto, las microcápsulas producidas tendrán la siguiente estructura:

- Una *matriz polimérica* de alginato sódico, que constituye el núcleo de la microcápsula. Esta matriz es producida por el proceso de atomización.
- Una *membrana semi-permeable o cubierta* de la microcápsula formada alrededor de la matriz polimérica de alginato sódico. Esta cubierta se forma por la reacción de gelificación iónica entre el alginato sódico y los cationes Ba^{2+} .

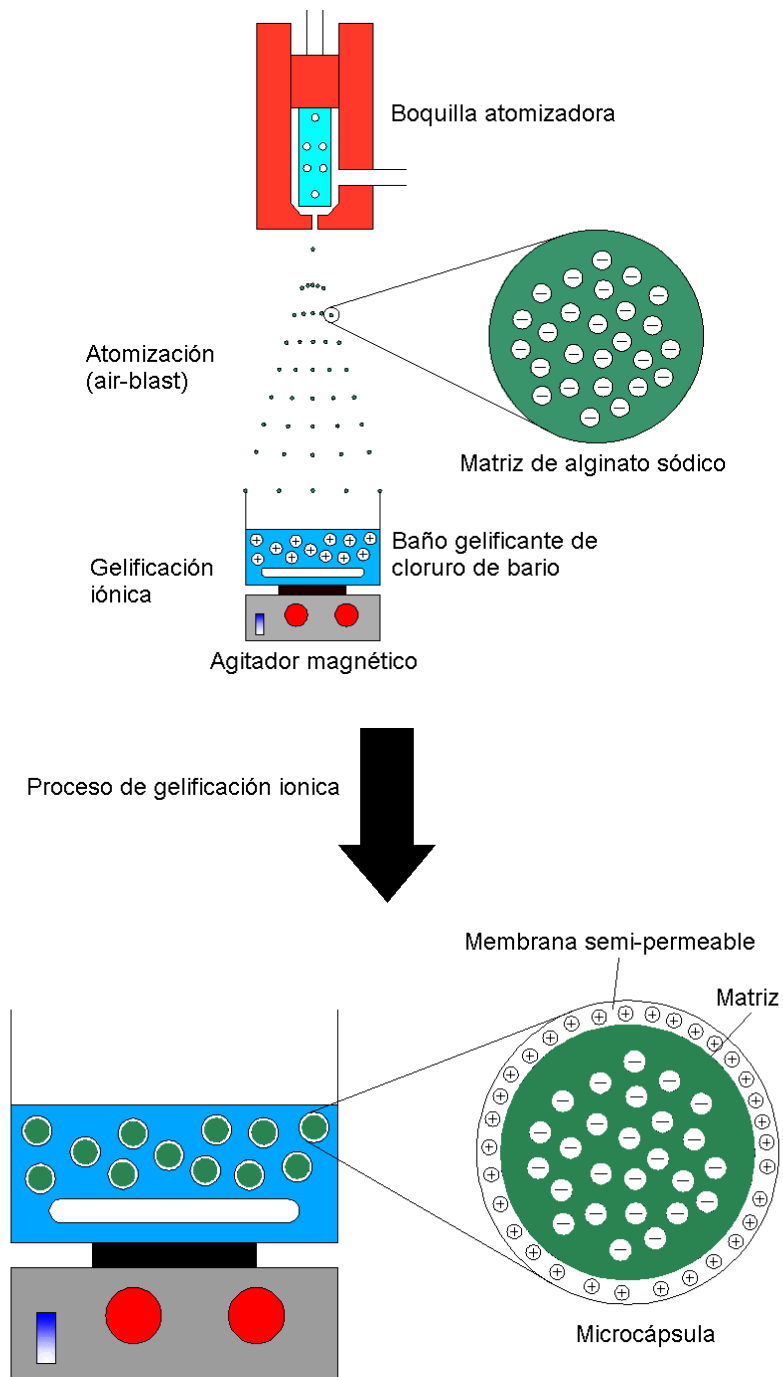


Figura 2.12. Esquema del proceso de microencapsulación utilizado

2.5.2. Puesta en marcha de la instalación

a) Calibración del rotámetro de área constante para el líquido

Debido a que se utiliza un rotámetro de área constante para la medición del caudal de alginato sódico, éste debe ser calibrado para las distintas disoluciones de alginato sódico utilizadas, ya que viene calibrado de fábrica para el agua.

La calibración de este rotámetro se realiza de forma manual, controlando los tiempos empleados por las disoluciones de alginato sódico en disminuir su volumen inicial en una probeta. Los resultados para las disoluciones de alginato sódico del 64,5-138-190 cP, se muestran en las Tabla 2.3. y en las Figuras 2.13., 2.14., y 2.15.

Como se observa en la Tabla 2.3., el rotámetro se calibra dentro del intervalo del 20 al 90 % de la escala de medición, ya que éste es el intervalo útil de medición en esta clase de medidores de caudal. Realizar medidas al 100 % o al 10 % conduciría a error.

En las Figuras 2.13.-2.15. se puede observar el comportamiento no lineal del rotámetro utilizado para la medición del caudal de alginato sódico. Esto es debido a que se utilizan viscosidades mayores a la del agua, que es el líquido para el que está fabricado el aparato de medida. Por ello, se ha realizado el calibrado punto por punto de la escala del rotámetro. No sería válida la calibración de un solo punto en la escala del aparato, ya que debido a su comportamiento no lineal, no sería posible obtener otro punto de la escala por aplicación de una extrapolación lineal.

Tabla 2.3.: Valores de la calibración del rotámetro de líquido

	64,5 cP	138,0 cP	190,0 cP
Escala (%)	Caudal (L/min)	Caudal (L/min)	Caudal (L/min)
90	0,037	0,017	0,010
80	0,029	0,013	0,009
70	0,023	0,010	0,006
65	0,020	0,009	0,005
60	0,017	0,008	0,005
50	0,012	0,006	0,003
40	0,009	0,004	0,003
30	0,006	0,003	0,002
20	0,003	0.002	0.001

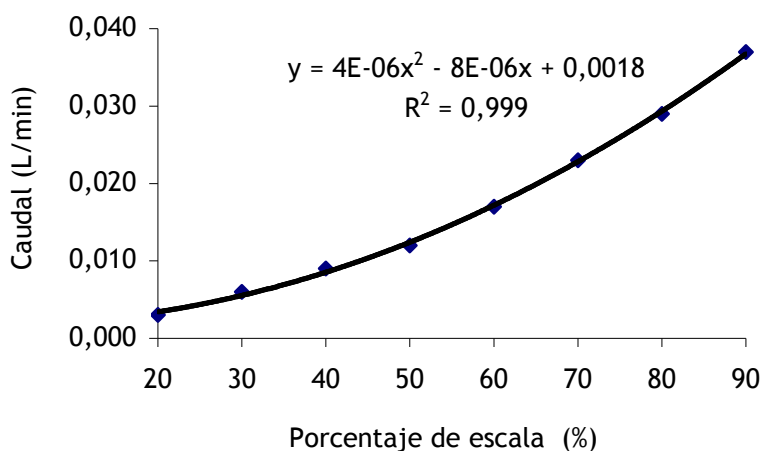


Figura 2.13. Curva de calibración del rotámetro de líquido para 64,5 cP

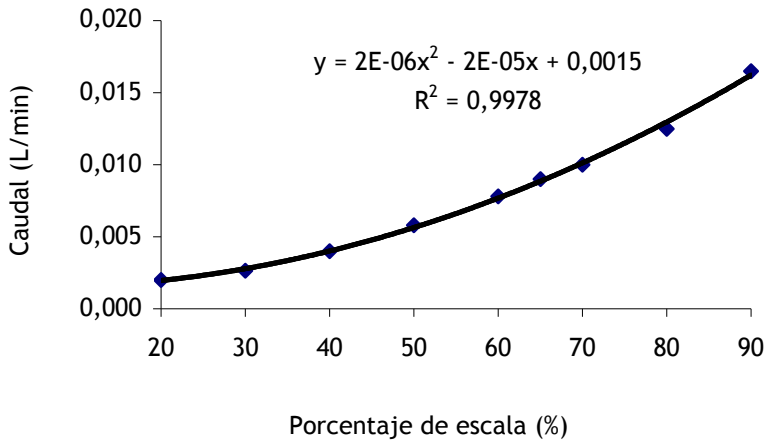


Figura 2.14. Curva de calibración del rotámetro de líquido para 138,0 cP

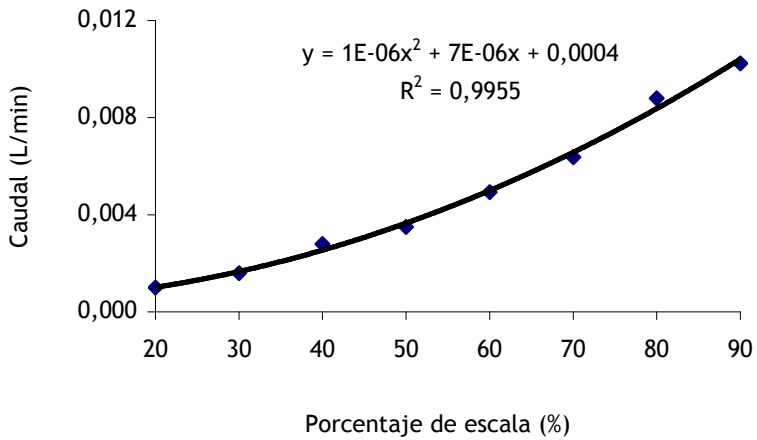


Figura 2.15. Curva de calibración del rotámetro de líquido para 190,0 cP

b) *Experimentos preliminares.*

Se llevaron a cabo una serie de experimentos preliminares para comprobar que la instalación producía microcápsulas esféricas y uniformes, con un tamaño de partícula en el intervalo de 20-50 μm . Además, se quiso comprobar que la variación del tamaño de partícula, generado al modificar las diferentes variables que influyen en el proceso, era apreciable, dentro del rango de operación.

Todos los experimentos preliminares fueron caracterizados mediante un análisis del tamaño de las cápsulas con difracción láser (véase Apéndice I, “Materiales y Métodos”, para una descripción del método), y mediante fotografías realizadas con una cámara científica conectada a un microscopio óptico (véase Apéndice I, “Materiales y Métodos”, para una descripción del método).

En este trabajo, el tamaño de partícula se expresa como distribución de Sauter (SMD = Sauter Mean Diameter = $D[3,2]$) que se puede definir como el diámetro de aquella partícula en el que el valor de la relación volumen/superficie es el mismo que la media aritmética de los valores de la relación volumen/superficie del total del número de partículas que pertenecen a la misma muestra bajo examen. Este tipo de distribución de tamaño de partícula suele ser utilizado en la bibliografía para modelar el proceso de la atomización, ya que está influenciado por las propiedades del líquido atomizado y del aire, así como por el diseño y las condiciones de operación de la boquilla atomizadora.

Normalmente, la distribución SMD se define como:

$$SMD = \frac{\int_0^{\infty} D^3 dN}{\int_0^{\infty} D^2 dN} \quad (2.1)$$

donde D es el diámetro de la partícula, y dN representa el porcentaje del total del número de gotas con un diámetro contenido en el intervalo $[D, D+dD]$.

Para la realización de estos experimentos exploratorios se utilizaron disoluciones acuosas de alginato sódico con diferente viscosidad, 64,5-138,0-190,0 cP. No se utilizaron disoluciones de alginato sódico con una viscosidad inferior a 64,5 cP, ya que éstas no producen microcápsulas con una membrana suficientemente resistente (Broechx y Del Valle, 2003). Tampoco se utilizaron disoluciones con una viscosidad superior a 190,0 cP, ya que en las condiciones de operación del sistema de atomización utilizado, no se produce el proceso de generación del spray.

Como solución gelificante se utilizó cloruro de bario al 2 % en peso (concentración seleccionada a partir de los experimentos realizados anteriormente por el grupo de investigación) (Broechx y Del Valle, 2003). El catión Ba^{2+} produce microcápsulas con una mayor resistencia que las producidas con Ca^{2+} . Esta resistencia aumenta al aumentar el radio iónico, ya que rellenan un mayor espacio entre las moléculas del alginato sódico en el proceso de la gelificación iónica. No se emplean estroncio ni radio, ya que estos elementos son tóxicos. Cationes menores que el calcio, como el magnesio, no producen la reacción de gelificación iónica (Broechx y Del Valle, 2003).

Se siguieron las siguientes condiciones experimentales:

- Distancia de la boquilla de atomización al baño de gelificación: 45 cm.
- Tamaño del baño de gelificación: 23 cm.
- Seguidor magnético: 15 cm.
- Tiempo de atomización: 1-4 minutos¹.

¹ El tiempo de atomización variará en este intervalo. Cuanto menor sea el tamaño de las cápsulas producidas, mayor será el tiempo necesario de atomización y viceversa. Esto es debido, a que el analizador del tamaño de partícula necesita un volumen mínimo de muestra para realizar las medidas. Por tanto, en el caso de obtener cápsulas pequeñas es necesario un mayor tiempo de atomización para obtener la muestra necesaria que necesita el dispositivo para realizar las medidas.

- Tiempo de gelificación iónica: 5 minutos.
- Temperatura de trabajo: 25 °C.

La boquilla neumática utilizada en este trabajo dispone de cuatro posiciones diferentes de apertura del orificio de salida que regulan la cantidad de aire disipada antes de salir por el orificio final de la boquilla una vez formado el spray. Así, una menor o mayor apertura genera conos de atomización con diferentes ángulos variando desde 15 hasta 90 grados.

Los primeros experimentos exploratorios se realizaron a una viscosidad de 64,5 cP con la apertura más pequeña de la boquilla atomizadora, posición uno.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se recogen en la Tabla 2.4., donde se observa la variación del tamaño de partícula con la variación del caudal de alginato sódico y de aire.

Tabla 2.4.: Experimentos preliminares realizados con la boquilla cerrada a 64,5 cP

Caudal alginato (L/min)	Caudal aire (L/min)	Tamaño (SMD)(μm)
0,029	96,000	30,19
0,017		27,72
0,006		31,16
0,029	116,000	50,19
	74,000	28,63

En la Tabla 2.4. se puede apreciar que se obtiene una variación del tamaño de partícula anómalo. No se produce una variación apreciable del tamaño de partícula con la variación del caudal de alginato en el rango de

operación, cuando debería producirse una disminución del tamaño al disminuir el caudal de líquido (Arai y Hashimoto, 1985; Rizk y Lefebvre, 1980). Además, se produce un aumento apreciable del tamaño de partícula con el aumento del caudal de aire, lo cual es incongruente con los estudios realizados hasta ahora por diversos autores (Arai y Hashimoto, 1985; Rizk y Lefebvre, 1980).

En la Figura 2.16., se muestra un ejemplo representativo de distribución de partícula para estos primeros experimentos exploratorios.

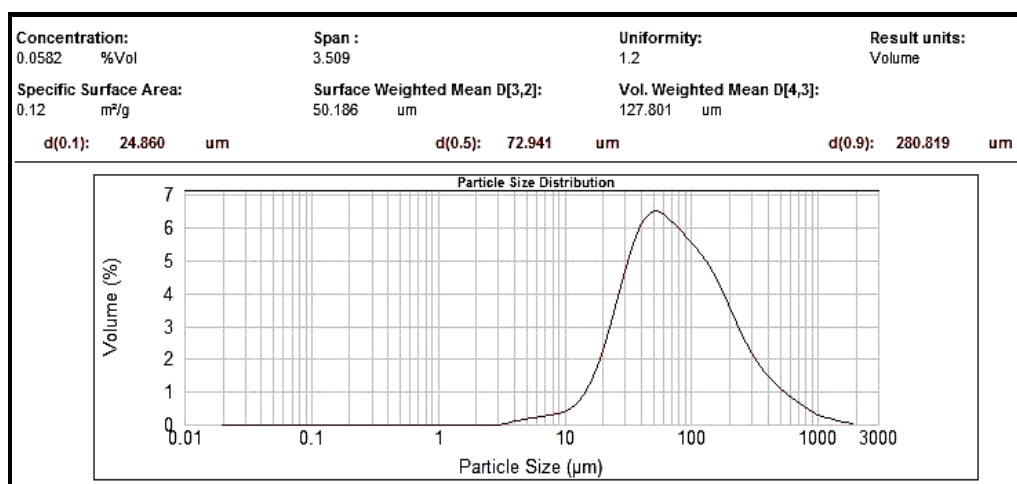


Figura 2.16. Ejemplo de distribución de partícula con boquilla cerrada
(Caudal de alginato: 29 mL/min; Caudal de aire: 116 L/min)

En la Figura 2.16. se observa que la distribución de partícula para estos experimentos tiene un alto span, que significa una distribución de tamaño muy amplia.

La razón por la que se produce este comportamiento es la pequeña apertura de la boquilla de atomización que produce un ángulo del cono de atomización pequeño, produciéndose una mala formación de las microcápsu-

las (Figura 2.17.), debido a que el aire choca más violentamente contra la superficie de la disolución de cloruro de bario, generando turbulencias.

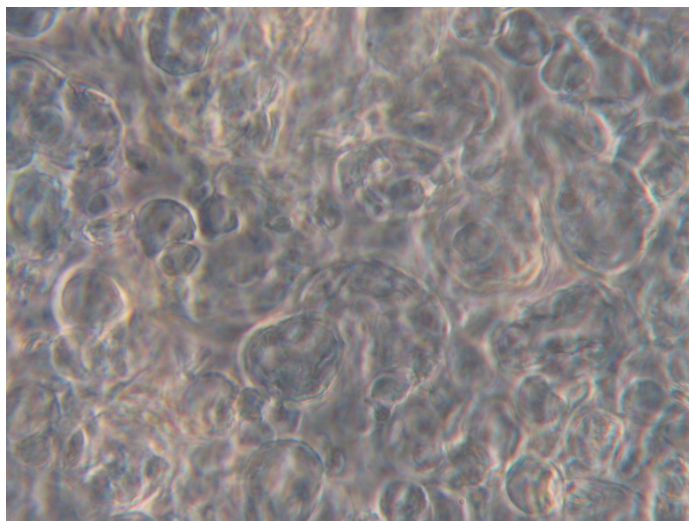


Figura 2.17. Fotografía de las microcápsulas con boquilla cerrada

(Objetivo 40X x 3X de zoom óptico; Boquilla atomizadora cerrada; Caudal y viscosidad de alginato sódico: 0,017 L/min y 64,5 cP, respectivamente)

Como se describió previamente, la boquilla atomizadora neumática utilizada en este trabajo dispone de cuatro posiciones de apertura del cono de atomización. Cuando la boquilla está en su mínima apertura, es decir, en la posición 1, se produce un cono de atomización muy pequeño, de tal forma que todo el aire utilizado para la generación del spray sale por el orificio final de la boquilla, incidiendo sobre la disolución gelificante, generando turbulencias en la superficie de la misma, produciéndose una mala formación de las capsulas.

A continuación se realizaron experimentos a la misma viscosidad, 64,5 cP, pero con la boquilla atomizadora con una mayor apertura, posición 3, de tal forma que se pueda disipar parte del aire de atomización una vez que

haya producido su efecto, el spray, y así se produzca una buena formación de las cápsulas.

Los resultados obtenidos en estos experimentos se recogen en la Tabla 2.5., donde se observa la variación del tamaño de partícula con la variación del caudal de alginato sódico y de aire.

Tabla 2.5.: Experimentos preliminares realizados con la boquilla abierta a 64,5 cP

Caudal alginato (L/min)	Caudal aire (L/min)	Tamaño (SMD)(μm)
0,029	138,000	28,39
0,023		27,03
0,012		24,70
0,009		23,43
0,003		18,48
0,009	110,000	28,03
	116,000	27,73
	138,000	23,43

En la Tabla 2.5. se puede observar una variación apreciable del tamaño de partícula, dentro del rango de operación, para las dos variables de operación. Además, el comportamiento del sistema está de acuerdo con los principales trabajos realizados sobre el tema (Arai y Hashimoto, 1985; Rizk y Lefebvre, 1980). Se obtuvieron microcápsulas en el intervalo de tamaños requerido, 20-50 micras.

En la Figura 2.18. se muestra un ejemplo representativo de distribución de partícula para estos experimentos.

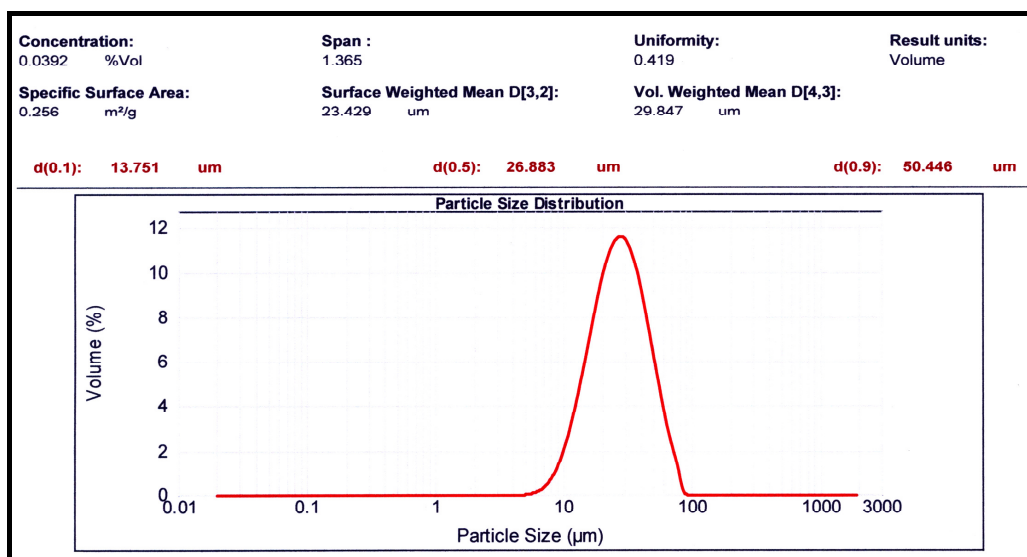


Figura 2.18. Ejemplo de distribución de partícula con boquilla abierta
(Caudal de alginato: 9 mL/min; Caudal de aire: 138 L/min)

En la Figura 2.18. se puede observar que la distribución de partícula para estos experimentos tiene un bajo valor en el span, que es indicativo de una distribución de tamaño estrecha.

La razón de esta mejora en el comportamiento de la instalación es la mayor apertura de la boquilla neumática (posición 3). Con una mayor apertura de la boquilla, posición 3, se consigue que el aire genere el spray de igual forma que en la posición 1, pero sin embargo, se consigue disipar parte de este aire (Figura 2.19.) antes de la salida por el orificio final de la boquilla, de tal forma que éste no incida sobre la disolución gelificante de cloruro de bario, evitando por tanto la formación de turbulencias en la superficie de la solución gelificante, y por tanto, produciéndose una buena formación de las cápsulas (Figura 2.20.). No se utiliza la posición 4 de la boquilla porque en esta posición se disipa todo el aire, de tal forma que no se consigue expulsar las gotas del spray fuera de la boquilla.

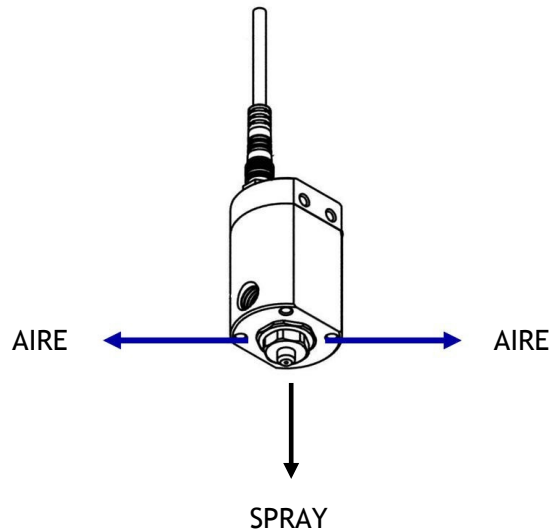


Figura 2.19. Esquema de la disposición del aire en la boquilla neumática

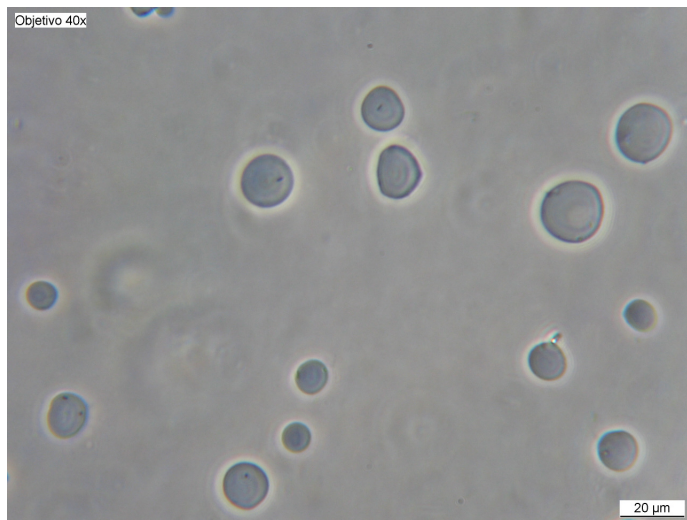


Figura 2.20. Fotografía de las microcápsulas con la boquilla abierta

(Objetivo 40X x 3X de zoom óptico; Boquilla abierta; Caudal de aire: 138,000 L/min; Caudal y viscosidad de alginato sódico: 0,009 L/min y 64,5 cP, respectivamente)

Por último, se realizaron experimentos preliminares a viscosidades mayores, 138,0 y 190,0 cP, con la boquilla atomizadora en posición 3, con el objetivo de comprobar que la instalación producía cápsulas esféricas, uniformes, y en el rango de tamaño requerido, a pesar del aumento de la viscosidad del polímero. Además, se quiso comprobar que la variación del tamaño de partícula, generado al modificar las diferentes variables que influyen en el proceso, era apreciable dentro del rango de operación.

En la Tabla 2.6. se observa la variación del tamaño de partícula con la variación del caudal de alginato sódico y de aire. En las Figuras 2.21. y 2.22., se muestran ejemplos representativos de distribución de partícula para estos experimentos exploratorios a altas viscosidades.

Tabla 2.6.: Experimentos preliminares (boquilla abierta a 138 y 190 cP)

		138,0 cP	190,0 cP
Caudal alginato (L/min)	Caudal aire (L/min)	Tamaño (SMD)(μm)	Tamaño (SMD)(μm)
0,013	138,000	31,33	-
0,010		29,07	31,56
0,009		27,41	30,69
0,006		26,43	29,81
0,003		23,60	28,26
0,009	110,250	36,68	39,79
	116,000	34,33	36,84
	138,000	27,41	30,69

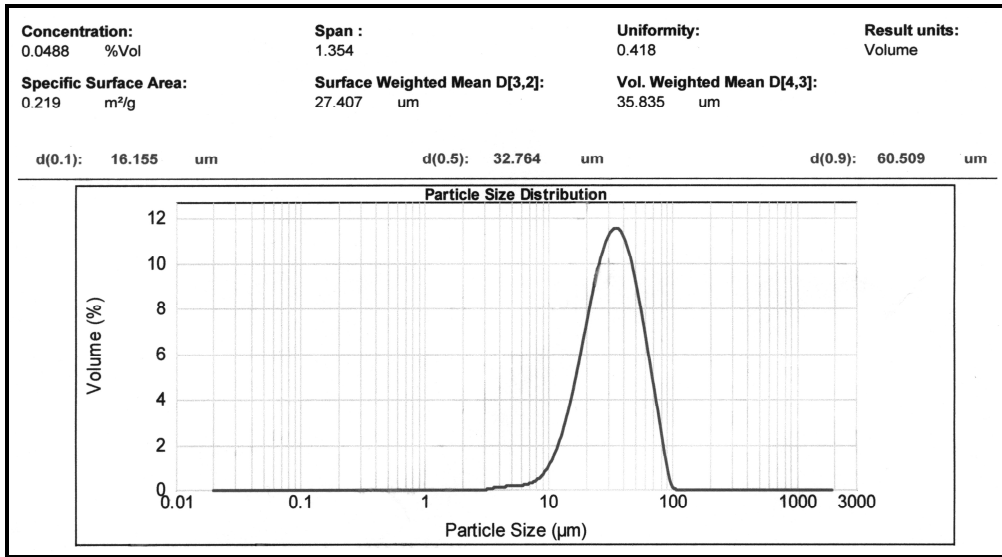


Figura 2.21. Distribución de partícula (boquilla abierta; viscosidad: 138 cP)
(Caudal de alginato: 9 mL/min; Caudal de aire: 138 L/min)

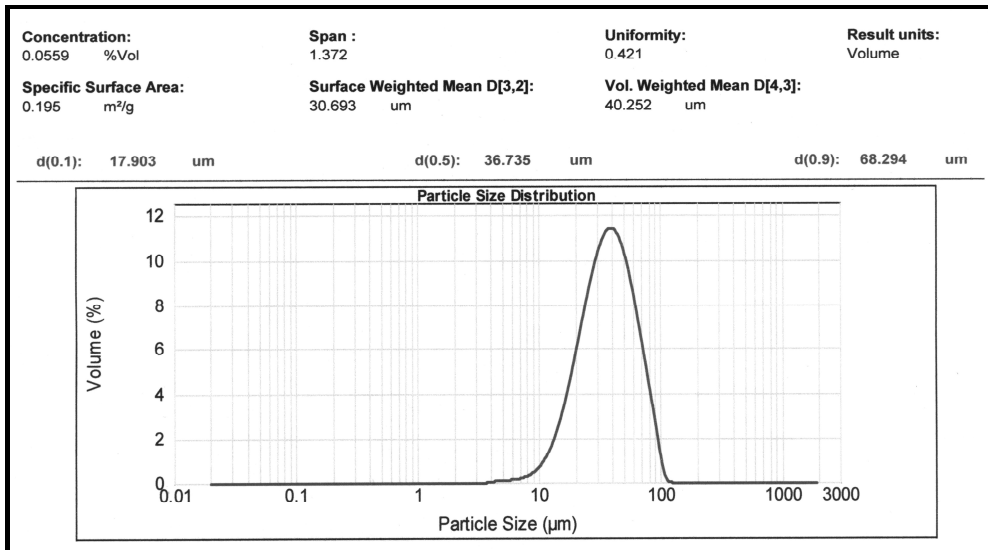


Figura 2.22. Distribución de partícula (boquilla abierta; viscosidad: 190 cP)
(Caudal de alginato: 9 mL/min; Caudal de aire: 138 L/min)

En la Tabla 2.6., se puede apreciar que se obtiene una variación apreciable del tamaño de partícula, dentro del rango de operación, para las dos variables. Además, el comportamiento del sistema está de acuerdo con los principales trabajos realizados sobre el tema (Arai y Hashimoto, 1985; Rizk y Lefebvre, 1980). Se obtuvieron microcápsulas en el intervalo de tamaños requerido, 20-50 micras.

En las Figuras 2.21. y 2.22. se puede observar que la distribución de partícula para estos experimentos tiene un bajo valor en el span que es indicativo de una distribución de tamaño estrecha.

Por tanto, al aumentar la viscosidad, si se mantiene la apertura de la boquilla en la posición 3, se sigue teniendo una buena formación de las cápsulas (ver Figuras 2.23 y 2.24.), obteniendo cápsulas esféricas y uniformes.

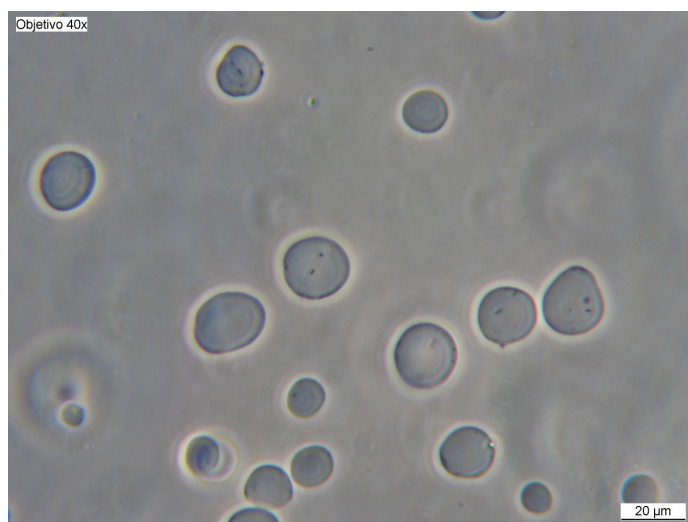


Figura 2.23. Fotografía de las microcápsulas con boquilla abierta
(Objetivo 40X x 3X de zoom óptico) (Caudal de aire de 138,000 L/min, y caudal y viscosidad de alginato de 0,006 L/min y 138,0 cP, respectivamente)

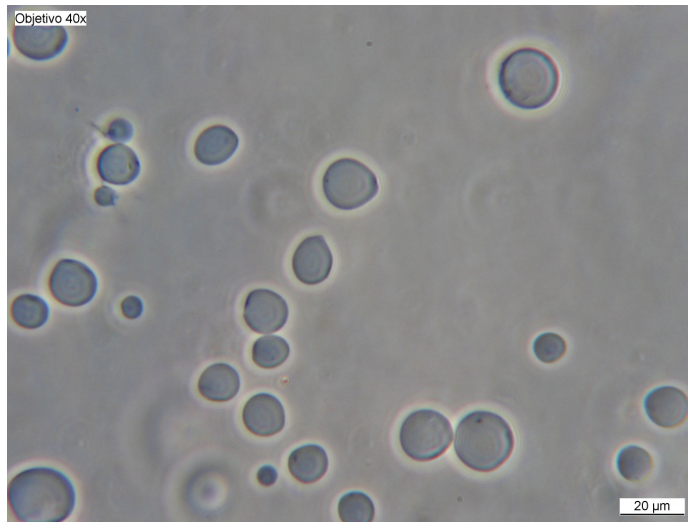


Figura 2.24. Fotografía de las microcápsulas con boquilla abierta
(Objetivo 40X x 3X de zoom óptico) (Caudal de aire de 138,000 L/min, y caudal y viscosidad de alginato de 0,006 L/min y 190,0 cP, respectivamente)

2.6. EFECTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN

La atomización es el proceso por el cual un chorro u hoja líquida se convierte en pequeñas gotas. Básicamente, se puede considerar como una alteración de la fuerza de la tensión superficial por la acción de fuerzas externas. La viscosidad del líquido atomizado, al igual que la fuerza de la tensión superficial, ejercen una influencia estabilizadora oponiéndose a cualquier cambio de la geometría del sistema. Sin embargo, las fuerzas aerodinámicas actúan sobre la tensión superficial del líquido promoviendo el proceso de ruptura del líquido, aplicando una fuerza de distorsión externa en el chorro u hoja líquida. El proceso de ruptura del líquido se produce justo cuando la fuerza de distorsión es mayor que la fuerza de tensión superficial (Figura 2.25.).

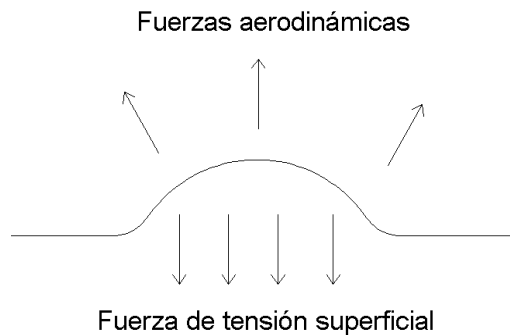


Figura 2.25. Sistema de fuerzas actuando sobre un chorro u hoja líquida moviéndose en aire

Además, como se describió previamente, para el proceso de atomización se utilizó una boquilla atomizadora neumática del tipo “prefilmer”, donde el líquido a una velocidad muy pequeña es dispersado en una fina hoja cónica antes de ser expuesto a corrientes de aire a alta velocidad en la parte interna y externa de la hoja anular de líquido (Figura 2.26.). En este tipo de boquillas se produce una buena atomización cuando existe una gran diferencia entre la velocidad del líquido atomizado y del aire atomizante.

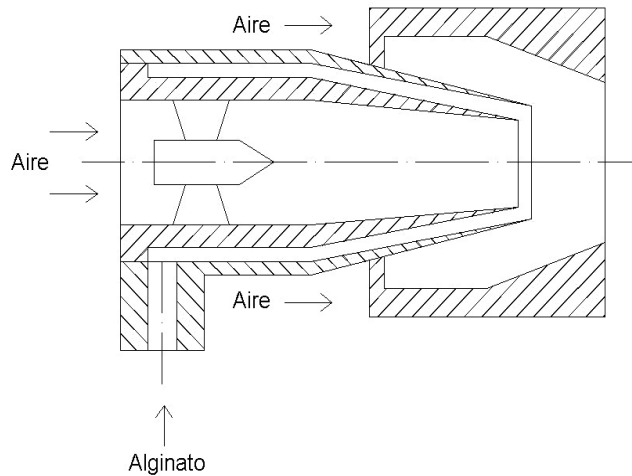


Figura 2.26. Esquema de la boquilla neumática prefilmer

Por tanto, el proceso de atomización depende no sólo de la geometría de la boquilla atomizadora sino también de las propiedades físicas del líquido atomizado y del aire atomizante.

Con el fin de conocer el efecto de los diferentes parámetros, que influyen en el proceso de atomización, en el tamaño final de partícula, se construyeron las curvas de comportamiento del sistema. Para ello, realizaron una serie de experimentos, donde se varió el caudal y la viscosidad de alginato sódico y el caudal de aire comprimido. Estas curvas nos permitirán conocer el comportamiento global del sistema, así como las condiciones de trabajo de la instalación para controlar el tamaño de gota.

Todos estos experimentos fueron caracterizados mediante un análisis del tamaño de las cápsulas con difracción láser (véase Apéndice I, “Materiales y Métodos” para ver una descripción del método) y fotografías realizadas con una cámara científica conectada a un microscopio óptico (véase Apéndice I, “Materiales y Métodos” para ver una descripción del método).

2.6.1. Efecto de la variación del caudal de alginato sódico

De acuerdo con la teoría de la atomización, debe existir una alta velocidad relativa entre el aire atomizante y el líquido atomizado para que se produzca la pulverización. Es decir, el caudal de alginato sódico es uno de los parámetros que influyen en el proceso de atomización. Por ello, es necesario estudiar la variación del tamaño de las microcápsulas con la modificación del caudal de alginato sódico a distintas viscosidades del polímero.

El intervalo de caudales de alginato sódico utilizados varía desde 0,003 L/min hasta 0,037 L/min, a un caudal constante de aire a presión de 138,0 L/min. Este intervalo de caudales viene impuesto por las características propias de la instalación. Con menos caudal de 0,003 L/min de alginato sódico es necesario demasiado tiempo de atomización para conseguir la cantidad de muestra necesaria para una medición óptima en el analizador del tamaño de partícula. Con un caudal mayor de 0,037 L/min se producen aglomerados por las características del sistema de atomización utilizado, ya que como se ha comentado anteriormente, el líquido se alimenta a la boquilla mediante succión, utilizando parte del aire de atomización. Por tanto, para aumentar el caudal de líquido es necesario aumentar el caudal de aire de atomización, produciéndose turbulencias en la superficie de la solución gelificante, deformándola y generando aglomerados y cápsulas deformadas.

Se comenzó con experimentos a una viscosidad constante de alginato sódico de 64,5 cP. Los tamaños de las cápsulas generadas se muestran en la Tabla 2.7., donde se observa la variación del tamaño de partícula con la variación del caudal de alginato sódico. A partir de estos datos, se construyó la curva de comportamiento correspondiente, mostrada en la Figura 2.27.

Tabla 2.7.: Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de alginato a 64,5 cP

<i>Caudal de aire constante : 138,0 L/min</i>	
Caudal de alginato (L/min)	Tamaño, SMD (μm)
0,037	30,56
0,029	28,39
0,023	27,03
0,013	24,70
0,009	23,75
0,006	19,20
0,003	18,48

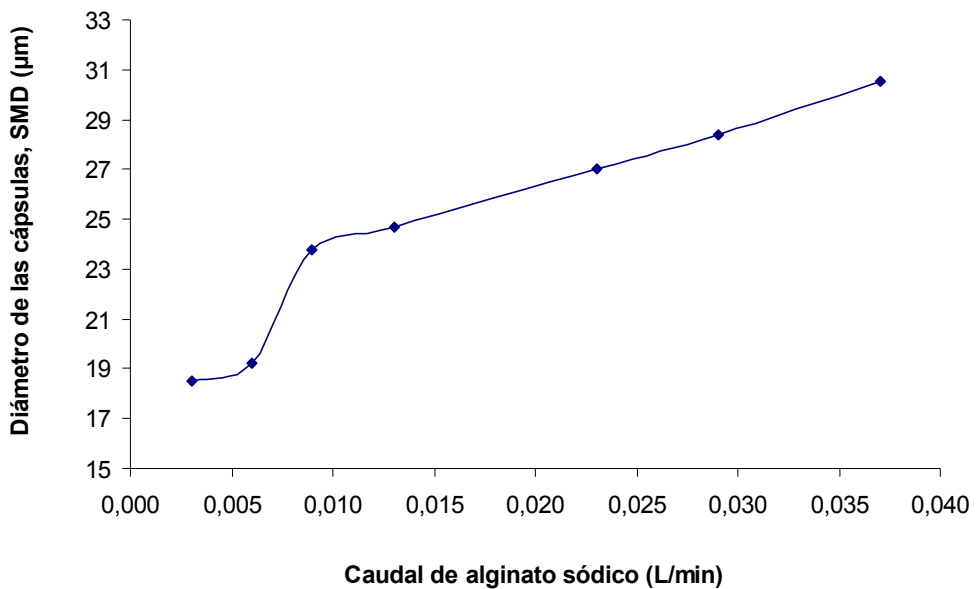


Figura 2.27. Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de alginato a 64,5 cP
(Viscosidad de alginato sódico: 64,5 cP; Caudal de aire: 138,0 L/min)

Un análisis de los datos experimentales obtenidos muestra que el diámetro medio de las microcápsulas decrece al hacerlo el caudal de alginato sódico.

Estos resultados están en concordancia con las explicaciones teóricas dadas por algunos autores sobre el fenómeno.

Rizk y Lefebvre (1980) estudiaron la influencia del espesor inicial de la hoja líquida en las características del pulverizado. Encontraron que se producían hojas líquidas más finas cuanto menor fuera el caudal de alginato sódico. Se observó que las hojas líquidas más delgadas rompían en gotas más pequeñas. Trabajos anteriores han comentado resultados similares. Por ejemplo, los análisis de York et al. (1953), Hagerty y Shea (1955), y Dombrowski y Johns (1963), sugirieron que el diámetro medio de las gotas producidas es aproximadamente proporcional a la raíz cuadrada del grosor de la hoja líquida.

Arai y Hashimoto (1985) estudiaron la desintegración de hojas líquidas inyectadas en corrientes de aire que fluyen en el mismo sentido. Estos autores mostraron que la longitud de ruptura se incrementa al hacerlo la velocidad del líquido. Al aumentar la longitud de ruptura se producen microcápsulas mayores.

Por lo tanto, un aumento del caudal de alginato sódico genera microcápsulas de mayor tamaño y los datos bibliográficos están en total concordancia con los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo.

Se tomaron fotografías de algunas de las microcápsulas producidas (Figura 2.28.). Se utilizaron dos magnificaciones, de 40 y 100 aumentos (40X y 100X). La imagen a 40X (Figura 2.28.-a) muestra una perspectiva general, donde se puede apreciar la esfericidad y homogeneidad de las microcápsulas obtenidas. El aumento de 100X (Figura 2.28.-b) muestra una imagen detallada de las microcápsulas obtenidas. En esta última fotografía se puede apreciar la estructura típica de una microcápsula: una matriz polimérica de alginato sódico, que constituye el núcleo de la microcápsula, y una membrana semi-

permeable o cubierta de la microcápsula formada alrededor de la matriz polimérica de alginato sódico.

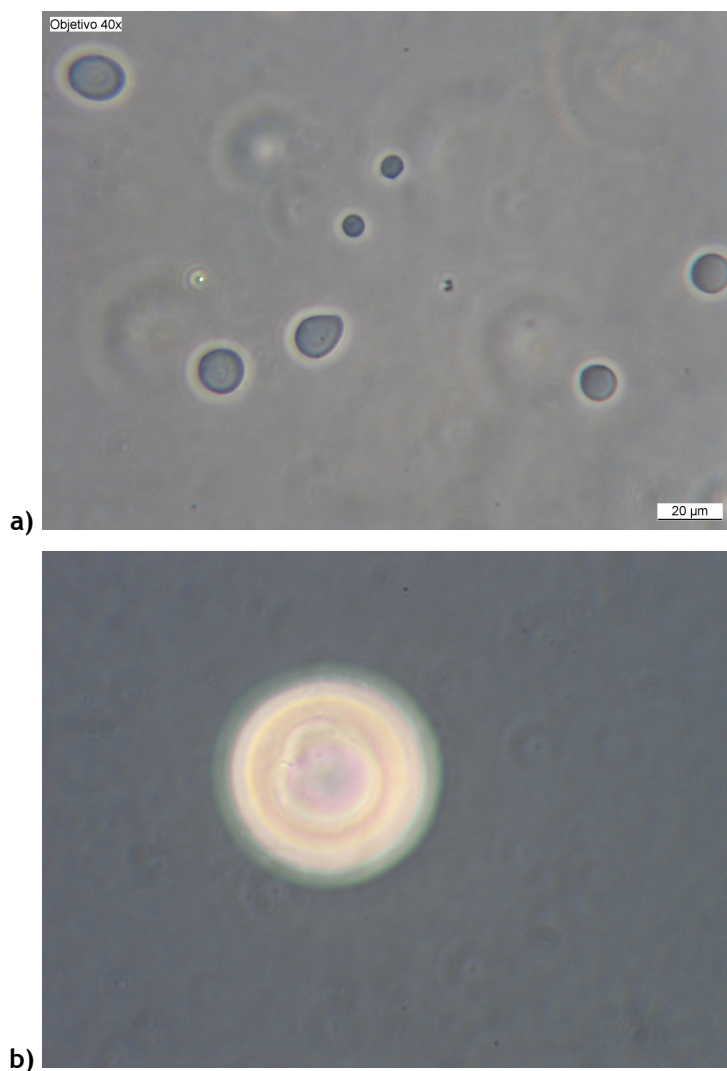


Figura 2.28. Fotografías de las microcápsulas a 64,5 cP

(Viscosidad y caudal alginato: 64,5 cP y 0,003 L/min; Caudal aire: 138,000 L/min)

- a) objetivo 40X x 3X de zoom óptico.
- b) objetivo 100X x 3X de zoom óptico.

Posteriormente, se realizaron experimentos a mayores viscosidades: 138,0 cP y 190,0 cP. En ambos casos, el intervalo de caudales de alginato sódico utilizados vino condicionado por las características propias de la instalación. Se varió el caudal de alginato sódico desde 0,003 L/min hasta 0,013 L/min para los experimentos llevados a cabo a 138,0 cP. Sin embargo, para 190,0 cP el intervalo se modificó desde 0,003 L/min hasta 0,010 L/min. Con menos caudal de 0,003 L/min es necesario demasiado tiempo de atomización para conseguir la cantidad de muestra necesaria para una medición óptima en el analizador del tamaño de partícula. El límite superior vino condicionado por la limitación que supone la viscosidad del líquido en cuanto a la alimentación de éste a la boquilla neumática. Como se comentó anteriormente, el líquido es alimentado a la boquilla mediante succión, lo que supone utilizar parte del aire de atomización en la impulsión del líquido hacia la boquilla. Téngase en cuenta, que cuanto más aire de atomización se utilice, más aumenta la probabilidad de que se genere una mala formación de las cápsulas. Al aumentar la viscosidad del alginato, para obtener el mismo caudal de líquido, es necesario aumentar aún más el caudal de aire para poder succionar un líquido más viscoso. Al aumentar el caudal de aire de atomización se producen turbulencias en la superficie de la solución gelificante, deformándola y generando aglomerados y cápsulas deformadas.

Con una viscosidad de 138,0 cP, el diámetro de las microcápsulas obtenidas (distribución de Sauter) y las curvas de comportamiento del sistema se muestran en la Tabla 2.8. y en la Figura 2.29., respectivamente.

Un análisis de los datos experimentales, muestra el mismo efecto que fue observado con disoluciones de menor viscosidad. Es decir, el aumento de la viscosidad de la disolución de alginato sódico, no produce cambios en la tendencia general del sistema.

Tabla 2.8.: Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de alginato a 138 cP.

<i>Caudal de aire: 138,0 L/min</i>	
Caudal de alginato (L/min)	Tamaño, SMD (μm)
0,013	31,33
0,010	29,07
0,009	27,42
0,006	26,43
0,003	23,60

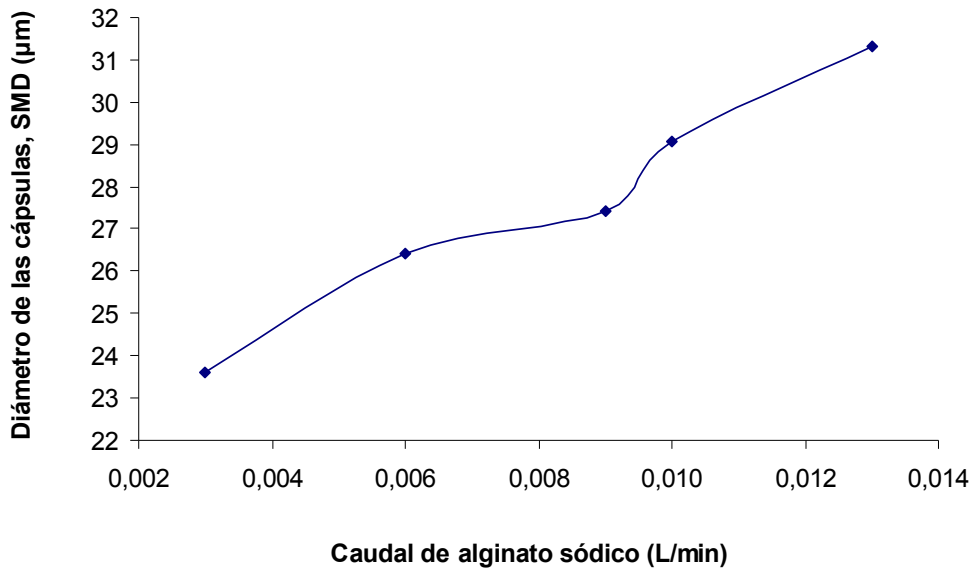


Figura 2.29. Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de alginato a 138 cP
(Viscosidad de alginato sódico: 138,0 cP; Caudal de aire: 138,0 L/min)

Por último, se tomaron fotografías de algunas de las microcápsulas producidas (Figura 2.30.).

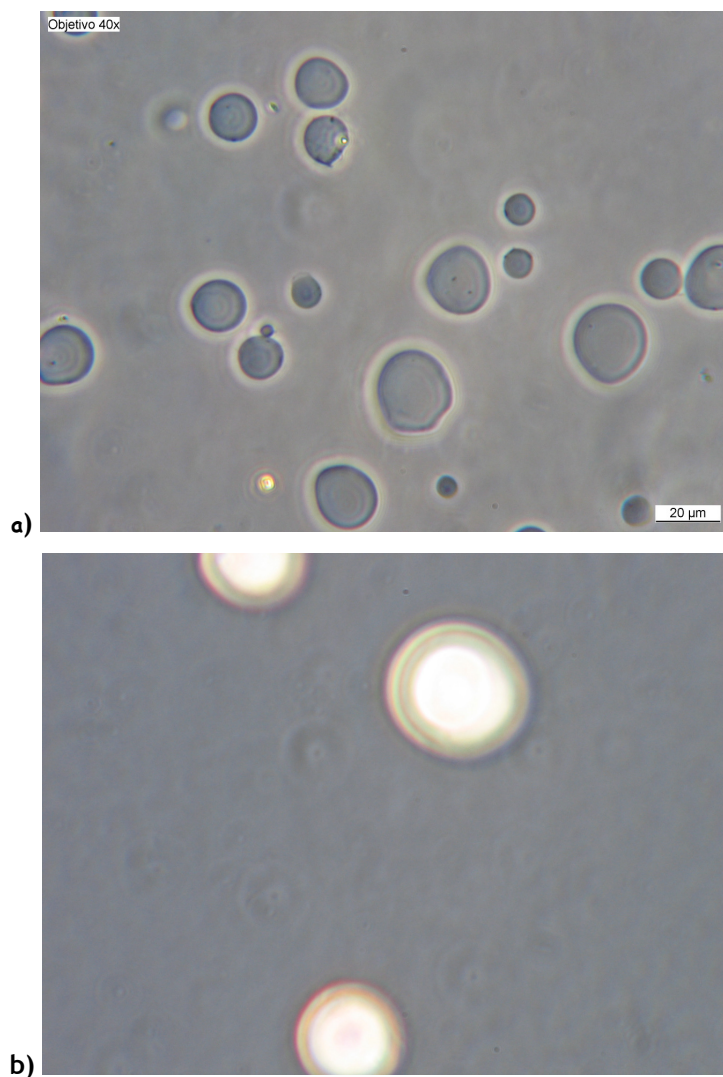


Figura 2.30. Fotografías de las microcápsulas a 138 cP

(Viscosidad y caudal alginato: 138,0 cP y 0,010 L/min, Caudal aire: 138L/min)

- a) objetivo 40X x 3X de zoom óptico.
- b) objetivo 100X x 3X de zoom óptico.

Se utilizaron dos magnificaciones, de 40 y 100 veces (40X y 100X). El aumento de 40X (Figura 2.30-a), muestra una imagen general, donde se puede apreciar la esfericidad y homogeneidad de la microcápsulas obtenidas. El aumento de 100X (Figura 2.30-b), muestra una imagen detallada de las microcápsulas obtenidas, donde puede apreciarse la estructura típica de una microcápsula: una matriz polimérica de alginato sódico, y alrededor una membrana semi-permeable.

Con una viscosidad de 190,0 cP, el diámetro de las microcápsulas obtenidas y las curvas de comportamiento se muestran en la Tabla 2.9. y en la Figura 2.31., respectivamente.

Un análisis de los datos experimentales muestra que con esta viscosidad (190 cP) se obtiene la misma tendencia que para las otras viscosidades estudiadas (64,5 y 138 cP), es decir, el tamaño de las microcápsulas disminuye al hacerlo el caudal de alginato sódico. Por tanto, se vuelve a observar que el cambio de viscosidad de la disolución de alginato sódico no produce ningún cambio en la tendencia general del sistema.

Tabla 2.9.: Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de alginato a 190 cP

<i>Caudal de aire: 138,0 L/min</i>	
Caudal de alginato (L/min)	Tamaño, SMD (μm)
0,010	31,56
0,009	30,76
0,006	29,81
0,005	28,98
0,003	28,26

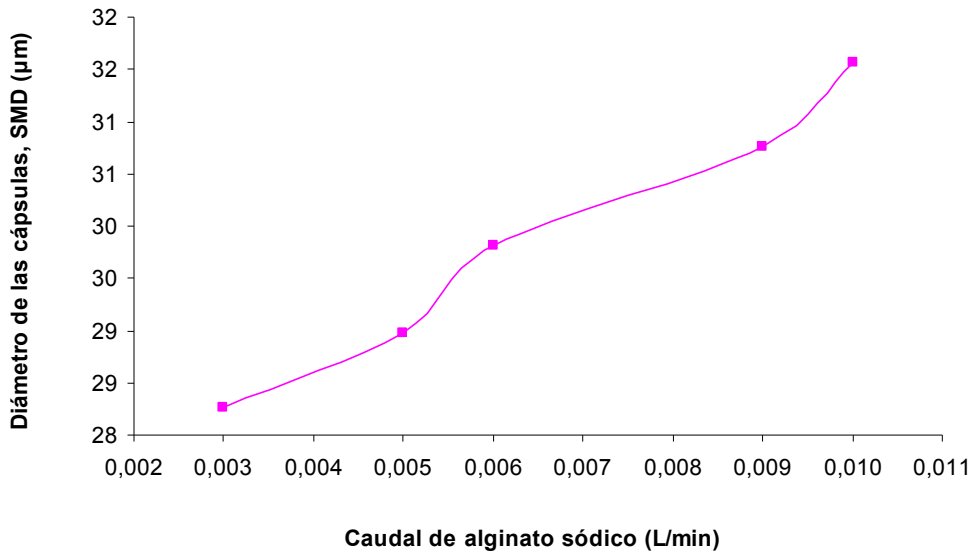


Figura 2.31. Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de alginato a 190 cP

Viscosidad de alginato sódico: 190,0 cP; Caudal de aire: 138,000 L/min)

Por último, se tomaron fotografías de algunas de las microcápsulas producidas (Figura 2.32.) mediante la cámara digital conectada al microscopio óptico. Se utilizaron dos magnificaciones, de 40 y 100 veces (40X y 100X).

El aumento de 40X (Figura 2.32-a), muestra una imagen general, donde se puede apreciar la esfericidad y homogeneidad de la microcápsulas obtenidas. El aumento de 100X (Figura 2.32-b), muestra una imagen detallada de las microcápsulas obtenidas, donde se puede apreciar la estructura típica de una microcápsula.

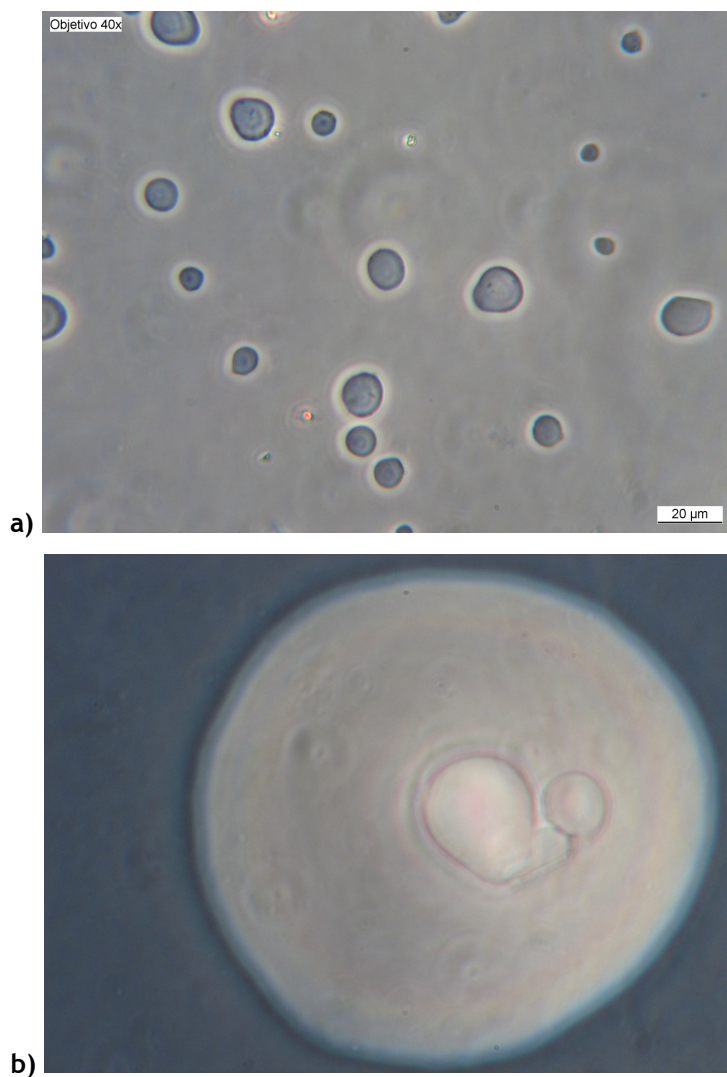


Figura 2.32. Fotografías de las microcápsulas a 190 cP

(Viscosidad y caudal alginato: 190,0 cP y 0,005 L/min; Caudal aire: 138,000 L/min)

- a) objetivo 40X x 3X de zoom óptico.
- b) objetivo 100X x 3X de zoom óptico.

2.6.2. Efecto de la variación del caudal de aire

El caudal de aire comprimido es otro de los parámetros que influyen en el proceso de atomización, y por lo tanto en el proceso de generación de las microcápsulas utilizado. El aire genera inestabilidad en el chorro líquido mediante las fuerzas aerodinámicas, oponiéndose a la fuerza estabilizante de la tensión superficial del líquido, provocando la ruptura del chorro líquido. Por ello, es necesario estudiar la variación del tamaño de las cápsulas con la modificación del caudal de aire comprimido a distintas viscosidades de alginato sódico.

Para estudiar el efecto del caudal de aire en el tamaño de partícula se llevaron a cabo una serie de experimentos a distintos caudales constantes de alginato sódico (0,003, 0,006, 0,009 L/min), variando el caudal de aire de 78,400 L/min a 138,000 L/min. El intervalo de caudales de aire utilizados viene impuesto por las características propias de la instalación. Con un caudal de aire menor que 78,4 L/min no se produce la atomización ni el caudal deseado de líquido, producido por succión con la boquilla utilizada. Un caudal mayor de 138,0 L/min genera una deformación en la superficie de la disolución de cloruro de bario cuando se realiza la atomización, produciéndose una mala formación de las cápsulas.

Se comenzó con experimentos a una viscosidad constante de alginato sódico de 64,5 cP. El diámetro de las microcápsulas y las curvas de comportamiento del sistema se muestran en la Tabla 2.10. y en la Figuras 2.33.-2.35., respectivamente.

Tabla 2.10.: Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de aire, a tres caudales y una viscosidad constantes de alginato de 0,009, 0,006 y 0,003 L/min y 64,5 cP, respectivamente

Caudal de alginato (L/min)	Caudal de aire (L/min)	Tamaño, SMD (μm)
0,009	89,600	35,87
	95,200	34,69
	110,250	28,03
	116,550	27,73
	138,000	23,75
0,006	78,400	33,47
	84,000	29,08
	95,200	28,57
	113,400	26,61
	131,100	24,13
	138,000	19,20
0,003	89,600	31,03
	95,200	29,81
	113,400	25,32
	131,100	22,12
	138,000	18,48

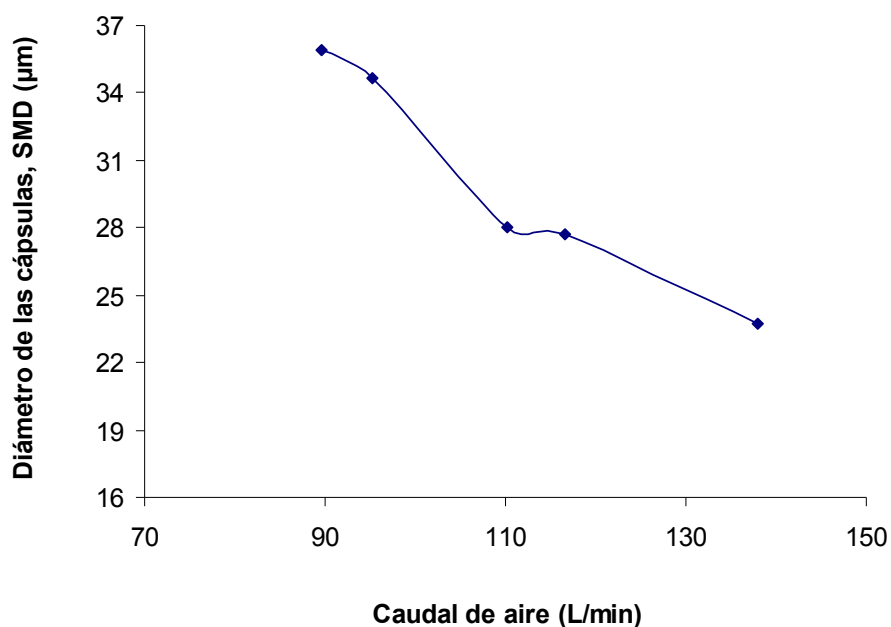


Figura 2.33. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire
(Viscosidad y caudal de alginato: 64,5 cP, 0,009 L/min, respectivamente)

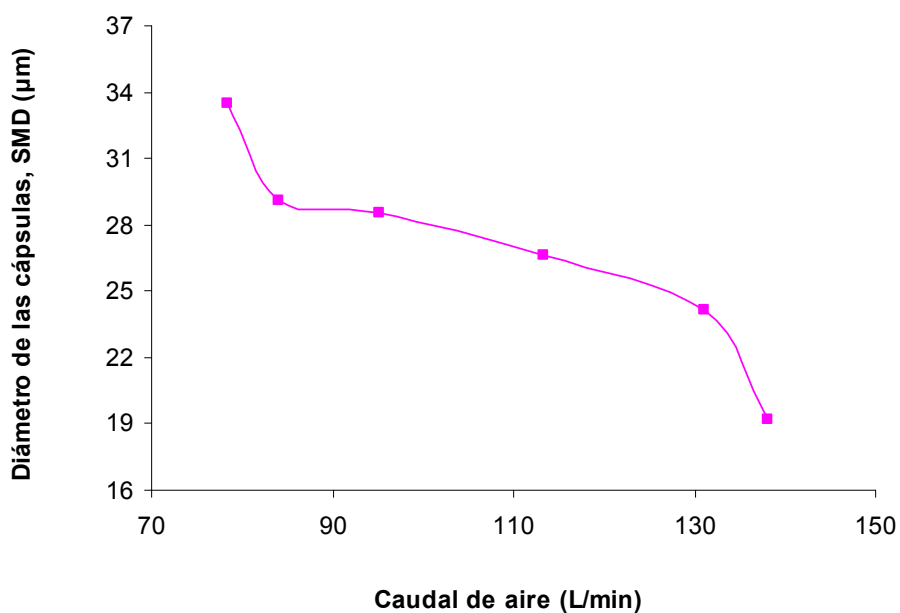


Figura 2.34. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire
(Viscosidad y caudal de alginato: 64,5 cP, 0,006 L/min, respectivamente)

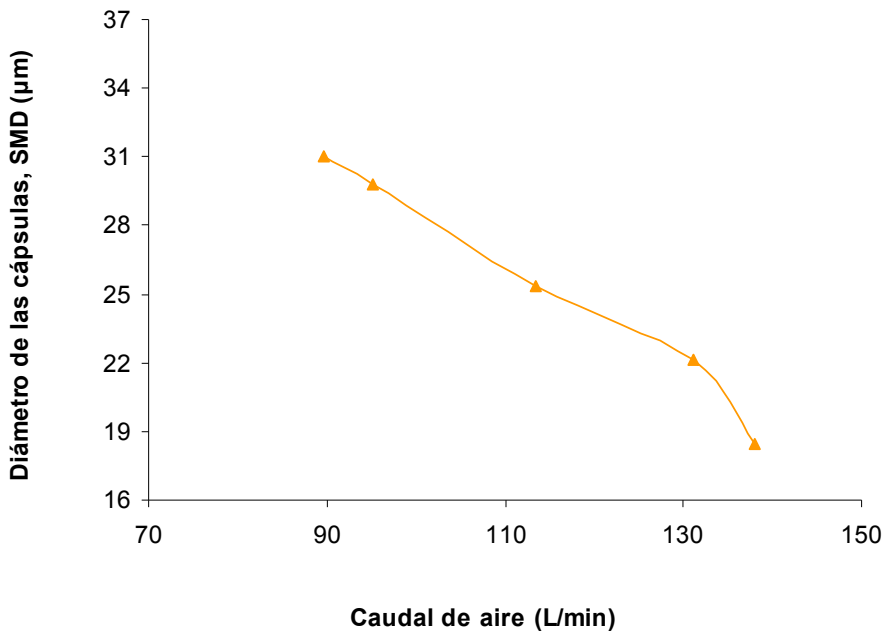


Figura 2.35. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire
(Viscosidad y caudal de alginato: 64,5 cP, 0,003 L/min, respectivamente)

Un análisis de los datos experimentales obtenidos muestra que el diámetro medio de las microcápsulas decrece al aumentar el caudal de aire comprimido.

El principio fundamental de la desintegración de un líquido se basa en el incremento del área superficial, normalmente en forma de un chorro u hoja líquida, que se convierte en inestable y rompe en gotas. El incremento del área superficial aire-líquido resulta del incremento en el movimiento entre la capa superficial del líquido y del aire, produciendo energía cinética para la desintegración. Por tanto, un incremento en el caudal de aire produce una mayor área superficial aire-líquido, que provoca una mayor desintegración, produciendo una disminución del tamaño de partícula.

Además, los resultados obtenidos están en concordancia con las explicaciones teóricas dadas por algunos autores sobre el fenómeno.

Rizk y Lefebvre (1980) examinaron los mecanismos de ruptura de la hoja líquida y de la formación de las gotas. Mostraron que la interacción líquido/aire produce ondas que se vuelven inestables y desintegran la lámina en fragmentos. Estos fragmentos se contraen formando ligamentos que rompen en gotas. Es decir, al aumentar el caudal del aire se promueven ondas inestables que provocan una mayor desintegración, produciendo un tamaño medio de las partículas menor. Estos autores probaron, además, que al incrementar la velocidad del aire, la hoja líquida desintegra más temprano y los ligamentos se forman más cerca de los labios de la boquilla atomizadora. Estos ligamentos tienden a ser más delgados y más cortos y se desintegran en gotas más pequeñas. Por tanto, el aumento del caudal de aire provoca una ruptura más cercana a la boquilla, produciendo ligamentos más delgados y cortos que se desintegran en gotas más pequeñas, produciéndose una disminución en el diámetro medio de las microcápsulas.

Arai y Hashimoto (1985) estudiaron la desintegración de hojas líquidas inyectadas en corrientes de aire que fluyen en el mismo sentido. Estos autores mostraron que para un espesor constante de la hoja líquida, la longitud de ruptura decrece al incrementar la velocidad relativa entre el aire y el líquido. Al disminuir la longitud de ruptura, se producen microcápsulas menores.

Por tanto, un aumento del caudal de aire comprimido genera microcápsulas de menor tamaño, y los datos bibliográficos están en total concordancia con los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo.

Se tomaron fotografías de algunas de las microcápsulas producidas (Figura 2.36.) mediante una cámara digital conectada a un microscopio óptico.

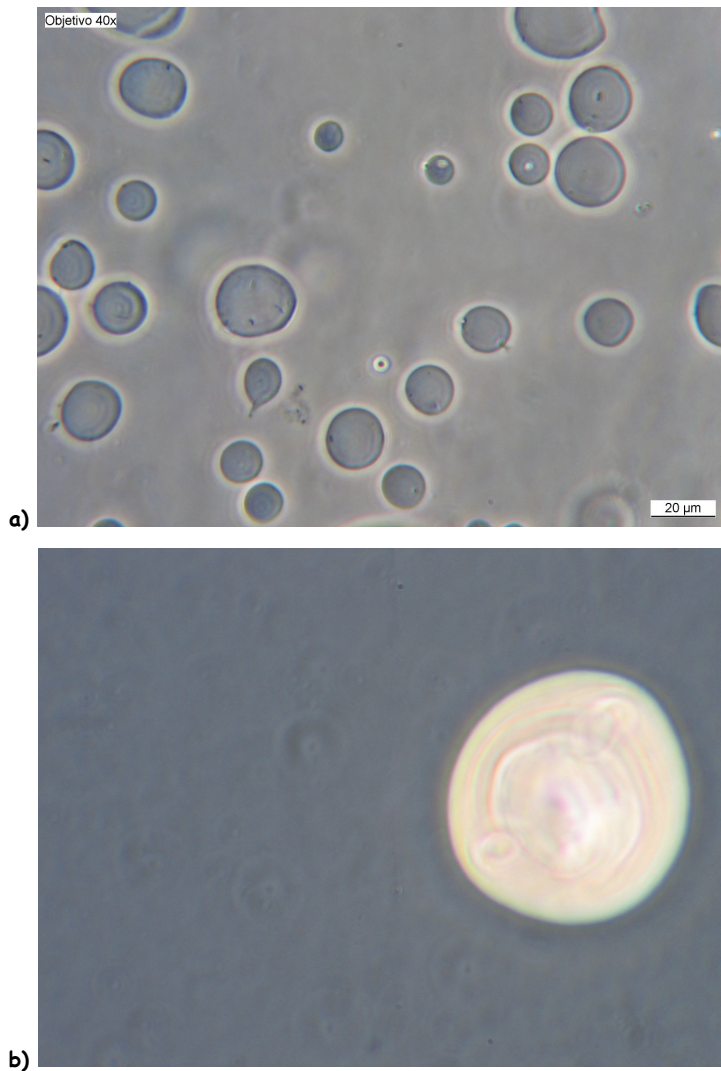


Figura 2.36. Fotografías de las microcápsulas a 64.5 cP

(Viscosidad y caudal de alginato: 64,5 cp y 0,006 L/min; Caudal de aire: 78,400 L/min)

- a) objetivo 40X x 3X de zoom óptico.
- b) objetivo 100X x 3X de zoom óptico.

Se utilizaron dos magnificaciones, de 40 y 100 veces (40X y 100X). El aumento de 40X (Figura 2.36-a), muestra una imagen general, donde se puede apreciar la esfericidad y homogeneidad de la microcápsulas obtenidas. El aumento de 100X (Figura 2.36-b), muestra una imagen detallada de las

microcápsulas obtenidas, donde se puede apreciar la estructura típica de una microcápsula.

Posteriormente, se realizaron experimentos a valores de viscosidad más altos: 138 cP y 190 cP. Se varió el caudal de aire desde 110,2 L/min hasta 138,0 L/min, por las razones anteriormente expuestas. Téngase en cuenta que al aumentar la viscosidad del alginato sódico es necesario utilizar una mayor cantidad de aire comprimido para que se produzca la atomización y el caudal deseado de líquido, producido por succión, con la boquilla utilizada.

Con una viscosidad de 138 cP el diámetro de las microcápsulas obtenidas y las curvas de comportamiento se muestran en la Tabla 2.11. y en la Figura 2.37.-2.39., respectivamente.

Un análisis de los datos experimentales, muestra que con un valor de viscosidad de 138 cP, se obtiene la misma tendencia que para 64,5 cP, es decir, el tamaño de las microcápsulas disminuye al aumentar el caudal de aire comprimido. Por tanto, no se produce ningún cambio en la tendencia general del sistema al incrementar la viscosidad de la solución de alginato sódico.

Tabla 2.11.: Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire, a tres caudales y una viscosidad constantes de alginato de 0,009, 0,006 y 0,003 L/min y 138,0 cP, respectivamente

Caudal de alginato (L/min)	Caudal de aire (L/min)	Tamaño, SMD (μm)
0,009	110,250	36,68
	116,550	34,33
	124,800	31,15
	138,000	27,42
0,006	113,280	34,91
	122,880	32,51
	131,100	29,51
	138,000	26,43
0,003	113,400	32,07
	131,100	25,36
	138,000	23,60

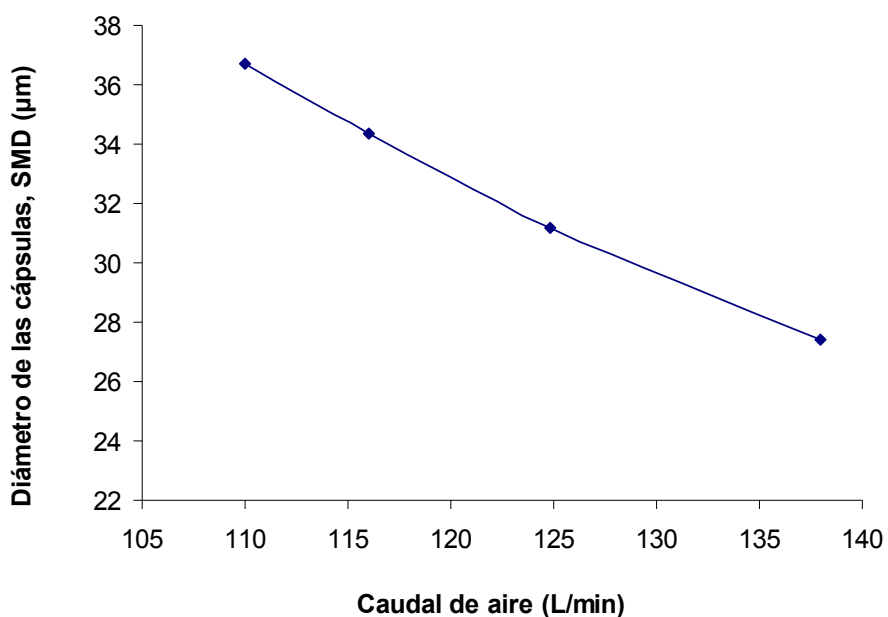


Figura 2.37. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire
 (Viscosidad y caudal de alginato: 138,0 cP, 0,009 L/min, respectivamente)

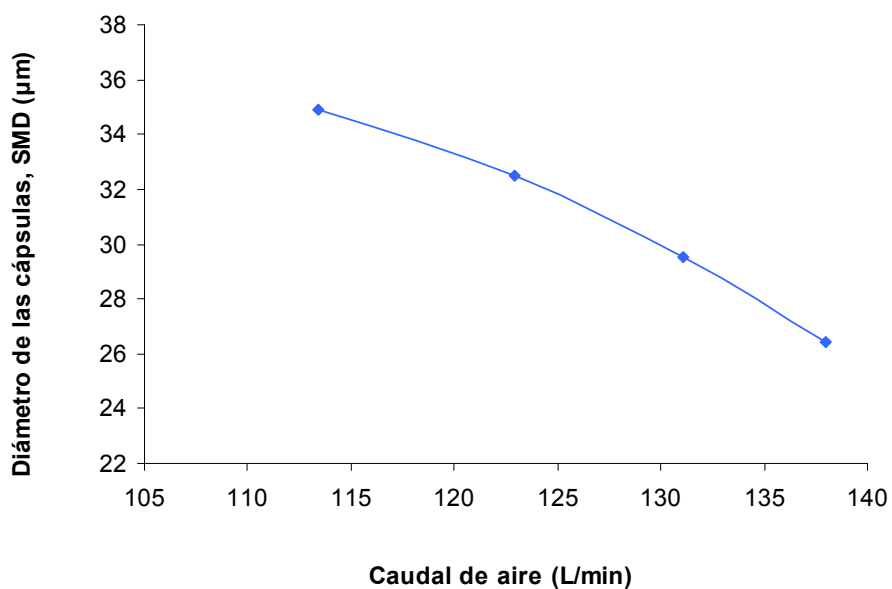


Figura 2.38. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire
 (Viscosidad y caudal de alginato: 138,0 cP, 0,006 L/min, respectivamente)

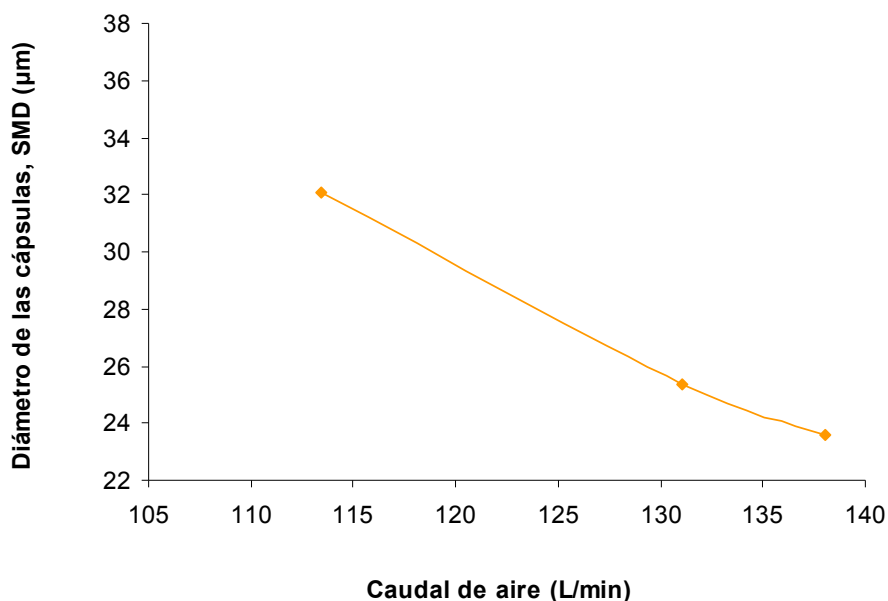


Figura 2.39. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire
(Viscosidad y caudal de alginato: 138,0 cP, 0,003 L/min, respectivamente)

Se tomaron fotografías de algunas de las microcápsulas producidas (Figura 2.40.) mediante una cámara digital conectada a un microscopio óptico.

Se utilizaron dos magnificaciones, de 40 y 100 veces (40X y 100X). El aumento de 40X (Figura 2.40-a), muestra una imagen general, donde se puede apreciar la esfericidad y homogeneidad de la microcápsulas obtenidas. El aumento de 100X (Figura 2.40-b), muestra una imagen detallada de las microcápsulas obtenidas, donde se puede apreciar la estructura típica de una microcápsula.

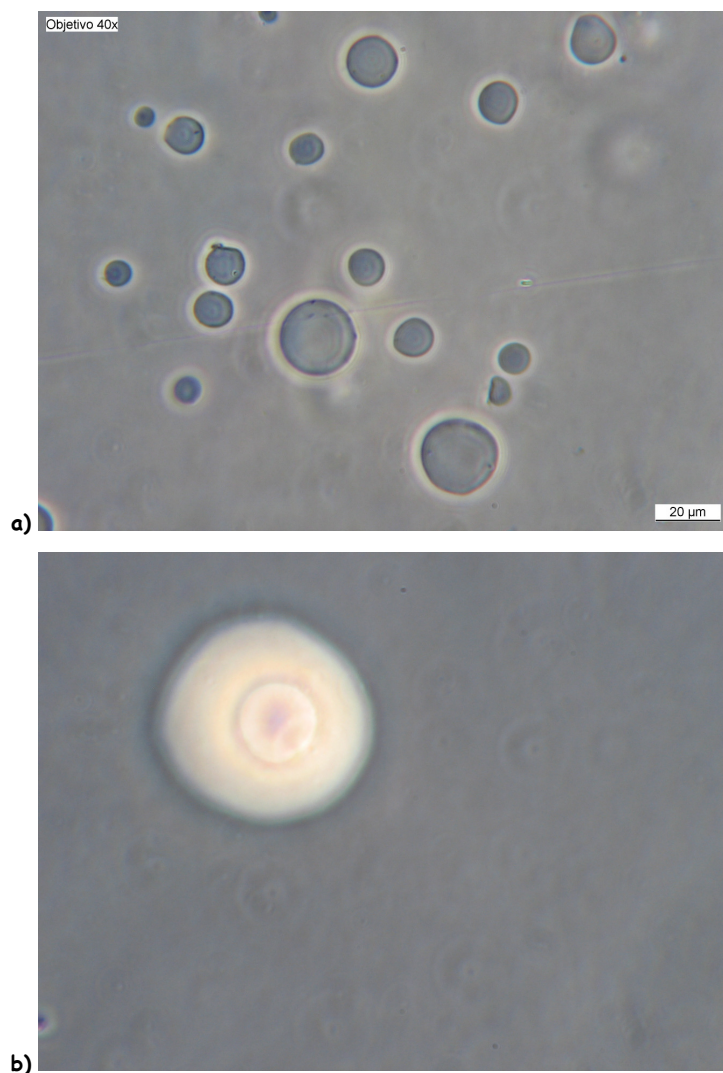


Figura 2.40. Fotografías de las microcápsulas

(Viscosidad y caudal de alginato: 138 cP y 0,009 L/min; Caudal de aire: 124,8 L/min)

- a) objetivo 40X x 3X de zoom óptico.
- b) objetivo 100X x 3X de zoom óptico.

El diámetro de las microcápsulas obtenidas con una viscosidad de 190 cP, así como las curvas de comportamiento, se muestran en la Tabla 2.12. y en la Figura 2.41.-2.43., respectivamente.

Tabla 2.12.: Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire, a tres caudales y una viscosidad constantes de alginato de 0,009, 0,006 y 0,003 L/min y 190 cP, respectivamente.

Caudal de alginato (L/min)	Caudal de aire (L/min)	Tamaño, SMD (μm)
0,009	110,250	39.79
	116,550	36.84
	128,640	32.91
	138,000	30.76
0,006	113,400	35.86
	131,100	32.61
	138,000	29.81
0,003	113,400	34.87
	128,640	30.51
	131,100	29.23
	138,000	28.26

Un análisis de los datos experimentales muestra que con esta viscosidad (190 cP) se obtiene la misma tendencia que para las otras viscosidades (64,5 y 138 cP), es decir, el tamaño de las microcápsulas disminuye al aumentar el caudal de aire comprimido. Por tanto, se vuelve a mostrar que el cambio de la viscosidad de la disolución de alginato sódico no produce cambios en la tendencia general del sistema.

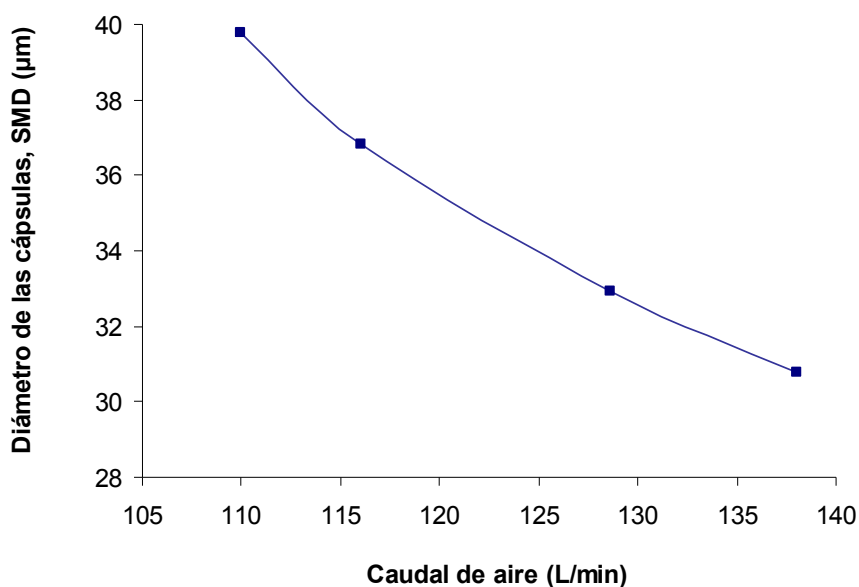


Figura 2.41. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire
 (Viscosidad y caudal de alginato: 190,0 cP, 0,009 L/min, respectivamente)

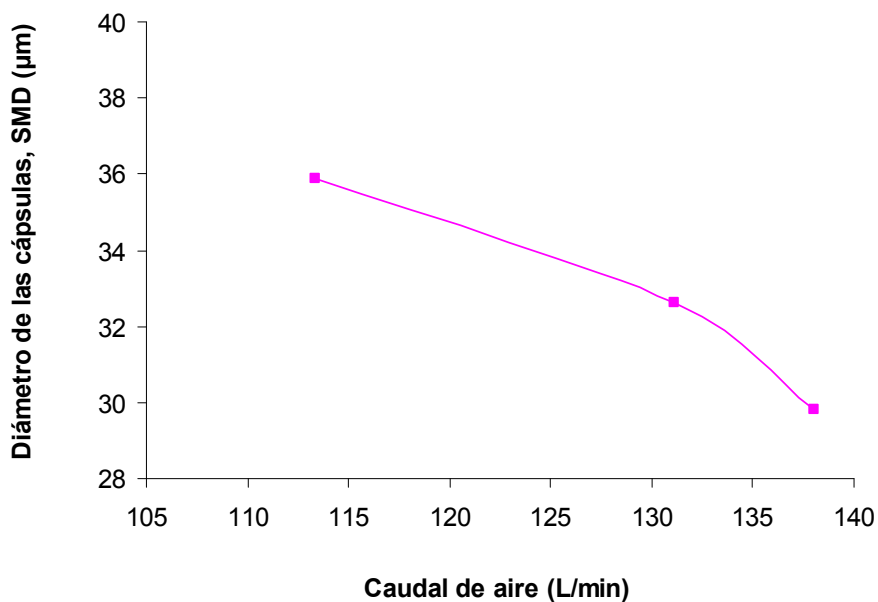


Figura 2.42. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire
 (Viscosidad y caudal de alginato: 190,0 cP, 0,006 L/min, respectivamente)

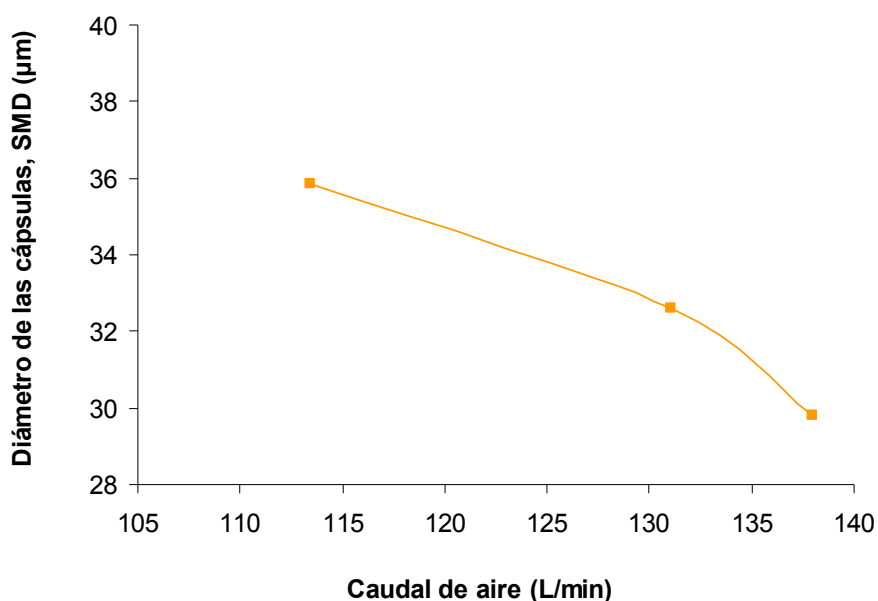


Figura 2.43. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire
(Viscosidad y caudal de alginato: 190,0 cP, 0,003 L/min, respectivamente)

Por último, se tomaron fotografías de algunas de las microcápsulas producidas (Figura 2.44) mediante una cámara digital conectada a un microscopio óptico. Se utilizaron dos magnificaciones, de 40 y 100 veces (40X y 100X). El aumento de 40X (Figura 2.44-a), muestra una imagen general, donde se puede apreciar la esfericidad y homogeneidad de la microcápsulas obtenidas. El aumento de 100X (Figura 2.44-b), muestra una imagen detallada de las microcápsulas obtenidas, donde se puede apreciar la estructura típica de una microcápsula.

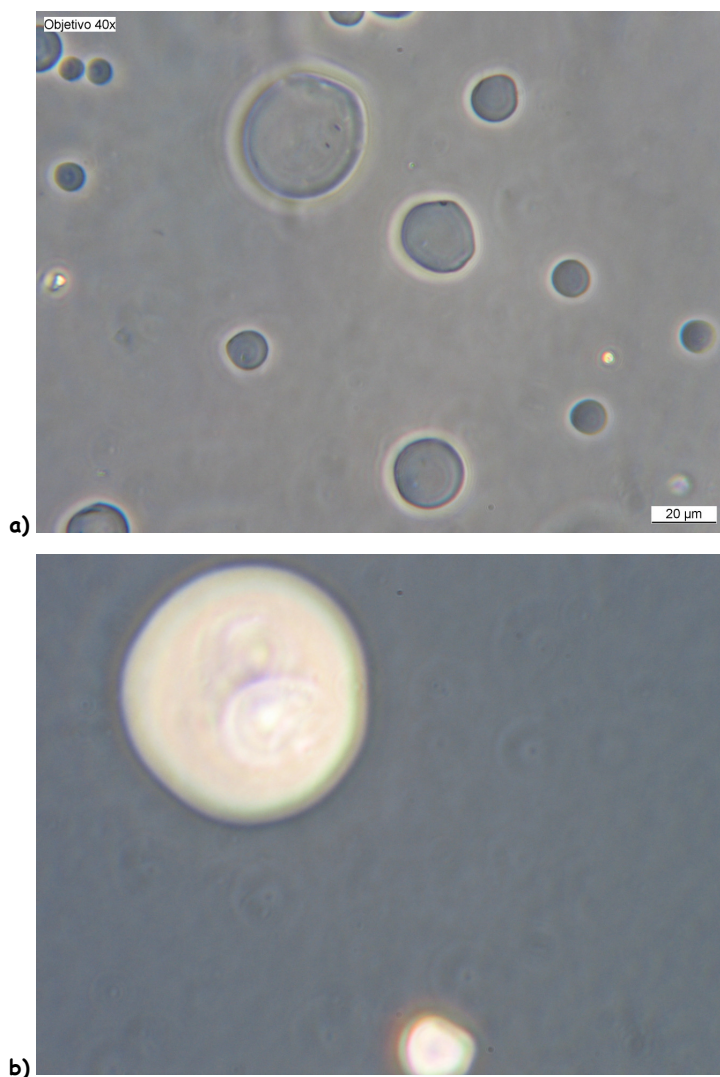


Figura 2.44. Fotografías de las microcápsulas

(Viscosidad y caudal de alginato: 190 cP y 0,003 L/min; Caudal de aire: 131,100 L/min)

- a) objetivo 40X x 3X de zoom óptico.
- b) objetivo 100X x 3X de zoom óptico.

2.6.3. Efecto de la variación de la viscosidad del alginato sódico

La viscosidad de alginato sódico es otro de los parámetros que influyen en el proceso de atomización, y por lo tanto en el proceso de microencapsulación utilizado.

El alginato es un fluido no-newtoniano, concretamente un pseudo-plástico, es decir, la viscosidad decrece al aumentar el grado de cizallamiento (ver Apéndice III). Además, las soluciones de alginato son viscoelásticas, es decir, que después de la deformación regresan parcialmente a su forma original cuando se elimina el esfuerzo aplicado. Este tipo de fluidos son más difíciles de pulverizar que los líquidos viscoinelásticos, ya que muestran patrones de ruptura notablemente diferentes a los de la pulverización del agua (Mansour y Chigier, 1995).

Para estudiar el efecto de la viscosidad del alginato sódico en el tamaño de partícula se llevaron a cabo una serie de experimentos ya descritos en los apartados anteriores, variando el caudal del alginato sódico y del aire comprimido a distintos valores de viscosidad constante. Un resumen de los valores representativos para este estudio se muestra en la Tabla 2.13. y en las Figuras 2.45., 2.46., 2.47., y 2.48.

El análisis de los datos experimentales muestra que el diámetro medio de las microcápsulas aumenta al hacerlo la viscosidad del alginato sódico. Esto es debido a que la viscosidad del líquido que va a ser pulverizado tiende a impedir el crecimiento de las inestabilidades que provocan la ruptura del chorro u hoja líquida, retrasando, por tanto, la desintegración del líquido y aumentando el tamaño de las microcápsulas producidas.

Tabla 2.13.: variación del tamaño de las cápsulas con la variación de la viscosidad de alginato sódico

		(64,5 cP)	(138,0 cP)	(190 cP)
Caudal de alginato (L/min)	Caudal de aire (L/min)	Tamaño (µm)	Tamaño (µm)	Tamaño (µm)
0,013	138,000	24,70	31,33	33,90
0,010		24,10	29,07	31,56
0,009		23,75	27,42	30,76
0,006		19,20	26,43	29,81
0,003		18,48	23,60	28,26
0,009	110,250	28,03	36,68	39,79
	116,000	27,73	34,33	36,84
	138,000	23,75	27,42	30,76
0,006	113,400	26,61	34,91	35,86
	131,100	24,13	29,51	32,61
	138,000	19,20	26,43	29,81
0,003	113,400	25,32	32,07	34,87
	131,100	22,12	25,36	29,23
	138,000	18,48	23,60	28,26

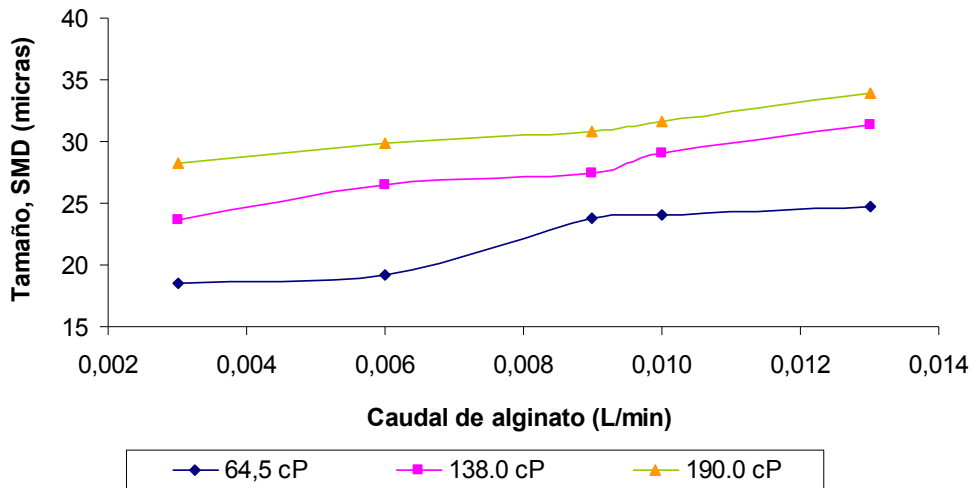


Figura 2.45. Variación del tamaño de las microcápsulas con la variación de la viscosidad de alginato sódico

(Caudal de aire constante de 138,000 L/min)

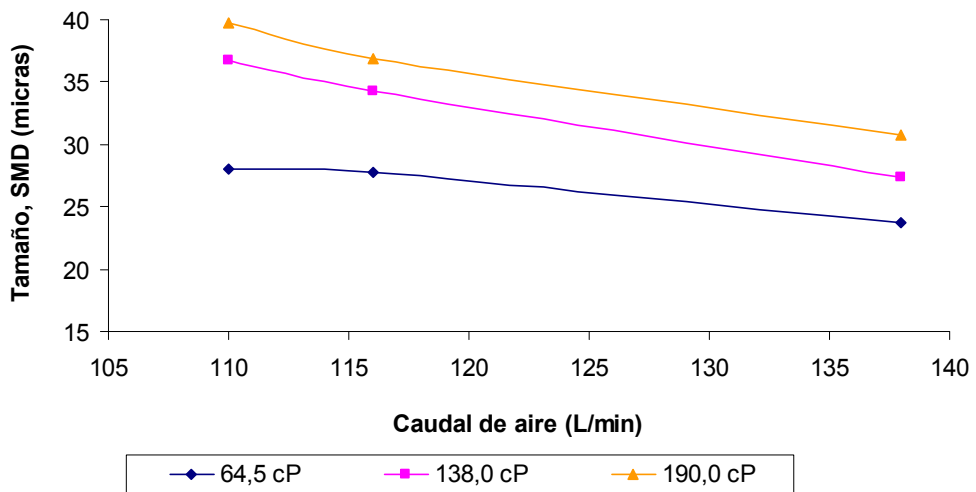


Figura 2.46. Variación del tamaño de las microcápsulas con la variación de la viscosidad de alginato sódico

(Caudal de alginato sódico constante de 0,009 L/min)

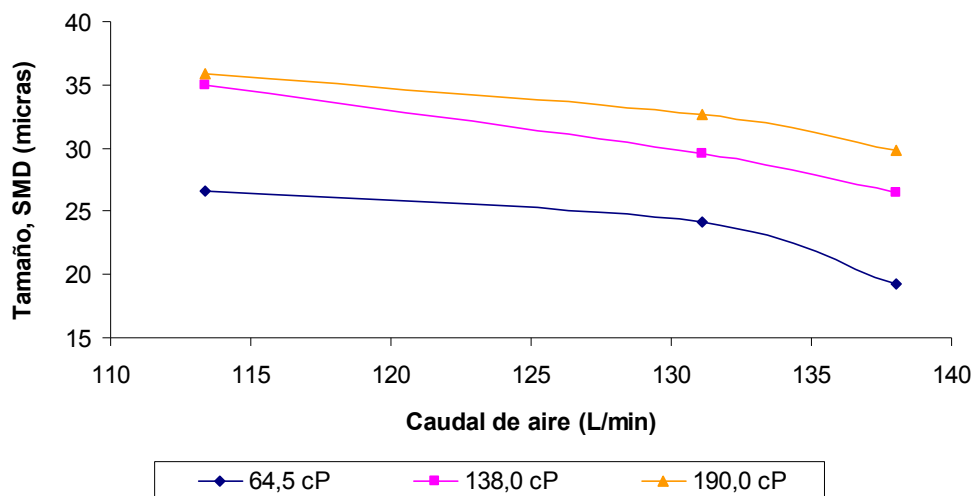


Figura 2.47. Variación del tamaño de las microcápsulas con la variación de la viscosidad de alginato sódico
(Caudal de alginato sódico constante de 0,006 L/min)

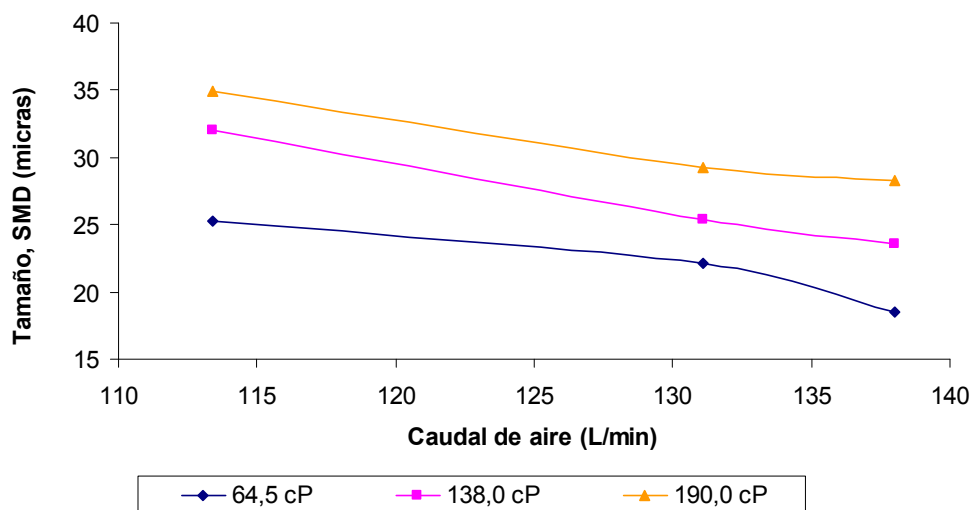


Figura 2.48. Variación del tamaño de las microcápsulas con la variación de la viscosidad de alginato sódico
(Caudal de alginato sódico constante de 0,003 L/min)

Los resultados experimentales obtenidos están en concordancia con las explicaciones teóricas dadas por algunos autores sobre el fenómeno.

Rizk y Lefebvre (1980), que estudiaron la influencia del espesor inicial de la hoja líquida en las características del pulverizado, encontraron que al disminuir la viscosidad del alginato sódico se produce una disminución en el espesor de las hojas líquidas obtenidas en el proceso de atomización. Por otra parte, se observó que las hojas líquidas que tienen un menor espesor rompen en gotas más pequeñas. Llegando a la conclusión de que una menor viscosidad del líquido atomizado produce un tamaño de microcápsula menor. Estas afirmaciones están en concordancia con los resultados experimentales obtenidos en este trabajo.

2.6.4. Conclusiones

Se ha desarrollado una técnica para la producción de cápsulas, basada en la generación de gotas por procesos de atomización neumática y su posterior estabilización mediante la reacción de gelificación iónica, que permite obtener cápsulas con un tamaño controlado comprendido entre 20 y 50 micras.

A partir de los datos obtenidos se puede concluir que:

- La nueva instalación desarrollada produce cápsulas esféricas y uniformes con un tamaño de partícula en el intervalo de 20-50 μm . La variación del tamaño de partícula que se produce al modificar el caudal de polímero y de aire, así como la viscosidad del polímero, es apreciable dentro de los parámetros de operación. Se producen distribuciones de partícula estrechas ($\text{span} < 1,4$), tratándose de sistemas de pulverización.

- Se obtiene una buena formación de las cápsulas con la máxima apertura posible de la boquilla neumática utilizada, ya que se disipa parte del aire utilizado en la formación del spray, de tal forma que no incide sobre la disolución gelificante.

A partir de las curvas de comportamiento, se puede concluir que:

- El diámetro medio de las microcápsulas decrece al disminuir el caudal de alginato sódico, ya que se producen hojas líquidas más delgadas que rompen en gotas más pequeñas.
- El diámetro medio de las microcápsulas decrece al aumentar el caudal de aire comprimido, ya que la interacción líquido/aire produce ondas que se convierten inestables y desintegran la lámina líquida en fragmentos que se contraen formando ligamentos, rompiendo posteriormente en gotas.
- El diámetro medio de las microcápsulas incrementa al aumentar la viscosidad del alginato sódico, debido a que la viscosidad del líquido que va a ser atomizado tiende a impedir el crecimiento de las inestabilidades que provocan la ruptura del chorro u hoja líquida.

2.7. MEJORA DE LA TÉCNICA DE GENERACIÓN DE LAS MICRO-CÁPSULAS

2.7.1. Descripción de la instalación

La instalación descrita previamente (Figura 2.9.) genera cápsulas dentro del intervalo de tamaños requerido, 20-50 micras, pero tiene una limitación en lo que se refiere a la atomización de líquidos viscosos. El sistema no es capaz de atomizar líquidos con una viscosidad mayor de 190 cP. Además, con viscosidades inferiores, el sistema no es capaz de pulverizar grandes cantidades de líquido, ya que, por las características propias del sistema, el líquido es alimentado a la boquilla mediante succión, y por tanto, un mayor caudal de líquido implica un mayor caudal de aire, que genera la deformación de la superficie de la solución gelificante, generando aplomados y cápsulas deformadas.

Por tanto, se diseñó una instalación con el fin de eliminar la limitación de la viscosidad y tener un mejor control de las variables que afectan al sistema.

La nueva instalación (**Patente Europea nº EP10153319.8, Del Valle et al., 2010**) que genera cápsulas sin limitación de viscosidad, se muestra en la Figura 2.49. y consta de las siguientes partes: un armario neumático (3), un panel de control (4), una caja de conexiones (5), un **tanque presurizado** (6), una boquilla neumática con control electrónico (7) y un baño gelificante (8).

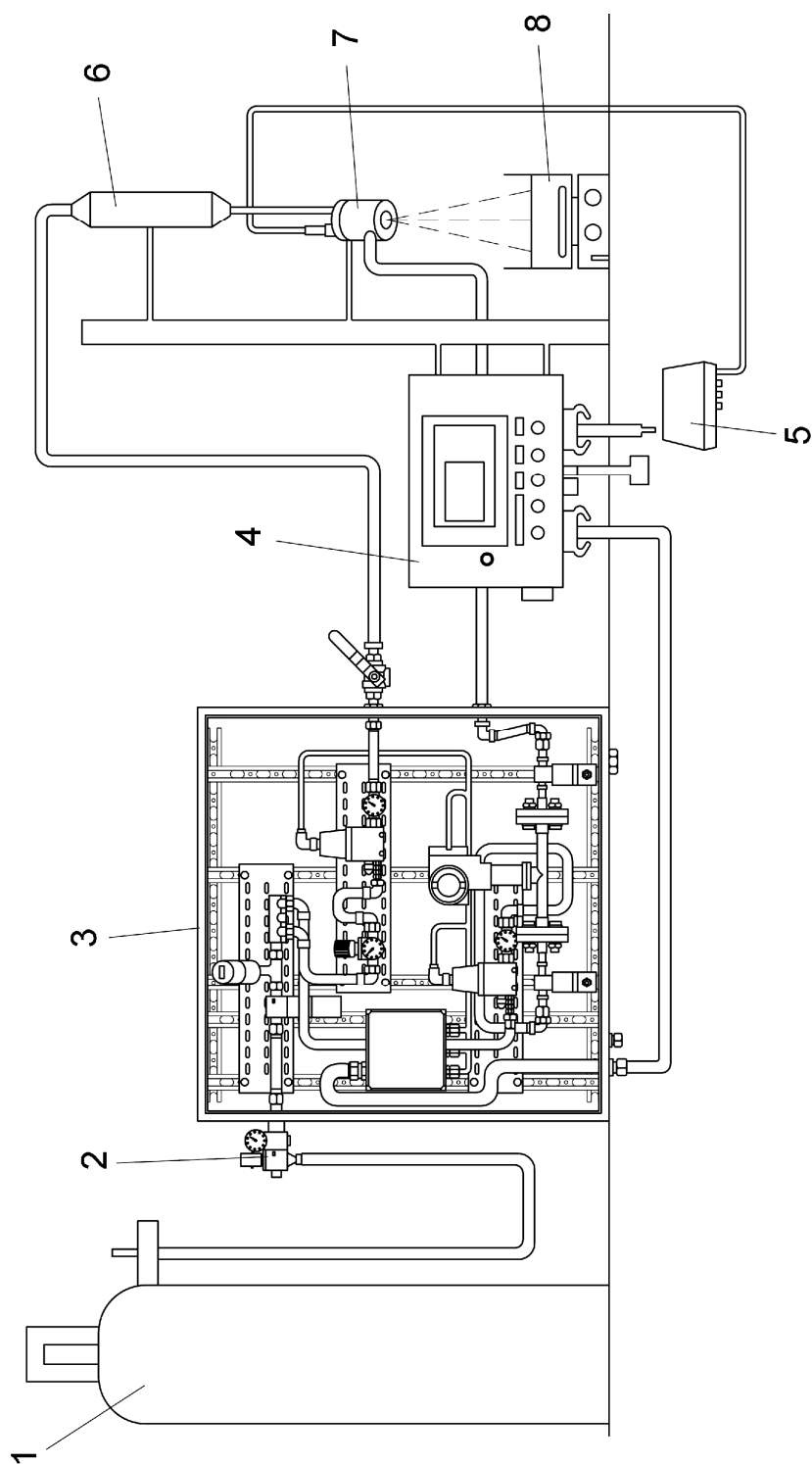


Figura 2.49. Esquema de la instalación utilizada para la producción de las microcápsulas

1.- bala de aire sintético presurizado; 2.- válvula general de aire de entrada; 3.- armario neumático; 4.- panel de control; 5.- caja de conexiones; 6.-tanque presurizado con alginato; 7.- boquilla atomizadora neumática; 8.- cristalizador con la solución gelificante.

Las principales mejoras que se introducen en esta nueva instalación de generación de cápsulas son:

- La incorporación de un **tanque presurizado**, que permite conducir líquidos de cualquier viscosidad hacia la boquilla neumática a mayores caudales.
- La **automatización** completa del proceso, a través de un sistema de regulación automática, que permite un control completo del proceso.

El nuevo proceso genera gotas micrométricas, mediante procesos de atomización, a través de una boquilla neumática (7) que funciona por presión de forma completamente automática. El líquido no se alimenta a la boquilla por succión, sino por presión, es decir, a través de un tanque presurizado (6), eliminando de esta forma la limitación de la viscosidad del diseño previo.

La instalación consta de una línea de aire completamente independiente para generar el proceso de atomización, es decir, todo el aire que lleva esta línea se emplea exclusivamente para la generación del spray, optimizándose la utilización del aire. Téngase en cuenta que en el anterior diseño, parte del aire de atomización se empleaba en la succión del líquido.

El nuevo diseño incorpora una línea de aire adicional que se utiliza para generar la presión necesaria en el tanque para conducir el líquido a la boquilla neumática sin ninguna limitación de viscosidad.

Por tanto, el proceso de generación de las gotas se puede describir de la siguiente forma: una disolución acuosa del polímero, alginato sódico, se alimenta al tanque presurizado (6), que por presión conduce el líquido hacia la boquilla neumática (7), donde será pulverizado por la acción de la línea de aire presurizado sobre el chorro líquido formado a la salida de la boquilla, generando las gotas.

El suministro general de aire se produce desde una bala de aire puro a presión (1) que se introduce al armario neumático (3) a través de una válvula general (2). Este armario consta de una serie de componentes que permiten la regulación de los caudales de líquido y aire, así como de sus presiones (Figura 2.50.).

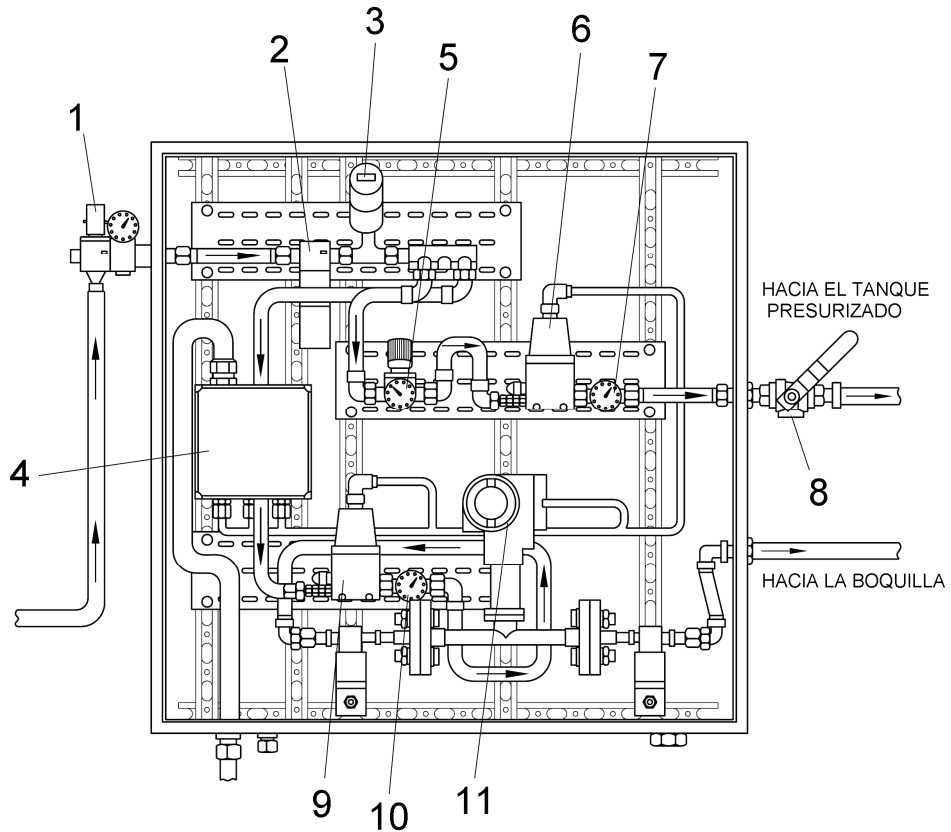


Figura 2.50. Detalle del armario neumático

1.- válvula general y manómetro de aire de entrada; 2.- filtro de aire; 3.- interruptor de presión; 4.- armario eléctrico; 5.- regulador manual de presión; 6.- regulador proporcional de presión; 7.- indicador mecánico de presión; 8.- válvula manual; 9.- regulador proporcional de presión; 10.- indicador mecánico de presión; 11.- caudalímetro másico por principio térmico.

El aire entra al armario neumático mediante una válvula general (1), pasando por un manómetro (1) y un filtro (2), para, posteriormente, dividirse de forma electrónica en dos líneas de aire diferenciadas mediante un interruptor de presión (3): la línea del aire que proporciona presión al tanque, y la línea del aire que sirve para producir la pulverización en la boquilla. Este interruptor de presión (3) está conectado al panel de control, permitiendo, además, conocer el estado del filtro de aire.

La línea de aire que produce la pulverización (Figura 2.50.) tiene un regulador proporcional de presión (9) y un caudalímetro másico por principio térmico (11), ambos conectados al panel de control, que permiten controlar la presión y el caudal de aire de atomización de forma precisa. El regulador posee un sensor interno de presión que permite obtener una retroalimentación. Además, se dispone de un indicador mecánico de presión (10).

La línea de aire que suministra presión al tanque del líquido (ver Figura 2.50.) consta de un regulador manual de la presión de entrada (5), un indicador mecánico de presión (7) y un regulador proporcional de presión (6). El regulador proporcional está conectado al panel de control permitiendo una regulación precisa de la presión, ya que tiene un sensor interno de presión que permite obtener una retroalimentación. Esta línea posee además una válvula para poder cortar la presión al tanque presurizado de forma instantánea en caso de emergencia (8).

Por tanto, dentro del armario neumático se produce la división, la medida y la regulación del aire, todo ello controlado desde el panel de control, que además proporciona electricidad al armario neumático.

El panel de control regula el proceso de pulverizado en tiempo real, permitiendo el control de la boquilla neumática electrónica a través de la caja de conexiones. El software incluido en este controlador permite monitorizar de forma precisa, y ajustar de forma automática el pulverizado depen-

diendo de las necesidades propias del proceso. Este controlador permite ajustar de forma muy precisa los caudales de aire, al igual que sus presiones, y el tiempo de pulverización.

La boquilla es de mezcla aire-líquido externa. Las líneas de líquido y aire de atomización son totalmente independientes, ya que el líquido se alimenta a la boquilla mediante un tanque presurizado. Esta boquilla, como la utilizada en el diseño anterior dispone de cuatro posiciones de apertura, habiéndose demostrado previamente, que con una mayor apertura se consigue una mejor formación de las cápsulas, por la disipación del aire generador del spray antes de su salida por el orificio final de la boquilla, evitándose así la formación de turbulencias en la superficie de la solución gelificante.

La boquilla consta básicamente de un cuerpo general y diferentes combinaciones de aspersión líquido-aire que permiten conseguir diferentes patrones de pulverización: cónico, de chorro plano, etc. En concreto se utiliza una boquilla neumática del tipo “prefilmer”, donde el líquido es dispersado en una fina hoja cónica antes de ser expuesto a corrientes de aire a alta velocidad en la parte interna y externa de la hoja anular de líquido (Figura 2.51.).

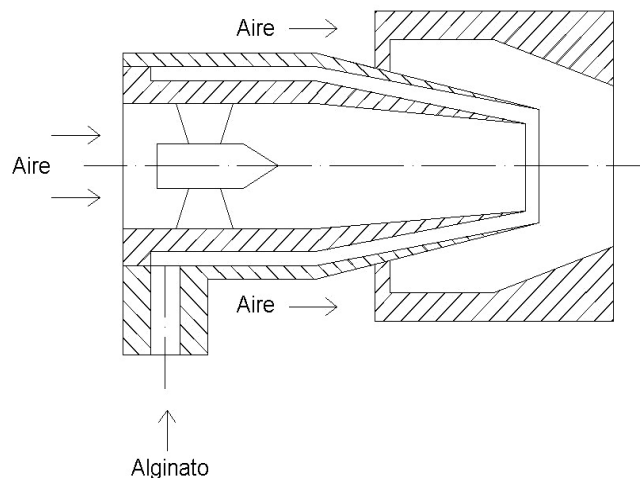


Figura 2.51. Esquema de la boquilla neumática prefilmer

La boquilla neumática permite una regulación precisa del caudal de líquido ya que se realiza de forma electrónica mediante la tecnología de modulación por ancho de pulsos (PWM: pulse width modulated). En este tipo de regulación se producen, de forma electrónica, ciclos muy rápidos de apertura y cierre de la boquilla a una frecuencia controlada (ver Figura 2.52.). La boquilla dispone de una válvula solenoide, controlada por ordenador, situada a la entrada de la boquilla que regula el flujo de líquido. El tiempo desde una señal de apertura y la siguiente se denomina período (en la figura dos segundos). Si la boquilla está funcionando la mitad del tiempo, el ciclo será del 50 %, y se tendrá un caudal del 50 % del caudal máximo para una determinada presión. Este sistema permite la obtención de caudales muy pequeños, reduciendo, de forma apreciable, el consumo del líquido que se está atomizando. El caudal del líquido también se puede regular por medio de la utilización de diferentes presiones en el tanque presurizado, previo calibrado.

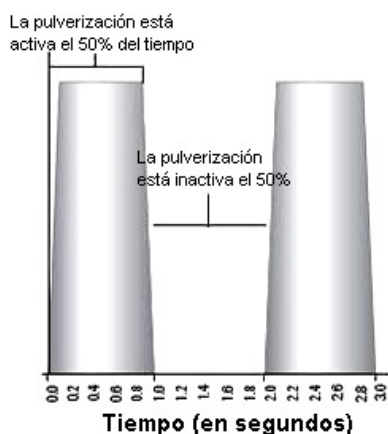


Figura 2.52. Funcionamiento de la tecnología de modulación por ancho de pulsos

Una vez formadas las gotas de alginato, éstas fueron estabilizadas mediante la reacción de gelificación iónica con una disolución de cloruro bórico situada en un cristalizador (8). La estabilización de las gotas se realiza

bajo una agitación continua para evitar que las cápsulas formadas se aglomeren. Dicha agitación fue seleccionada a partir de experimentos previos. Las microcápsulas se mantuvieron cinco minutos en agitación continua para permitir que se completara en su totalidad la reacción de gelificación iónica en el cristalizador. Después de esto, se lavaron con agua destilada y se filtraron con filtros de membrana de nylon de 0,45 μm , para obtener las microcápsulas libres, y parar así la reacción de gelificación iónica. Finalmente, las microcápsulas se mantuvieron en agua destilada, para evitar un proceso de hinchamiento o encogimiento, para su posterior análisis de tamaño e imagen en un analizador del tamaño de partículas y un microscopio óptico, respectivamente.

Esta nueva instalación posibilita atomizar líquidos con viscosidades superiores a los 200 cP, además de poder pulverizar mayores caudales de líquido sin producirse aglomerados, ya que las líneas de líquido y aire son completamente independientes.

Calibración del tanque presurizado.

El caudal del líquido fue regulado por medio de la utilización de diferentes presiones en el tanque presurizado, previo calibrado, ya que la tecnología de modulación por ancho de pulsos de la boquilla neumática, no puede utilizarse en esta aplicación en concreto, ya que no produce una buena formación de las cápsulas.

La calibración del tanque presurizado se realizó por pesada directa, pulverizando en botellas de PVC, a diferentes presiones y para las diferentes viscosidades. Un resumen de los datos de calibración se muestran en las Tablas 2.14., 2.15., y 2.16., para las viscosidades de 162,8, 420, 5, y 962,6 cP, respectivamente.

Tabla 2.14.: Datos de calibración para una viscosidad de alginato de 162,8 cP

Presión tanque (bar)	mL/min	l/h
0,10	16,58	0,99
0,20	41,45	2,49
0,30	68,46	4,11

Tabla 2.15.: Datos de calibración para una viscosidad de alginato de 420,5 cP

Presión tanque (bar)	mL/min	l/h
0,15	17,21	1,03
0,30	40,74	2,45
0,42	67,54	4,05

Tabla 2.16.: Datos de calibración para una viscosidad de alginato de 982,6 cP

Presión tanque (bar)	mL/min	l/h
0,30	17,22	1,03
0,50	40,90	2,45
0,70	68,58	4,11

2.7.2. Caracterización de la instalación mejorada

Se realizaron una serie de experimentos para comprobar que, después de las mejoras realizadas en el diseño de la instalación, ésta seguía el mismo comportamiento que la original, es decir, que las curvas de comportamiento del nuevo sistema tenían la misma tendencia que las de la instalación original, pero permitiendo realizar experimentos a viscosidades y caudales de líquido a los que antes no era posible llegar.

Todos los experimentos fueron caracterizados, mediante un análisis del tamaño de las cápsulas mediante difracción láser (véase Apéndice I, “Materiales y Métodos” para una descripción del método), y mediante fotografías realizadas mediante una cámara científica conectada a un microscopio óptico (véase Apéndice I, “Materiales y Métodos” para una descripción del método).

2.7.2.1. Efecto de la variación del caudal de alginato sódico

Se estudió el efecto de la variación del caudal de alginato sódico en el tamaño de las microcápsulas.

Para ello, se realizaron experimentos a tres caudales de alginato sódico desde 0,017 L/min hasta 0,070 L/min, a tres caudales constante de aire presurizado desde 2,000 L/min hasta 36,000 L/min.

El intervalo de caudales de alginato sódico y aire presurizado utilizados viene impuesto por las características propias de la instalación. La impulsión del líquido a un determinado caudal viene determinada por la presión existente en el interior del tanque presurizado. Ésta se produce por aire proveniente de una línea controlada por un regulador proporcional de presión, que en el caso del diseño actual, permite una variación de la presión desde 0,1 hasta 0,9 bares. Según la calibración en función de la viscosidad, previa-

mente detallada (Tablas 2.14.-2.16.), no es posible trabajar fuera de un rango de caudales de alginato sódico que vayan desde 17 hasta 70 mL/min. En el caso del aire, con un caudal de aire menor que 2,0 L/min no se produce la atomización con la boquilla utilizada. Un caudal mayor de 36,0 L/min lleva a una deformación en la superficie de la disolución de cloruro de bario cuando se realiza la atomización, generando una mala formación de las cápsulas.

Para la realización de estos experimentos se mantuvo una viscosidad constante de alginato sódico de 162,8 cP. Además, se trabajó con la boquilla neumática en la posición de mayor apertura, la posición tres.

El diámetro medio de las microcápsulas obtenidas y las curvas de comportamiento del sistema para esta variable del proceso se muestran en la Tabla 2.17. y en la Figura 2.53., respectivamente. Además, se muestra un ejemplo representativo de las distribuciones de partícula obtenidas en estos experimentos (Figura 2.54.).

Tabla 2.17.: Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de líquido

Caudal de alginato (L/min)	Caudal de aire (L/min)		
	2,80	20,70	35,5
	Tamaño de las cápsulas, SMD (μm)		
0,017	45,06	30,25	18,32
0,041	55,50	39,03	26,21
0,068	61,52	46,42	30,07

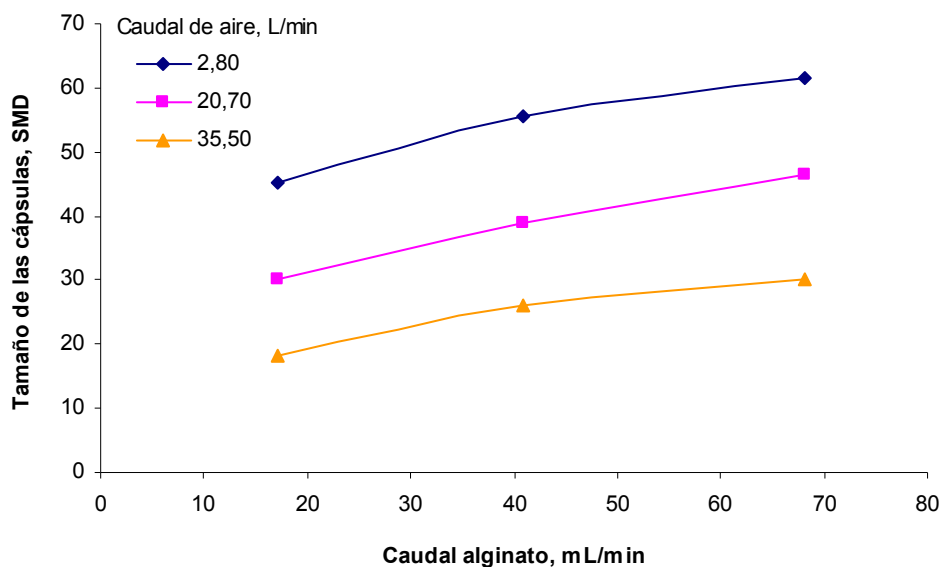


Figura 2.53. Variación del tamaño de las cápsulas con el caudal de líquido

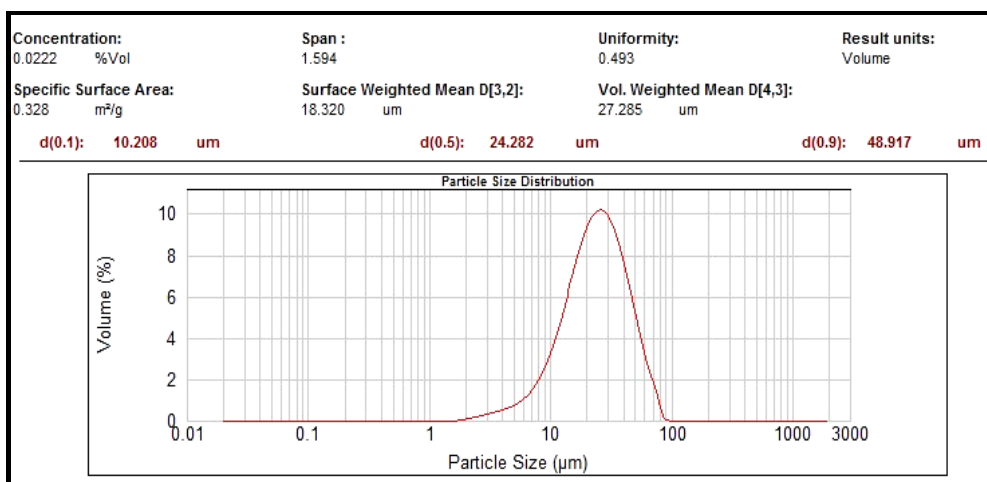


Figura 2.54. Ejemplo de distribución de partícula
(Caudal de alginato: 17 mL/min; Caudal de aire: 35,5 L/min)

Un análisis de los datos experimentales obtenidos muestra que el diámetro medio de las microcápsulas decrece al hacerlo el caudal de alginato sódico, ya que, como se explicó en el apartado 2.6.1., caudales bajos de líquido producen hojas líquidas de un menor espesor, dando lugar a gotas más pequeñas.

En la Figura 2.54. se observa que la distribución de partícula para estos experimentos tiene un bajo valor de span, que es indicativo de una distribución de tamaño estrecha, para tratarse de sistemas de pulverización.

Por último, se tomaron fotografías de algunas de las microcápsulas producidas (Figura 2.55.). Se puede apreciar la buena formación de las cápsulas obtenidas, ya que se observa una buena esfericidad y homogeneidad de estas.

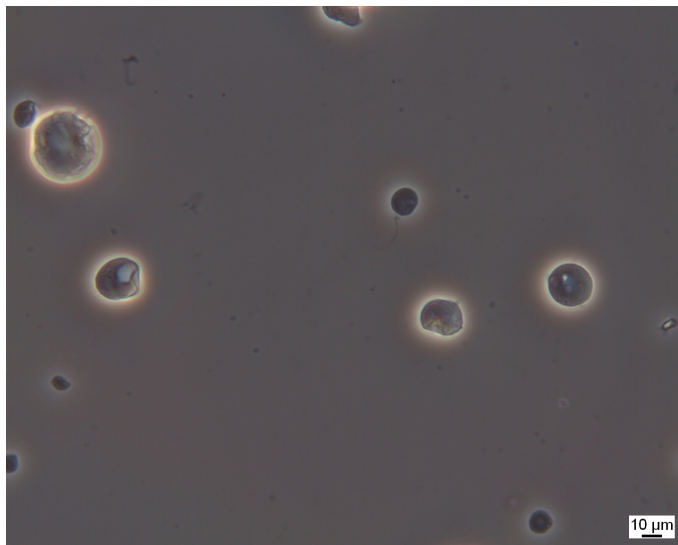


Figura 2.55. Fotografía de las cápsulas

(Viscosidad y caudal de líquido: 162,8 cP y 0,041 L/min; Caudal de aire: 20,7 L/min)

2.7.2.2. Efecto de la variación del caudal de aire

Para estudiar el efecto del caudal de aire en el tamaño de partícula, con la instalación modificada, se llevaron a cabo una serie de experimentos a distintos caudales constantes de líquido (0,017, 0,041, 0,068 L/min), variando el caudal de aire desde 2,8 L/min hasta 35,5 L/min. El intervalo de caudales de alginato sódico y aire presurizado utilizados vino impuesto por las características propias de la instalación, como se detalló en el apartado anterior (2.7.2.1.).

Para la realización de estos experimentos se mantuvo una viscosidad constante de alginato sódico de 162,8 cP. Además, se trabajó con la boquilla neumática en la posición de mayor apertura, la posición tres.

El diámetro de las microcápsulas obtenidas y las curvas de comportamiento del sistema se muestran en la Tabla 2.18. y en la Figura 2.56., respectivamente. Además, se muestra un ejemplo representativo de las distribuciones de partícula obtenidas en estos experimentos (Figura 2.57.).

Tabla 2.18.: Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire

Caudal de aire (L/min)	Caudal de líquido (L/min)		
	0,017	0,041	0,068
	Tamaño de las cápsulas, SMD (μm)		
2,8	45,058	55,501	61,523
20,7	30,254	39,025	46,422
35,5	18,32	26,21	30,071

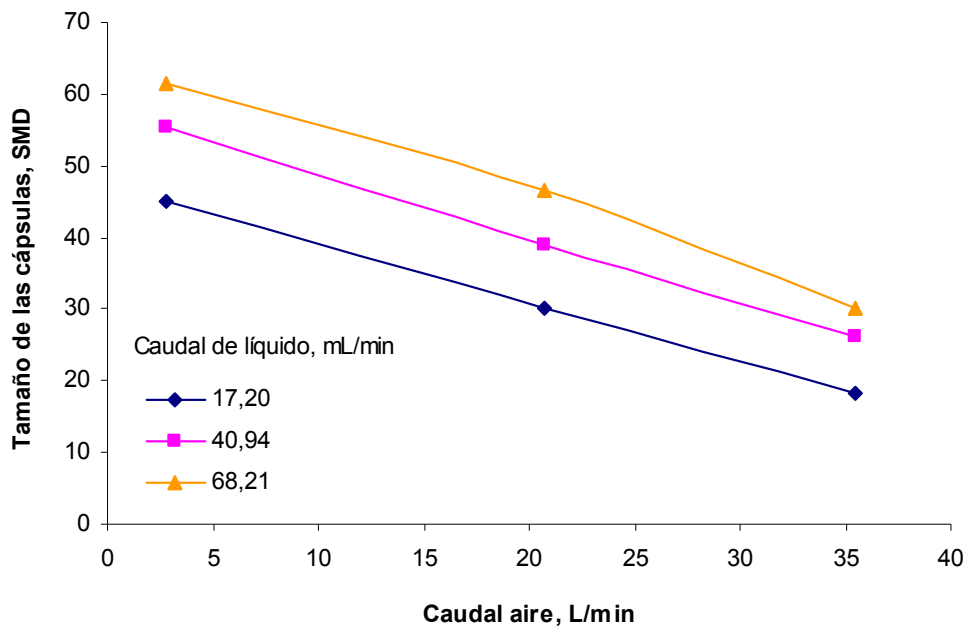


Figura 2.56. Variación del tamaño de las cápsulas con la variación del caudal de aire

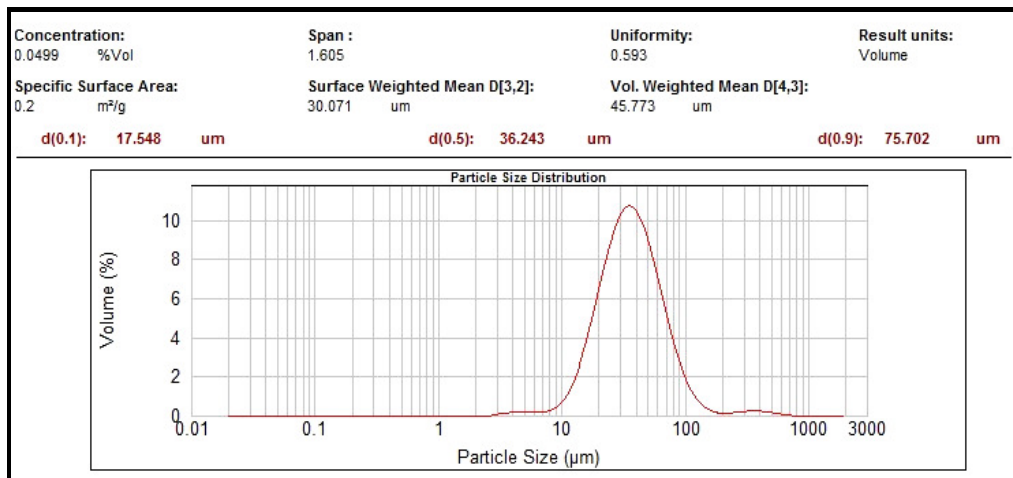


Figura 2.57. Ejemplo de distribución de partícula
(Caudal de alginato: 68 mL/min; Caudal de aire: 35,5 L/min)

Un análisis de los datos experimentales obtenidos muestra que el diámetro medio de las microcápsulas decrece al aumentar el caudal de aire comprimido, ya que, como se explicó en el apartado 2.6.2., al incrementarse la velocidad del aire, la hoja líquida se desintegra antes y los ligamentos se forman más cerca de los labios de la boquilla atomizadora. Estos ligamentos tienden a ser más delgados y más cortos y se desintegran en gotas más pequeñas.

La Figura 2.57. muestra que la distribución de partícula para estos experimentos tiene un bajo valor de span, que es indicativo de una distribución de tamaño estrecha, para tratarse de sistemas de pulverización.

Por último, se tomaron fotografías de algunas de las microcápsulas producidas (Figura 2.51.). Se puede apreciar la buena formación de las cápsulas obtenidas, ya que se observa una buena esfericidad y homogeneidad de estas.

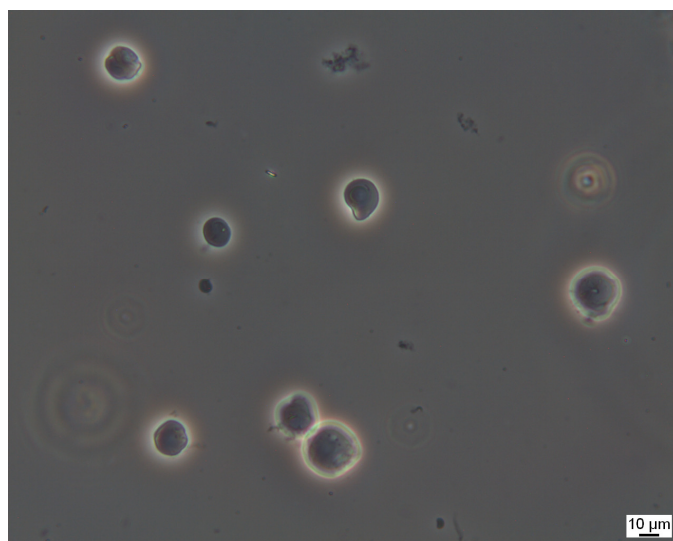


Figura 2.58. Fotografía de las cápsulas

(Viscosidad y caudal de líquido: 162,8 cP y 0,068 L/min; Caudal de aire: 2,8 L/min)

2.7.2.3. Efecto de la variación de la viscosidad del líquido

Con el objetivo de estudiar el efecto de la viscosidad del líquido en el tamaño de partícula con la instalación modificada, se llevaron a cabo una serie de experimentos, a tres caudales fijos de alginato sódico, variando la viscosidad desde 160 hasta 1000 cP. Estos experimentos se realizaron a un caudal constante de aire de 20,7 L/min. Con estos experimentos se pretende observar cual es el efecto de valores de viscosidad más altos, que antes no era posible conseguir, pero que ahora, debido al tanque presurizado, si es posible lograr. Se trabajó con la boquilla neumática en la posición de mayor apertura, la posición tres.

El diámetro de las microcápsulas obtenidas y las curvas de comportamiento del sistema se muestran en la Tabla 2.19. y en la Figura 2.59., respectivamente.

Tabla 2.19.: Variación del tamaño de las cápsulas con la viscosidad del líquido

Viscosidad del líquido (cP)	Caudal de líquido (L/min)		
	0,017	0,041	0,068
	Tamaño de las cápsulas, SMD (μm)		
162,8	30,254	39,025	46,422
420,5	32,829	38,374	44,475
982,6	27,961	34,688	41,852

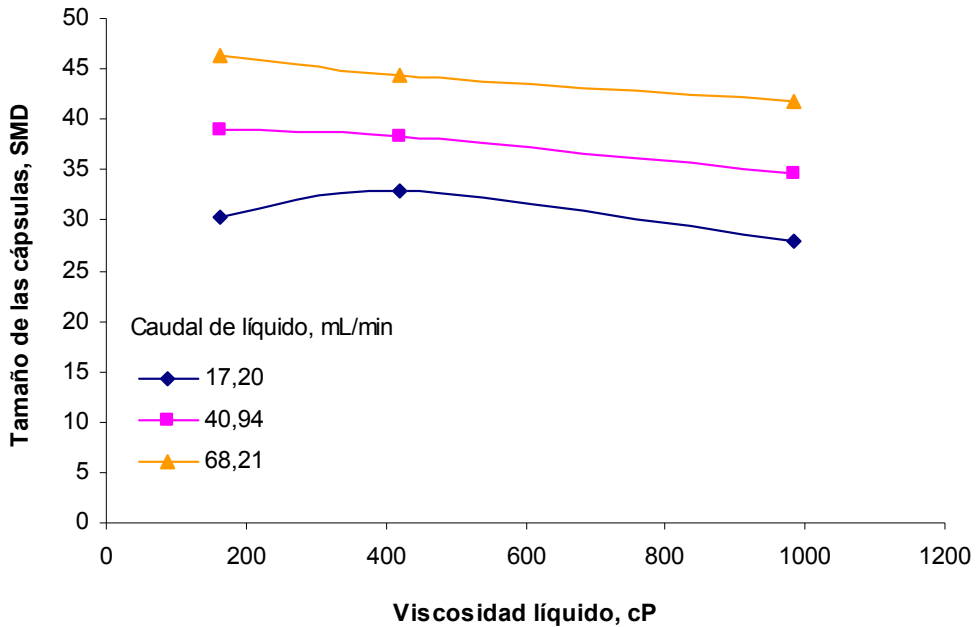


Figura 2.59. Variación del tamaño de las cápsulas con la viscosidad del líquido

Un análisis de los datos experimentales muestra que el diámetro medio de las microcápsulas no aumenta al hacerle la viscosidad del alginato sódico, sino que se mantiene prácticamente constante. Como se describió previamente en el apartado 2.6.3. un aumento de la viscosidad del líquido debe incrementar el tamaño de las cápsulas, ya que la viscosidad tiende a impedir el crecimiento de las inestabilidades que provocan la ruptura de la hoja líquida. Pero esto se cumple hasta una viscosidad de 200 cP, a partir de este valor se observa que la viscosidad del líquido no influye en el tamaño final de las cápsulas. Para justificar este comportamiento debe considerarse la reología del alginato sódico. Así, a viscosidades inferiores a 200 cP el alginato se comporta como un fluido newtoniano, sin embargo se comporta como fluido no-newtoniano para viscosidades superiores a 200 cP (Jia et al., 2001). En este tipo de fluidos la viscosidad disminuye a medida que aumenta el esfuerzo de corte sobre el fluido. Para valores de viscosidad altos es nece-

sario tener una mayor presión en el tanque presurizado para impulsar el fluido hacia la boquilla atomizadora al caudal requerido, lo que provoca un mayor esfuerzo cortante sobre el fluido, provocando una disminución apreciable de la viscosidad del líquido. Por lo que un aumento en la viscosidad inicial del líquido no implica un aumento del tamaño final de las cápsulas, ya que la viscosidad disminuye sustancialmente al incrementarse el esfuerzo cortante por la presión ejercida dentro del tanque presurizado.

La Figura 2.60. muestra un ejemplo representativo de distribución de partícula para estos experimentos. Se observa que la distribución de partícula para estos experimentos tiene un bajo valor de span, que es indicativo de una distribución de tamaño estrecha, para tratarse de sistemas de pulverización.

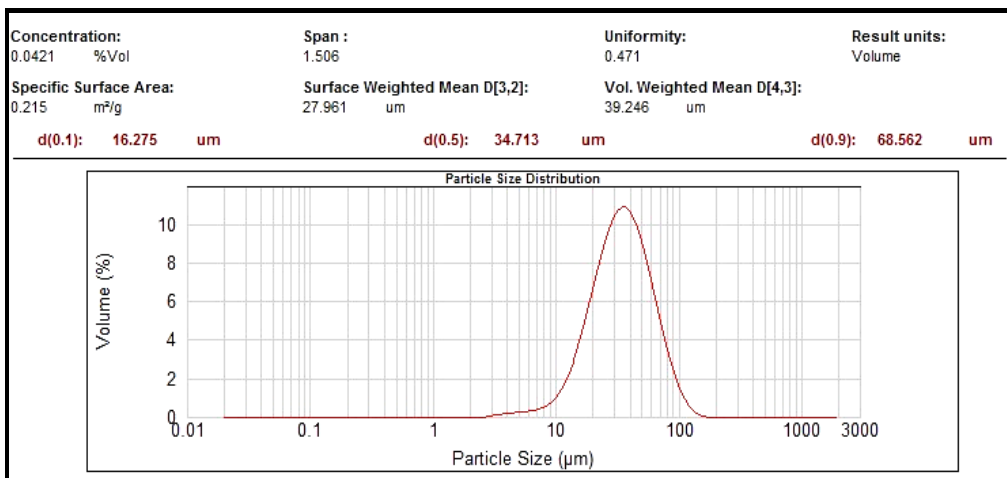


Figura 2.60. Ejemplo de distribución de partícula
(Caudal de alginato: 17 mL/min; Viscosidad alginato: 982,6 cP)

Por último, se tomaron fotografías de algunas de las microcápsulas producidas (Figura 2.61.). Se puede apreciar la esfericidad y homogeneidad de la microcápsulas obtenidas.

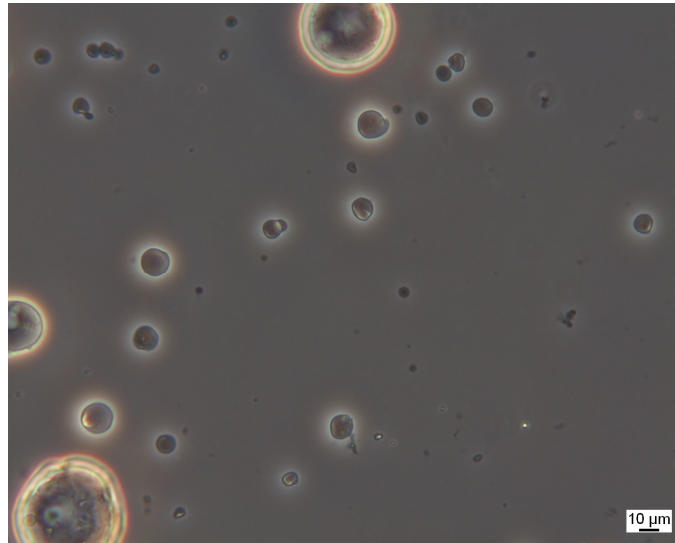


Figura 2.61. Fotografía de las cápsulas

(Viscosidad y caudal de líquido: 982,6 cP y 0,041 L/min; Caudal de aire: 20,7 L/min)

2.7.3. Conclusiones

Se ha diseñado una instalación que produce cápsulas con un tamaño comprendido entre 20 y 50 micras, sin limitación en lo que respecta a la pulverización de líquidos viscosos a cualquier caudal, y con control automático de todas las variables involucradas en el proceso. La clave de esta nueva instalación está en la utilización de un tanque presurizado. Dada la relevancia de este trabajo, la instalación diseñada ha dado lugar a una **Patente Europea (EP10153319.8)**.

Esta instalación fue caracterizada por completo, obteniéndose resultados muy similares con respecto al diseño previo, en cuanto a su comportamiento, tamaño, forma, y condiciones de producción.

2.8. BIBLIOGRAFÍA

- Angelova, N., Hunkeler, D. (1999), “Rationalizing the design of polymeric biomaterials”, *Trends Biotechnol.*, **17**, 409-415.
- Arai, T., Hashimoto, H. (1985), “Disintegration of a thin liquid sheet in a concurrent gas stream”, *Proceedings of the 3rd international conference of liquid atomization and spray systems*. V1B/1/1-8.
- Bartkowiak, A., et al. (1999), “New multicomponent capsules for immunoisolation”, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **875**, 135-145.
- Baxter, G. (1974), “Microencapsulation: processes and applications”, *Plenum Press, New York*.
- Benita, J.P., Benoit, F., Puisieux, F., Thies, C. (1984), “Characterization of drug-loaded poly (d,l-lactide) microspheres”, *Int. J. Pharm.*, **73**, 1721-1724.
- Benita, S. (1996), “Microencapsulation methods and industrial applications”, *Marcel Dekker, New York*.
- Broeckx, W.A.M., Del Valle, E.M. (2003), Patent, priority Date: 01-08-2003. ”Microcapsules”. Filled number: 03254825.7, Priority country: U.S.A., owner: Procter & Gamble, Company.
- Burgess, D.J., Carless, J.E. (1987a), “Manufacture of gelatine/gelatine coacervate microcapsules”, *Int. J. Pharm.*, **27**, 61-70.
- Burgess, D.J., Davis, S.S., Tomlinson, E. (1987b), “Potential use of albumin microspheres as a drug delivery system. I. Preparation and in vitro release of steroids”, *Int. J. Pharm.*, **39**, 129-136.

- Canaple, L, Rehor, A., Hunkeler, D. (2002), “Improving cell encapsulation through size control”, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, **13**, 783-796.
- Chandra, R., Rustgi, R. (1998), “Biodegradable polymers”, *Prog. Polym. Sci.*, **23**, 1273-1335.
- Chandy, T., Mooradian, D.L., Rao, G.H.R. (1999), “Evaluation of modified alginate-chitosan-polyethylene glycol microcapsules for cell encapsulation”, *Artif. Organs.*, **23**, 894-903.
- De, S., Robinson, D.J. (2003), “Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-L-lysine-alginate nanospheres”, *Control Release*, **89**, 101-112.
- Debenedetti, P.G., Tom, J.W., Yeo, S.D., Lim, G.B. (1993), “Application of supercritical fluids for the production of sustained delivery devices”, *J. Controlled Release*, **24(1-3)**, 27-44.
- Del Valle, E.M.M, Galán, M.A., Carbonell, R.G. (2009), “Drug delivery technologies: the way forward in the new decade”, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **48(5)**, 2475-2486.
- Del Valle, E.M.M., Galán, M.A., Herrero, E.P. (2010), “System for producing microcapsules and use thereof”, Patente Europea, EP10153319.8.
- De Vos, P., Wolters, G.H., Fritschy, W.M., Van Schilfgaarde, R. (1993), “Obstacles in the application of microencapsulation in islet transplantation”, *Int. J. Artif. Organs*, **16**, 205-212.

- Di Martino, A., Sittinger, M, Risbud, M.V. (2005), “Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering”, *Biomaterials*, **26**, 5983-5990.
- Dombrowski, N., Johns, W.R. (1963), “The Aerodynamic Instability and Disintegration of Viscous liquid sheets”, *Chem. Engr. Sci.*, **18**, 203-214.
- Dornish, M., Aarnold, M., Skaugrud, O. (1996), “Alginate and chitosan: biodegradable biopolymers in drug delivery systems”, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **4**, S153.
- Epstein, S.S., Fujii, K., Andrea, J., Mantel, N. (1970), “Carcinogenicity testing of selected food additives by parenteral administration to infant Swiss mice”, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **16**, 321-334.
- Filipovic, J., Skalko, N., Jalsenjak, I. (2001), “Mucoadhesive chitosan-coated liposomes: characteristics and stability”, *J. Microencapsul.*, **18**, 3-12.
- Fu, K. et al. (1999), “FTIR characterization of the secondary structure of protein encapsulation within PLGA microspheres”, *J. Control. Release*, **58**, 357-366.
- Galán, M.A., Ruiz, C.A., Del Valle, E.M. (2005), “The encapsulation art: applications and scale up”. En “Chemical Engineering: Trends and Developments”, *John Wiley & Sons*.

- Gaserod, O., Jolliffe, I.G., Thompson, F.C., Dettmar, P.W., Skjak-Braek, G. (1998), “The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan”, *Int. J. Pharm.*, **175**, 237-246.
- Gaserod, O., Sannes, A., Skjak-Braek, G. (1999), “Micro-capsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability”, *Biomaterials*, **20**, 773-783.
- Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C., Thom, D. (1973), “Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model”, *FEBS Lett.*, **32**, 195-198.
- Grasdalen, H., Larsen, H., Smidsrod, O. (1981), “C-NMR studies of monomeric composition and sequence in alginate”, *Carbohydr. Res.*, **89**, 179-184.
- Greco, R.S. (ed) (1994), “Implantation biology, the host response and biomedical devices”, *CRC Press, Boca Raton, Florida*.
- Griffith, L.G. (2000), “Polymeric biomaterials”, *Acta Mater.*, **48**, 263-277.
- Gutcho, M.H. (1972), “Capsule technology and microencapsulation”, *Noyes Data* (1972).
- Gutcho, M.H. (1976), “Microcapsules and microencapsulation techniques”. *Chemical Technology Review series, Noyes Data*.
- Hagerty, W.W., Shea, J.F. (1955), “A study of the stability of plane fluid sheets”, *J. Appl. Phys.*, **22**, 509-514.

- Hang, A. (1959), "Fractionation of alginic acid", *Acta Chem. Scand.*, **13**, 601-603.
- Haque, T. et al. (2005), "Superior cell delivery features of poly(ethylene glycol) incorporated alginate, chitosan, and poly-L-lysine microcapsules", *Molecular pharmaceuticals*, **1**, 29-36.
- Ikada, Y. (1994), "Surface modification of polymers for medical applications", *Biomaterials*, **15(10)**, 725-736.
- Jia, Y., Kanno, Y., Xie, Z-p. (2002), "New gel-casting process for alumina ceramics based on gelation of alginate", *Journal of the European Ceramic Society*, **22**, 1911-1916.
- Kawaguchi, H. (2000), "Functional polymer microspheres", *Prog. Polym. Sci.*, **25**, 1171-1210.
- Kelco Inc. (1987), "Alginate products for scientific water control", *San Diego, C.A., Third Edition*.
- Kirk, R., Othmer, D.F. (2001), "Enciclopedia de tecnología química", *México, D.F.: Limusa cop.*
- Klöck, G. et al. (1994), "Production of purified alginates suitable for use in immunisolated transplantation", *Applied Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 639-643.
- Lim, F. (1984), *Biomedical applications of microencapsulation*, *CRC Press*.

- Liu, X.D. et al. (2004), “Swelling behaviour of alginate-chitosan microcapsules prepared by external gelation or internal gelation technology”, *Carbohydr. Polym.*, **56**, 459-464.
- Longer, M.A, Chang, H.S., Robinson, J.R. (1985), “Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery-III: oral delivery of chlorothiazide using a bioadhesive polymer”, *J. Pharm. Sci.*, **74(4)**, 406-411.
- Mansour, A., Chigier, N. (1995), “Air-blast atomization of non-Newtonian liquids”, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, **58**, 161-194.
- Mathowitz, E.C.D., Jacob, S.J. (1999), “Bioadhesive drug delivery systems”. En “Encyclopaedia of controlled drug delivery 1”, *John Wiley and Sons, New York*.
- McHugh, D.J. (1987), "Production, Properties and Uses of Alginates". En “Production and utilization of products from commercial seaweeds (McHugh, D.J.)”, *Rome: Fao fisheries technical paper 288*.
- Mi, F-L, Wong, T-B, Shyu, S-S, Chang, S-F (1999), “Chitosan microspheres: modification of polymeric chem-physical properties of spray-dried microspheres to control the release of antibiotic drug”, *J. Appl. Polym. Sci.*, **71**, 747-759.
- Orive, G., Hernández, R.M., Gascón, A.R., Igartua, M, Pedraz, J.L. (2003), “Development and optimisation of alginate-PMCG-alginate microcapsules for cell immobilisation”, *Int. J. Pharm.*, **259**, 57-68.

- Peirone, M., Ross, C.J., Hortelano, G., Brash, J.L., Chang, P.L. (1998), “Encapsulation of various recombinant mammalian cell types in different alginate microcapsules”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 587-596.
- Pillai, O., Panchagnula, R. (2001), “Polymers in drug delivery”, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5**, 447-451.
- Rantakylä, M. (2004), “Particle production by supercritical antisolvent processing techniques”, *Tesis Doctoral*. Helsinki University of Technology (Espoo, Finland).
- Rihova, B. (2000), “Immunocompatibility of Cell Delivery Systems”. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **42**, 65-80.
- Ritz, N.K., Lefebvre, A.H. (1980), “Influence of liquid film thickness on airblast atomization. *Trans. ASME J. Eng. Power*, **102**, 706-710.
- Robitaille, R., Pariseau, J.F., Leblond, F.A., Lamoureux, M., Lepage, Y., Hallé, J.P. (1999), “Studies on small (<350 microns) alginate-poly-L-lysine microcapsules. III. Biocompatibility of smaller versus standard microcapsules”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **44**, 116-120.
- Rokkaben, P.U. (1991), “Absorbable materials in orthopaedic surgery”, *Ann. Med.*, **23**, 109-115.
- Sato, T., Kanke, M., Schroeder, H., DeLuca, P. (1988), “Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery. I. Assessment of processing conditions and solvent removal techniques”, *Pharm. Res.*, **5**, 21-30.

- Sefton, M.V., May, M.H., Lahooti, S., Babensee, J.E. (2000), “Making microencapsulation work: conformal coating, immobilization gels and in vivo performance”, *J. Control Release*, **65**, 173-186.
- Segiura, S., Oda, T., Izumida, Y. Aoyagi, Y., Satake, M., Ochiai, A., Ohkohchi, N, Nakajima, M. (2005), “Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array”, *Biomaterials*, **26**, 3327-3331.
- Senuma, Y., Hilborn, J.G. (1999), “Key parameters for monodispersed polymer microspheres with spinning disk atomization”, *Mater. Res. Innovations*, **3**, 42-49.
- Senuma, Y., Lowe, C., Zweife, Y, Hilborn, J.G., Marison, I. (2000), “Alginate hydrogel microspheres and microcapsules prepared by spinning disk atomization”, *Biotechnol. Bioeng.*, **67**, 616-622.
- Serp. D., Cantana, E., Heinzen, C., von Stockar, U., Marison, I.W. (2000), “Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization”, *Biotechnol. Bioeng.*, **70**, 41-53.
- Shwinger, C., Klemenz, A., Busse, K., Kressler, J. (2004), “Encapsulation of living cells with polymeric systems”, *Macromol. Symp.*, **210**, 493-499.
- Singh, D.K., Ray, A.R. (2000), “Biomedical applications of chitin, chitosan, and their derivatives”, *J.M.S.-Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **C40(1)**, 69-83.

- Skjaek-Braek, G., Murano, E., Poaletti, S. (1989), “Alginate as immobilization material II: Determination of polyphenolic contaminants by fluorescence spectroscopy and evaluation of methods for their removal”, *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 90-94.
- Smidsrod, O., Draget, K.I. (1996), “Alginates: chemistry and physical properties”, *Carbohydr. Eur.*, **14**, 6-13.
- Stanford, E.C.C. (1883), “New substance obtained from some of the commoner species of marine algae”, *Algin. Chem. News*, **47**, 254-257, 267-269.
- Strand, B.L., Ryan, L., Veld, P.I., Kulseng, B., Rokstad, A.M., Skjak-Braek, G., Espevik, T. (2001), “Poly-L-Lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines”, *Cell Transplant.*, **10**, 263-275.
- Uludag, H., De Vos, P., Tresco, P.A. (2000), “Technology of mammalian cell encapsulation”, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **42**, 29-64.
- Valenta, C., Kast, C. E., Harich, I., Bernkop-Schnürch, A. (2001), “Development and in vitro evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone”, *J. Control Release*, **77(3)**, 323-332.
- Valenta, C., Janisch, M. (2003), “Permeation of cyproterone acetate through pig skin from different vehicles with phospholipids”, *Int. J. Pharm.*, **258**, 133-139.

- Venugopal, V. (2009), “Marine products for healthcare: functional and bioactive nutraceutical compounds from the ocean”, *CRC Press, Taylor and Francis Group, Florida, USA*.
- Whateley, T.L. (1992), “Microencapsulation of drugs (Drugs targeting and delivery)”, *Harwood Academic Publishers, Berkshire, UK*.
- Winzenburg, G., Schmidt, C., Fuchs, S., Kissel, T. (2004), “Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems”, *Advd. Drug. Deliv. Rev.*, **56**, 1453-1466.
- York, J.L., Stubbs, H.F., Tek, M.R. (1953), “The mechanism of disintegration of liquid sheets”. *T. ASME.*, **75**, 1279-1286.
- Zekorn, T. et al. (1992), “Barium-alginate beads for immunoisolated transplantation of islets of Langerhans”, *Transplant. Proc.*, **24**, 937-939.
- Zielinski, B.A., Aebischer, P. (1994), “Chitosan as a matrix for mammalian-cell encapsulation”, *Biomaterials.*, **15**, 1049-1056.
- Zimmermann, U. et al. (1992), “Production of mitogen contamination free alginates with variable rations of mannuronic to guluronic acid by free flow electrophoresis”, *Electrophoresis*, **13**, 269-274.

2.9. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados derivados del Capítulo 2 se difundieron a través de dos congresos internacionales, una patente, y un artículo internacional:

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, M.A. Galán.
Título: *Development of a microencapsulation technology of stem cell.*
Congreso: *10th Mediterranean Congress of Chemical Engineering.*
Ciudad: Barcelona, España.
Fecha: 15-18 Noviembre 2005.
Participación: Poster (TO4-32).

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, M.A. Galán.
Título: *Development and modelling of a new microencapsulation technology based on air blast atomization.*
Congreso: *17th International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA 2006).*
Ciudad: Praga, República Checa.
Fecha: 27-31 Agosto 2006.
Participación: Comunicación Oral (0197).

Autores: Eva M. Martín Del Valle, Miguel. A. Galán, Edgar Pérez Herrero.
Título: System for producing microcapsules and use thereof.
Nº registro: Patente europea, *EP 10153319.*
Institución: Universidad de Salamanca.
Fecha: 11/02/2010
País: España.

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, M.A. Galán.
Título: *Development of a new technology for the production of microcapsules based on atomization processes.*
Revista: *Chemical Engineering Journal*, **117** (2006) 137-142.
Impacto: 1,594 (año 2006).

A continuación, se adjunta una copia del artículo publicado en la revista internacional *Chemical Engineering Journal*, así como una copia del documento de registro y el abstract de la **Patente Europea**:



Development of a new technology for the production of microcapsules based in atomization processes

E.P. Herrero, E.M. Martín Del Valle*, M.A. Galán

Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, P/Los Caídos S/N, 37008 Salamanca, Spain

Received 31 October 2005; received in revised form 22 December 2005; accepted 29 December 2005

Abstract

A new microencapsulation technology of polyelectrolyte complex beads which produce very small particles (1–50 μm) with particle size control has been developed. The polymers used were sodium alginate as polyanion and barium chloride as polycation. To do that, an air-blast atomizer that uses compressed air was used. This works by spraying a solution of sodium alginate in a solution of barium chloride, which induces the gelation. The air flow rate, alginate flow rate and viscosity of the alginate solution effects were studied. The behaviour curves of the system were built with the microparticles size data obtained at different operation conditions. These curves will allow knowing the operation conditions for a suitable microparticle size.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Microencapsulation; Polyelectrolyte complexes; Atomization; Control size

1. Introduction

Over the past few decades, the rise of modern pharmaceutical technology and the amazing growth of the biotechnology industry have revolutionized the approach to drug discovery and development.

The most common method of administration of drugs is in the form of pills or injections. These methods of administration meet the requirements of efficacy for several drugs. However, these methods are inadequate for many new drugs. To overcome these difficulties, new technologies, like the microencapsulation, have been developed [1–5].

These technologies are based on the use of polymers. Polysaccharides, such as alginate, have been widely used in the microencapsulation technology.

Alginate is a water soluble linear polysaccharide extracted from brown seaweed, and is composed of alternating blocks of 1–4 linked α -L-guluronic and β -D-mannuronic acid residues. Depending on the source of the alginate, the molecules can be composed of three types of blocks: polymannuronic acid blocks (MM), polyguluronic acid blocks (GG) and mixed blocks (MG). Also, the amount of each component (M and G) varies with the

source of the alginate. Alginate has an excellent biocompatibility and biodegradability.

Probably, the most important property of alginates is their ability to form gels by reaction with divalent cations such as calcium or barium by binding between guluronic acid blocks in alginate and the divalent cations. These gels are similar to solids because they retain their shape and resist stress. This process of gelation is an almost instantaneous and irreversible process, which is governed by the relative rate of diffusion of barium ions and polymer molecules into the gelling zone.

Most methods of microencapsulation involve one of two harsh conditions (contact with an organic solvent and/or heating during processing) which usually is a problem, especially for biomaterials handling [2,3]. The previous work done on microencapsulation without harsh conditions produce capsules with diameters ranged between 300 and 1000 μm [4,5–13].

Several attends have been done in order to produce very small particles based in polyelectrolyte complexes, but there is not a technology able to produce these microparticles below 300 μm , with control size and narrow distribution [7–13].

Microcapsules prepared by spinning disk atomization, in which the fluid breakup is induced by a rotating disk, have sizes ranging from 300 to 600 μm [6,7]. Other sample is the alginate beads produced by a vibrating nozzle device. In this, a suspension of active material to be encapsuled, in an immobilization media solution, is forced through a small orifice; the subsequent

* Corresponding author.

E-mail address: emvalle@usal.es (E.M.M.D. Valle).

liquid jet is put into vibration and breaks up into drops that are then solidified to form particles. However, a big limitation in this technology is the viscosity of the solution to be used. It is not possible to break up jet with higher viscosities of 50 cP. This type of device produce capsules with diameters within the range 300–600 μm [4,8,9].

Other technology used to encapsulation is the coaxial air-flow dropping that produces microcapsules within the range 400–800 μm [4,9–11].

Other example of encapsulation technology is the JetCutter technology, which is essentially based on rotating wires that cut falling jets of the hydrogel precursor solution into small pieces. These are cut at regular intervals, forming identically sized drops that are gelled in a crosslinking bath as they fall. The JetCutter can be operated either in the “normal mode” or in the “soft-landing mode”. Normal mode means that the JetCutter is placed somewhere at a definite height and the beads are collected in a CaCl_2 bath placed on the floor. Soft-landing mode means that the JetCutter is placed on the floor and the beads are collected at a height of about 2 m, this reduces the velocity of the bead when entering the gelation bath. Both modes of this technology produces capsules within the range 320–800 μm [4,9].

Electrostatic droplet generation produces microcapsules by an electrostatic pulse generator within the range 300–800 μm [11,12,4]. A new method based on a microfluidics device, that use a silicon micro-nozzle array, have achieved reduce the diameter of the capsules to 162 μm . Alginate is extruded through the micro-nozzle and is sheared by the viscous drag force of oil flow to form calcium alginate gel beads [13].

For that reason, based in atomization processes, a new microencapsulation technology of polyelectrolyte complex beads (alginate–barium) which produced very small particles (1–50 μm) has been developed. The system alginate–barium was used because a wide knowledge was already obtained from previous work done [14,15].

Atomization is a process in which the disruptive action of externally applied aerodynamic forces is opposed by the consolidating influences of the liquid viscosity and surface tension forces. Disintegration of liquid jets injected into quiescent and high-velocity gas streams has been studied by many researchers [16].

From the different atomization techniques air-blast or twin-fluid atomization has been widely used suspension spray drying [11–13].

In air-blast atomization, low-speed liquid jets are accelerated by the surrounding high-speed gas flow, usually in the spray flow direction. The liquid is subjected to both tensile and shearing stresses. The magnitude of the extension has been shown to be significant for applications involving polymer solutions. Twin-fluid atomizers have a number of advantages over pressure atomizers including lower requirements for the liquid injection pressure and finer sprays. Unfortunately, the process of air-blast atomization is very complex and its physical mechanisms are not fully understood [16].

Therefore, in order to have a better understanding of the atomization process for microencapsulation applications the disintegration of polymer liquid jets (sodium alginate) injected into

high-velocity gas streams were studied. The air flow rate effect, alginate flow rate effect and viscosity of the alginate solution were studied. The behaviour curves of the system were built with the size data obtained for the microparticles at different operation conditions. These curves will allow knowing the operation conditions for a suitable microparticle size and a better understanding of the use of this technology for microencapsulation proposes.

2. Materials and methods

2.1. Material

Sodium alginate from *Macrocystis pyrifera* (medium viscosity) was purchased from Sigma Chemicals, barium chloride dehydrate, reagent grade was purchased from Scharlau.

2.2. Production of microcapsules

The microencapsulation procedure, optimized to produce microcapsules in the size range 1–50 μm , can be described as follow. Sodium alginate (0.7 wt.%) was fed from a beaker to an atomization nozzle of 1.8 mm by air intake. After that, sodium alginate is sprayed into a crystallizer containing 1000 ml of hardening solution, 2 wt.% calcium chloride solution, which induces the gelation. The device to the atomization works with pressurized air that mixes with the liquid, forcing liquid droplets out through the orifice of the nozzle. The divalent barium ions crosslink the droplets of sodium alginate on contact to form the microcapsules. The microbeads were kept 5 min under crosslinked conditions to form a semi-permeable membrane. The resultant microbeads were collected by filtration and washed with 30 ml of 0.9% of barium chloride and kept in distilled water. The scheme of the microencapsulation device is shown in Fig. 1.

2.3. Particle size analysis

We have obtained the particle size distribution of the microcapsules produced with laser diffractometry. To do that we have used a Leeds and Northrup Microtrac Particle Size Analyzer. This device utilizes the phenomenon of scattered light from a laser beam projected through a stream of particles.

3. Results

3.1. Behaviour curves of the system

In order to obtain the behaviour curves of the atomization system, experiments at different alginate flow rate, different air flow rate and three different alginate solution viscosities were carried out.

3.1.1. Sodium alginate flow rate effect

In order to study the effect of the alginate flow rate in the average diameter, atomization experiments were conducted at

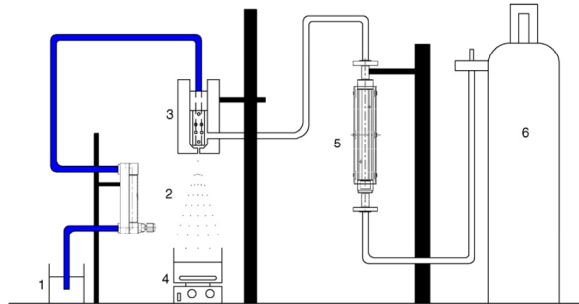


Fig. 1. A scheme of the microencapsulation device: (1) beaker with sodium alginate (0.7 wt.%); (2) rotameter of sodium alginate; (3) nozzle; (4) crystallizer with calcium chloride (2 wt.%) and a magnetic stirrer; (5) rotameter of air; (6) gas cylinder of pure pressurized air.

constant flow of pressurized air of 138.000 L/min, sodium alginate viscosity of 64.50 cP and sodium alginate flow rate ranged from 0.003 to 0.037 L/min. Flow rate of sodium alginate lower than 0.003 L/min requires long time of atomization. Flow rate higher than 0.037 L/min produces agglomerates.

Under these conditions the microcapsules were produced. After that, the particle size distribution was obtained. It has been measured the distribution in number. We have considered the 50% percentile of the particle size distribution as the average diameter of the microcapsules. With these data the behaviour curve was plot (Fig. 2).

3.1.2. Air flow rate effect

In order to study the air flow rate effect atomization experiments were conducted at constant alginate flow rate (0.003, 0.006, 0.009 L/min), a constant viscosity of alginate solution of 64.50 cP, and an air flow rate ranged from 78.40 to 138.00 L/min. Air flow rate lower than 78.40 L/min did not produce atomization. Air flow rate higher than 138.00 L/min generated the deformation of the surface of the barium chloride solution when atomization is performed.

Under these conditions the microcapsules were produced. After that, the particle size distribution was obtained. It has been measured the distribution in number. We have considered the

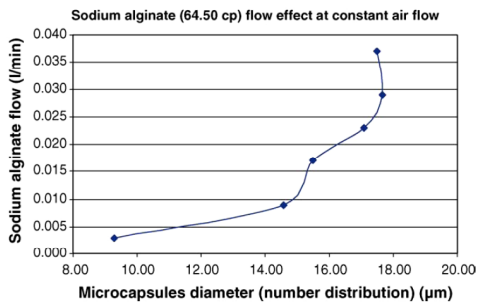


Fig. 2. Variation of the microcapsules size at different sodium alginate flow rate.

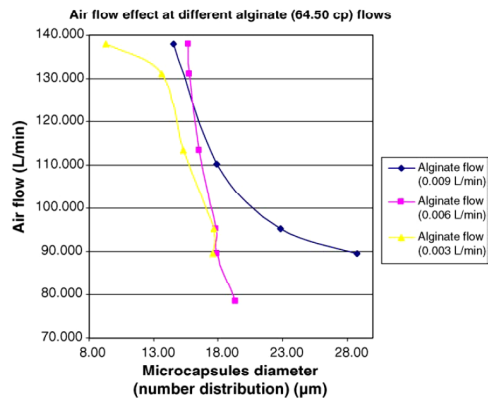


Fig. 3. Variation of the microcapsules size at different air flow rate.

50% percentile of the particle size distribution as the average diameter of the microcapsules. With these data the behaviour curve was plot (Fig. 3).

3.1.3. Alginate solution viscosity effect

In order to study the effect of alginate viscosity in the average diameter, atomization experiments were carried out, varying alginate flow rate and air flow rate like Sections 3.1.1 and 3.1.2, at sodium alginate viscosities of 64.50, 138.00, and 190.00 cP. Alginate viscosities were obtained varying alginate concentration (Table 1). To measure the alginate viscosity it was used a

Table 1
Alginate viscosity with the alginate concentration variation

Alginate concentration (wt.%)	Alginate viscosity (cP)
0.7	64.50
0.8	138.00
1.0	190.00

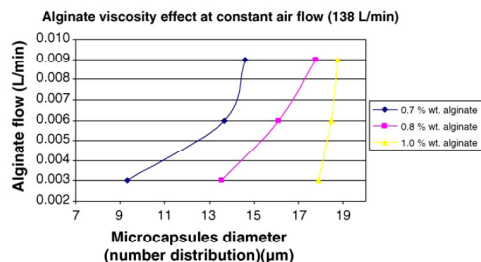


Fig. 4. Alginate viscosity effect on the microparticle size at constant air flow rate of 138 L/min.

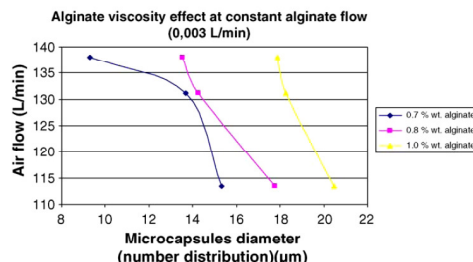


Fig. 7. Alginate viscosity effect on the microparticle size at constant alginate flow rate of 0.003 L/min.

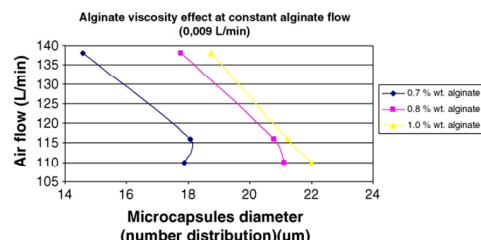


Fig. 5. Alginate viscosity effect on the microparticle size at constant alginate flow rate of 0.009 L/min.

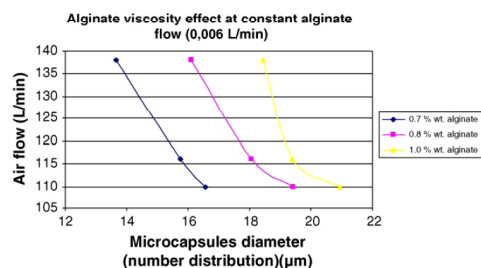


Fig. 6. Alginate viscosity effect on the microparticle size at constant alginate flow rate of 0.006 L/min.

relatively low velocity liquid sheet or jet into droplets, was used to produce the atomization. One kind of these atomizers is the air-blast atomizer, in which, an annular liquid sheet exiting from the atomizer is exposed to an inner and an outer air streams moving at high velocities.

The fundamental principle of the disintegration of a liquid consists of increasing its surface area, usually in the form of a cylindrical rod or sheet, until it becomes unstable and disintegrates into drops.

When a sheet of liquid emerges from a nozzle, its subsequent development is influenced mainly by its initial velocity and the physical properties of the liquid and the ambient gas. To expand the sheet against the contracting surface tension force, a minimum sheet velocity is required, which is provided by aerodynamic drag. Increasing the initial velocity expands and lengthens the sheet until a leading edge is formed where equilibrium exists between surface tension and inertial forces.

A number of previous studies [17,18] indicate that the curvature effect may be negligible due to the relatively small thickness of the liquid sheet compared to the radius of curvature. As a result, the liquid to be atomized may be modelled in a first approximation as a plane liquid sheet [19].

We have considered the system of forces acting on the slightly disturbed surface of a liquid sheet moving in air, as is shown in Fig. 8. Surface tension forces try to return the protuberance back to its original position, but the air experiences a local decrease in static pressure (corresponding to the local increase in velocity) that tends to expand the protuberance farther outward. This corresponds to the normal pattern of wind-induced instability, where surface tension forces oppose any movement

rotational viscometer VISCO ELITE, purchased to FUNGILAB S.A.

Under these conditions the microcapsules were produced. After that, the particle size distribution was obtained. It has been measured the distribution in number. We have considered the 50% percentile of the particle size distribution as the average diameter of the microcapsules. With these data the behaviour curves were plot (Figs. 4–7).

4. Discussion

A twin-phased gas–liquid atomizer, which utilizes the kinetic energy carried with high-velocity gas streams to disintegrate the

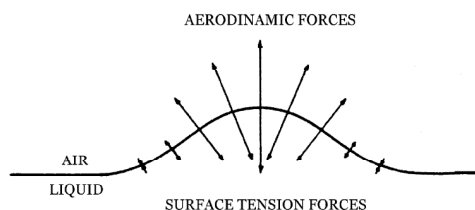


Fig. 8. System of forces acting on a liquid sheet moving in air.

of the interface from its initial plane and attempt to restore equilibrium, while the aerodynamic forces increase any deviation from the interface and thereby promote instability.

The instability of thin liquid sheets resulting from interaction with the surrounding gaseous medium gives rise to rapidly growing surface waves. Disintegration occurs when the wave amplitude reaches a critical value; fragments of the sheet are torn off and rapidly contract into unstable ligaments under the action of surface tension, and drops are produced as the ligaments break down.

The microcapsules that have been formed in this work are spherical. We have obtained a narrow particle size distribution.

4.1. Sodium alginate flow rate

An analysis of the experimental data obtained show that the microcapsules average diameter decreases when it is decreased the sodium alginate flow.

These results are in a very good agreement with the theoretical explanation that some authors have given to justify this phenomenon.

Rizt and Lefebvre [20] studied the influence of initial liquid film thickness on spray characteristics. They found that high values of liquid flow rate result in thicker films. It was also observed that thinner liquid films break down into smaller drops. Previous workers had noted a similar relationship. For example, the analyses of York et. al. [21], Hagerty and Shea [22], and Dombrowski and Johns [23] all suggest that mean drop diameter is roughly proportional to the square root of the film thickness.

4.2. Air flow rate effect

An analysis of the experimental data obtained show that the microcapsules average diameter decreases when we increase the air flow.

These results are in accordance with the theoretic explanation that some authors have given to this phenomenon in previous studies.

Rizt and Lefebvre [20] examined the mechanism of sheet disruption and drop formation. They showed that the liquid/air interaction produces waves that become unstable and disintegrate into fragments. These fragments then contract into ligaments, which in turn break down into drops. They proved that with increase in air velocity, the liquid sheet disintegrates earlier and ligaments are formed nearer the lip. These ligaments tend to be thinner and shorter and disintegrate into smaller drops.

Arai and Hashimoto [24] studied the disintegration of liquid sheets injected into a coflowing airstream. For a constant liquid sheet thickness they showed that breakup length decrease with increase in the relative velocity between the air and the liquid.

4.3. Alginate viscosity effect

An analysis of the experimental data obtained show that the microcapsules average diameter increases when we increase the alginate viscosity.

The aqueous solutions of alginates have shear-thinning characteristics, i.e. the viscosity decreases with increasing shear rate (stirrer speed). This property is also called pseudoplasticity, or non-Newtonian fluid. The viscosity of an alginate solution depends on the concentration of alginate and the length of the alginate molecules, i.e. the number of monomer units in the chains. The longer the chains the higher the viscosity at similar concentrations [6]. Also, alginate solutions are viscoelastic liquids, that is, recover the deformation when is removed the stress. Viscoelastic fluids are much more difficult to atomize than viscoelastic liquids. Viscoelastic liquids showed breakup patterns similar to those of water sprays. Viscoelastic materials have remarkably different breakup patterns. The ligaments undergo a very large stretching motion before they break up, resulting in long threads of liquid attached to droplets. The normal stresses developed in viscoelastic materials are much higher than their associated shear stresses. Consequently, the development of the large normal stresses appears to be the most important rheological mechanism that inhibits breakup. The ability of viscoelastic materials to resist breakup in these contexts is caused by the molecular orientation that arises when the ligaments are extended. This extension leads to large increases in the extensional viscosity [25].

5. Conclusions

It was developed a microencapsulation technology of polyelectrolyte complex beads which produce very small particles (1–50 μm) with particle size control. The polymers used is sodium alginate as polyanion and barium chloride as polycation. To do that, it was used an air-blast atomizer.

The microcapsules that have been formed in this work are spherical. It was obtained a narrow particle size distribution. It was achieved the behaviour curves of the system.

An analysis of the curves shows that smaller microcapsules are produced at lower alginate flows because of high values of liquid flow rate result in thicker films. It was also observed that thinner liquid films break down into smaller drops.

It has been observed that higher air flow rates produce smaller microcapsules because of with an increase in air velocity, the liquid sheet disintegrates earlier and ligaments are formed nearer the lip. These ligaments tend to be thinner and shorter and disintegrate into smaller drops. Also, it is demonstrated that breakup length decrease with an increase in the relative velocity between the air and the liquid and the breakup length increases as the liquid sheet velocity increases.

The microcapsules average diameter increases when we increase the alginate viscosity because of alginate solutions are viscoelastic liquids and are much more difficult to atomize than viscoelastic liquids. The normal stresses developed in viscoelastic materials are much higher than their associated shear stresses and this is the most important rheological mechanism that inhibits breakup. This work will be used in the future to encapsulate stem cell for therapeutical treatment of some diseases, such as multiple sclerosis, child brochopulmonary dysplasia or emphysema and pulmonary fibrosis.

References

- [1] T. Sato, M. Kanke, H. Schroeder, P. DeLuca, Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery. I. Assessment of processing conditions and solvent removal techniques, *Pharm. Res.* 5 (1988) 21–30.
- [2] D.J. Burgess, S.S. Davis, E. Tomlinson, Potential use of albumin microspheres as a drug delivery system. I. Preparation and in vitro release of steroids, *Int. J. Pharm.* 39 (1987) 129–136.
- [3] F.-L. Mi, T.-B. Wong, S.-S. Shyu, S.-F. Chang, Chitosan microspheres: modification of polymeric chem-physical properties of spray-dried microspheres to control the release of antibiotic drug, *J. Appl. Polym. Sci.* 71 (1999) 747–759.
- [4] L. Bilancetti, M. Bucko, B. Bugarski, J. Bukowski, P. Gemeiner, D. Lewinska, V. Manojlovic, B. Massart, C. Nastruzzi, V. Nedovic, D. Poncellet, U. Pruesse, S. Rosinski, S. Siebenhaar, L. Tobler, A. Vikartovska, K. Vorlop. Round robin experiment “Bead production technologies”, University of Perugia, Faculty of Pharmacy, Department of Chemistry and Pharmaceutical Technology of Drugs.
- [5] M.A. Galan, C.A. Ruiz, E.M.M. Valle del, The Encapsulation art: applications and scale up, in: *Chemical Engineering: Trends and Developments*, John Wiley & Sons, 2005.
- [6] Y. Senuma, C. Lowe, Y. Zweifel, J.G. Hilborn, I. Marison, Alginate hydrogel microspheres and microcapsules prepared by spinning disk atomization, *Biotechnol. Bioeng.* 67 (2000) 616–622.
- [7] Yoshinori Senuma, Jöns Gunnar Hilborn, Key parameters for monodispersed polymer microspheres with spinning disk atomisation, *Mater. Res. Innovations* 3 (1999) 42–49.
- [8] D. Serp, E. Cantana, C. Heinzen, U. von Stockar, I.W. Marison, Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization, *Biotechnol. Bioeng.* 70 (2000) 41–53.
- [9] C. Shwinger, A. Klemenz, K. Busse, J. Kressler, Encapsulation of living cells with polymeric systems, *Macromol. Symp.* 210 (2004) 493–499.
- [10] L. Canaple, A. Rehor, D. Hunkeler, Improving cell encapsulation through size control, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 13 (2002) 783–796.
- [11] R. Robitaille, J.F. Pariseau, F.A. Leblond, M. Lamoureux, Y. Lepage, J.P. Hallé, Studies on small (<350 µm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. III. Biocompatibility of smaller versus standard microcapsules, *J. Biomed. Mater. Res.* 44 (1999) 116–120.
- [12] G. Orive, R.M. Hernandez, A.R. Gascón, M. Igartua, J.L. Pedraz, Development and optimisation of alginate-PMCG-alginate microcapsules for cell immobilisation, *Int. J. Pharm.* 259 (2003) 57–68.
- [13] S. Sugiura, T. Oda, Y. Izumida, Y. Aoyagi, M. Satake, A. Ochiai, N. Ohkohchi, M. Nakajima, Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array, *Biomaterials* 26 (2005) 3327–3331.
- [14] E.M. Martín Del Valle, W.A.M. Broeckx. Microcapsules useful in liquid detergents for use in e.g. manual and automatic laundering, have core and polyelectrolyte complex shell in the form of semipermeable membrane and comprise a particulate permeability regulator. EP1502645-A1; US2005026800-A1; WO2005011856-A1, 2005.
- [15] E.M. Martín del Valle, O. Nabet, M.A. Galán. Mass transfer characteristics of chitosan-barium-alginate beads. *Process Biochem.*, submitted for publication.
- [16] A.H. Lefebvre, *Atomization and Sprays*, Hemisphere, New York, 1989.
- [17] J. Shen, X. Li, Instability of an annular viscous liquid jet, *Acta Mech.* 114 (1996) 167–183.
- [18] J. Shen, X. Li, Breakup of annular viscous liquid jets in two gas streams, *AIAA J.* 12 (1996) 752–759.
- [19] W.T. Kim, S.K. Mitra, S. Li, L.A. Prociw, T.C.J. Hu, A predictive model for the initial droplet size and velocity distributions in sprays and comparison with experiments, *Part. Part. Syst. Char.* 20 (2003) 135–149.
- [20] N.K. Rizt, A.H. Lefebvre, Influence of liquid film thickness on airblast atomization, *J. Eng. Power-T ASME* 102 (1980) 706–710.
- [21] J.L. York, H.F. Stubbs, M.R. Tek, The mechanism of disintegration of liquid sheets, *T. ASME.* 75 (1953) 1279–1286.
- [22] W.W. Hagerty, J.F. Shea, A study of the stability of plane fluid sheets, *J. Appl. Phys.* 22 (1955) 509–514.
- [23] N. Dombrowski, W.R. Johns, The aerodynamic instability and disintegration of viscous liquid sheets, *Chem. Eng. Sci.* 18 (1963) 203–214.
- [24] T. Arai, H. Hashimoto, Disintegration of a thin liquid sheet in a cocurrent gas stream, in: *Proceedings of the 3rd International Conference of Liquid Atomization and Spray Systems*, V1B/1/1-8, 1985.
- [25] A. Mansour, N. Chigier, Air-blast atomization of non-Newtonian liquids, *J. Non-Newtonian Fluid Mech.* 58 (1995) 161–194.



Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	753754	
Application number	EP10153319.8	
File No. to be used for priority declarations	EP10153319	
Date of receipt	11 February 2010	
Your reference	EP1367.37	
Applicant	UNIVERSIDAD DE SALAMANCA	
Country	ES	
Title	System for producing microcapsules and use thereof	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml SPECEPO-1.pdfDESCRIPCION DEF.pdf (9 p.) SPECEPO-3.pdfRESUMEN DEF.pdf (1 p.) f1002-1.pdf (1 p.) f1002-3.pdf (1 p.)	ep-request.xml ep-request.pdf (4 p.) SPECEPO-2.pdfREIVINDICACIONES DEF.pdf (3 p.) SPECEPO-4.pdfDIBUJOS DEF.pdf (2 p.) f1002-2.pdf (1 p.)
Submitted by	CN=A. Pons Arino 7414,O=Pons Patentes y Marcas Internacional, S.L.,C=ES	
Method of submission	Online	
Date and time	11 February 2010, 14:30 (CET)	

Acknowledgement of receipt - application number EP10153319.8

Page 1 of 2

SYSTEM FOR PRODUCING MICROCAPSULES AND USE THEREOF**OBJECT OF THE INVENTION**

5

The main object of the present invention relates to the field of microencapsulation techniques, specifically to a biocompatible system and method for producing microcapsules without any viscosity limitation.

10

Microcapsules obtained by the above mentioned system and method comprise an active material enclosed in a polymer matrix, surrounded by a semipermeable membrane.

15

BACKGROUND OF THE INVENTION

Microencapsulation is the process by which an active material is enclosed in a polymer matrix, surrounded by a semi-permeable membrane. Microcapsules have a number of interesting advantages and the main reasons for microencapsulation can be exemplified as controlled release, protection of the encapsulated materials against oxidation or deactivation due to reaction in the environment, masking of odour and/or taste of encapsulating materials, isolation of encapsulating materials from undesirable phenomena, and easy handling as powder-like materials.

25

Most methods of microencapsulation involve one of two harsh conditions (contact with an organic solvent and/or heating during processing) which usually is a problem, especially for biomaterials handling. For example, microencapsulation by coacervation of oppositely charged gelatines may involve the use of either formaldehyde or heat to cross-link the gelatine. The production of poly (d, l lactide) and poly (glycolic acid) microspheres by solvent

30

CAPÍTULO 3: DESARROLLO DE UN MODELO PARA LA PREDICCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

3. DESARROLLO DE UN MODELO PARA LA PREDICCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

Dado que las cápsulas generadas por el dispositivo diseñado en este trabajo se producen por procesos de atomización, es necesario desarrollar un modelo que tenga en cuenta el mecanismo por el cual se produce la ruptura de la hoja líquida.

Rayleigh, Tyler, Weber, Haenlin, Ohnesorge y Castleman (Lefebvre, 1989) han llevado a cabo diferentes estudios teóricos y experimentales sobre el mecanismo de atomización. Giffen y Muraszew (1953) y más recientemente Chigier (1981) y Lefebvre (1989) han publicado detalladas revisiones de trabajos realizados con anterioridad. De estos trabajos es posible concluir que el mecanismo más ampliamente aceptado para explicar el proceso de atomización es el mecanismo de ondas o teoría de ondas.

3.1. MÉCANISMO O TEORÍA DE ONDAS

Según la teoría de ondas, la desintegración de chorros u hojas líquidas por la acción del aire se produce debido al crecimiento de ondas inestables en la interfase líquido-gas motivado por las interacciones aerodinámicas entre el líquido y el gas que hacen que las perturbaciones crezcan en magnitud y alcancen un valor máximo. Este tipo de inestabilidad se conoce como *inestabilidad de Kelvin-Helmholtz* (Panton, 1995).

Existe un número de onda dominante o más inestable correspondiente a la máxima relación de crecimiento. Cuando la amplitud de la perturbación alcanza un valor crítico la onda se separa de la hoja para formar tiras o ligamentos, los cuales se vuelven inestables y rompen en gotas. Este proceso se muestra en la Figura 3.1.

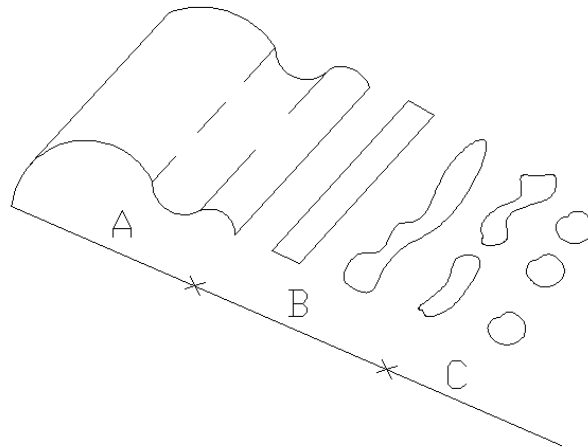


Figura 3.1. Desintegración de una lámina líquida (Dombrowski y Johns, 1963)

(A) Crecimiento de las ondas inestables, (B) Formación de los ligamentos, (C) Rotura de los ligamentos en gotas.

El sistema de fuerzas que actúa en la superficie alterada de una lámina de líquido moviéndose en aire se muestra en la Figura 3.2.

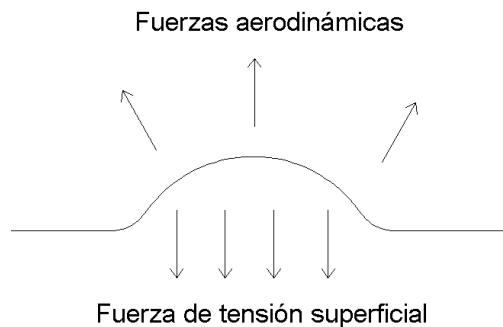


Figura 3.2. Sistema de fuerzas actuando en una hoja de líquido moviéndose en aire

Las fuerzas de tensión superficial intentan devolver la protuberancia a su posición original, pero el aire experimenta una disminución localizada en la presión estática (correspondiente al incremento localizado en la velocidad)

que tiende a expandir la protuberancia hacia fuera. Esto corresponde al patrón normal de inestabilidad inducida por el aire, donde las fuerzas de tensión superficial se oponen a cualquier movimiento de la interfase desde su plano inicial e intentan restaurar el equilibrio, mientras que las fuerzas aerodinámicas incrementan cualquier desviación desde la interfase y por lo tanto promueven la inestabilidad.

Las ondas se generan por fluctuaciones de presión o turbulencias en las corrientes de gas o de líquido (Adelberg, 1967, 1968). Éstas continúan como ondas capilares si la tensión superficial predomina, y como ondas de aceleración si dominan las fuerzas de presión aerodinámica. Cuando la presión aerodinámica ($\rho_a U_a^2/2$) de la corriente gaseosa en la atomización neumática aumenta, la amplitud de las ondas superficiales crecerá si su longitud de onda (λ) excede un valor mínimo (Adelberg, 1967, 1968; Jeffreys, 1925; Mayer, 1961). Cuando la amplitud se hace lo suficientemente grande, las ondas emiten ligamentos que rápidamente quiebran en gotas.

La amplitud (A) de las ondas superficiales en el líquido es descrita por la siguiente ecuación diferencial (Jeffreys, 1925):

$$\frac{dA}{dt} = A \left[\frac{\pi\beta\rho_a(U_a - u)^2}{\lambda\rho_l u} - \frac{8\pi^2\mu_l}{\rho_l\lambda^2} \right] \quad (3.1)$$

El subíndice l se refiere a las propiedades de la fase líquida y el subíndice a se refiere a las propiedades de la fase gaseosa.

De la ecuación (3.1), se observa que la amplitud, amortiguada por la fuerza viscosa del líquido, aumenta cuando lo hace la velocidad del aire.

Cuando la fuerza de presión aerodinámica y la fuerza de tensión superficial son significantes, la velocidad de la onda u viene dada por la ecuación (3.2) (Adelberg, 1967):

$$u = \left[\frac{a\lambda}{2\pi} + \frac{2\pi\sigma}{\lambda\rho_l} \right]^{1/2} \quad (3.2)$$

La aceleración producida por la resistencia aerodinámica en el chorro del líquido, a , está descrita por:

$$a = \frac{4C_{Do} \sin^2 \zeta}{\pi D \rho_l} (\overline{\rho_a U_a^2} / 2) \quad (3.3)$$

donde C_{Do} es el coeficiente de resistencia, ζ es el ángulo entre el aire y la corriente líquida, D es el diámetro del chorro líquido, y $\overline{\rho_a U_a^2} / 2$ es la presión dinámica de la corriente libre.

Substituyendo la ecuación (3.2) en la ecuación (3.1) y asumiendo que $U_a \gg u$, se llega a la siguiente ecuación:

$$\frac{dA}{dt} = A \left[\frac{\pi\beta\rho_a U_a^2}{\lambda\rho_l \left[\frac{a\lambda}{2\pi} + \frac{2\pi\sigma}{\lambda\rho_l} \right]^{1/2}} - \frac{8\pi^2\mu_l}{\rho_l\lambda^2} \right] \quad (3.4)$$

La Eq. (3.4) muestra que el crecimiento de la amplitud es contrarrestado por la tensión superficial (σ). Obsérvese que en este estudio la velocidad del líquido es insignificanemente pequeña comparada con la velocidad del aire.

La longitud de onda mínima λ_m , por encima de la cual la amplitud crece exponencialmente con el tiempo, puede ser estimada estableciendo $dA/dt=0$. Esto resulta en la siguiente expresión cúbica para λ_m :

$$\lambda_m^2 - \lambda_a \lambda_m^2 - \lambda_\sigma^2 = 0 \quad (3.5)$$

donde:

$$\frac{\lambda_{\sigma}}{D} = \frac{2\pi(16)^{1/3}}{\beta^{2/3}} (Z/We)^{2/3} \quad (3.6)$$

$$\frac{\lambda_a}{D} = \frac{64C_{Do} \sin^2 \zeta}{n^* \beta^2 \pi} (Z^2/We) \quad (3.7)$$

siendo λ_{σ} y λ_a las longitudes de onda de las ondas capilares y de aceleración, respectivamente, y $n^* = \rho_a U_a^2 / \overline{\rho_a U_a^2}$ la relación de presión dinámica de descarga.

El número de Weber ($We = \rho_a U_a^2 D / \sigma$) representa la relación entre la fuerza aerodinámica y la tensión superficial.

El número de Ohnesorge ($Z = \mu_l / (\rho_l \sigma D)^{1/2}$) contiene sólo las propiedades de los glóbulos formados en la atomización primaria antes de romperse en pequeñas gotas durante la atomización secundaria. Este grupo suele denominarse grupo de estabilidad porque proporciona una indicación de la resistencia del glóbulo para una mayor desintegración, pero también se llama grupo de viscosidad porque tiene en cuenta el efecto de la viscosidad del líquido en el glóbulo.

Cuando la fuerza de presión aerodinámica predomina, las ondas se propagan como ondas de aceleración a una velocidad mínima de $(a\lambda_m/2\pi)^{1/2}$. En este caso, $\lambda_a \ll \lambda_{\sigma}$, y una solución a la ecuación (3.5) es $\lambda_m = \lambda_{\sigma}$, la cual está gobernada por $(Z/We)^{2/3}$, como se muestra en la ecuación (3.6).

En contraste, cuando la tensión superficial predomina, las ondas se propagan como ondas capilares a una velocidad mínima de $(2\pi\sigma/\lambda_m\sigma_l)^{1/2}$. Puesto que $\lambda_{\sigma} \ll \lambda_a$, una solución a la ecuación (3.5) es $\lambda_m = \lambda_a$, que está gobernada por (Z^2/We) , como se muestra en la ecuación (3.7).

Por lo tanto, ambos números adimensionales (We , Z), que, o bien tienen los mismos exponentes, o el exponente de Z es el doble que el

exponente de We , serán considerados en el desarrollo posterior de un modelo para la predicción del tamaño de partícula.

Además, también debe de ser considerada en el proceso de atomización la relación adimensional entre los flujos de líquido y de aire (Arai y Hashimoto, 1985; Ritz y Lefebvre, 1980).

3.2. DESARROLLO DE UN MODELO PARA LA PREDICCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

El modelo que se pretende desarrollar para la predicción del tamaño de las microcápsulas tiene como base la teoría de ondas descrita previamente. El tamaño de las micropartículas será expresado en términos de tres grupos adimensionales: la relación en masa entre el líquido y el aire, el número de Weber, y el número de Ohnesorge.

Se llevaron a cabo diferentes experimentos, variando diferentes parámetros, para la obtención experimental del tamaño de partícula, que nos permitirán el estudio del proceso de atomización y la posterior generación del modelo. Para ello, se determinará la dependencia exponencial de los tres números adimensionales, que influyen en el proceso de atomización, en el tamaño de partícula.

Todos los experimentos fueron caracterizados, mediante el análisis del tamaño de las cápsulas mediante difracción láser (véase Apéndice I, “Materiales y Métodos” para una descripción del método).

3.2.1. *Influencia de la viscosidad del líquido, o del número de Ohnesorge, en el tamaño de partícula*

Tanto los estudios teóricos como los experimentales que tratan sobre la desintegración de chorros y hojas líquidas han demostrado la necesidad de agrupar las variables, que influyen en el proceso de atomización, en parámetros adimensionales, para clarificar sus efectos sobre el proceso y dar generalidad al mismo.

Como se dijo anteriormente, uno de estos grupos adimensionales importantes es el número de Ohnesorge ($Z = \mu_l / (\rho_l \sigma D)^{1/2}$).

Para examinar la influencia del número de Ohnesorge en el tamaño de partícula (Diámetro de Sauter: SMD) se llevaron a cabo diferentes experimentos variando la viscosidad del alginato sódico, manteniendo constante la relación de flujos líquido/aire. Los datos presentados en la Figura 3.3 (SMD frente a Z) muestran la dependencia funcional del SMD con el número de Ohnesorge. Se puede observar que el SMD aumenta al aumentar Z, lo cual es bastante lógico teniendo en cuenta que el tamaño de partícula aumenta con la viscosidad como ya se vió en el apartado 2.6.3, ya que Z está directamente relacionado con la viscosidad.

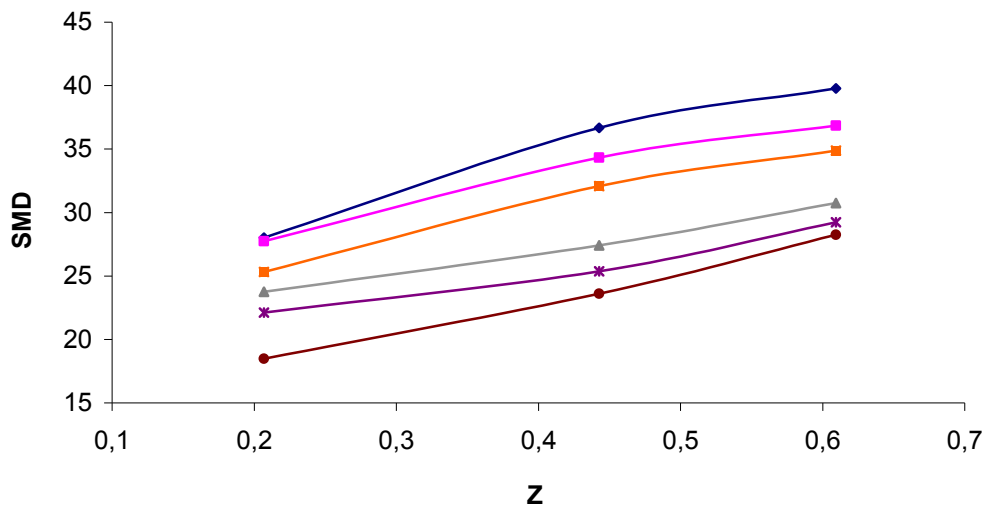


Figura 3.3. Influencia del número de Ohnesorge (Z) en el tamaño de partícula

Por lo tanto, para obtener la dependencia exponencial del número de Ohnesorge con el SMD, los datos presentados en la Figura 3.3. deben ser correlacionados de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$SMD = f(Z^{X_z}) \quad (3.8)$$

La representación logarítmica del tamaño de las microcápsulas frente al logaritmo del número de Ohnesorge (Figura 3.4.) proporciona la dependencia exponencial del SMD con el número de Ohnesorge, que está dada por la siguiente ecuación:

$$SMD = f(Z^{0,277}) \quad (3.9)$$

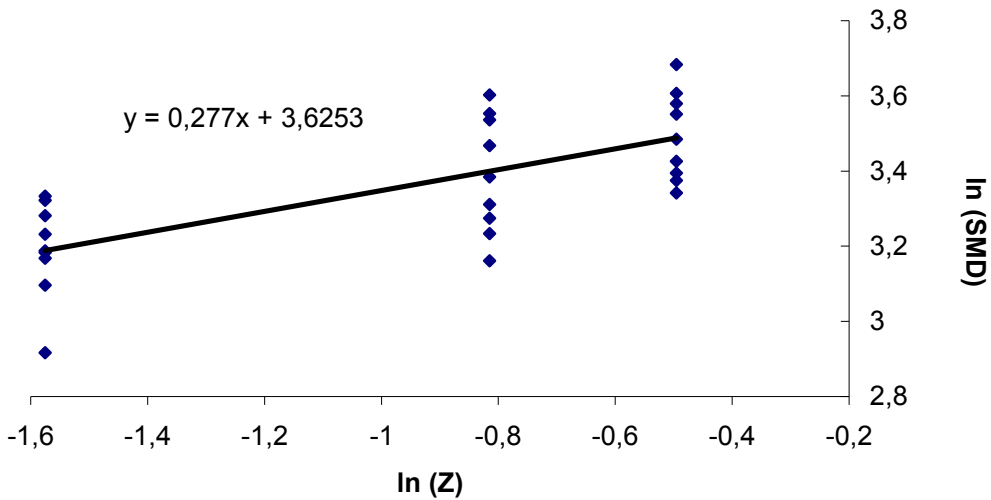


Figura 3.4. Dependencia exponencial del número de Ohnesorge (Z) con el SMD

Además, debe tenerse en cuenta que el valor de X_z no depende de las variaciones en el caudal de alginato sódico o en la velocidad del aire, ya que el número de Ohnesorge solamente depende de la viscosidad del líquido atomizado.

3.2.2. Influencia de la relación de flujos máscicos de líquido y aire en el tamaño de partícula

Otro de los grupos adimensionales que influye en el proceso de atomización es la relación de flujos máscicos líquido/aire. Anteriormente, se

comentó la importancia del caudal de alginato sódico y del caudal de aire en el proceso de atomización (apartados 2.6.1. y 2.6.2). El grupo adimensional que engloba los flujos de aire y de alginato sódico no solo agrupa los efectos del caudal de alginato sódico y de aire por separado, sino que también expresa el efecto conjunto de ambos en el proceso de atomización, ya que, esencialmente, este proceso se basa en una alta velocidad relativa entre el aire y el líquido que va a ser atomizado.

Se llevaron a cabo diferentes experimentos variando el caudal de alginato sódico, y manteniendo constante tanto el caudal de aire comprimido, como la viscosidad del alginato sódico, para examinar la influencia del número adimensional de la relación de flujos en el Diámetro de Sauter.

La dependencia exponencial de la relación de flujos, se examinó mediante el trazado del SMD en función de $(1 + \dot{M}_l / \dot{M}_a)$ a un número de Weber constante. Mediante el trazado logarítmico de los datos (ver Figura 3.5.) se obtuvo la ecuación de correlación entre el Diámetro de Sauter y el número adimensional de la relación de flujos:

$$SMD = f \left(1 + \frac{\dot{M}_l}{\dot{M}_a} \right)^{2,66} \quad (3.10)$$

donde \dot{M}_l y \dot{M}_a son los flujos máscicos del líquido y del aire, respectivamente.

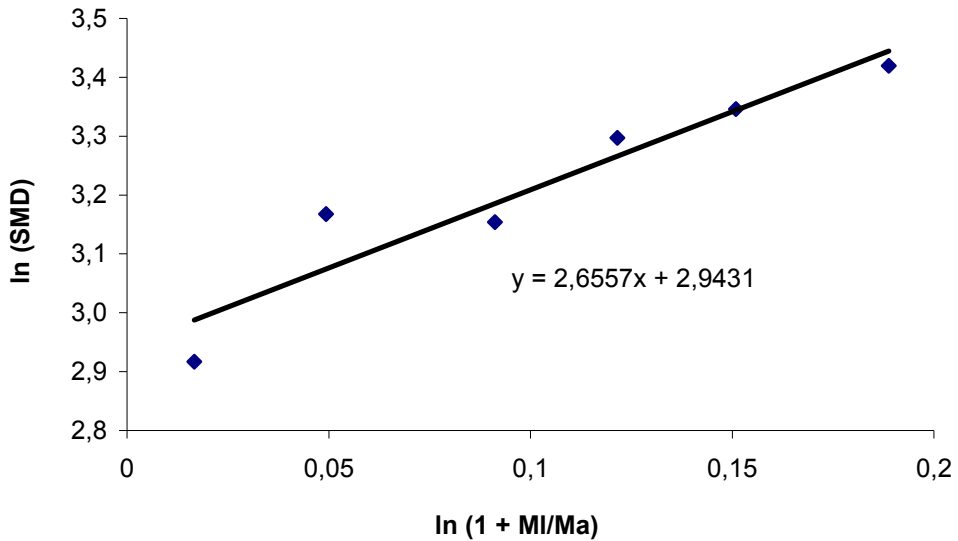


Figura 3.5. Influencia de la relación de flujos másicos de líquido y aire en el tamaño de partícula

En la Figura 3.5. puede apreciarse como el tamaño de partícula aumenta con la relación de flujos líquido/aire. En el apartado 2.6.1. se mostró como el tamaño de partícula aumentaba al hacerlo el caudal de alginato sódico, lo cual se puede apreciar también en la Figura 3.5. En el apartado 2.6.2. se mostró como el tamaño de partícula disminuía cuando aumentaba el caudal de aire comprimido, lo cual puede apreciarse también en la Figura 3.5. Se puede observar como el efecto conjunto de ambos flujos influye en el proceso de atomización, un tamaño de partícula pequeño se consigue con un caudal de aire alto y un caudal de alginato sódico pequeño, ya que así la hoja líquida se desintegra antes y los ligamentos se forman más cerca de los labios de la boquilla atomizadora. Éstos tienden a ser más delgados y más cortos y se desintegran en gotas más pequeñas.

La dependencia lineal entre el SMD y $(1 + \dot{M}_l / \dot{M}_a)$ está basada en el balance de momentos y en consideraciones energéticas:

$$\dot{M}_l U_l + \dot{M}_a U_a = (\dot{M}_l + \dot{M}_a) V_d \quad (3.11)$$

donde V_d es la velocidad de la partícula atomizada y del aire atomizante después de la transferencia de parte de su energía cinética al líquido. Se asume que la energía superficial total de las partículas atomizadas es proporcional a la pérdida de energía cinética:

$$\sum N_i d_i^2 \sigma_s = f [(\dot{M}_l U_l^2 + \dot{M}_a U_a^2) - (\dot{M}_l + \dot{M}_a) V_d^2] \quad (3.12)$$

donde N_i es el número de partículas con diámetros d_i producidos por unidad de tiempo y σ_s es la energía superficial de las partículas por unidad de área.

Sustituyendo la ecuación (3.11) y la ecuación (3.13)

$$\dot{M}_l = \pi \rho_l \sum N_i d_i^3 / 8 \quad (3.13)$$

en la ecuación (3.12), se obtiene:

$$SMD = f \left[1 + (\dot{M}_l / \dot{M}_a) \right] \quad (3.14)$$

donde

$$SMD = \frac{\sum N_i d_i^3}{\sum N_i d_i^2} \quad (3.15)$$

3.2.3. Influencia del número de Weber en el tamaño de partícula

Otro de los grupos adimensionales que influye en el proceso de atomización es el número de Weber ($We = \rho_a U_a^2 D / \sigma$) que representa la relación entre la fuerza aerodinámica y la tensión superficial. Las fuerzas aerodinámicas se oponen a la fuerza estabilizante de la tensión superficial del líquido, provocando la ruptura del chorro líquido. Los valores altos del número de Weber indican el vencimiento de la tensión superficial en las partículas del fluido y la formación de partículas muy pequeñas.

Se llevaron a cabo diferentes experimentos variando la velocidad de salida del aire para examinar la influencia del número de Weber en el tamaño de partícula. Se asumió que no se produjeron cambios en la tensión superficial. Los datos representados en la Figura 3.6. (SMD frente Número de Weber) se utilizaron para establecer la dependencia funcional del SMD en el número de Weber.

La figura 3.6. muestra que el SMD decrece al aumentar el número de Weber, que es bastante lógico teniendo en cuenta que el tamaño de partícula disminuye con el aumento del caudal del aire, como ya se vio en el apartado 2.6.2, ya que el número de Weber está directamente relacionado con la velocidad del aire atomizante.

La dependencia exponencial del número de Weber se examinó mediante la representación de este frente al SMD a $(1 + \dot{M}_l / \dot{M}_a)^{2,66}$ constante.

Previamente, se estableció que los efectos del caudal de aire en el comportamiento viscoso de las soluciones poliméricas son despreciables.

Además, en el apartado 3.2.2. fue establecido que la dependencia exponencial del SMD con $(1 + \dot{M}_l / \dot{M}_a)$ fue 2,66.

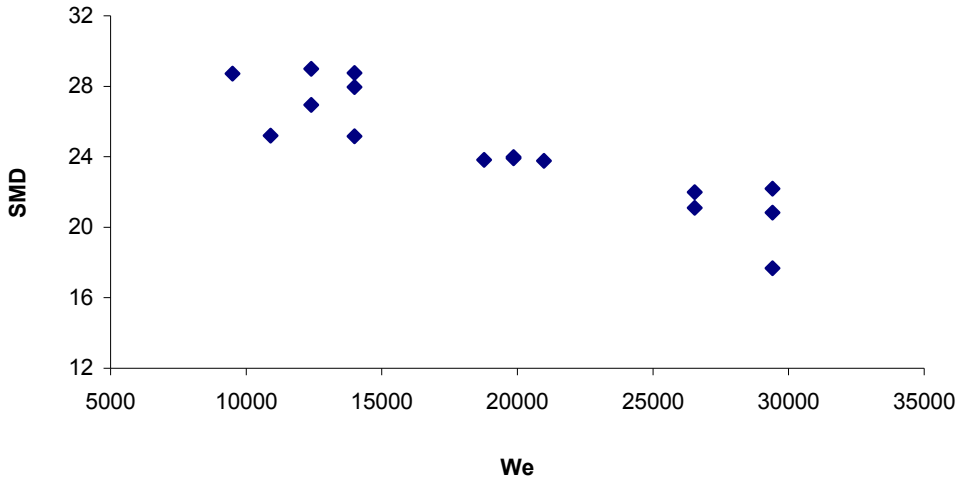


Figura 3.6. Variación del SMD con el número de Weber

Para obtener la dependencia exponencial del número de Weber con el SMD de los datos presentados en la Figura 3.6., estos deben ser correlacionados de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{SMD}{\left(1 + \frac{\dot{M}_l}{\dot{M}_a}\right)^{2,66}} \propto We^{x_w} \quad (3.16)$$

La representación logarítmica del SMD de las micropartículas frente al logaritmo del número de Weber, a $\left(1 + \frac{\dot{M}_l}{\dot{M}_a}\right)^{2,66}$ constante (Figura 3.7.), muestra que la dependencia exponencial entre el SMD y el número de Weber está dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{SMD}{\left(1 + \frac{\dot{M}_l}{\dot{M}_a}\right)^{2,66}} \propto We^{-0,2718} \quad (3.17)$$

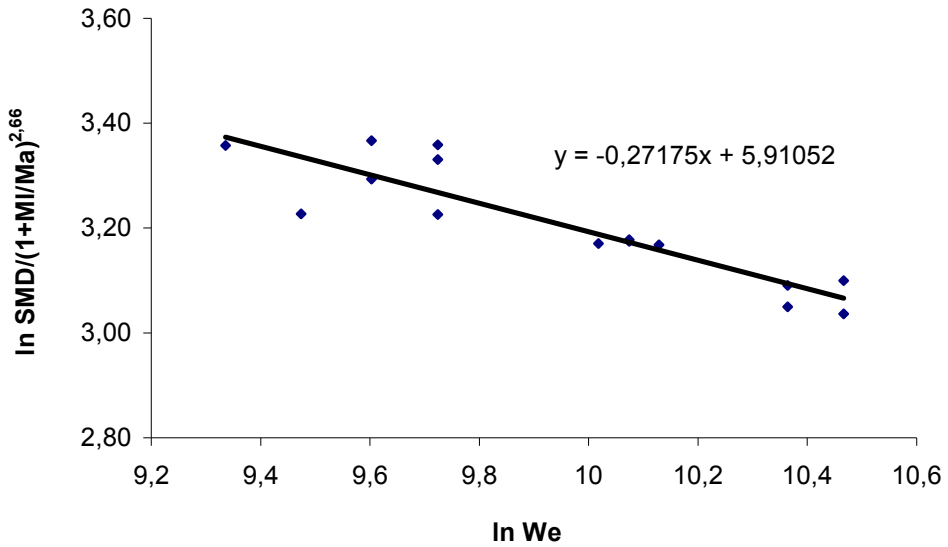


Figura 3.7. Influencia del número de Weber en el tamaño de partícula de las cápsulas

3.2.4. Modelo semi-empírico para la atomización neumática

Basado en el ya mencionado mecanismo de ondas, teniendo en cuenta las dependencias exponenciales de los números adimensionales, que influyen en el proceso de atomización, en el tamaño de partícula, y considerando los modelos propuestos por Mansour y Chigier (1995) para la atomización de fluidos no-Newtonianos, se proponen las siguientes ecuaciones de dos y tres parámetros para la predicción del tamaño de las microcápsulas obtenidas:

$$\frac{SMD}{D} = \left(1 + \frac{\dot{M}_l}{\dot{M}_a}\right)^{2,66} \left[X_2 We^{-X_1} + X_3 Z^{X_1} + Cte\right] \quad (3.18)$$

$$\frac{SMD}{D} = \left(1 + \frac{\dot{M}_l}{\dot{M}_a}\right)^{2,66} \left[X_2 We^{-X_1} + X_3 Z^{2*X_1} + Cte\right] \quad (3.19)$$

$$\frac{SMD}{D} = \left(1 + \frac{\dot{M}_l}{\dot{M}_a}\right)^{2,66} \left[X_2 \left(\frac{Z}{We}\right)^{X_1} \right] \quad (3.20)$$

donde D es el diámetro del orificio de descarga del atomizador.

En las ecuaciones 3.18 y 3.20 los números adimensionales We y Z tienen los mismos exponentes. Esta consideración está basada en la teoría de atomización por el mecanismo de ondas. Cuando la fuerza de presión aerodinámica predomina, las ondas se propagan como ondas de aceleración produciendo una solución en la ecuación de la longitud de onda mínima gobernada por $(Z/We)^{2/3}$, es decir, con el mismo exponente para el número de Weber y el número de Ohnesorge (ver apartado 3.1.).

En la ecuación 19 el exponente de Z es el doble que el exponente de We. Esta consideración está basada en el mecanismo de ondas. Cuando la tensión superficial predomina, las ondas se propagan como ondas capilares produciendo una solución en la ecuación de la longitud de onda mínima gobernada por (Z^2/We) , es decir, el exponente de Z es el doble que el exponente de We (ver apartado 3.1.).

Se llevaron a cabo diferentes experimentos, modificando las diferentes variables que influyen en el proceso de atomización (caudal y viscosidad del alginato sódico, y caudal de aire), para la obtención experimental del tamaño de partícula, que nos permita la obtención del modelo semi-empírico.

De acuerdo con las ecuaciones 3.18, 3.19, y 3.20, junto con los datos experimentales de los tamaños de las microcápsulas, se obtuvieron, mediante regresión lineal múltiple, los valores de los parámetros de ajuste desconocidos, X_2 , X_3 (ver Tabla 3.1.). El exponente X_1 es la dependencia exponencial entre los números adimensionales y el tamaño de partícula, determinados en los apartados anteriores.

Tabla 3.1.: Parámetros desconocidos para las ecuaciones 3.18, 3.19, y 3.20

	X_1	X_2	X_3	Cte.
Ecuación (3.18)	0,2718	0,3035	0,0205	-0,0202
Ecuación (3.19)	0,2718	0,3012	0,0135	-0,0124
Ecuación (3.20)	0,2723	0,3134	-	-

3.2.5. Comparación entre los datos experimentales del tamaño de las microcápsulas y las predicciones del modelo

Los datos experimentales del tamaño de partícula obtenidos previamente en el Capítulo 2, fueron comparados con los datos generados con el modelo semi-empírico, bajo una amplia variedad de condiciones de trabajo.

a) Variación del caudal de alginato sódico a 64,5 cP:

La primera serie de experimentos fue llevada a cabo a un valor constante del caudal de aire de 138,000 L/min. El caudal del alginato sódico fue variado de 0,003 L/min a 0,037 L/min. Este intervalo de caudales fue elegido por las razones ya descritas anteriormente en el apartado 2.6.1. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a un valor constante de viscosidad de alginato sódico de 64,5 cP.

Los valores experimentales del SMD obtenidos de los diferentes experimentos y los valores teóricos del tamaño de las microcápsulas, calculados a partir de las ecuaciones 3.18, 3.19, y 3.20 del modelo se recogen en la Tabla 3.2.

En la Tabla 3.2. se observa que las ecuaciones 3.18 y 3.19 son las que mejor ajustan los datos experimentales que se producen por la variación del caudal de alginato sódico a esta viscosidad.

Tabla 3.2.: Comparación de los valores experimentales con los valores teóricos

Caudal de alginato (L/min)	Caudal de aire (L/min)	SMD experimental (μm)	SMD teórico (μm)		
			Eq. (18)	Eq. (19)	Eq. (20)
0,037	138,000	30,56	32,27	32,39	35,06
0,029	138,000	28,39	29,18	29,29	31,70
0,023	138,000	27,03	26,99	27,09	29,32
0,013	138,000	24,70	24,90	24,99	27,05
0,003	138,000	18,48	20,43	20,51	22,20

Los datos obtenidos a partir de las ecuaciones semi-empíricas tienen la misma tendencia que los datos experimentales, es decir, el tamaño de partícula decrece al hacerlo el caudal de alginato sódico. En cualquiera de las tres ecuaciones del modelo se puede observar que el flujo másico de alginato sódico es directamente proporcional al diámetro medio de partícula. Esto está totalmente de acuerdo con las explicaciones teóricas del fenómeno de atomización, que predicen una mejor atomización (cápsulas de menor tamaño) con caudales de alginato sódico pequeños, debido a que se producen hojas líquidas más delgadas que son más fáciles de desintegrar (Arai y Hashimoto, 1985; Ritz y Lefebvre, 1980).

Todos los valores experimentales y teóricos fueron representados en la Figura 3.8., de donde se puede observar la buena concordancia de los valores experimentales con los valores obtenidos a partir de los tres modelos propuestos.

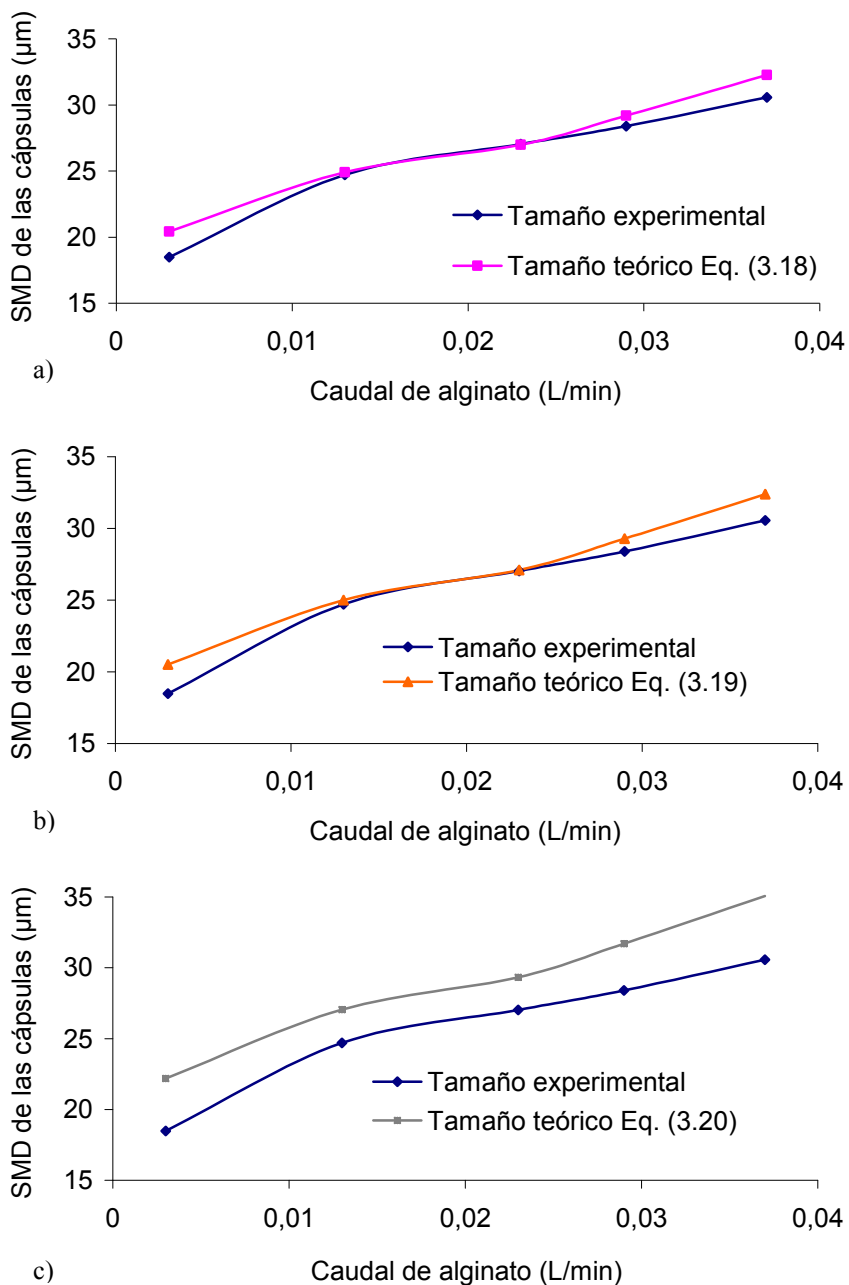


Figura 3.8. Tamaño de partícula: valores teóricos frente a valores experimentales

(Caudal de aire: 138,0 L/min; Viscosidad de alginato: 64,5 cP)

- a) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.18.
- b) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.19.
- c) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.20.

b) Variación del caudal de aire a 64,5 cp:

Los siguientes experimentos fueron llevados a cabo a unos valores constantes de caudal alginato sódico de 0,009, 0,006, 0,003 L/min. El caudal de aire fue variado de L/min a 78,400 a 138,000 L/min. Este intervalo de caudales fue elegido por las razones ya descritas anteriormente en el apartado 2.6.2. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a un valor constante de viscosidad de alginato sódico de 64,5 cP.

Los valores experimentales del SMD obtenidos de los diferentes experimentos y los valores teóricos del tamaño de las microcápsulas, calculados a partir de las ecuaciones 3.18, 3.19, y 3.20 del modelo se recogen en la Tabla 3.3. En ésta se puede observar que la ecuación 3.20 es la que mejor ajusta los datos experimentales a esta viscosidad del alginato sódico.

Los datos teóricos obtenidos a partir de las ecuaciones del modelo tienen la misma tendencia que los datos experimentales, es decir, el tamaño de partícula decrece al aumentar el caudal de aire comprimido. En cualquiera de las tres ecuaciones del modelo se puede observar que, tanto el flujo másico de aire comprimido, como el número de Weber (número adimensional proporcional a la velocidad del aire comprimido), son inversamente proporcionales al tamaño. Esto está totalmente de acuerdo con las explicaciones teóricas del fenómeno de atomización, que predicen una mejor atomización con caudales de aire comprimido altos, debido a que las ondas producidas por la interacción del líquido con el aire, se convierten inestables y desintegran la hoja líquida en fragmentos, que se contraen formando ligamentos que rompen en gotas (Arai y Hashimoto, 1985; Ritz y Lefebvre, 1980).

Tabla 3.3.: Comparación de los valores experimentales con los valores teóricos

Caudal de alginato (L/min)	Caudal de aire (L/min)	SMD experimental (μm)	SMD teórico (μm)		
			Eq. (18)	Eq. (19)	Eq. (20)
0,009	89,600	35,87	34,11	34,12	35,78
0,009	110,250	28,03	27,86	27,91	28,24
0,009	116,550	27,73	26,37	26,43	27,17
0,009	138,000	23,75	22,28	22,36	24,20
0,006	78,400	33,47	36,10	36,08	33,67
0,006	95,200	28,57	30,25	30,27	29,50
0,006	113,400	26,61	25,73	25,78	26,29
0,006	131,100	24,13	22,42	22,50	23,95
0,003	89,600	31,03	29,92	29,93	28,76
0,003	95,200	29,81	28,41	28,43	27,71
0,003	113,400	25,32	24,40	24,45	24,94
0,003	131,100	22,12	21,42	21,49	22,88

Todos los valores experimentales y teóricos fueron representados en las Figuras 3.9., 3.10., y 3.11., de donde se puede observar la buena concordancia de los valores experimentales con los valores obtenidos a partir de los tres modelos propuestos.

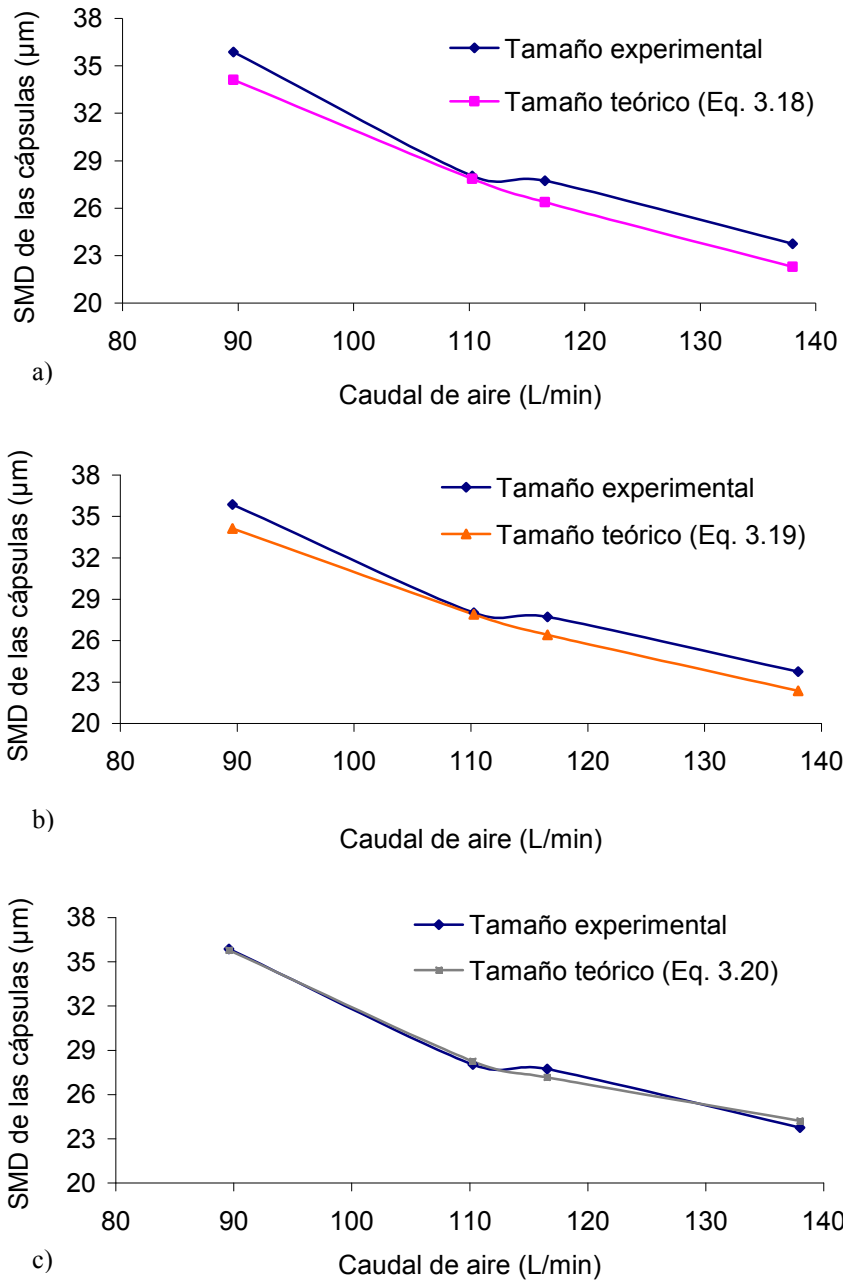


Figura 3.9. Tamaño de partícula: valores teóricos frente a valores experimentales

(Caudal y viscosidad de alginato: 0,009 L/min y 64,5 cP)

- a) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.18.
- b) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.19.
- c) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.20.

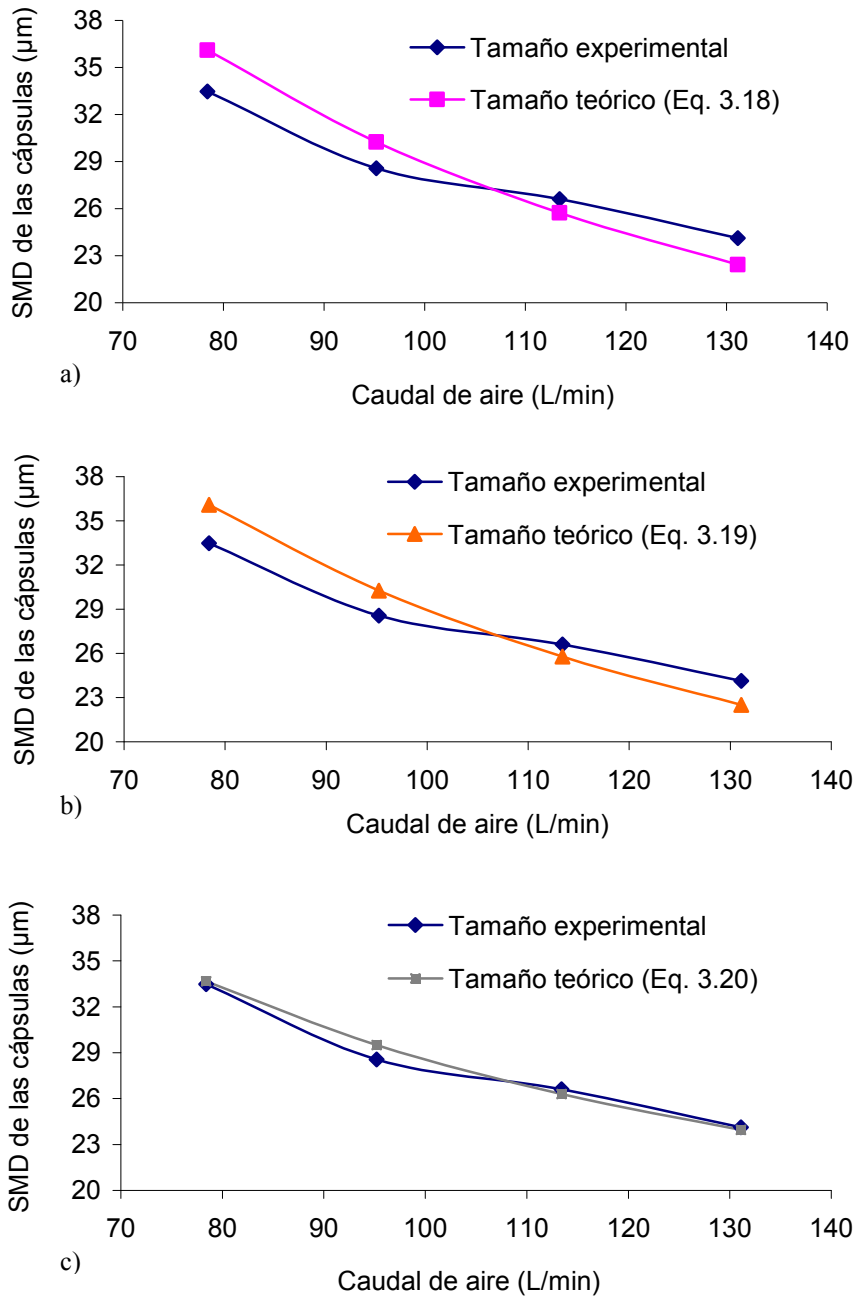


Figura 3.10. Tamaño de partícula: valores teóricos frente a valores experimentales

(Caudal y viscosidad de alginato: 0,006 L/min y 64,5 cP).

- a) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.18.
- b) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.19.
- c) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.20.

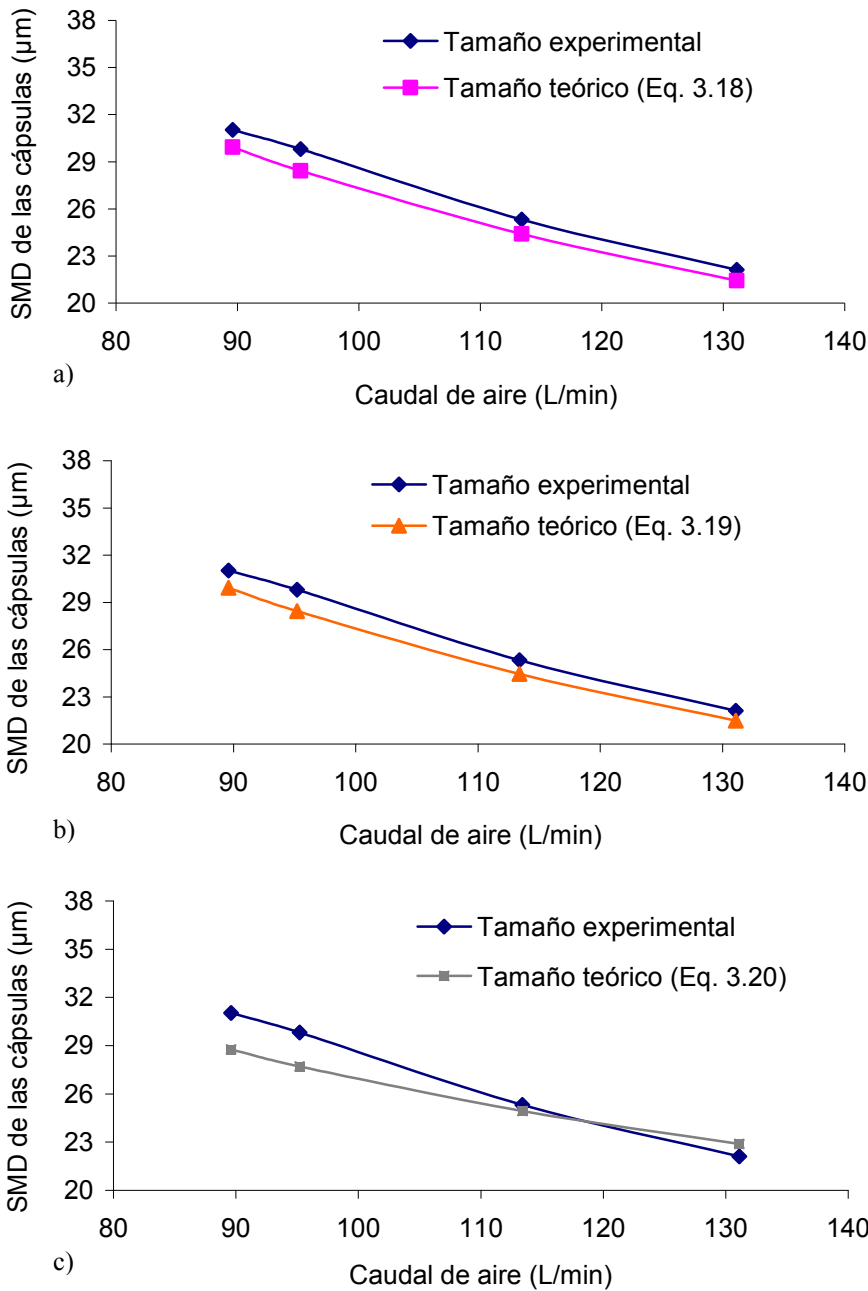


Figura 3.11. Tamaño de partícula: valores teóricos frente a valores experimentales

(Caudal y viscosidad de alginato: 0,003 L/min y 64,5 cP).

- a) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.18.
- b) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.19.
- c) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.20.

c) Variación del caudal de alginato sódico a 138,0 cP:

La siguiente serie de experimentos fue llevada a cabo a un valor constante del caudal de aire de 138,000 L/min. El caudal del alginato sódico fue variado de 0,003 L/min a 0,013 L/min. Este intervalo de caudales fue elegido por las razones ya descritas anteriormente en el apartado 2.6.3. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a un valor constante de viscosidad de alginato sódico de 138,0 cP.

Los valores experimentales del SMD obtenidos de los diferentes experimentos y los valores teóricos del tamaño de las microcápsulas, calculados a partir de las ecuaciones 3.18, 3.19, y 3.20 del modelo se recogen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4.: Comparación de los valores experimentales con los valores teóricos

Caudal de alginato (L/min)	Caudal de aire (L/min)	SMD experimental (μm)	SMD teórico(μm)		
			Eq. (18)	Eq. (19)	Eq. (20)
0,013	138,000	31,33	30,22	30,03	31,50
0,010	138,000	29,07	28,98	28,79	30,20
0,009	138,000	27,42	28,57	28,39	29,78
0,006	138,000	26,43	27,37	27,19	28,52

En la Tabla 3.4. se puede observar que las ecuaciones 3.18 y 3.19 son las que mejor ajustan los datos experimentales con la variación del caudal de

alginato sódico, a esta viscosidad. Los datos teóricos obtenidos a partir de las ecuaciones del modelo tienen la misma tendencia que los datos experimentales, es decir, el tamaño de partícula decrece al hacerlo el caudal de alginato sódico. Por tanto, la tendencia observada para una viscosidad de 138,0 cP es similar que para 64,5 cP.

Todos los valores experimentales y teóricos fueron representados en la Figura 3.12., de donde se puede observar la buena concordancia de los valores experimentales con los valores obtenidos a partir de los tres modelos propuestos.

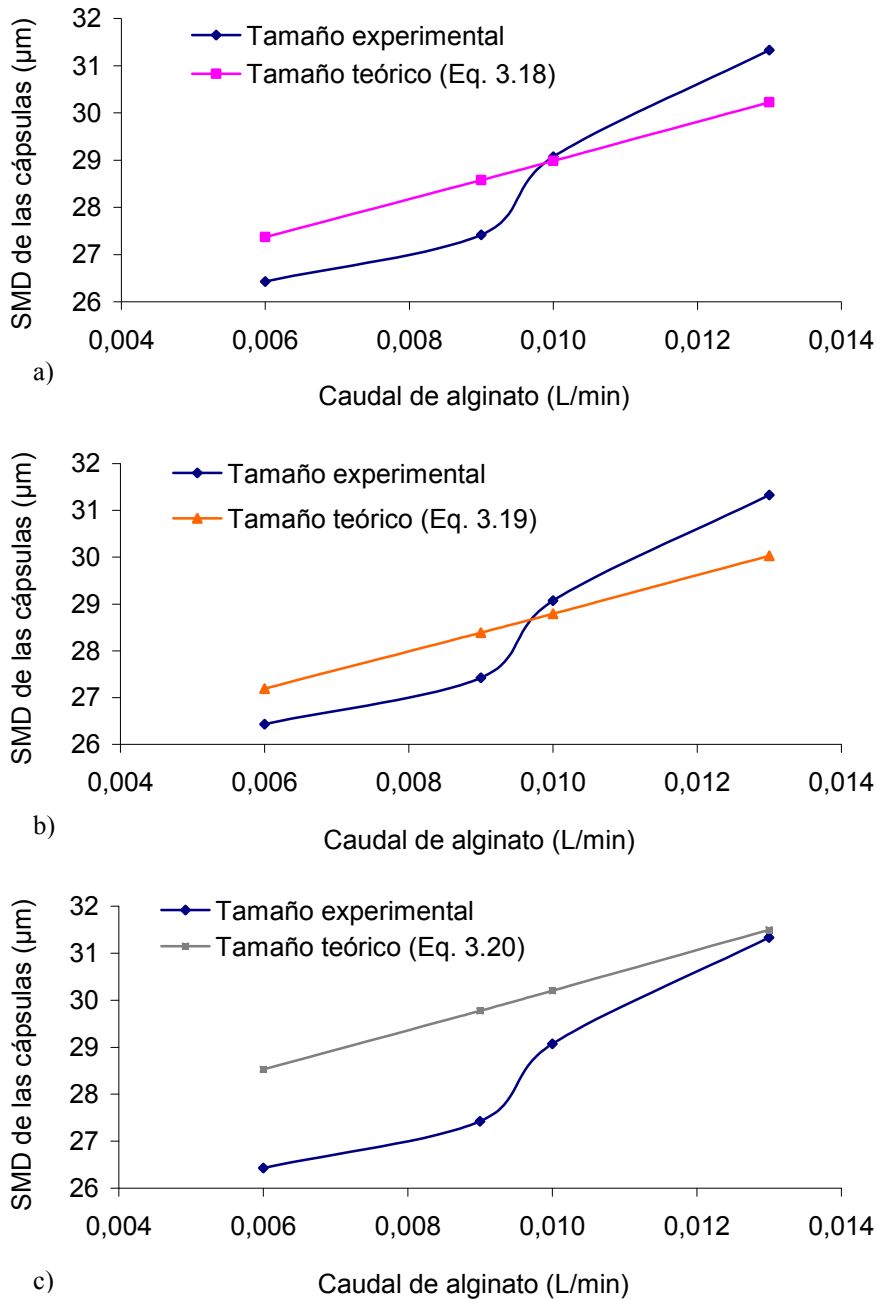


Figura 3.12. Tamaño de partícula: valores teóricos frente a los valores experimentales

(Caudal de aire: 138,0 L/min; viscosidad de alginato: 138 cP)

- a) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.18.
- b) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.19.
- c) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.20.

d) Variación del caudal de aire a 138,0 cP:

A continuación, fueron llevados a cabo otros experimentos a unos valores constantes de caudal alginato sódico de 0,009, 0,006, 0,003 L/min. El caudal de aire fue variado de 110,250 a 138,000 L/min. Este intervalo de caudales fue elegido por las razones ya descritas anteriormente en el apartado 2.6.3. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a un valor constante de viscosidad de alginato sódico de 138,0 cP.

Los valores experimentales del SMD obtenidos de los diferentes experimentos y los valores teóricos del tamaño de las microcápsulas, calculados a partir de las ecuaciones 3.18, 3.19, y 3.20 del modelo, se recogen en la Tabla 3.5.

En la Tabla 3.5. se puede observar que la ecuación 3.20 ajusta mejor los datos experimentales con la variación del caudal de aire comprimido, a esta viscosidad.

Los datos teóricos obtenidos a partir de las ecuaciones del modelo tienen la misma tendencia que los datos experimentales, es decir, el tamaño de partícula decrece al aumentar el caudal de aire comprimido. Por tanto, la tendencia observada para una viscosidad de 138,0 cP es similar que para 64,5 cP.

Todos los valores experimentales y teóricos fueron representados en las Figuras 3.13., 3.14., y 3.15., de donde se puede observar la buena concordancia de los valores experimentales con los valores obtenidos a partir de los tres modelos propuestos.

Tabla 3.5.: Comparación de los valores experimentales con los valores teóricos

Caudal de alginato (L/min)	Caudal de aire (L/min)	SMD experimental (μm)	SMD teórico(μm)		
			Eq. (18)	Eq. (19)	Eq. (20)
0,009	110,250	36,68	34,42	34,19	34,80
	116,550	34,33	32,94	32,73	33,53
	124,800	31,15	31,02	30,82	31,88
	138,000	27,42	28,57	28,39	29,78
0,006	113,400	34,91	31,87	31,66	32,34
	122,880	32,51	29,95	29,75	30,71
	131,100	29,51	28,48	28,30	29,47
	138,000	26,43	27,37	27,19	28,52
0,003	113,400	32,07	30,23	30,03	30,68
	131,100	25,36	27,20	27,03	28,14
	138,000	23,60	26,20	26,03	27,31

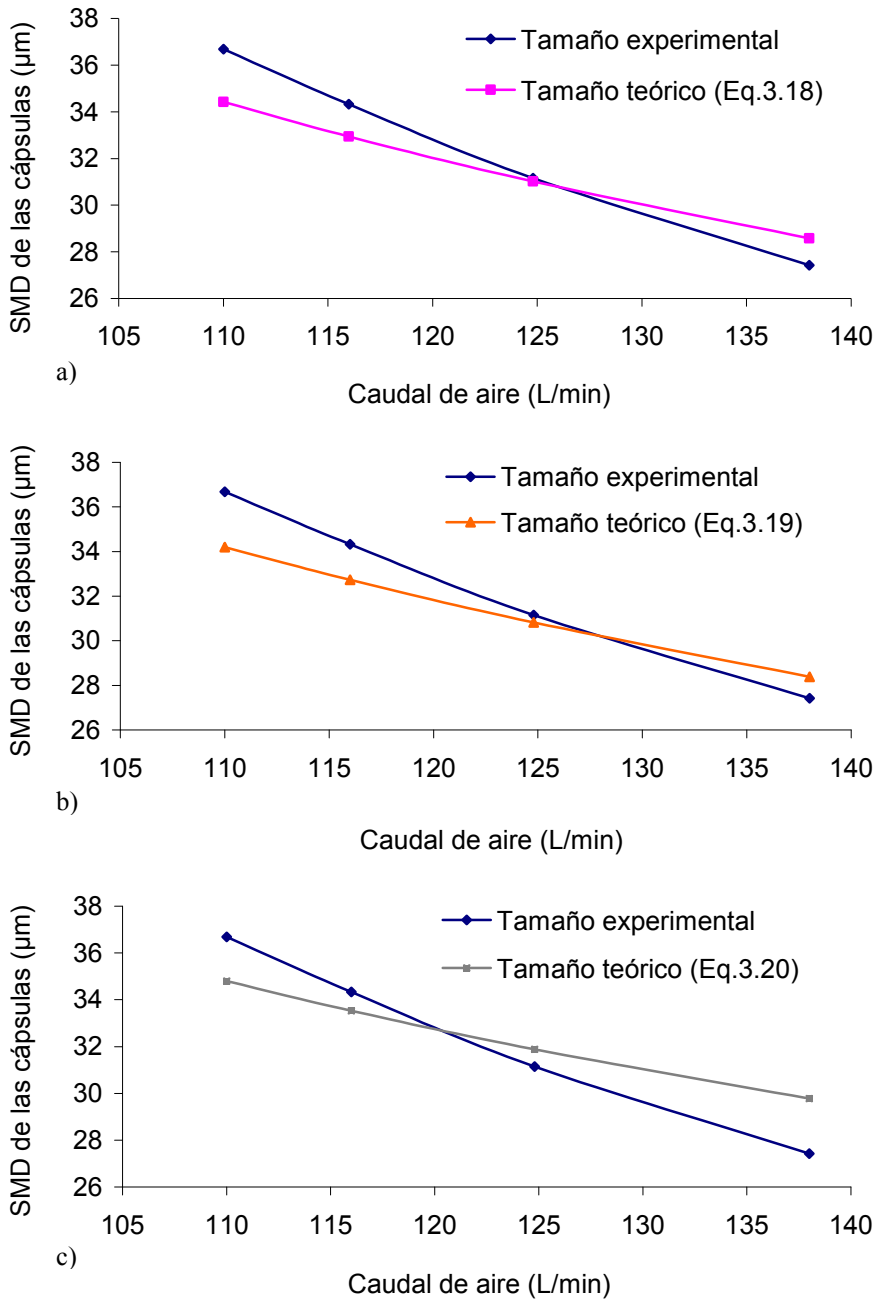


Figura 3.13. Tamaño de partícula: valores teóricos frente a valores experimentales
 (Caudal y viscosidad de alginato: 0,009 L/min y 138 cP).

- a) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.18.
- b) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.19.
- c) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.20.

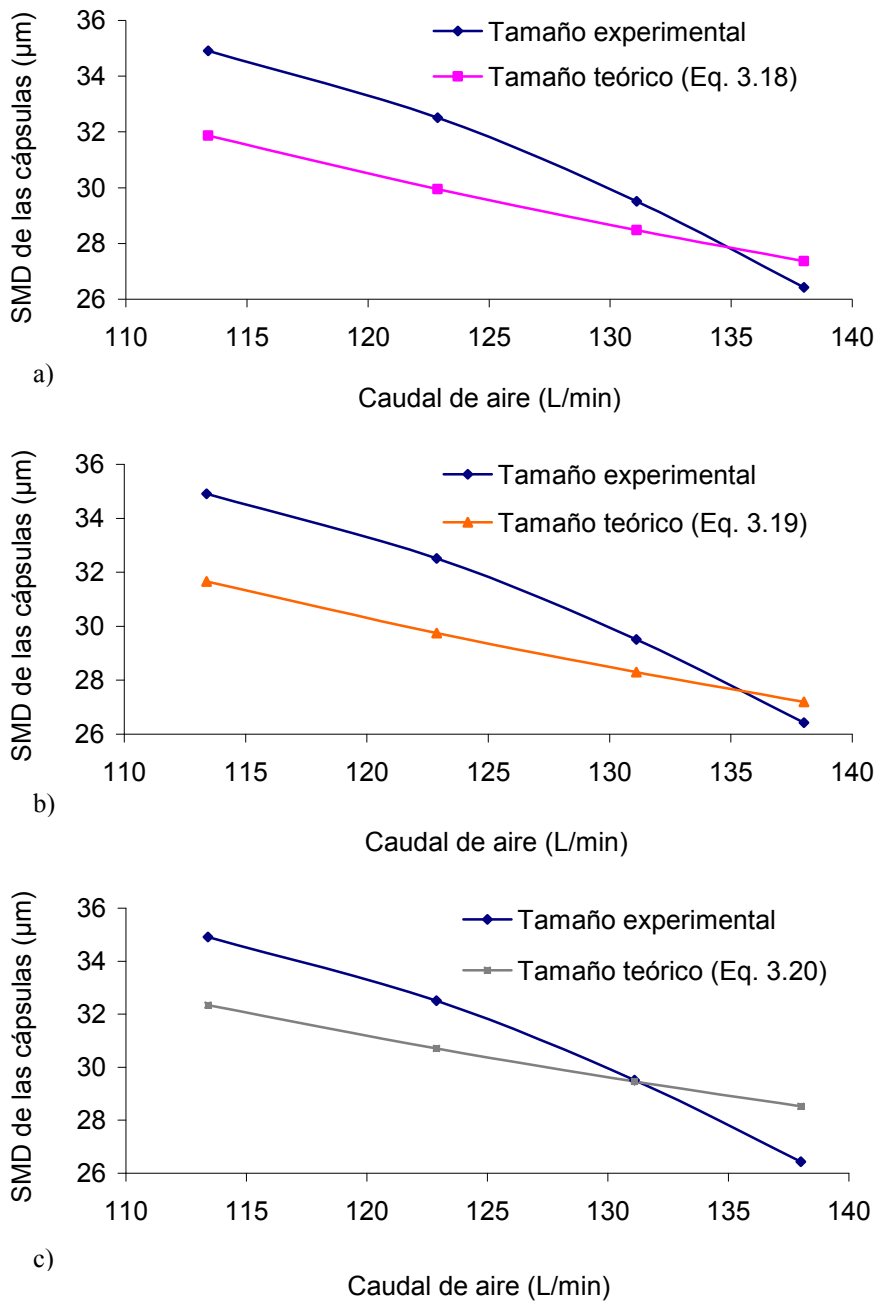


Figura 3.14. Tamaño de partícula: valores teóricos frente a valores experimentales

(Caudal y viscosidad de alginato: 0,006 L/min y 138 cP).

- a) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.18.
- b) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.19.
- c) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.20.

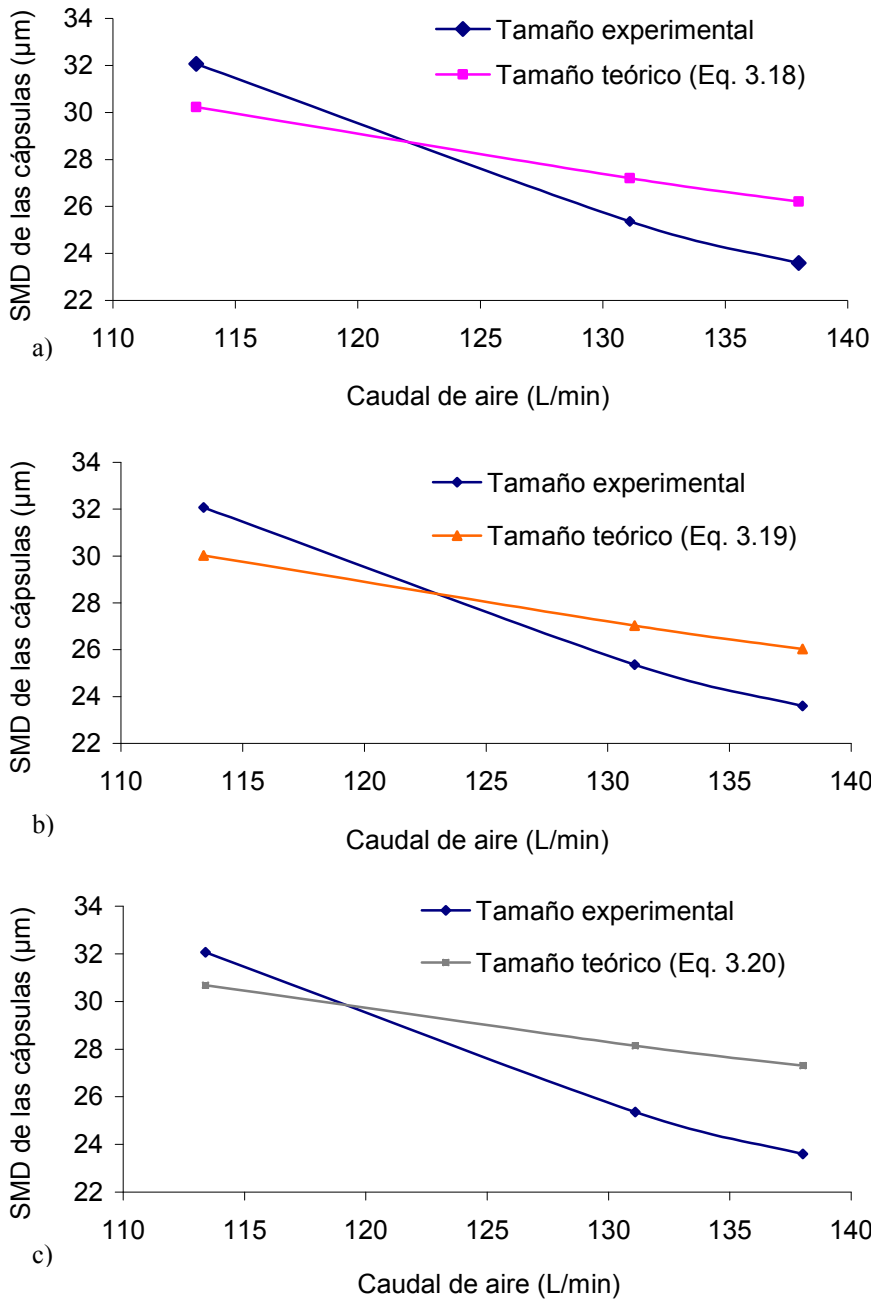


Figura 3.15. Tamaño de partícula: valores teóricos frente a valores experimentales

(Caudal y viscosidad de alginato: 0,003 L/min y 138 cP).

- a) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.18.
- b) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.19.
- c) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.20.

e) Variación del caudal de alginato sódico a 190,0 cP:

La última serie de experimentos fue llevada a cabo a un valor constante del caudal de aire de 138,000 L/min. El caudal del alginato sódico fue variado de 0,003 L/min a 0,009 L/min. Este intervalo de caudales fue elegido por las razones ya descritas anteriormente en el apartado 2.6.3. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a un valor constante de viscosidad de alginato sódico de 190,0 cP.

Los valores experimentales del SMD obtenidos de los diferentes experimentos y los valores teóricos del tamaño de las microcápsulas, calculados a partir de las ecuaciones 3.18, 3.19, y 3.20 del modelo, se recogen en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6.: Comparación de los valores experimentales con los valores teóricos

Caudal de alginato (L/min)	Caudal de aire (L/min)	SMD experimental (µm)	SMD teórico(µm)		
			Eq. (18)	Eq. (19)	Eq. (20)
0,009	138,000	30,76	31,63	31,76	32,49
0,006	138,000	29,81	30,30	30,43	31,12
0,005	138,000	28,98	29,87	29,99	30,67
0,003	138,000	28,26	29,01	29,13	29,79

En la Tabla 3.6. se puede observar que las ecuaciones 3.18 y 3.19 son las que mejor ajustan los datos experimentales con la variación del caudal de alginato sódico, a esta viscosidad. Los datos teóricos obtenidos a partir de las

ecuaciones del modelo tienen la misma tendencia que los datos experimentales, es decir, el tamaño de partícula decrece al hacerlo el caudal de alginato sódico. Por tanto, la tendencia observada para una viscosidad de 190,0 cP es similar que para las otras viscosidades estudiadas.

Todos los valores experimentales y teóricos fueron representados en la Figura 3.16., de donde se puede observar la buena concordancia de los valores experimentales con los valores obtenidos a partir de los tres modelos propuestos.

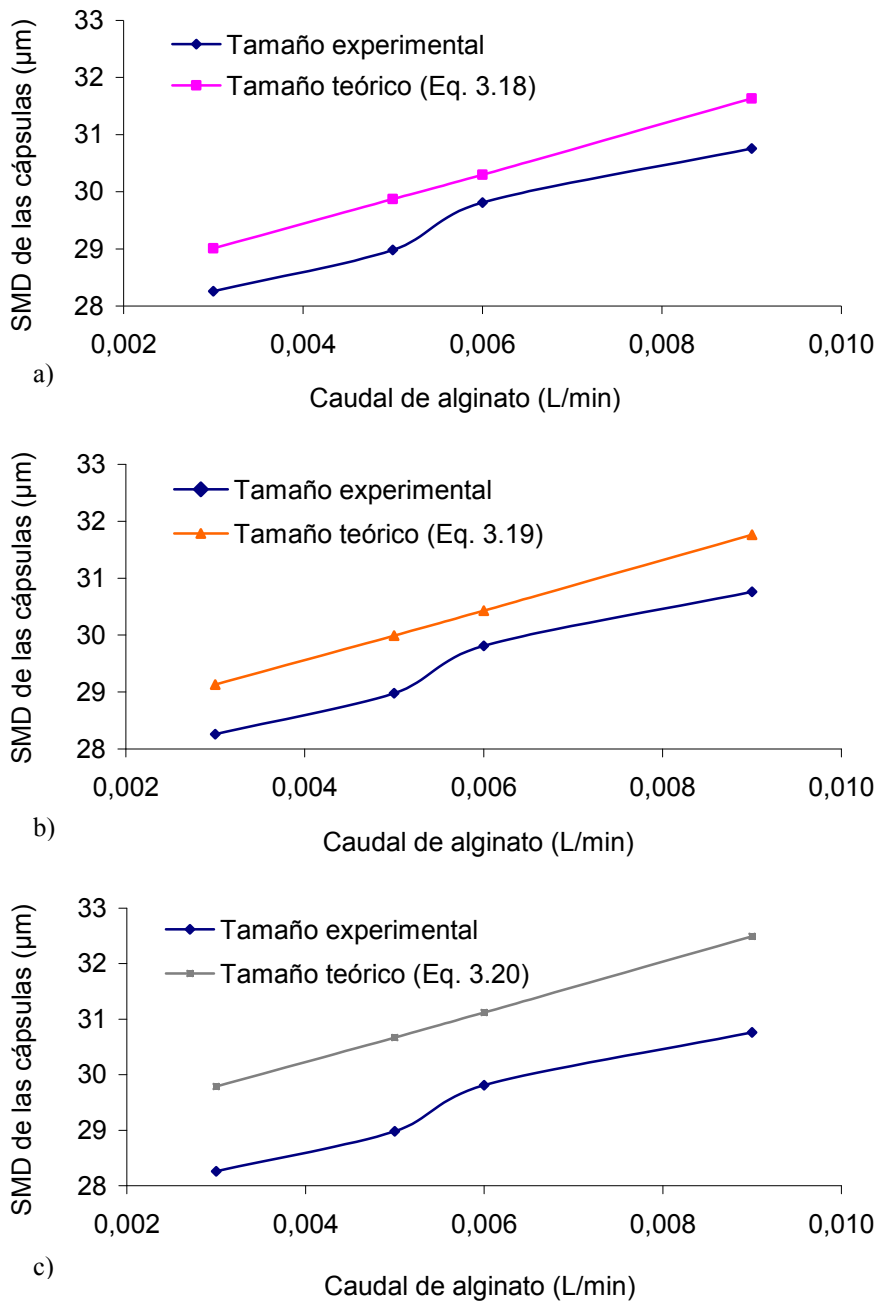


Figura 3.16. Tamaño de partícula: valores teóricos frente a los valores experimentales

(Caudal de aire: 138 L/min; Viscosidad de alginato: 190 cP).

- a) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.18.
- b) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.19.
- c) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.20.

f) Variación del caudal de aire a 190,0 cP:

Por último se llevaron a cabo los experimentos realizados a unos valores constantes de caudal alginato sódico de 0,009, 0,006, 0,003 L/min. El caudal de aire fue variado de 95,200 L/min a 138,000 L/min. Este intervalo de caudales fue elegido por las razones ya descritas anteriormente en el apartado 2.6.3. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a un valor constante de viscosidad de alginato sódico de 190,0 cP.

Los valores experimentales del SMD obtenidos de los diferentes experimentos y los valores teóricos del tamaño de las microcápsulas, calculados a partir de las ecuaciones 3.18, 3.19, y 3.20 del modelo, se recogen en la Tabla 3.7.

En la Tabla 3.7. se puede observar que la ecuación 20 ajusta mejor los datos experimentales con la variación del caudal de aire comprimido, a esta viscosidad. Los datos teóricos obtenidos a partir de las ecuaciones del modelo tienen la misma tendencia que los datos experimentales, es decir, el tamaño de partícula decrece al aumentar el caudal de aire comprimido. Por tanto, la tendencia observada para una viscosidad de 190,0 cP es similar que para las otras viscosidades estudiadas.

Tabla 3.7.: Comparación de los valores experimentales con los valores teóricos

Caudal de alginato (L/min)	Caudal de aire (L/min)	SMD experimental (μm)	SMD teórico(μm)		
			Eq. (18)	Eq. (19)	Eq. (20)
0,009	110,250	39,79	37,58	37,68	37,96
	116,550	36,84	36,08	36,19	36,58
	128,640	32,91	33,35	33,47	34,07
	138,000	30,76	31,63	31,76	32,49
0,006	95,200	38,00	39,56	39,63	39,60
	113,400	35,86	34,86	34,96	35,29
	131,100	32,61	31,43	31,55	32,15
	138,000	29,81	30,30	30,43	31,12
0,003	103,680	35,01	35,10	35,18	35,32
	128,640	30,51	30,40	30,51	31,05
	131,100	29,23	30,02	30,13	30,71
	138,000	28,26	29,01	29,13	29,79

Todos los valores experimentales y teóricos fueron representados en las Figuras 3.17, 3.18., y 3.19., de donde se puede observar la buena concordancia de los valores experimentales con los valores obtenidos a partir de los tres modelos propuestos.

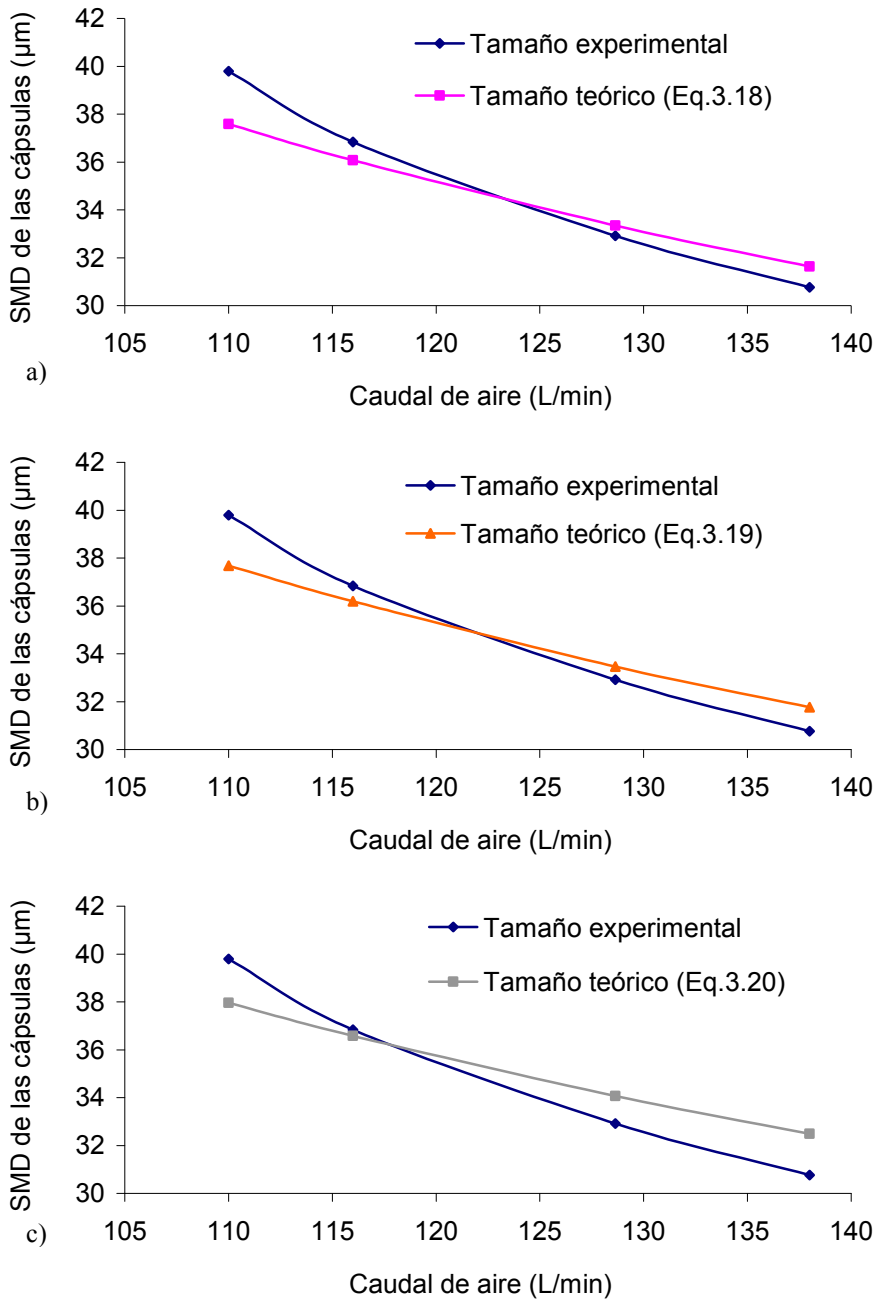


Figura 3.17. Tamaño de partícula: valores teóricos frente a los valores experimentales

(Caudal y viscosidad de alginato: 0,009 L/min y 190 cP).

- a) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.18.
- b) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.19.
- c) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.20.

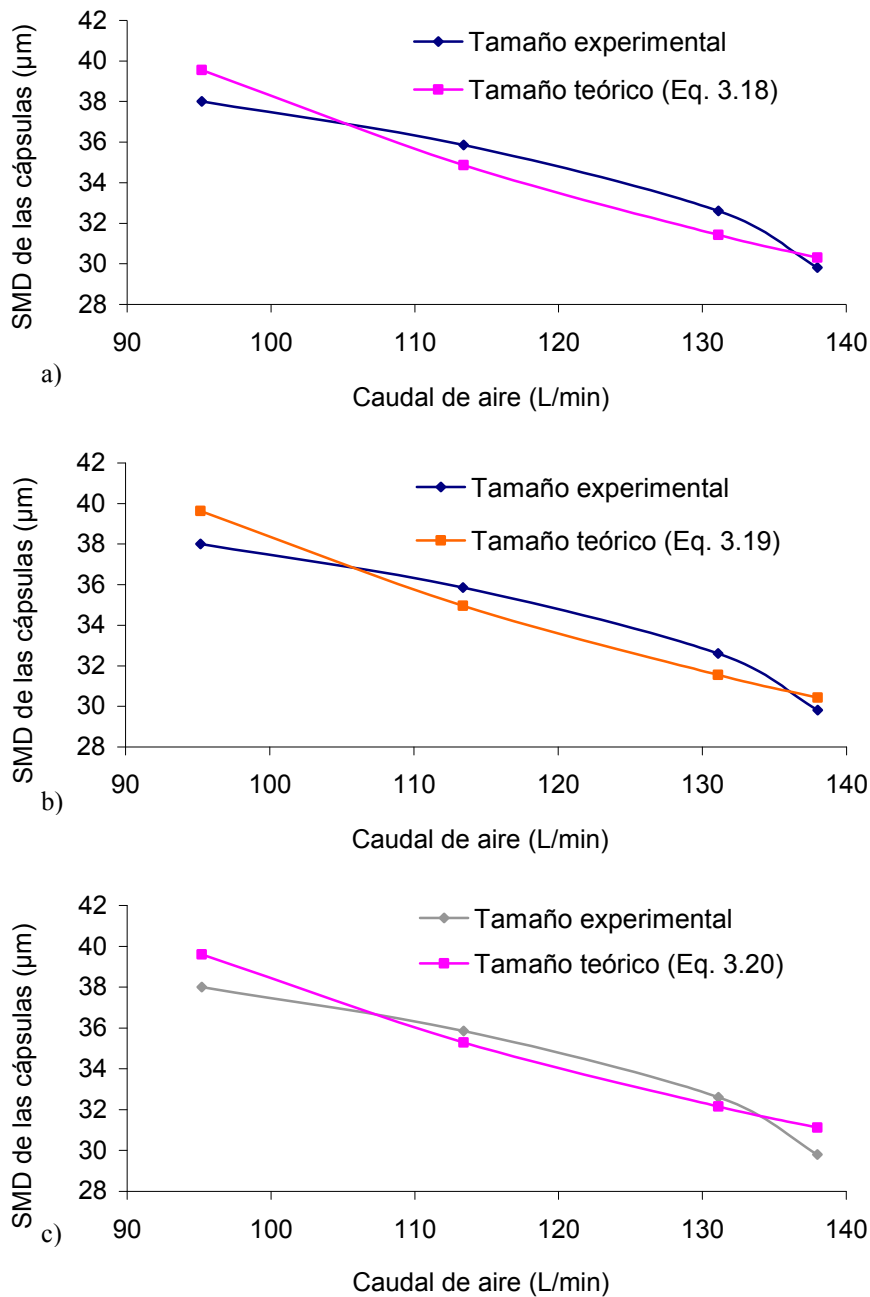


Figura 3.18. Tamaño de partícula: valores teóricos frente a los valores experimentales

(Caudal y viscosidad de alginato: 0,006 L/min y 190,0 cP).

- a) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.18.
- b) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.19.
- c) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.20.

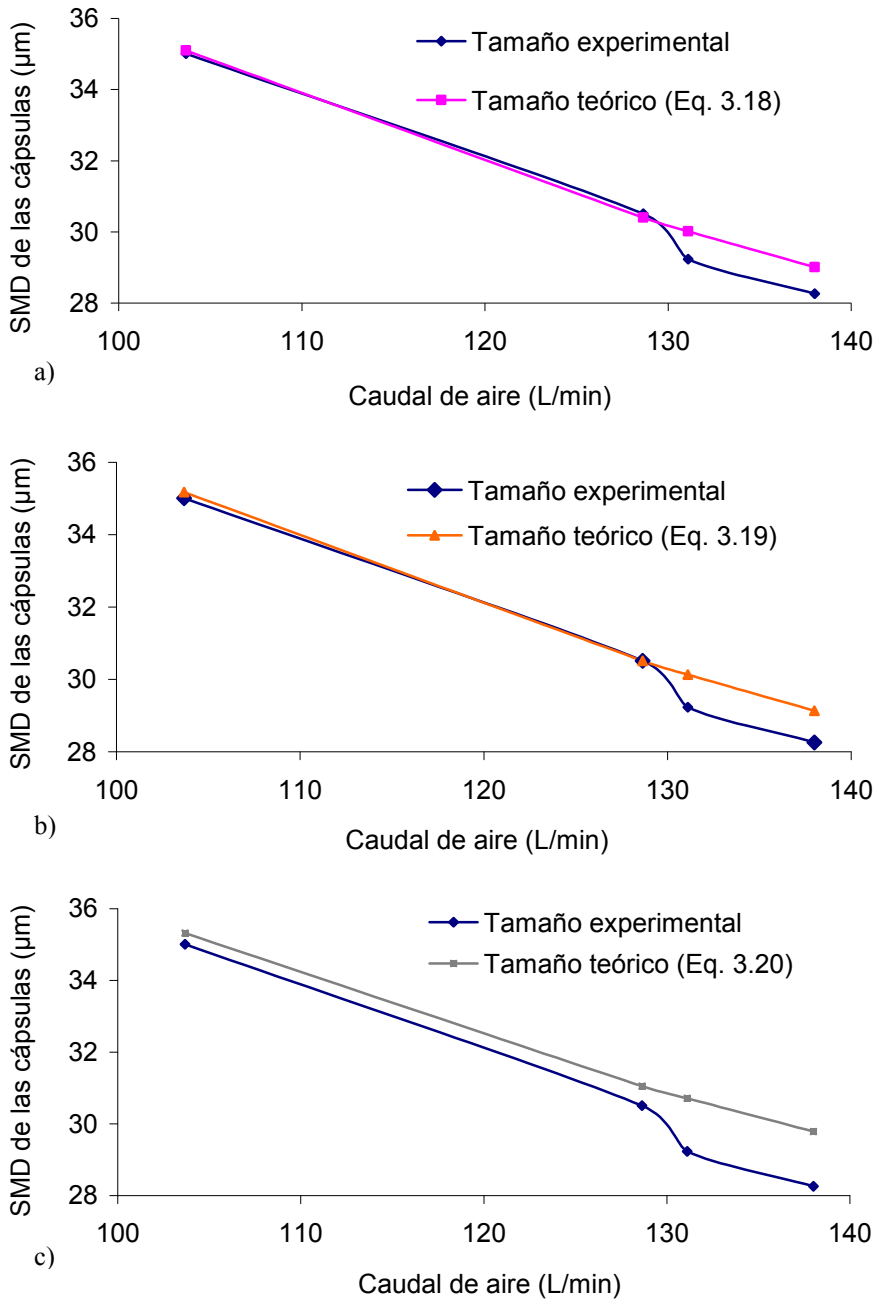


Figura 3.19. Tamaño de partícula: valores teóricos frente a los valores experimentales
 (Caudal y viscosidad de alginato: 0,003 L/min y 190,0 cP).

- a) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.18.
- b) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.19.
- c) Valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación 3.20.

Así, se puede concluir que bajo todas las condiciones estudiadas, los tres modelos propuestos predicen el tamaño de las microcápsulas, obteniéndose muy buena concordancia entre los tamaños experimentales y teóricos. Además, con estos resultados es posible afirmar que el tamaño de las gotas generadas por el proceso de atomización, es aproximadamente el mismo que el tamaño final de las cápsulas generadas.

3.3. CONCLUSIONES

En este capítulo se propone un modelo semi-empírico para predecir el tamaño de las cápsulas obtenidas con la nueva técnica desarrollada en este trabajo, a partir de los principales parámetros que influyen en el proceso (caudal de aire y líquido, y viscosidad del líquido). Este modelo permite la predicción del tamaño de las cápsulas sin necesidad de experimentación, lo que será de gran utilidad en el futuro, a la hora de elegir los parámetros para generar cápsulas de un determinado tamaño.

El modelo desarrollado en este capítulo tiene como base la teoría de ondas, que explica el mecanismo de ruptura de un chorro líquido en gotas mediante el proceso de atomización. El tamaño de las cápsulas fue expresado en términos de tres grupos adimensionales que influyen en el proceso de atomización, el número de Weber, el número de Ohnesorge, y la relación en masa líquido/aire.

Con el objetivo de generar el modelo semi-empírico, se determinó la dependencia exponencial de los números adimensionales, que influyen en el proceso de atomización, con el tamaño de las microcápsulas, mediante una serie de experimentos. Con esto se generaron tres ecuaciones, en las cuales los coeficientes y exponentes fueron determinados mediante regresión lineal múltiple a partir de los datos experimentales.

Después de la comparación de los datos teóricos obtenidos del modelo con los datos experimentales, se pudo comprobar que los modelos basados en el mecanismo de ondas son los que predicen el tamaño de partícula con una mayor precisión.

3.4. NOMENCLATURA

Símbolo	Descripción	Unidades
a	Aceleración producida por la resistencia aerodinámica	m^2/s
A	Amplitud de las ondas superficiales	m
C_{Do}	Coefficiente de resistencia de un cilindro	
d_i	Diámetro de gota	μm
D	Diámetro del chorro líquido y de salida de al boquilla	μm
$D_{0.9}$	Diámetro para un percentil del 90%	μm
$D_{0.1}$	Diámetro para un percentil del 10%	μm
$D_{0.5}$	Diámetro para un percentil del 50%	μm
\dot{M}_l	Flujo másico del líquido	g/s
\dot{M}_a	Flujo másico del aire	g/s
N_i	Número de gotas	
n^*	Relación de presión dinámica de descarga	
SMD	Diámetro medio Sauter	μm
t	Tiempo	s
u	Velocidad de la onda	m/s
U_a	Velocidad media de la fase gas	m/s
U_l	Velocidad del líquido	m/s
V_d	Velocidad de la partícula atomizada y del aire atomízate después de la transferencia de parte de su energía cinética al líquido	m/s
We	Número de Weber = $(We = \rho_a U_a^2 D / \sigma)$	adimens.
X_Z	Dependencia exponencial de la viscosidad y el número de Ohnesorge con el SMD	
X_W	Dependencia exponencial del número de Weber con el SMD	
X_1	Exponente de las dependencias exponenciales	

Símbolo	Descripción	Unidades
$X_{2,3}$	Coefficientes de correlación	
Z	Número de Ohnesorge = $= (We)^{1/2} / Re = \mu_l / (\rho_l \sigma D)^{1/2}$	adimens.

Letras griegas:

B	Parámetro de abrigo de Jeffrey	
ζ	Ángulo entre el aire y la corriente líquida	radian
λ	Longitud de onda de la perturbación	m^{-1}
λ_m	Longitud de onda mínima	m^{-1}
λ_a	Longitud de onda de las ondas de aceleración	m^{-1}
λ_σ	Longitud de onda de las ondas capilares	m^{-1}
μ	Viscosidad dinámica	kg/m s
ν	Viscosidad cinemática	m^2/s
ρ_l	Densidad del líquido	Kg/m^3
ρ_a	Densidad del aire	Kg/m^3
σ	Tensión superficial	N/m
σ_s	Tensión superficial por unidad de área	N/m^3

Superíndices:

(-)	Velocidad media o densidad evaluada después de la ruptura del chorro líquido
-------	--

3.5. BIBLIOGRAFÍA

- Arai, T., Hashimoto, H. (1985), “Disintegration of a thin liquid sheet in a concurrent gas stream”, *Proceedings of the 3rd international conference of liquid atomization and spray systems*. V1B/1/1-8.
- Adelberg, M. (1967), “Breakup rate and penetration of a liquid jet in a gas stream”, *AIAA J.*, **8**, 1408-1415.
- Adelberg, M. (1968), “Mean Drop Size Resulting from the Injection of a Liquid Jet Into a High-Speed Gas Stream”, *AIAA J.*, **6**, 1143-1147.
- Chigier, N., (1981), “Energy combustion and the environment”, *McGraw-Hill, New York*.
- Dombrowski, N., Johns, W.R. (1963), “The aerodynamic instability and disintegration of viscous liquid sheets”, *Chem. Eng. Sci.*, **18**, 203-214.
- Giffen, E., Muraszew, A. (1953), “The atomization of liquid fuels”, *John Wiley, New York*.
- Jeffreys, H. (1925), “On the formation of water waves by wind”, *Proc. R. Soc. A.*, **107**, 189-206.
- Lefebvre, A.H. (1989), “Atomization and sprays”, *Hemisphere, New York*.
- Mansour, A., Chigier, N. (1995), “Air-blast atomization of non-Newtonian liquids”, *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, **58**, 161-194.

- Mayer, E. (1961), “Theory of liquid atomization on high gas streams”, *ARS. J.* **31(12)**, 1783-1785.
- Panton R.L., (1995), “Incompressible flow”, *John Wiley and Sons, Inc.*
- Ritz, N.K., Lefebvre, A.H. (1980), “Influence of liquid film thickness on airblast atomization”, *Trans. ASME J. Eng. Power*, **102**, 706-710.

3.6. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados derivados del Capítulo 3 se difundieron a través de un congreso internacional y un artículo internacional:

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, M.A. Galán
Título: *Development and modelling of a new microencapsulation technology based on air blast atomization.*
Congreso: *17th International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA 2006).*
Ciudad: Praga, República Checa.
Fecha: 27-31 Agosto 2006.
Participación: Comunicación Oral (0197).

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, M.A. Galán
Título: *Modelling prediction of the microcapsule size of polyelectrolyte complexes produced by atomization.*
Revista: *Chemical Engineering Journal*, 121 (2006) 1-8.
Impacto: 1,594 (año 2006).

A continuación, se adjunta una copia del artículo publicado en la revista internacional *Chemical Engineering Journal*:



Modelling prediction of the microcapsule size of polyelectrolyte complexes produced by atomization

Edgar P. Herrero, E.M. Martín Del Valle*, M.A. Galán

Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, P/Los Caídos S/N, 37008 Salamanca, Spain

Received 30 November 2005; received in revised form 17 April 2006; accepted 19 April 2006

Abstract

In order to have a better understanding of the atomization process for microencapsulation applications the disintegration of polymer liquid jets (sodium alginate) injected into high-velocity gas streams was studied and a mathematical model to predict the microparticle size has been developed.

Air-blast atomization of viscous non-Newtonian fluid (alginate solution) was carried out in order to produce microbeads (1–50 μm) based on polyelectrolyte complexes with particle size control and a particle size distribution with a relative span factor, $(D_{0.9} - D_{0.1})/D_{0.5}$, less than 1.4. The accuracy of the wave-mechanisms-based models in predicting droplet size after breakup of alginate solution has been demonstrated. The atomized microparticle size were expressed in terms of three dimensionless groups, the liquid/air mass ratio, the Weber number and the Ohnesorge number in simple forms whose exponents and coefficients were determined by least-squares fit to the experimental data. With these data two semi-empirical models have been proposed to predict the particle size obtained from the microencapsulation. Both models allow the prediction of particle size of the microcapsules obtained by atomization processes.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Air-blast atomization; Particle size prediction; Wave mechanisms

1. Introduction

In the rapidly changing scientific world, contributions of scientists and engineers are leading to major new solutions of significant medical problems [1,2].

The most common method of administration of drugs is in the form of pills or injections. These methods of administration meet the requirements of efficacy for several drugs, with regard to the introduction and elimination of the drug in the organism, its absorption in blood, and its distribution to points where it is necessary. However, these methods are inadequate for many new drugs such as hormones and vaccines. These protein drugs are usually high molecular weight proteins and are very sensitive to environmental conditions. Most proteins cannot be delivered orally due to problems related to degradation in the acidic environment of the gastrointestinal tract. Moreover, the high molecular weight of these substances often results in poor absorption in to the blood stream when administered orally.

The most common mode of administration of these therapeutic proteins is intravenous injections, which are usually not well tolerated by the recipient. Also, most of these proteins have short half-lives in the blood stream and need to be administered frequently in high doses to obtain therapeutic efficacy. Systemic administration in high doses can lead to side effects and can also be toxic. To overcome these difficulties, new technologies, like the microencapsulation, have been developed [3–6]. Microencapsulation is a process by which the active material is enclosed in a polymeric matrix and surrounded by a coating to produce capsules in the micrometer range known as microcapsules. The most important application of this technology is the immobilization of stem cells for cellular therapy to the treatment of the most devastating diseases. To do that, is needed the administration of the microcapsules via injection Hamilton and aerosol that requires particles diameter below 50 μm .

These technologies are based on the use of polymers. Polysaccharides, such as alginate, have been widely used in the microencapsulation technology. Alginate is a water-soluble linear polysaccharide extracted from brown seaweed, and is composed of alternating blocks of 1-4-linked α -L-guluronic and β -D-mannuronic acid residues. Alginate has an excellent bio-

* Corresponding author.

E-mail address: emvalle@usal.es (E.M.M. Del Valle).

Nomenclature

A	Amplitude of surface waves (m)
C_{Do}	Drag coefficient of a cylinder in cross-flow
d_i	Diameter of droplet (μm)
D	Injector exit diameter, diameter of liquid jet (μm)
$D_{0.1}$	Diameter at the 10th percentile (μm)
$D_{0.5}$	Diameter at the 50th percentile (μm)
$D_{0.9}$	Diameter at the 90th percentile (μm)
\dot{M}_a	Air mass flow rate (g/s)
\dot{M}_l	Liquid mass flow rate (g/s)
n^*	Shock dynamic pressure ratio
N_i	number of droplets
SMD	Sauter mean diameter (μm)
t	Time (s)
u	Wave velocity (m/s)
U_a	Gas phase average velocity (m/s)
U_l	Velocities of the liquid (m/s)
V_d	Velocity of the atomized drop and the atomizing air after transferring part of its kinetic energy to the liquid (m/s)
We	Weber number = $(We = \rho_a U_a^2 D / \sigma)$
X_{We}	Power dependence of SMD on Weber number
X_Z	Power dependence of SMD on viscosity or Ohnesorge number
X_1	General correlation exponents
$X_{2,3}$	General correlation coefficients
Z	Ohnesorge number = $(We)^{1/2} / Re = \mu_l / (\rho_l \sigma D)^{1/2}$

Greek letters

β	Jeffrey's sheltering parameter
ζ	Angle between the jet axis and gas velocity (radian)
λ	Wavelength of a disturbance (m^{-1})
μ	Newtonian viscosity (Ns/m^2)
ν	Kinematic viscosity (m^2/s)
ρ_a	Air density (kg/m^3)
ρ_l	Liquid density (kg/m^3)
σ	Surface tension (N/m)

Superscript

(-)	Mean velocity or density evaluated before of the break-up of the liquid jet
-----	---

compatibility and biodegradability. Alginates have the ability to form gels by reaction with divalent cations such as calcium or barium. The aqueous solutions of alginates have shear-thinning characteristics, i.e. the viscosity decreases with increasing shear rate (stirrer speed). This property is also called pseudoplasticity, or non-Newtonian fluid. The viscosity of an alginate solution depends on the concentration of alginate and the length of the alginate molecules, i.e. the number of monomer units in the chains. The longer the chains the higher the viscosity at similar concentrations [7].

Most methods of microencapsulation involve one of two harsh conditions (contact with an organic solvent and/or heating during processing), which usually is a problem, especially for biomaterials handling [4,5]. The previous work done on microencapsulation without harsh conditions produce capsules with diameters ranged between 300 and 1000 μm [6–14].

Several attempts have been done in order to produce very small particles based on polyelectrolyte complexes, but there is not a technology able to produce these microcapsules below 300 μm , with control size and a particle size distribution with a relative span factor less than 1.4 [8–14].

For that reason, based in atomization processes, a microencapsulation technology of polyelectrolyte complex beads (alginate–barium), which produced very small particles (1–50 μm) has been developed.

Atomization is a process in which the disruptive action of externally applied aerodynamic forces is opposed by the consolidating influences of the liquid viscosity and surface tension forces. Disintegration of liquid jets injected into quiescent and high-velocity gas streams has been studied by many researchers. Theoretical and experimental studies on the mechanism of atomization have been carried out by Rayleigh, Tyler, Weber, Haenlein, Ohnesorge and Castleman [15]. Detailed reviews of earlier work have been published by Giffen and Muraszew [16], and more recently by Chigier [17], and Lefebvre [15].

During the last decade atomization techniques as air-blast or twin-fluid atomization has been widely used taking the place of spray drying [12–14].

In air-blast atomization, low-speed liquid jets are accelerated by the surrounding high-speed gas flow, usually in the spray flow direction. The liquid is subjected to both tensile and shearing stresses. The magnitude of the extension has been shown to be significant for applications involving polymer solutions. Twin-fluid atomizers have a number of advantages over pressure atomizers including lower requirements for the liquid injection pressure and finer sprays. Unfortunately, the process of air-blast atomization is very complex and its physical mechanisms are not fully understood [15].

Therefore, in order to have a better understanding of the atomization process for microencapsulation applications the disintegration of polymer liquid jets (sodium alginate) injected into high-velocity gas streams were studied. Two semi-empirical models of air-blast atomization based on the wave mechanism of breakup of non-Newtonian polymer have been developed. Both models allow the prediction of particle size of the microcapsules obtained by atomization processes. The experimental data of the microcapsules size were compared with the models predictions.

2. Materials and methods

2.1. Material

Sodium alginate from *Macrocystis pyrifera* (medium viscosity) was purchased from Sigma Chemicals, barium chloride dihydrate, reagent grade was purchased from Scharlau.

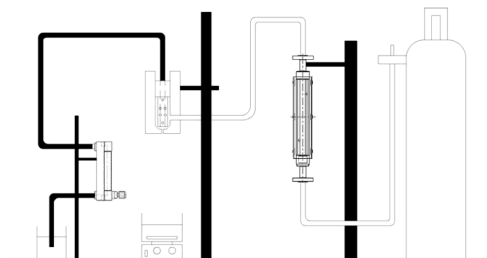


Fig. 1. A scheme of the microencapsulation device. 1, sodium alginate solution (0.7 wt.%); 2, rotameter of sodium alginate; 3, nozzle; 4, hardening solution (BaCl_2) (2 wt.%); 5, rotameter of air; 6, pressurized air.

2.2. Production of microcapsules

The generation of the microcapsules, optimized to produce microcapsules in the size range of 1–50 μm , can be described as follows. Sodium alginate (0.7 wt.%) was fed from a beaker to an atomization nozzle of 1.8 mm by air intake. After that, sodium alginate is sprayed into a crystallizer containing 1000 ml of hardening solution, 2 wt.% barium chloride solution, which induces the gelation. The device to the atomization works with pressurized air that mixes with the liquid, forcing liquid droplets out through the orifice of the nozzle. The divalent barium ions cross-link the droplets of sodium alginate on contact to form the microcapsules. The microbeads were kept 5 min under cross-linked conditions to form a semi-permeable membrane. The resultant microbeads were collected by filtration and washed with 30 ml of 0.9% of barium chloride and kept in distilled water. The scheme of the microencapsulation device is shown in Fig. 1.

The experimental conditions span a wide range of Weber numbers and are presented in Table 1.

2.3. Particle size analysis

We have obtained the particle size distribution of the microcapsules produced with laser diffractometry. To do that we have used a Leeds and Northrup Microtac Particle Size Analyzer. This device utilizes the phenomenon of scattered light from a laser beam projected through a stream of particles.

The droplet size distribution is frequently characterized by its Sauter mean diameter (SMD), which is the diameter of that drop whose volume/surface ratio value is the same as the arithmetic mean of volume/surface values on the total number of drops

belonging to the sample spray under examination. Usually the concept of SMD is defined as:

$$\text{SMD} = \frac{\int_0^\infty D^3 dN}{\int_0^\infty D^2 dN} \quad (1)$$

where, D is the droplet diameter, and dN stands for the percentage of the total number of droplets with a diameter contained in the interval $[D, D+dD]$.

The SMD is influenced by the properties of the atomized and atomizing fluids and by the nozzle design and operating conditions.

3. Wave mechanisms and size distribution

In various ways of atomization, small disturbances in the jet or sheet will start growing across the liquid, which eventually disintegrates into ligaments and then drops, thus increasing the specific surface area of the liquid exposed to the gas medium and thereby achieving high rates of heat transfer, mixing and evaporation.

Essentially, all that is needed for liquid atomization is a high relative velocity between the liquid to be atomized and its surrounding air or gas. This can be achieved through the increase of the liquid kinetic energy, or by the exposure of relative slow moving liquid to a high air or gas velocity, or by applying external mechanical energy on the liquid through the utilization of a rotating or vibrating device to increase the energy carried within the liquid to overcome the consolidating surface tension force. Based on the forms of energy applied, atomizers are classified into pressure atomizer, pressure swirl atomizer, twin-fluid atomizer, rotary atomizers, electrostatic and ultrasonic atomizers, etc. [15]

In this work a twin-phased gas–liquid atomizer was used. In this way, the kinetic energy carried with high velocity gas stream is utilized to disintegrate the relatively low velocity liquid sheet or jet into droplets. A variety of these atomizers is the air-blast atomizer, in which, an annular liquid sheet exiting from the atomizer is exposed to an inner and an outer air streams moving at high velocities (Fig. 2). The liquid is subjected to both tensile and shearing stresses.

The wave mechanism has found the widest acceptance among the mechanisms of atomization. In this theory the disintegration of liquid sheets or liquid jets is caused by the growth of unstable waves at the liquid–gas interface due to the aerodynamic interactions between the liquid and the gas. This type of instability is referred to as Kelvin–Helmholtz instability [18] and is characterized by unstable waves that appear in the fluid interface between two superimposed fluids of differing densities and velocities.

A number of previous studies [20,21] indicate that the curvature effect may be negligible due to the relatively small thickness of the liquid sheet compared to the radius of curvature. As a result, the liquid to be atomized may be modelled in a first approximation as a plane liquid sheet [22].

The waves are generated by factors such as pressure fluctuations or turbulence in the gas stream or liquid stream [23,24].

Table 1

Experimental conditions	
Alginate flow rate (g/s)	3.00–37.00
Alginate exit velocity (m/s)	0.02–0.24
Air mass flow rate (g/s)	101.17–178.00
Air exit velocity (m/s)	513.49–903.84
Weber number, We	9492.10–29409.55
Alginate kinematic viscosity (m^2/s)	6.45×10^{-5}
Surface tension (N/m)	0.054
Ohnesorge number, Z	0.21

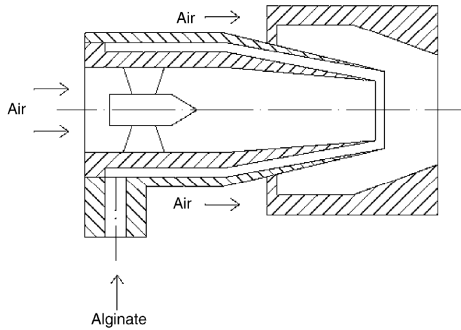


Fig. 2. Schema of a pre-filming air-blast atomizer.

Due to aerodynamic interactions, the perturbations grow in magnitude and reach a maximum value. When the dynamic pressure ($\rho_a U_a^2/2$) of the air stream in air-blast atomization is large enough, the amplitude of the surface waves will grow if their wavelength (λ) exceeds a minimum value [23–26]. There exists a dominant or most unstable wave number corresponding to the maximum growth rate and when the amplitude of the disturbance reaches a critical value, the wave detaches from the sheet to form shreds or ligaments, which rapidly collapse, forming drops. This process is shown in Fig. 3.

The system of forces acting on the slightly disturbed surface of a liquid sheet moving in air, are shown in Fig. 4. Surface tension forces try to return the protuberance back to its original position, but the air experiences a local decrease in static pressure (corresponding to the local increase in velocity) that tends to expand the protuberance farther outward. This corresponds to the normal pattern of wind-induced instability, where surface tension forces oppose any movement of the interface from its initial plane and attempt to restore equilibrium, while the aerodynamic forces increase any deviation from the interface and thereby promote instability.

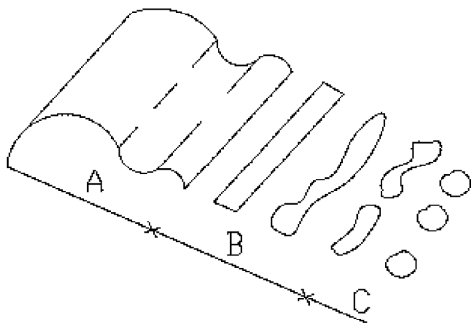


Fig. 3. Disintegration of the liquid sheet [19]. (A) Growth of unstable waves, (B) formation of ligaments, (C) breakup of ligaments into droplets.

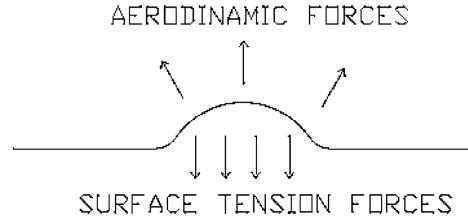


Fig. 4. System of forces acting on a liquid sheet moving in air.

The amplitude (A) of the surface waves on the liquid is described by the following differential equation [25]:

$$\frac{dA}{dt} = A \left[\frac{\pi\beta\rho_a(U_a - u)^2}{\lambda\rho_l u} - \frac{8\pi^2\mu_l}{\rho_l\lambda^2} \right] \quad (2)$$

where the subscript ‘l’ refers to liquid phase properties and the subscript ‘a’ refers to gas phase properties. From Eq. (2), it is seen that the amplitude, damped by liquid viscous force, increase as the air velocity increase. When both the aerodynamic pressure force and the surface tension forces are significant, the wave velocity u is given by [23]:

$$u = \left[\frac{a\lambda}{2\pi} + \frac{2\pi\sigma}{\lambda\rho_l} \right]^{1/2} \quad (3)$$

where a is the acceleration caused by the aerodynamic drag on the liquid jet, described by:

$$a = \frac{4C_{D0} \sin^2\zeta}{\pi D\rho_l} \left(\frac{\bar{p}_a U_a^2}{2} \right) \quad (4)$$

where C_{D0} is the drag coefficient, ζ is the angle between the air and the liquid stream, D is the diameter of the liquid jet, and $\bar{p}_a U_a^2/2$ is the free stream aerodynamic pressure. Substituting Eq. (3) into Eq. (2) and assuming $U_a \gg u$ leads to the following equation:

$$\frac{dA}{dt} = A \left[\frac{\pi\beta\rho_a U_a^2}{\lambda\rho_l [(a\lambda/2\pi) + (2\pi\sigma/\lambda\rho_l)]^{1/2}} - \frac{8\pi^2\mu_l}{\rho_l\lambda^2} \right] \quad (5)$$

Eq. (5) shows that the amplitude growth is resisted by surface tension (σ). Note that in this study the liquid velocity is negligibly small compared to the air velocity.

The minimum wavelength λ_m , above which the amplitude grows exponentially with time, may be estimated by setting $dA/dt=0$. This results in the following cubic expression for λ_m :

$$\lambda_m^3 - \lambda_a \lambda_m^2 - \lambda_\sigma^2 = 0 \quad (6)$$

where

$$\frac{\lambda_\sigma}{D} = \frac{2\pi(16)^{1/3}}{\beta^{2/3}} \left(\frac{Z}{We} \right)^{2/3} \quad (7)$$

$$\frac{\lambda_a}{D} = \frac{64C_{D0} \sin^2\zeta}{n^* \beta^2 \pi} \left(\frac{Z^2}{We} \right) \quad (8)$$

where λ_σ and λ_a are the wavelengths of the capillary waves and acceleration waves, respectively, and $n^* = \rho_a U_a^2 / \bar{p}_a U_a^2$

the shock dynamic pressure ratio. The Weber number ($We = \rho_a U_a^2 D / \sigma$) represents the ratio of aerodynamic force to surface tension. And the Ohnesorge number ($Z = \mu_l / (\rho_l \sigma D)^{1/2}$) contains only the properties of the globules formed in primary atomization before they split up into smaller drops during secondary atomization. It is sometimes called a stability group because it provides an indication of the resistance of a globule to further disintegration, but it is also called a viscosity group because it accounts for the effect of liquid viscosity on the globule.

When the aerodynamic pressure force predominates, waves propagate as acceleration waves at a minimum velocity of $(a\lambda_m/2\pi)^{1/2}$. In this case, $\lambda_a \ll \lambda_\sigma$, and one solution to Eq. (6) is $\lambda_a = \lambda_\sigma$, which is governed by $(Z/We)^{2/3}$, as shown in Eq. (7). In contrast, when the surface tension predominates, waves propagate as capillary waves at a minimum velocity of $(2\pi\sigma/\lambda_m\sigma_1)^{1/2}$. Since $\lambda_\sigma \ll \lambda_a$, one solution to Eq. (6) is $\lambda_m = \lambda_a$, which is governed by Z^2/We , as shown in Eq. (8).

Additionally, the dimensionless ratio liquid/air should be considered in atomization processes. Rizt and Lefebvre [27] showed that the liquid/air interaction produces waves that become unstable and disintegrate into fragments. These fragments then contract into ligaments, which in turn break down into drops. They proved that with increase in air velocity, the liquid sheet disintegrates earlier and ligaments are formed nearer the lip. These ligaments tend to be thinner and shorter and disintegrate into smaller drops. Arai and Hashimoto [28] for a constant liquid sheet thickness, showed that breakup length decrease with increase in the relative velocity between the air and the liquid. Also, they prove that breakup length increases as the liquid sheet velocity increases or as the liquid viscosity decrease.

3.1. Dependence of SMD on fluid viscosity or the Ohnesorge number

Mansour and Chigier [29] studied the influence of the fluid viscosity on the Sauter mean diameter for non-Newtonian fluids. They found that the SMD increase with the apparent viscosity of the fluid according to the equation:

$$SMD = f(Z^{Xz}) \tag{9}$$

The value of Xz was found insensitive to the variations in the air mass flow rate or air velocity.

3.2. Dependence of SMD on $(1 + (\dot{M}_l/\dot{M}_a))$

The power dependence on $(1 + (\dot{M}_l/\dot{M}_a))$ is examined by plotting the SMD data as a function of $(1 + (\dot{M}_l/\dot{M}_a))$ at constant Weber number. Using a logarithmic plot (Fig. 5) of these data the following equation was found:

$$SMD = f\left(1 + \frac{\dot{M}_l}{\dot{M}_a}\right)^{2.66} \tag{10}$$

where \dot{M}_l and \dot{M}_a are the liquid mass flow and the air mass flow, respectively.

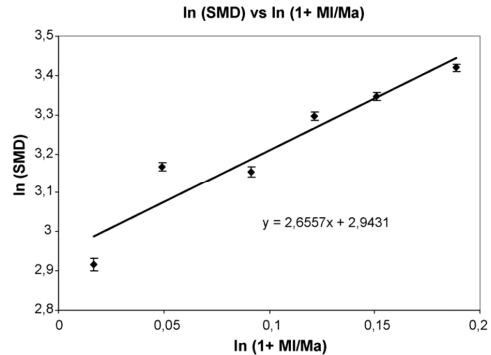


Fig. 5. Dependence between SMD and $(1 + (\dot{M}_l/\dot{M}_a))$.

The linear dependence between SMD and $(1 + (\dot{M}_l/\dot{M}_a))$ is based on momentum balance and energy considerations:

$$\dot{M}_l U_l + \dot{M}_a U_a = (\dot{M}_l + \dot{M}_a) V_d \tag{11}$$

where V_d is the velocity of the atomized drop and the atomizing air after transferring part of its kinetic energy to the liquid. It is assumed that the total surface energy of the atomized droplets is proportional to the loss of kinetic energy:

$$\sum N_i d_i^2 \sigma_s = f[(\dot{M}_l U_l^2 + \dot{M}_a U_a^2) - (\dot{M}_l + \dot{M}_a) V_d^2] \tag{12}$$

where N_i is the number of droplets with diameters d_i produced per unit time and σ_s is the droplet surface energy per unit area. Substituting Eq. (11) and

$$\dot{M}_l = \pi \rho_l \sum \frac{N_i d_i^3}{8} \tag{13}$$

into Eq. (12) yields

$$SMD = f\left[1 + \left(\frac{\dot{M}_l}{\dot{M}_a}\right)\right] \tag{14}$$

where

$$SMD = \frac{\int_0^\infty D^3 dN}{\int_0^\infty D^2 dN} \tag{15}$$

3.3. Dependence of SMD on the Weber number

Experiments were conducted to examine the influence of the Weber number on the SMD. The effect of Weber number on the microcapsule SMD was examined by varying the air exit velocity. No variations of surface tension were undertaken. The data presented in Fig. 6 (SMD versus Weber number) were used to establish the functional dependence of the SMD on the Weber number. Fig. 6 shows that the SMD decreases with increasing Weber number.

The power dependence on the Weber number is examined by plotting the SMD data as a function of the Weber number at constant $(1 + (\dot{M}_l/\dot{M}_a))^{2.66}$. It has been previously established

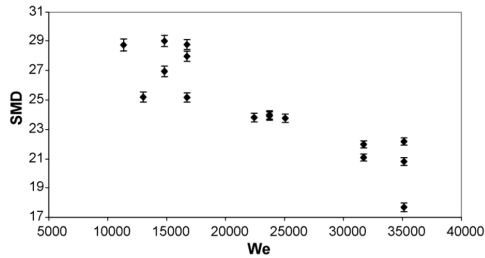


Fig. 6. Variations of SMD with Weber number.

that the effects of the air flow on the viscous behaviour of the polymeric solutions are negligible. Recall that the power dependence X_2 of the SMD was nearly constant, irrespective of the Weber number [29]. In Section 3.2 it was also established that the power dependence of SMD on $(1 + (\dot{M}_1/\dot{M}_a))$ was 2.66. Thus, in order to extract the Weber number power dependence from the data presented in Fig. 6 should be correlated according to the following relation:

$$\frac{SMD}{(1 + (\dot{M}_1/\dot{M}_a))^{2.66}} = f(We)^{X_{We}} \quad (16)$$

A logarithmic representation of SMD of the microparticles versus the logarithm of the Weber number at constant $(1 + (\dot{M}_1/\dot{M}_a))^{2.66}$ (Fig. 7) show that the power dependence between the SMD and the Weber number is given by the following relation:

$$\frac{SMD}{(1 + (\dot{M}_1/\dot{M}_a))^{2.66}} = f(We)^{-0.2718} \quad (17)$$

3.4. Semi-empirical model for air-blast atomization

Based on the above-mentioned wave mechanism, and considering the models proposed by Mansour and Chigier [29] for atomization of non-Newtonian fluids, the following two- and three-parameter equations are proposed to predict the particle

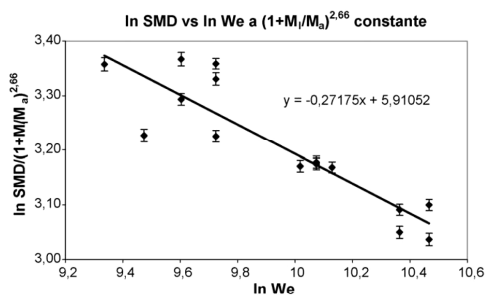


Fig. 7. Influence of the Weber number on the Sauter mean diameter of the microcapsules.

Table 2
Unknown variables for Eqs. (18) and (19)

	X_1	X_2	X_3
Eq. (18)	0.2717 ± 0.0214	0.2771 ± 0.0214	$-8.1992E-03 \pm 1.827E-03$
Eq. (19)	0.2717 ± 0.0214	0.2996 ± 0.0214	–

size of the microcapsules obtained:

$$\frac{SMD}{D} = \left(1 + \frac{\dot{M}_1}{\dot{M}_a}\right)^{2.66} [X_2 We^{-X_1} + X_3 Z^{X_1}] \quad (18)$$

$$\frac{SMD}{D} = \left(1 + \frac{\dot{M}_1}{\dot{M}_a}\right)^{2.66} \left[X_2 \left(\frac{Z}{We}\right)^{X_1}\right] \quad (19)$$

where D is the discharge orifice diameter.

According to Eqs. (18) and (19) together with the experimental data of microcapsules sizes the unknown variables, X_1 , X_2 , X_3 were obtained (Table 2).

3.4.1. Comparison between experimental microcapsules size and model predictions

In order to obtain the experimental variation of the SMD of the microcapsules (behaviour curves) the effect of sodium alginate flow rate and the air flow rate were studied. The experimental microcapsules sizes obtained were compared with the models predicted sizes.

3.4.1.1. Sodium alginate flow rate variation. The first set of experiments were carried out at constant value of pressurized flow air of 138 l/min and the sodium alginate flow rate was modified ranged from 0.003 to 0.037 l/min. It was previously checked, that sodium alginate flow rates lower than 0.003 l/min, did not generate an homogeneous regimen and flow rates higher than 0.037 l/min produced agglomerates.

The experimental SMD data obtained from the different experiments and the theoretical size of the microcapsules, calcu-

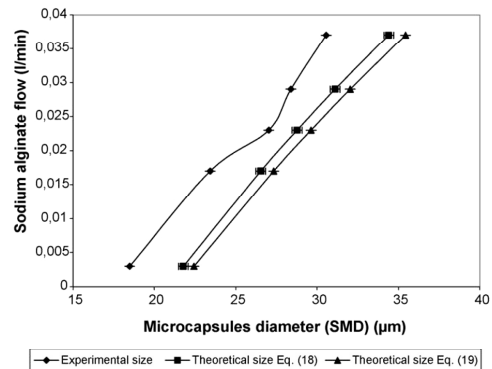


Fig. 8. Calculated by Eqs. (18) and (19) vs. SMD measured.

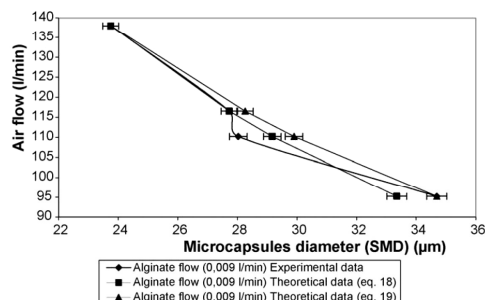


Fig. 9. Agreement between the experimental data and the theoretical data (variation of the air flow at a constant alginate flow, 0.009 l/min).

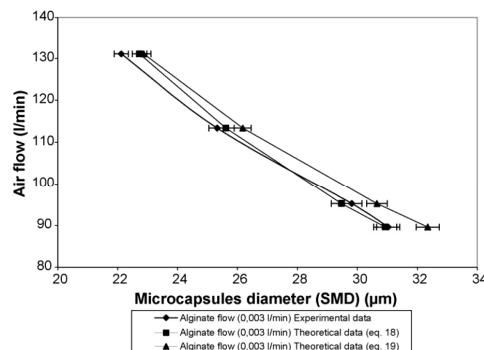


Fig. 11. Agreement between the experimental data and the theoretical data (variation of the air flow at a constant alginate flow, 0.003 l/min).

lated from Eqs. (18) and (19) are collected and were represented in Fig. 8. From this figure it can be seen that there is a very good agreement between the experimental data obtained and both proposed models.

3.4.1.2. Pressurized air flow rate variation. The second set of experiments was carried out at different pressurized air flow rate ranged from 78.40 to 138.00 l/min, at different constant flows of sodium alginate (0.003, 0.006, 0.009 l/min). Flow rates of pressurized air lower than 78.40 l/min, did not generate atomization. However, flow rates higher than 138.00 l/min generated turbulences on the of the barium chloride solution surface when atomization is performed.

The experimental SMD data obtained from the different experiments and the theoretical size of the microcapsules, calculated from Eqs. (18) and (19) are collected and were represented in Figs. 9–11. From this figures it can be seen that there is a very good agreement between the experimental data obtained and both proposed models.

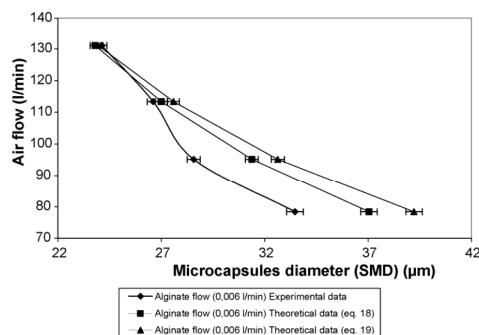


Fig. 10. Agreement between the experimental data and the theoretical data (variation of the air flow at a constant alginate flow, 0.006 l/min).

4. Conclusions

It is the first time that two semi-empirical models have been proposed to predict the particle size obtained from a microencapsulation technology of polyelectrolyte complex beads, which produce based in atomization processes. The polymer used was sodium alginate as polyanion and barium chloride solution as polycation. To do that, an air-blast atomizer, was used.

The accuracy of the wave-mechanisms-based models in predicting droplet size after breakup of alginate solution has also been demonstrated. The atomized microparticle size were expressed in terms of three dimensionless groups, the liquid/air mass ratio, the Weber number and the Ohnesorge number in simple forms whose exponents and coefficients were determined by least-squares fit to the experimental data. The best correlations were found for the equations involving the exponent of the *Z*-dependency equal to the exponent of the *We*-dependency. This verifies the basic hypothesis that at the conditions of this study the waves propagate as acceleration waves.

There is a good agreement between the data obtained from the proposed models and the experimental data. This shown that the air-blast atomization theory can be used to predict the particle size obtained in a microencapsulation technique based in atomization processes.

References

- [1] D.J. Burgess, J.E. Carless, Manufacture of gelatine/gelatine coacervate microcapsules, *Int. J. Pharm.* 27 (1987) 61–70.
- [2] S. Benita, J.P. Benoit, F. Puisieux, C. Thies, Characterization of drug-loaded poly (D,L-lactide) microspheres, *J. Pharmacol. Sci.* 73 (1984) 1721–1724.
- [3] T. Sato, M. Kanke, H. Schroeder, P. DeLuca, Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery. I. Assessment of processing conditions and solvent removal techniques, *Pharm. Res.* 5 (1988) 21–30.
- [4] D.J. Burgess, S.S. Davis, E. Tomlinson, Potential use of albumin microspheres as a drug delivery system. I. Preparation and in vitro release of steroids, *Int. J. Pharm.* 39 (1987) 129–136.
- [5] F.-L. Mi, T.-B. Wong, S.-S. Shyu, S.-F. Chang, Chitosan microspheres: modification of polymeric chem-physical properties of spray-

- dried microspheres to control the release of antibiotic drug, *J. Appl. Polym. Sci.* 71 (1999) 747–759.
- [6] L. Bilancetti, M. Bucko, B. Bugarski, J. Bukowski, P. Gemeiner, D. Lewinska, V. Manojlovic, B. Massart, C. Nastruzzi, V. Nedovic, D. Poncelet, U. Pruesse, S. Rosinski, S. Siebenhaar, L. Tobler, A. Vikartovska, K. Vorlop, Round robin experiment “Bead production technologies”, University of Perugia, Faculty of Pharmacy, Department of Chemistry and Pharmaceutical Technology of Drugs.
- [7] Y. Senuma, C. Lowe, Y. Zweifel, J.G. Hilborn, I. Marison, Alginate hydrogel microspheres and microcapsules prepared by spinning disk atomization, *Biotechnol. Bioeng.* 67 (2000) 616–622.
- [8] Y. Senuma, J.G. Hilborn, Key parameters for monodispersed polymer microspheres with spinning disk atomization, *Mater. Res. Innov.* 3 (1999) 42–49.
- [9] D. Serp, E. Cantana, C. Heinzen, U. von Stockar, I.W. Marison, Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization, *Biotechnol. Bioeng.* 70 (2000) 41–53.
- [10] C. Shwinger, A. Klemenz, K. Busse, J. Kressler, Encapsulation of living cells with polymeric systems, *Macromol. Symp.* 210 (2004) 493–499.
- [11] L. Canaple, A. Rehor, D. Hunkeler, Improving cell encapsulation through size control, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 13 (2002) 783–796.
- [12] R. Robitaille, J.F. Pariseau, F.A. Leblond, M. Lamoureux, Y. Lepage, J.P. Hallé, Studies on small (<350 μm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. III. Biocompatibility of smaller versus standard microcapsules, *J. Biomed. Mater. Res.* 44 (1999) 116–120.
- [13] G. Orive, R.M. Hernandez, A.R. Gascón, M. Igartua, J.L. Pedraz, Development and optimization of alginate-PMCG-alginate microcapsules for cell immobilization, *Int. J. Pharm.* 259 (2003) 57–68.
- [14] S. Sugiura, T. Oda, Y. Izumida, Y. Aoyagi, M. Satake, A. Ochiai, N. Ohkohchi, M. Nakajima, Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array, *Biomaterials* 26 (2005) 3327–3331.
- [15] A.H. Lefebvre, *Atomization and Sprays*, Hemisphere, New York, 1989.
- [16] E. Giffen, A. Muraszew, *The Atomization of Liquid Fuels*, John Wiley, New York, 1953.
- [17] N. Chigier, *Energy Combustion and the Environment*, McGraw-Hill, New York, 1981.
- [18] R.L. Panton, *Incompressible Flow*, John Wiley and Sons Inc., 1995.
- [19] N. Dombrowski, W.R. Johns, The aerodynamic instability and disintegration of viscous liquid sheets, *Chem. Eng. Sci.* 18 (1963) 203–214.
- [20] J. Shen, X. Li, Instability of an annular viscous liquid jet, *Acta Mech.* 114 (1996) 167–183.
- [21] J. Shen, X. Li, Breakup of annular viscous liquid jets in two gas streams, *AIAA J.* 12 (1996) 752–759.
- [22] W.T. Kim, S.K. Mitra, S. Li, L.A. Prociw, T.C.J. Hu, A predictive model for the initial droplet size and velocity distributions in sprays and comparison with experiments, *Part. Part. Syst. Char.* 20 (2003) 135–149.
- [23] M. Adelberg, Breakup rate and penetration of a liquid jet in a gas stream, *AIAA J.* 5 (1967) 1408–1415.
- [24] M. Adelberg, Mean drop size resulting from the injection of a liquid jet into a high-speed gas stream, *AIAA J.* 6 (1968) 1143–1147.
- [25] H. Jeffreys, On the formation of water waves by wind, *Proc. Roy. Soc. Lond. A* 107 (1925) 189.
- [26] E. Mayer, *ARS J.* 31 (1961) 1783–1785.
- [27] N.K. Ritz, A.H. Lefebvre, Influence of liquid film thickness on air-blast atomization, *J. Eng. Power Trans. ASME* 102 (1980) 706–710.
- [28] T. Arai, H. Hashimoto, Disintegration of a thin liquid sheet in a cocurrent gas stream, in: *Proceedings of the 3rd International Conference of Liquid Atomization and Spray Systems*, 1985, V1B/1/1–8.
- [29] A. Mansour, N. Chigier, Air-blast atomization of non-Newtonian liquids, *J. Non-Newton. Fluid Mech.* 58 (1995) 161–194.

**CAPÍTULO 4: ESTUDIO DE INESTABILIDAD PARA HOJAS
LÍQUIDAS DE UN POLÍMERO PRODUCIDAS POR
ATOMIZACIÓN NEUMÁTICA**

4. ESTUDIO DE INESTABILIDAD PARA HOJAS LÍQUIDAS DE UN POLÍMERO PRODUCIDAS POR ATOMIZACIÓN NEUMÁTICA

Una vez desarrollado el modelo semi-empírico que predice el tamaño de las microcápsulas, se procedió a estudiar y modelar el mecanismo de atomización, es decir, la inestabilidad que provoca la ruptura de la hoja líquida de polímero, que sale de la boquilla neumática, en pequeñas gotas.

De acuerdo con la teoría de la atomización, la desintegración de chorros y hojas líquidas es provocada por el crecimiento de ondas inestables en la interfase líquido-gas debido a las interacciones aerodinámicas entre el líquido y el gas. Debido a estas interacciones, las perturbaciones crecen en magnitud y alcanzan un valor máximo. Existe un número de onda dominante o más inestable correspondiente a la máxima relación de crecimiento. Cuando la amplitud de la perturbación alcanza un valor crítico, la onda se separa de la hoja para formar ligamentos que se vuelven inestables y rompen en gotas.

Por tanto, para modelar el complejo proceso de la atomización de una hoja líquida, anular, viscosa con componentes tangenciales, de un fluido No-newtoniano, que surge de un atomizador neumático sujeto a corrientes de aire interiores y exteriores no viscosas con componentes tangenciales, es necesario desarrollar un análisis temporal de estabilidad.

Un análisis temporal de estabilidad ayuda a determinar los efectos de las fuerzas que actúan en la interfase líquido-gas, incluyendo las fuerzas viscosas, de presión, inerciales, la tensión superficial, y la fuerza centrífuga que gobiernan el mecanismo de inestabilidad de la hoja líquida.

Con este estudio se pretende obtener la ecuación de dispersión adimensional que gobierna la inestabilidad de un flujo anular de un líquido viscoso, lo que permitirá investigar los efectos del caudal del líquido y del gas en la relación de máximo crecimiento, que puede ser relacionada con la longitud de ruptura de la hoja líquida, y por lo tanto, con el tamaño final de las microcápsulas obtenidas.

Normalmente esta ecuación se deriva y se resuelve para hojas líquidas no viscosas, ya que este análisis se utiliza, por ejemplo, para mejorar la atomización de combustibles en motores de aviones. La eliminación de la viscosidad del líquido en las ecuaciones principales no afecta demasiado en la solución en estos casos concretos. Sin embargo, en el caso de la aplicación de la microencapsulación, donde se utilizan polímeros de diferentes viscosidades, ésta no puede ser eliminada, ya que es un parámetro importante.

4.1. DEFINICIÓN Y CONCEPTO DE INESTABILIDADES

El estudio de la estabilidad de un sistema consiste en observar la evolución de una perturbación infinitesimal. Si esta perturbación es amortiguada con el transcurso del tiempo el sistema es considerado estable (en referencia a esta perturbación). Por el contrario, si la perturbación crece con el transcurso del tiempo, el sistema se considera inestable (Reitz y Bracco, 1986).

Generalizando, un sistema se considera estable si lo es en referencia a todas las perturbaciones posibles, y se considera inestable si lo es al menos en referencia a una perturbación.

Para realizar el estudio de la estabilidad de un sistema existen dos vías diferentes. La primera emplea los métodos globales, mientras que la otra se denomina análisis en modos normales.

El estudio mediante los métodos globales consiste habitualmente en determinar un potencial generalizado de producción de entropía y en la observación de la estabilidad en términos de extremos de este potencial (Ranz, 1958).

El análisis en modos normales consiste en descomponer la perturbación y examinar la estabilidad del sistema observando cada uno de los términos de la descomposición (cada uno de los modos). Físicamente, una perturbación puede expresarse como un “paquete de ondas” de extensión finita (Reitz y Bracco, 1986). Sólo podrá existir una solución al sistema si el número de onda y la frecuencia están relacionados. La ecuación que determina las re-

laciones permisibles entre ambas variables se conoce como ecuación de dispersión (Bower, 1989). En esta ecuación además de la frecuencia y el número de onda se encuentran involucrados como variables algunos parámetros adimensionales típicos de la atomización como el número de Weber. Las soluciones de la ecuación de dispersión son, en el caso más general, magnitudes complejas.

4.2. TEORÍAS DE INESTABILIDAD

Las teorías lineales de inestabilidad predicen que los chorros sujetos a la acción de la tensión superficial se desintegran en gotas de tamaño uniforme, con una gota formada por longitud de onda de perturbación, y que la forma de la superficie del chorro perturbado corresponde a una senoide que se amplifica. Las observaciones experimentales sin embargo muestran que sobre todo cerca de la zona de ruptura, la forma del chorro es diferente a la sinusoidal, y destaca la presencia de gotas pequeñas (satélite) entre las gotas de mayor tamaño. Para explicar estos fenómenos se han desarrollado trabajos experimentales y teorías no lineales por parte de numerosos investigadores entre los que se encuentran Donnelly y Glaberson (1966), Wang (1968), y Yuen (1968).

En los estudios lineales de estabilidad, solo se conservan los términos de primer orden, mientras que en el caso de teorías no lineales se conservan términos de orden superior. Los análisis lineales sólo son rigurosamente aplicables en tanto y en cuanto las amplitudes de las perturbaciones sean mucho menores que el radio del chorro no perturbado, razón por la cual alguna de las predicciones que pueden hacerse en base a ellos, tales como la longitud de ruptura, solo tienen un carácter aproximado.

Las teorías no lineales en cambio, se ajustan mucho mejor a las observaciones experimentales sobre todo cerca de la zona de ruptura, en donde la amplitud de las perturbaciones adquiere relevancia. A pesar de que las hipótesis básicas acerca del chorro, las ecuaciones de movimiento y las condiciones de contorno son las mismas que en las teorías lineales, las aproximaciones matemáticas son diferentes en este caso y permiten llegar a conclusiones distintas (Hiroyasu, H. et al., 1991). Un ejemplo de ello es la predicción de las características de las rupturas denominadas anormales (formación de gotas satélites).

A pesar de que existen varias publicaciones en las que se utiliza un tratamiento no lineal para predecir la ruptura de un chorro líquido (Ibrahim & Jog, 2006c; Ibrahim & Jog, 2008; Jazayeri, & Li, 2000; Tharakan, et al. 2002), en este trabajo se utilizó un tratamiento lineal, por ser más simple, generando unos resultados totalmente satisfactorios. En un gran número de problemas estos análisis son suficientemente precisos como para dar indicaciones confiables sobre la estabilidad de un chorro, ya que la amplitud de las perturbaciones toma importancia solo en el final de la longitud de ruptura (Arai et al., 1991). Es decir, como nos interesan las medidas lejos de la zona de ruptura, un análisis lineal es más que suficiente para predecir el comportamiento del sistema.

4.3. ANTECEDENTES RELATIVOS A LA ATOMIZACIÓN POR AIRE

Debido a la relevancia de la atomización en multitud de aplicaciones, la inestabilidad de chorros y hojas líquidas ha recibido mucha atención en la bibliografía desde el clásico estudio de Rayleigh (Lefebvre, 1989). Mehring y Sirignano (2000) y Lin (2003) han proporcionado exhaustivos estudios sobre la inestabilidad de chorros y hojas líquidas. Además, Ibrahim et al. (2006) ha resumido todo el trabajo desarrollado con hojas anulares. La presente revisión bibliográfica se restringe únicamente a estudios desarrollados con hojas líquidas anulares.

El **primer estudio** sobre inestabilidad de hojas líquidas anulares fue publicado por Ponstein (1959). En este trabajo se obtuvo una ecuación general de dispersión para hojas líquidas con componentes tangenciales con una velocidad media axial uniforme, despreciando la presencia de viscosidad del líquido y las fases gaseosas.

Posteriormente, varios estudios han examinado el **efecto de la viscosidad de la fase líquida** en la desintegración de hojas líquidas sin componentes tangenciales y chorros líquidos sujetos a perturbaciones axi-simétricas (Lin, 2003).

Li y Tankin (1991) llevaron a cabo un análisis temporal de inestabilidad de hojas líquidas finas y **viscosas** en un medio gaseoso no viscoso, encontrando que para procesos con números de Weber pequeños, la inestabilidad era controlada por perturbaciones anti-simétricas. Para este tipo de perturbaciones observaron que la viscosidad de la fase líquida aumentaba la inestabilidad para números de Weber pequeños, mientras que para números de Weber altos se reducía tanto la relación de crecimiento como el número de onda dominante. Estos autores encontraron que a números de Weber intermedios la viscosidad del líquido producía complicados efectos debidos a la interacción del aumento de viscosidad y las inestabilidades aerodinámicas.

Shen y Li (1996) llevaron a cabo un análisis temporal de inestabilidad de chorros líquidos anulares viscosos moviéndose en medios gaseosos no viscosos, extendiendo este estudio a **diferentes geometrías**, incluyendo hojas

líquidas con geometría plana, así como chorros circulares llenos y huecos. Encontraron que el proceso de inestabilidad para números de Weber altos era controlado por el modo para-anti-simétrico. Observaron que la viscosidad de la fase líquida aumentaba la inestabilidad de la hoja líquida a números de Weber pequeños para el modo para-anti-simétrico, que tiene un comportamiento similar a las hojas líquidas planas examinadas por Li y Tankin (1991). Sin embargo, se observó un efecto estabilizante de la viscosidad del líquido para números de Weber altos.

Cousin y Dumouchel (1996) investigaron el efecto de la viscosidad del líquido en **hojas planas** sujetas a una **corriente de gas no viscosa moviéndose en la dirección axial**. Observaron que la viscosidad tiene un efecto estabilizante y que el intervalo de longitudes de onda que producen el crecimiento de las perturbaciones es independiente de la viscosidad. Se concluyó que en presencia de la viscosidad y de la tensión superficial del líquido, la tensión superficial es la responsable del control del intervalo de longitudes de onda que producen el crecimiento de las perturbaciones, y la viscosidad impone las características de la onda dominante. Se obtuvo un número adimensional, $M = We_g^2 / Re_l$, que justifica la influencia de la viscosidad. Cuanto menor sea el valor de M , menor será la influencia de la viscosidad en la estabilidad lineal de la hoja. Jeandel et al. (1999) extendió este análisis para una **hoja anular líquida** sujeta a una **corriente gaseosa no viscosa que se mueve en la dirección axial**. Se observó que la influencia de la viscosidad del líquido era la más importante a altas velocidades relativas. Estos autores obtuvieron un nuevo número adimensional a partir del número adimensional M para hojas planas, para evaluar la influencia de la viscosidad en la inestabilidad de una hoja líquida anular:

$$D = g \frac{We_l}{Re} \left(\frac{R_b - R_a}{R_b} \right) \left(gWe_l + \frac{R_b}{R_a} \right) \quad (4.0.)$$

Al incrementarse el radio interno, la hoja líquida anular adopta el comportamiento de una hoja líquida plana y el parámetro D se reduce al número adimensional M .

Los modelos de viscosidad considerados hasta ahora estaban sujetos a perturbaciones axi-simétricas. Chen et al. (2003) condujo un análisis de estabilidad para una hoja anular líquida viscosa sujeta a **perturbaciones tridimensionales** en una fase gas no viscosa sin movimiento. Mediante una aproximación numérica fue probado que el modo axi-simétrico es el más inestable.

Panchagnula et al. (1996) han analizado la inestabilidad espacial de una hoja anular líquida no viscosa con **componentes tangenciales** moviéndose con velocidad axial uniforme y con la velocidad media tangencial del líquido descrita por un perfil de vortex libre.

Liao et al. (1999) han estudiado la inestabilidad temporal de una hoja anular líquida no viscosa con **componentes de velocidad tangenciales** sujeta a perturbaciones tridimensionales en un **medio gaseoso no viscoso con movimiento axial**. Para una hoja líquida compuesta únicamente con componentes de velocidad tangenciales, descritos por un perfil de vortex libre, la inestabilidad se incrementó mediante un aumento del número de Weber tangencial del líquido. Se observó que para la desintegración de una hoja líquida es más efectiva la combinación de los componentes de velocidad axial y tangencial que solo el componente axial.

Ibrahim et al. (2006) han llevado a cabo un análisis temporal lineal de inestabilidad de una hoja líquida anular no viscosa en un medio gaseoso no viscoso que se mueve axialmente. Se investigó el efecto de los componentes tangenciales del perfil de velocidad en la inestabilidad considerando como posibles variaciones el **vortex libre** y el **vortex sólido**.

Posteriormente, Ibrahim et al. (2006b) han llevado a cabo un análisis temporal lineal para investigar la inestabilidad de una hoja líquida anular con componentes tangenciales moviéndose en **corrientes de aire interiores y exteriores con componentes tangenciales**. Tanto el aire como el líquido se

consideraron no viscosos e incompresibles. Se investigó el efecto del movimiento axial y tangencial tanto del líquido como de las corrientes gaseosas, así como los efectos de la orientación relativa entre los componentes tangenciales de la parte interna y externa de las corrientes gaseosas con respecto a la dirección de los componentes tangenciales del líquido, en la inestabilidad de la hoja líquida.

Tal y como se describió previamente, en este trabajo se ha utilizado un atomizador del tipo “prefilmer”, donde el líquido es dispersado en una fina hoja cónica antes de ser expuesto a corrientes de aire a alta velocidad en la parte interna y externa de la hoja anular de líquido. Por tanto, es necesario modelar el complejo proceso de la atomización de una hoja líquida, anular, viscosa con componentes tangenciales, de un fluido no-newtoniano, que surge de un atomizador neumático sujeto a corrientes de aire interiores y exteriores no viscosas con componentes tangenciales, a través del desarrollo de un análisis temporal de estabilidad.

Normalmente el estudio de inestabilidad se realiza en líquidos no viscosos, debido a que este análisis se utiliza para mejorar la atomización de combustibles en motores de aviones. La eliminación de la viscosidad del líquido en las ecuaciones principales no afecta mucho en la solución para estos casos concretos. Sin embargo, en el caso de la aplicación de la microencapsulación, donde se utilizan polímeros, la viscosidad no se puede eliminar, ya que es un parámetro importante, especialmente cuando los polímeros tienen un comportamiento no-newtoniano. Además, debido al tipo de boquilla atomizadora utilizada es necesario tener en cuenta los componentes tangenciales, tanto del líquido como de las dos corrientes de aire (internas y externas).

Hasta ahora, no existe ningún estudio de estabilidad con estas características peculiares, típicas de un sistema de microencapsulación mediante atomización.

4.4. PLANTEAMIENTO GENERAL DEL ANÁLISIS DE ESTABILIDAD LINEAL

Entre las diferentes técnicas de atomización, la neumática (air blast atomization) o de dos fases (twin-fluid atomization) ha sido la más utilizada, después de la pulverización y secado (spray drying). El proceso de la atomización neumática es muy complejo y sus mecanismos físicos no son del todo comprendidos (Lefebvre, 1989). De acuerdo con la teoría de la atomización, la desintegración de chorros y hojas líquidas es provocada por el crecimiento de ondas inestables en la interfase líquido-gas debido a las interacciones aerodinámicas entre el líquido y el gas.

Por tanto, para modelar el complejo proceso de la atomización es necesario desarrollar un análisis temporal de estabilidad. Con este estudio se pretende obtener una ecuación de dispersión adimensional que gobierne la inestabilidad del flujo del fluido.

4.4.1. Suposiciones del modelo

El modelo de estabilidad considera una hoja anular de líquido viscoso con componentes de velocidad tangenciales sujeta a corrientes de aire con componentes asimismo tangenciales, como se muestra en la Figura 4.1.

Las corrientes de aire se asumen como incompresibles y no viscosas. Las velocidades para el líquido y las corrientes internas y externas de aire se asumen como $(U_l, 0, A_l/r)$, $(U_i, 0, \Omega r)$, $(U_o, 0, A_o/r)$, respectivamente. El componente tangencial del perfil de velocidad de la capa interna de aire se asume como la rotación de un cuerpo sólido, mientras que el de la capa externa de aire y de la hoja líquida se asume como un vortex libre. Los perfiles de velocidad supuestos son similares a los de un atomizador neumático (Rizk y Mongia, 1991).

Además, con el objetivo de suprimir los términos no lineales en las ecuaciones, la amplitud de la perturbación será asumida muy pequeña en comparación con su longitud de onda y el espesor de la hoja líquida.

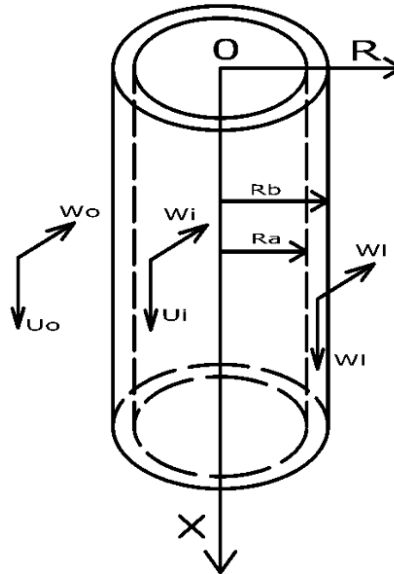


Figura 4.1. Hoja anular de líquido viscoso sujeta a corrientes de aire.

4.4.2. Ecuaciones de perturbación linealizadas

La ecuación de continuidad y las ecuaciones de movimiento (Navier-Stokes) gobiernan el flujo de fluidos viscosos, que en coordenadas cilíndricas se expresan como:

Ecuación de continuidad:

$$\frac{V}{r} + \frac{\partial V}{\partial r} + \frac{1}{r} \frac{\partial W}{\partial \theta} + \frac{\partial U}{\partial x} = 0 \quad (4.1)$$

Ecuaciones de movimiento (Navier-Stokes):

$$\begin{aligned} \frac{\partial U}{\partial t} + V \frac{\partial U}{\partial r} + \frac{W}{r} \frac{\partial U}{\partial \theta} + U \frac{\partial U}{\partial x} = \frac{-1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial x} + \\ + \nu \left(\frac{\partial^2 U}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial U}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 U}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 U}{\partial x^2} \right) \end{aligned} \quad (4.2)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial V}{\partial t} + V \frac{\partial V}{\partial r} + \frac{W}{r} \frac{\partial V}{\partial \theta} + U \frac{\partial V}{\partial x} - \frac{W^2}{r} = \frac{-1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial r} + \\ + \nu \left(\frac{\partial^2 V}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial V}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 V}{\partial \theta^2} - \frac{V}{r^2} - \frac{2}{r^2} \frac{\partial W}{\partial \theta} + \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} \right) \end{aligned} \quad (4.3)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial W}{\partial t} + V \frac{\partial W}{\partial r} + \frac{W}{r} \frac{\partial W}{\partial \theta} + U \frac{\partial W}{\partial x} + \frac{VW}{r} = \frac{-1}{\rho r} \frac{\partial p}{\partial \theta} + \\ + \nu \left(\frac{\partial^2 W}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial W}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 W}{\partial \theta^2} - \frac{W}{r^2} + \frac{2}{r^2} \frac{\partial V}{\partial \theta} + \frac{\partial^2 W}{\partial x^2} \right) \end{aligned} \quad (4.4)$$

Para obtener las ecuaciones de las perturbaciones linealizadas se supone que la velocidad es de la forma:

$$U = \bar{U} + u, \quad V = v, \quad W = \bar{W} + w, \quad P = \bar{P} + p \quad (4.5)$$

donde la barra superior representa las magnitudes medias del flujo, y las letras minúsculas indican las perturbaciones.

Las perturbaciones se asumen en la forma de una onda (análisis en modo normal):

$$(u, v, w, p) = (\hat{u}(r), \hat{v}(r), \hat{w}(r), \hat{p}(r)) e^{i(kx+n\theta-\omega t)} \quad (4.6)$$

donde $\hat{\cdot}$ representa la amplitud de la perturbación que es únicamente función del radio. Los números de onda k y n son reales, mientras que la frecuencia ω es compleja. El máximo valor de la parte imaginaria de ω representa la máxima relación de crecimiento y el valor correspondiente de k representa el número de onda más inestable.

Las ondas inestables que se desarrollan en las superficies interior y exterior de la hoja líquida pueden estar o no en fase. En el caso de hojas líquidas planas, cuando las ondas se producen con una diferencia de fase de π , entonces éstas son simétricas con respecto al plano medio de la hoja líquida, y este tipo de inestabilidad es denominado como modo simétrico o varicoso, como se puede observar en la Figura 4.2. En el caso de que las ondas se desarrollen en fase, estas son anti-simétricas con respecto al plano medio de la hoja líquida, y este tipo de inestabilidad es denominado como modo anti-simétrico o sinusoidal, como puede observarse en la Figura 4.2.

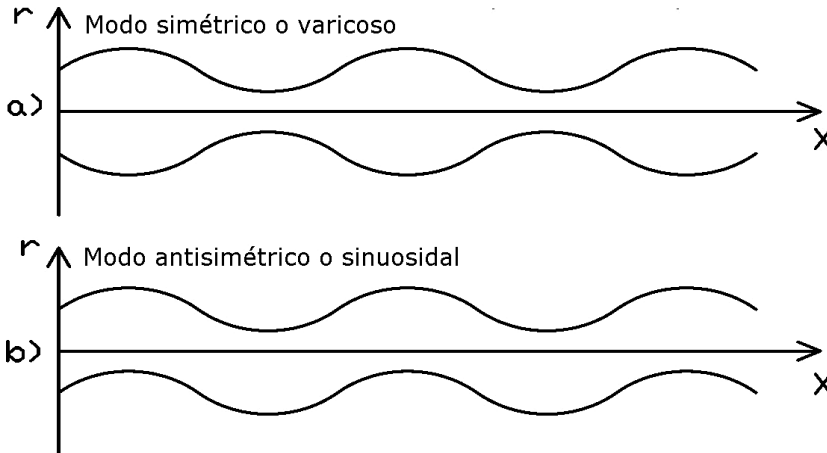


Figura 4.2. Descripción esquemática de los modos en los que se desarrollan las ondas superficiales

Squire (1953) fue el primero en investigar de forma teórica la inestabilidad de hojas líquidas planas no viscosas. Consideró los dos tipos de

inestabilidad, encontrando que el modo anti-simétrico dominaba el crecimiento de perturbaciones infinitesimales. El estudio de Dombrowski y Hooper (1962) mostró que el grado de inestabilidad del modo varicoso es mucho menor que el del modo sinusoidal. En otras palabras, es esperable que las ondas sinusoidales predominen durante la ruptura de la hoja líquida. Estas conclusiones fueron validadas por importantes estudios (Hagerty y Shea, 1955; Dombrowski y Johns, 1963; Clark y Dombrowski, 1972).

Posteriormente, se han llevado a cabo estudios sobre inestabilidad tanto espacial como temporal de hojas líquidas viscosas (Li y Tankin 1991 y Cousin y Dumouchel, 1996). Todos ellos encontraron que el modo simétrico es el dominante a números de Weber bajos, mientras que para números de Weber altos domina el modo antisimétrico.

Sin embargo, en el caso de hojas líquidas anulares, la diferencia de fase puede ser cercana a π , o a cero, conociéndose este tipo de inestabilidades como modo para-simétrico o para-varicoso y modo para-anti-simétrico o para-sinusoidal, respectivamente (Shen y Li, 1996).

Por tanto, en el presente estudio, para el análisis del crecimiento de las ondas sólo se consideraron perturbaciones para-sinusoidales.

La perturbación de desplazamiento para las superficies interior y exterior de la hoja líquida pueden expresarse como:

$$\eta_i(x, \theta, t) = \eta_i e^{i(kx+n\theta-\omega t)+i\phi} \quad (4.7)$$

$$\eta_o(x, \theta, t) = \eta_o e^{i(kx+n\theta-\omega t)} \quad (4.8)$$

donde ϕ representa la diferencia de fase entre el desplazamiento en la parte interna y externa de la interfase.

Sustituyendo la ecuación (4.5) y los componentes de velocidad en las ecuaciones (4.1-4.4), substrayendo la velocidad media y despreciando los términos de segundo orden, se obtienen las ecuaciones linealizadas para las perturbaciones:

$$\frac{v}{r} + \frac{\partial v}{\partial r} + \frac{1}{r} \frac{\partial w}{\partial \theta} + \frac{\partial u}{\partial x} = 0 \quad (4.9)$$

$$\frac{\partial u}{\partial t} + \frac{A_l}{r^2} \frac{\partial u}{\partial \theta} + U_l \frac{\partial u}{\partial x} = \frac{-1}{\rho_l} \frac{\partial p}{\partial x} + v \left(\frac{\partial^2 u}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial u}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 u}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} \right) \quad (4.10)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial v}{\partial t} + \frac{A_l}{r^2} \frac{\partial v}{\partial \theta} + U_l \frac{\partial v}{\partial x} - \frac{2wA_l}{r^2} = \frac{-1}{\rho_l} \frac{\partial p}{\partial r} + \\ + v \left(\frac{\partial^2 v}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial v}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 v}{\partial \theta^2} - \frac{v}{r^2} - \frac{2}{r^2} \frac{\partial w}{\partial \theta} + \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} \right) \end{aligned} \quad (4.11)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial w}{\partial t} + \frac{A_l}{r^2} \frac{\partial w}{\partial \theta} + U_l \frac{\partial w}{\partial x} = \frac{-1}{\rho_l r} \frac{\partial p}{\partial \theta} + \\ + v \left(\frac{\partial^2 w}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial w}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 w}{\partial \theta^2} - \frac{w}{r^2} + \frac{2}{r^2} \frac{\partial v}{\partial \theta} + \frac{\partial^2 w}{\partial x^2} \right) \end{aligned} \quad (4.12)$$

De manera similar se obtienen las ecuaciones linealizadas para las perturbaciones de los componentes gaseosos.

$$\frac{v}{r} + \frac{\partial v}{\partial r} + \frac{1}{r} \frac{\partial w}{\partial \theta} + \frac{\partial u}{\partial x} = 0 \quad (4.13)$$

$$\frac{\partial u}{\partial t} + \frac{W_j}{r} \frac{\partial u}{\partial \theta} + U_j \frac{\partial u}{\partial x} = \frac{-1}{\rho_l} \frac{\partial p_j}{\partial x} \quad (4.14)$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} + \frac{W_j}{r} \frac{\partial v}{\partial \theta} + U_j \frac{\partial v}{\partial x} - \frac{2wW_j}{r^2} = \frac{-1}{\rho_l} \frac{\partial p_j}{\partial r} \quad (4.15)$$

$$\frac{\partial w}{\partial t} + \frac{W_j}{r} \frac{\partial w}{\partial \theta} + U_j \frac{\partial w}{\partial x} + \frac{vW_j}{r} + v \frac{\partial W_j}{\partial r} = \frac{-1}{\rho_j r} \frac{\partial p_j}{\partial \theta} \quad (4.16)$$

donde $j = i, o$ y $W_i = \Omega r$, $W_o = A_o / r$

4.4.3. Adimensionalización

Para determinar los efectos de las fuerzas viscosas, las propiedades de los fluidos y otros parámetros geométricos, las ecuaciones linealizadas son adimensionalizadas introduciendo los parámetros adimensionales mostrados en la Figura 4.3.

$We_l = \frac{\rho_l U_l^2 D_b}{\sigma}$	$We_i = \frac{\rho_i U_i^2 D_b}{\sigma}$	$We_o = \frac{\rho_o U_o^2 D_b}{\sigma}$	$h = \frac{R_a}{R_b}$
$We_s = \frac{\rho_l W_l^2 D_b}{\sigma}$	$We_{si} = \frac{\rho_i W_i^2 D_b}{\sigma}$	$We_{so} = \frac{\rho_o W_o^2 D_b}{\sigma}$	$\bar{k} = kR_b$
$\bar{\omega} = \frac{\omega R_b}{U_l}$	$g_i = \frac{\rho_i}{\rho_l}$	$g_o = \frac{\rho_o}{\rho_l}$	$Z = \frac{\mu_l}{(\rho_l \sigma D_b)^{1/2}}$
$\frac{U_i}{U_l} = \sqrt{\frac{We_i}{We_l} \frac{1}{g_i}}$	$\frac{U_o}{U_l} = \sqrt{\frac{We_o}{We_l} \frac{1}{g_o}}$	$\frac{A_l}{U_l R_b} = \sqrt{\frac{We_s}{We_l}}$	
$\frac{A_o}{U_l R_b} = \sqrt{\frac{We_{so}}{We_l} \frac{1}{g_o}}$	$\frac{\Omega R_b}{U_l} = \sqrt{\frac{We_{si}}{We_l} \frac{1}{g_i}}$	$\bar{s} = \left(\bar{k}^2 + \frac{1}{Z} (-i\bar{\omega} + i\bar{k}) \right)^{1/2}$	

Figura 4.3. Parámetros adimensionales utilizados en la adimensionalización

Como parámetros adimensionales se han incluido el número de Weber que representa la relación entre la fuerza aerodinámica y la tensión superficial, y el número de Ohnesorge que contiene sólo las propiedades de los glóbulos formados en la atomización primaria antes de romperse en pequeñas gotas durante la atomización secundaria. Este último grupo es llamado grupo de estabilidad porque proporciona una indicación de la resistencia del glóbulo para una mayor desintegración, pero también es llamado grupo de viscosidad porque tiene en cuenta el efecto de la viscosidad del líquido en el glóbulo.

Sustituyendo los parámetros adimensionales de la Figura 4.3. en las ecuaciones (4.9-4.12) y teniendo en cuenta la ecuación (4.6), se obtienen las ecuaciones de perturbación adimensionalizadas para el caso de la fase líquida:

$$\hat{u}(i\bar{k}) + \frac{d\hat{v}}{dr} + \frac{\hat{v}}{r} + \frac{\hat{w}}{r}(ni) = 0 \quad (4.17)$$

$$\hat{u}\left(-i\bar{\omega} + \sqrt{\frac{We_s}{We_l}} \frac{in}{r^2} + i\bar{k}\right) = -i\bar{k}\hat{p} + Z\left(\frac{d^2\hat{u}}{dr^2} + \frac{1}{r}\frac{d\hat{u}}{dr} - \frac{\hat{u}}{r^2}\left(n^2 + \bar{k}^2 r^2\right)\right) \quad (4.18)$$

$$\begin{aligned} \hat{v}\left(-i\bar{\omega} + \sqrt{\frac{We_s}{We_l}} \frac{in}{r^2} + i\bar{k}\right) - 2\sqrt{\frac{We_s}{We_l}} \frac{\hat{w}}{r^2} = -\frac{d\hat{p}}{dr} + \\ + Z\left(\frac{d^2\hat{v}}{dr^2} + \frac{1}{r}\frac{d\hat{v}}{dr} - \frac{\hat{v}}{r^2}\left(n^2 + \bar{k}^2 r^2 + 1\right) - \frac{2\hat{w}ni}{r^2}\right) \end{aligned} \quad (4.19)$$

$$\begin{aligned} \hat{w}\left(-i\bar{\omega} + \sqrt{\frac{We_s}{We_l}} \frac{in}{r^2} + i\bar{k}\right) = -\frac{\hat{p}ni}{r} + \\ + Z\left(\frac{d^2\hat{w}}{dr^2} + \frac{1}{r}\frac{d\hat{w}}{dr} - \frac{\hat{w}}{r^2}\left(n^2 + \bar{k}^2 r^2 + 1\right) - \frac{2\hat{v}ni}{r^2}\right) \end{aligned} \quad (4.20)$$

Las ecuaciones de perturbación adimensionalizadas para el caso de la fase gas son:

Superficie interna:

$$\hat{u}(i\bar{k}) + \frac{d\hat{v}}{dr} + \frac{\hat{v}}{r} + \frac{\hat{w}}{r}(ni) = 0 \quad (4.21)$$

$$\hat{u} \left(-i\bar{\omega} + in \sqrt{\frac{We_{si}}{We_l} \frac{1}{g_i}} + i\bar{k} \sqrt{\frac{We_i}{We_l} \frac{1}{g_i}} \right) = -\frac{1}{g_i} i\bar{k} \hat{p} \quad (4.22)$$

$$\hat{v} \left(-i\bar{\omega} + in \sqrt{\frac{We_{si}}{We_l} \frac{1}{g_i}} + i\bar{k} \sqrt{\frac{We_i}{We_l} \frac{1}{g_i}} \right) - 2\hat{w} \sqrt{\frac{We_{si}}{We_l} \frac{1}{g_i}} = -\frac{1}{g_i} \frac{d\hat{p}}{dr} \quad (4.23)$$

$$\hat{w} \left(-i\bar{\omega} + in \sqrt{\frac{We_{si}}{We_l} \frac{1}{g_i}} + i\bar{k} \sqrt{\frac{We_i}{We_l} \frac{1}{g_i}} \right) - 2\hat{v} \sqrt{\frac{We_{si}}{We_l} \frac{1}{g_i}} = -\frac{1}{g_i} \frac{\hat{p}ni}{r} \quad (4.24)$$

Superficie externa:

$$\hat{u}(i\bar{k}) + \frac{d\hat{v}}{dr} + \frac{\hat{v}}{r} + \frac{\hat{w}}{r}(ni) = 0 \quad (4.25)$$

$$\hat{u} \left(-i\bar{\omega} + \frac{in}{r^2} \sqrt{\frac{We_{so}}{We_l} \frac{1}{g_o}} + i\bar{k} \sqrt{\frac{We_o}{We_l} \frac{1}{g_o}} \right) = -\frac{1}{g_o} i\bar{k} \hat{p} \quad (4.26)$$

$$\hat{v} \left(-i\bar{\omega} + \frac{in}{r^2} \sqrt{\frac{We_{so}}{We_l} \frac{1}{g_o}} + i\bar{k} \sqrt{\frac{We_o}{We_l} \frac{1}{g_o}} \right) - 2\frac{\hat{w}}{r^2} \sqrt{\frac{We_{so}}{We_l} \frac{1}{g_o}} = -\frac{1}{g_o} \frac{d\hat{p}}{dr} \quad (4.27)$$

$$\hat{w} \left(-i\bar{\omega} + \frac{in}{r^2} \sqrt{\frac{We_{so}}{We_l} \frac{1}{g_o}} + i\bar{k} \sqrt{\frac{We_o}{We_l} \frac{1}{g_o}} \right) = -\frac{1}{g_o} \frac{\hat{p}ni}{r} \quad (4.28)$$

4.4.4. Condiciones de contorno

Las siguientes condiciones de contorno son necesarias para resolver las ecuaciones linealizadas obtenidas anteriormente:

Condición de contorno cinemática: una partícula de fluido en la superficie de la interfase se mueve con la superficie, por lo tanto, permanece en la superficie, o en otras palabras, el componente de la velocidad normal a la interfase es continuo a través de la interfase:

Líquido:

$$v_l = \frac{D\eta_i}{Dt} = \frac{\partial\eta_i}{\partial t} + \frac{\partial\eta_i}{\partial\theta} \sqrt{\frac{We_s}{We_l}} + \frac{\partial\eta_i}{\partial x} \quad \text{para } r=h \quad (4.29)$$

$$v_l = \frac{D\eta_o}{Dt} = \frac{\partial\eta_o}{\partial t} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial\eta_o}{\partial\theta} \sqrt{\frac{We_s}{We_l}} + \frac{\partial\eta_o}{\partial x} \quad \text{para } r=1 \quad (4.30)$$

Superficie interna de la fase gas:

$$v_i = \frac{D\eta_i}{Dt} = \frac{\partial\eta_i}{\partial t} + \frac{\partial\eta_i}{\partial\theta} \sqrt{\frac{We_{si}}{We_l} \frac{1}{g_i}} + \frac{\partial\eta_i}{\partial x} \sqrt{\frac{We_i}{We_l} \frac{1}{g_i}} \quad \text{para } r=h \quad (4.31)$$

Superficie externa de la fase gas:

$$v_o = \frac{D\eta_o}{Dt} = \frac{\partial\eta_o}{\partial t} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial\eta_o}{\partial\theta} \sqrt{\frac{We_{so}}{We_l} \frac{1}{g_o}} + \frac{\partial\eta_o}{\partial x} \sqrt{\frac{We_o}{We_l} \frac{1}{g_o}} \quad \text{para } r=1 \quad (4.32)$$

Suposición de no viscosidad en la corriente gaseosa: en la interfase líquido-gas la carga por viscosidad es igual a cero:

$$\frac{\partial u}{\partial r} + \frac{\partial v}{\partial x} = 0 \quad \text{para } r = h, 1 \quad (4.33)$$

$$\frac{\partial w}{\partial r} - \frac{w}{r} + \frac{1}{r} \frac{\partial v}{\partial \theta} = 0 \quad \text{para } r = h, 1 \quad (4.34)$$

Condición de contorno dinámica: esta condición considera el balance entre las cargas de superficie en ambos lados de la interfase líquido-gas, incluyendo el salto de presión a través de la superficie debido a la tensión superficial y las fuerzas viscosas:

$$p_l - p_i = \frac{1}{h^2 We_l} \left(\eta_i + \frac{\partial^2 \eta_i}{\partial \theta^2} + h^2 \frac{\partial^2 \eta_i}{\partial x^2} \right) + \\ + h \frac{We_{si}}{We_l} \eta_i - \frac{We_s}{We_l} \frac{\eta_i}{h^3} + 2Z \frac{\partial v}{\partial r} \quad \text{para } r = h \quad (4.35)$$

$$p_l - p_o = \frac{-1}{We_l} \left(\eta_o + \frac{\partial^2 \eta_o}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 \eta_o}{\partial x^2} \right) + \\ + \frac{We_{so}}{We_l} \eta_o - \frac{We_s}{We_l} \eta_o + 2Z \frac{\partial v}{\partial r} \quad \text{para } r = 1 \quad (4.36)$$

Las ecuaciones (4.17-4.28) son las ecuaciones que gobiernan el proceso, y las ecuaciones (4.29-4.36) proporcionan las condiciones de contorno para un planteamiento general del problema, considerando una hoja líquida anular viscosa sujeta a perturbaciones tridimensionales en corrientes gaseosas no viscosas. En el siguiente apartado se considera el caso simplificado de perturbaciones axi-simétricas ($n=0$).

4.5. PLANTEAMIENTO SIMPLIFICADO DEL ANÁLISIS DE ESTABILIDAD LINEAL

4.5.1. Suposiciones del modelo

Como se consideran perturbaciones tridimensionales, las dos ondas superficiales pueden también ser axi-simétricas ($n=0$) o no axi-simétricas ($n \geq 1$) respecto al eje central de la hoja líquida. Varios autores después del estudio de la desintegración de hojas líquidas han llegado a la conclusión de que el modo axi-simétrico es el modo más inestable del sistema. Li y Tankin (1991) condujeron un análisis temporal de inestabilidad de hojas viscosas sujeto a corrientes gaseosas no viscosas y encontraron que las perturbaciones axi-simétricas controlaban el proceso de inestabilidad para números de Weber pequeños. Liao et al. (2001) encontraron que el modo axi-simétrico es el dominante. Chen et al. (2003) llevaron a cabo un análisis lineal de estabilidad de hojas viscosas sujeto a corrientes tridimensionales gaseosas mostrando que el modo axi-simétrico era el más inestable en el sistema estudiado.

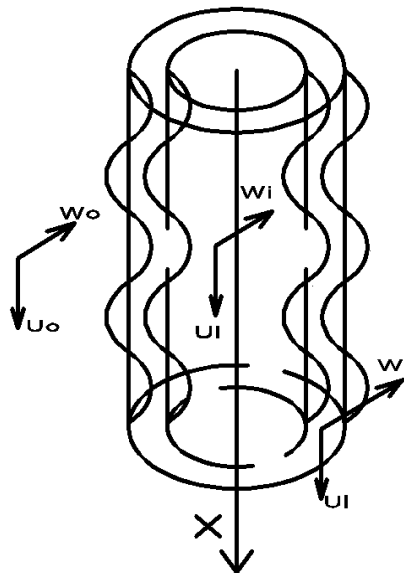


Figura 4.4. Hoja anular de líquido viscoso sujeta a perturbaciones axi-simétricas

Por lo tanto, se ha restringido el presente análisis al modo axisimétrico, considerando la perturbación en la dirección tangencial igual a cero, es decir, $\hat{w} = 0$. Las velocidades para el líquido, y las corrientes internas y externas de aire se asumen como $(U_l, 0, A_l / r)$, $(U_i, 0, \Omega r)$, $(U_o, 0, A_o / r)$, respectivamente (Figura 4.4.).

4.5.2. Ecuaciones de perturbación lineales adimensionalizadas

Para el modelo y simplificaciones descritas, las ecuaciones de perturbación para la **fase líquida** son:

$$\hat{u}(i\bar{k}) + \frac{d\hat{v}}{dr} + \frac{v}{r} = 0 \quad (4.37)$$

$$\hat{u}(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) = -i\bar{k}\hat{p} + Z \left(\frac{d^2\hat{u}}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{u}}{dr} - \frac{\hat{u}}{r^2} (\bar{k}^2 r^2) \right) \quad (4.38)$$

$$\hat{v}(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) = -\frac{d\hat{p}}{dr} + Z \left(\frac{d^2\hat{v}}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{v}}{dr} - \frac{\hat{v}}{r^2} (\bar{k}^2 r^2 + 1) \right) \quad (4.39)$$

En el caso de la **fase gas**, las ecuaciones son:

Superficie interna de la fase gas:

$$\hat{u}(i\bar{k}) + \frac{d\hat{v}}{dr} + \frac{v}{r} = 0 \quad (4.40)$$

$$\hat{u} \left(-i\bar{\omega} + i\bar{k} \sqrt{\frac{We_i}{We_l} \frac{1}{g_i}} \right) = -\frac{1}{g_i} i\bar{k}\hat{p} \quad (4.41)$$

$$\hat{v} \left(-i\bar{\omega} + i\bar{k} \sqrt{\frac{We_i}{We_l} \frac{1}{g_i}} \right) = -\frac{1}{g_i} \frac{d\hat{p}}{dr} \quad (4.42)$$

Superficie externa de la fase gas:

$$\hat{u}(\bar{k}) + \frac{d\hat{v}}{dr} + \frac{v}{r} = 0 \quad (4.43)$$

$$\hat{u} \left(-i\bar{\omega} + i\bar{k} \sqrt{\frac{We_o}{We_l} \frac{1}{g_o}} \right) = -\frac{1}{g_o} i\bar{k} \hat{p} \quad (4.44)$$

$$\hat{v} \left(-i\bar{\omega} + i\bar{k} \sqrt{\frac{We_o}{We_o} \frac{1}{g_i}} \right) = -\frac{1}{g_o} \frac{d\hat{p}}{dr} \quad (4.45)$$

4.5.3. Condiciones de contorno

Las siguientes condiciones de contorno son necesarias para resolver las ecuaciones linealizadas obtenidas anteriormente:

a) Condición de contorno cinemática:

Líquido:

$$v_l = \frac{\partial \eta_i}{\partial t} + \frac{\partial \eta_i}{\partial x} \quad \text{para } r = h \quad (4.46)$$

$$v_l = \frac{\partial \eta_o}{\partial t} + \frac{\partial \eta_o}{\partial x} \quad \text{para } r = 1 \quad (4.47)$$

Superficie interna de la fase gas:

$$v_i = \frac{\partial \eta_i}{\partial t} + \frac{\partial \eta_i}{\partial x} \sqrt{\frac{We_i}{We_l} \frac{1}{g_i}} \quad \text{para } r = h \quad (4.48)$$

Superficie externa de la fase gas:

$$v_o = \frac{\partial \eta_o}{\partial t} + \frac{\partial \eta_o}{\partial x} \sqrt{\frac{We_o}{We_l} \frac{1}{g_o}} \quad \text{para } r = 1 \quad (4.49)$$

b) Suposición de no viscosidad en la corriente gaseosa: como la perturbación en la dirección azimutal es cero, la segunda ecuación general de esta condición de contorno es eliminada, por lo que se reduce en este caso simplificado en:

$$\frac{\partial u}{\partial r} + \frac{\partial v}{\partial x} = 0 \quad \text{para } r = h, 1 \quad (4.50)$$

c) Condición de contorno dinámica:

$$p_l - p_i = \frac{1}{h^2 We_l} \left(\eta_i + h^2 \frac{\partial^2 \eta_i}{\partial x^2} \right) + h \frac{We_{sl}}{We_l} \eta_i - \frac{We_s}{We_l} \frac{\eta_i}{h^3} + 2Z \frac{\partial v}{\partial r} \quad \text{para } r = h \quad (4.51)$$

$$p_l - p_o = \frac{-1}{We_l} \left(\eta_o + \frac{\partial^2 \eta_o}{\partial x^2} \right) + \frac{We_{so}}{We_l} \eta_o - \frac{We_s}{We_l} \eta_o + 2Z \frac{\partial v}{\partial r} \quad \text{para } r = 1 \quad (4.52)$$

En resumen, para resolver las ecuaciones (4.37-4.45) se requieren las ecuaciones de las condiciones de contorno (4.46-4.52).

4.5.4. Perturbación de presión dentro de la hoja líquida

Ya que las ecuaciones que gobiernan el proceso (4.37-4.39) son lineales, es posible descomponer la solución en dos partes: la no viscosa y la viscosa:

$$\hat{u} = \hat{u}_1 + \hat{u}_2 \quad (4.53)$$

$$\hat{v} = \hat{v}_1 + \hat{v}_2 \quad (4.54)$$

donde los subíndices 1 y 2 representan la parte no viscosa y viscosa de las perturbaciones de velocidad, respectivamente (Sarasua y Sicardi, 2000). Por tanto las ecuaciones pueden ser escritas como:

$$\hat{u}_1(i\bar{k}) + \frac{d\hat{v}_1}{dr} + \frac{\hat{v}_1}{r} = 0 \quad (4.55)$$

$$\hat{u}_1(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) = -i\bar{k}\hat{p} \quad (4.56)$$

$$\hat{v}_1(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) = -\frac{d\hat{p}}{dr} \quad (4.57)$$

$$\hat{u}_2(i\bar{k}) + \frac{d\hat{v}_2}{dr} + \frac{\hat{v}_2}{r} = 0 \quad (4.58)$$

$$\hat{u}_2(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) = Z \left(\frac{d^2\hat{u}_2}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{u}_2}{dr} - \frac{\hat{u}_2}{r^2} \left(\bar{k}^2 r^2 \right) \right) \quad (4.59)$$

$$\hat{v}_2(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) = Z \left(\frac{d^2 \hat{v}_2}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{v}_2}{dr} - \frac{\hat{v}_2}{r^2} (\bar{k}^2 r^2 + 1) \right) \quad (4.60)$$

Diferenciando la ecuación (4.56) respecto a r y eliminando \hat{p} de las ecuaciones (4.56) y (4.57):

$$\hat{v}_1 = -\frac{1}{ik} \frac{d\hat{u}_1}{dr} \quad (4.61)$$

Sustituyendo la ecuación (4.61) en la ecuación (4.55):

$$\left(\frac{d^2 \hat{u}_1}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{u}_1}{dr} - \frac{\hat{u}_1}{r^2} (\bar{k}^2 r^2) \right) = 0 \quad (4.62)$$

La ecuación anterior es una ecuación de Bessel que tiene una solución del tipo:

$$\hat{u}_1 = C_1 I_0(\bar{k}r) + C_2 K_0(\bar{k}r) \quad (4.63)$$

Sustituyendo la ecuación (4.63) en las ecuaciones (4.61) y (4.56):

$$\hat{v}_1 = -iC_1 I_1(\bar{k}r) + iC_2 K_1(\bar{k}r) \quad (4.64)$$

$$\hat{p} = \frac{\bar{\omega} - \bar{k}}{\bar{k}} (C_1 I_0(\bar{k}r) + C_2 K_0(\bar{k}r)) \quad (4.65)$$

Suponiendo:

$$\bar{s}^2 = \left(\bar{k}^2 + \frac{1}{Z} (-i\bar{\omega} + i\bar{k}) \right) \quad (4.66)$$

Reordenando las ecuaciones (4.59) y (4.60) y utilizando la ecuación (4.66) se obtienen las ecuaciones de Bessel para los componentes viscosos de la velocidad que están dados por las ecuaciones (4.67) y (4.68), respectivamente:

$$\left(\frac{d^2 \hat{u}_2}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{u}_2}{dr} - \frac{\hat{u}_2}{r^2} \left(\bar{s}^2 r^2 \right) \right) = 0 \quad (4.67)$$

$$\left(\frac{d^2 \hat{v}_2}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{v}_2}{dr} - \frac{\hat{v}_2}{r^2} \left(\bar{s}^2 r^2 + 1 \right) \right) = 0 \quad (4.68)$$

Las soluciones a las ecuaciones (4.67) y (4.68) se pueden expresar como:

$$\hat{u}_2 = M_1 I_0(\bar{s}r) + M_2 K_0(\bar{s}r) \quad (4.69)$$

$$\hat{v}_2 = M_3 I_1(\bar{s}r) + M_4 K_1(\bar{s}r) \quad (4.70)$$

Sustituyendo las ecuaciones anteriores en la ecuación de continuidad, la ecuación (4.58), y utilizando las relaciones de recurrencia dadas en el apéndice II (A):

$$\left(i\bar{k}M_1 + \bar{s}M_3 \right) I_0(\bar{s}r) + \left(i\bar{k}M_2 - \bar{s}M_4 \right) K_0(\bar{s}r) = 0 \quad (4.71)$$

Ya que $I_0(\bar{s}r)$ y $K_0(\bar{s}r)$ son funciones linealmente independientes de $\bar{s}r$:

$$\left(i\bar{k}M_1 + \bar{s}M_3 \right) = 0 \quad (4.72)$$

$$\left(i\bar{k}M_2 - \bar{s}M_4 \right) = 0 \quad (4.73)$$

Las ecuaciones anteriores pueden ser reducidas de tal forma que se consigan las siguientes relaciones entre constantes:

$$M_1 = -\left(\frac{\bar{s}}{ik}\right)M_3 \quad (4.74)$$

$$M_2 = -\left(\frac{\bar{s}}{ik}\right)M_4 \quad (4.75)$$

Utilizando las ecuaciones (4.53) y (4.54) pueden obtenerse los componentes totales de velocidad:

$$\hat{u} = C_1 I_0(\bar{kr}) + C_2 K_0(\bar{kr}) + M_1 I_0(\bar{sr}) + M_2 K_0(\bar{sr}) \quad (4.76)$$

$$\hat{v} = -iC_1 I_1(\bar{kr}) + iC_2 K_1(\bar{kr}) + M_3 I_1(\bar{sr}) + M_4 K_1(\bar{sr}) \quad (4.77)$$

Utilizando las condiciones de contorno, ecuaciones (4.46), (4.47), y (4.50), y utilizando las relaciones de las ecuaciones (4.74) y (4.75), fueron determinadas las constantes C_1 , C_2 , M_1 , M_2 , M_3 , y M_4 :

$$C_1 = \frac{i(-i\bar{\omega} + ik)}{l_{18} I_1(kh)} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} l_{16} - \hat{\eta}_o l_{17}) \quad (4.78)$$

$$C_2 = \frac{2\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + ik)}{l_{13}} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_1(\bar{k}) l_{14} - \hat{\eta}_o l_{15}) \quad (4.79)$$

$$M_1 = \frac{2\bar{k}\bar{s}i(-i\bar{\omega} + ik)}{l_9 l_{11}} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_1(\bar{k}) l_{12} - \hat{\eta}_o l_9 l_{10}) \quad (4.80)$$

$$M_2 = \frac{2\bar{k}\bar{s}i(-i\bar{\omega} + i\bar{k})}{l_{11}} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_1(\bar{k}) l_4 l_6 - \hat{\eta}_o l_9) \quad (4.81)$$

$$M_3 = \frac{2\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})}{l_9 l_{11}} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_1(\bar{k}) l_{12} - \hat{\eta}_o l_9 l_{10}) \quad (4.82)$$

$$M_4 = -\frac{2\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})}{l_{11}} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_1(\bar{k}) l_4 l_6 - \hat{\eta}_o l_9) \quad (4.83)$$

El valor de los coeficientes está disponible en el Apéndice II (B).

La perturbación de presión dentro de la hoja líquida, ecuación (4.65), puede expresarse como:

$$p_i = \frac{\bar{\omega} - \bar{k}}{\bar{k}} \left(\frac{2\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})}{l_{13}} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_1(\bar{k}) l_{14} - \hat{\eta}_o l_{15}) I_0(\bar{k}r) + \right. \\ \left. + \frac{2\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})}{l_{13}} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_1(\bar{k}) l_{14} - \hat{\eta}_o l_{15}) K_0(\bar{k}r) \right) e^{i(\bar{k}x - \bar{\omega}t)} \quad (4.84)$$

4.5.5. Perturbación de presión en la superficie interior de la fase gas

La perturbación de presión en la superficie interior de la fase gas se obtiene resolviendo las ecuaciones (4.40-4.42). Diferenciando la ecuación (4.41) con respecto r y eliminando \hat{p} de las ecuaciones (4.41) y (4.42) se obtiene:

$$\hat{v} = -\frac{1}{ik} \frac{d\hat{u}}{dr} \quad (4.85)$$

Sustituyendo la ecuación (4.85) en la ecuación (4.40) se obtiene una ecuación de Bessel:

$$\left(\frac{d^2 \hat{u}}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{u}}{dr} - \frac{\hat{u}}{r^2} \left(\bar{k}^2 r^2 \right) \right) = 0 \quad (4.86)$$

La ecuación de Bessel anterior tiene una solución del tipo:

$$\hat{u} = C_3 I_0(\bar{k}r) + C_4 K_0(\bar{k}r) \quad (4.87)$$

Sustituyendo la ecuación (4.87) en la ecuación (4.85):

$$\hat{v} = -iC_3 I_1(\bar{k}r) + iC_4 K_1(\bar{k}r) \quad (4.88)$$

Para la superficie interior de la fase gas, cuando $r \rightarrow 0$, $K_0(\bar{k}r) \rightarrow \infty$, ya que la amplitud de la perturbación de velocidad está limitada al eje central de la hoja líquida. Por lo tanto, $C_4 = 0$ y la ecuaciones (4.87) y (4.88) se reducen a:

$$\hat{u} = C_3 I_0(\bar{k}r) \quad (4.89)$$

$$\hat{v} = -iC_3 I_1(\bar{k}r) \quad (4.90)$$

La constante C_3 se determina por la condición de contorno cinemática, ecuación (4.48):

$$C_3 = \frac{\left(\bar{\omega} - \bar{k} \sqrt{\frac{We_i}{We_l} \frac{1}{g_i}} \right)}{I_1(\bar{k}h)} \hat{\eta}_i e^{i\phi} \quad (4.91)$$

Por tanto, la ecuación que describe la perturbación de presión de la superficie interna de la fase gas se obtiene de la ecuación (4.41) y se representa como:

$$p_i = \left(\frac{g_i \left(\bar{\omega} - \bar{k} \sqrt{\frac{We_i}{We_l}} \frac{1}{g_i} \right)^2 \hat{\eta}_i e^{i\phi}}{\bar{k} I_1(\bar{k}h)} I_0(\bar{k}h) \right) e^{i(\bar{k}x - \bar{\omega}t)} \quad (4.92)$$

4.5.6. Perturbación de presión en la superficie externa de la fase gas

La perturbación de presión en la superficie externa de la fase gas se obtiene de la misma forma que en la sección e). Diferenciando la ecuación (4.44) con respecto r y eliminando \hat{p} de las ecuaciones (4.44) y (4.45) se obtiene:

$$\hat{v} = -\frac{1}{ik} \frac{d\hat{u}}{dr} \quad (4.93)$$

Sustituyendo la ecuación (4.93) en la ecuación (4.43), se obtiene una ecuación de Bessel para u que tiene una solución:

$$\hat{u} = C_5 I_0(\bar{k}r) + C_6 K_0(\bar{k}r) \quad (4.94)$$

Sustituyendo la ecuación (4.94) en la ecuación (4.93):

$$\hat{v} = -iC_5 I_1(\bar{k}r) + iC_6 K_1(\bar{k}r) \quad (4.95)$$

Para la superficie exterior de la fase gas, cuando $r \rightarrow \infty$, $I_0(\bar{k}r) \rightarrow \infty$, ya que la amplitud de la perturbación de velocidad esta limitada al infinito. Por lo tanto, $C_5 = 0$, y las ecuaciones (4.94) y (4.95) se reducen a:

$$\hat{u} = C_6 K_0(\bar{k}r) \quad (4.96)$$

$$\hat{v} = -iC_6 K_1(\bar{k}r) \quad (4.97)$$

La constante C_6 se determina por la condición de contorno cinemática para la superficie externa de la fase gas, ecuación (4.49):

$$C_6 = \frac{\left(\bar{\omega} - \bar{k} \sqrt{\frac{We_o}{We_l} \frac{1}{g_o}} \right)}{K_1(\bar{k})} \hat{\eta}_o \quad (4.98)$$

Por lo tanto, la ecuación que describe la perturbación de presión de la superficie externa de la fase gas se obtiene de la ecuación (4.44) y se representa como:

$$p_o = \left(\frac{g_o \left(\bar{\omega} - \bar{k} \sqrt{\frac{We_o}{We_l} \frac{1}{g_o}} \right)^2 \hat{\eta}_o}{\bar{k} K_1(\bar{k})} K_0(\bar{k}) \right) e^{i(\bar{k}x - \bar{\omega}t)} \quad (4.99)$$

4.5.7. Ecuación adimensional de dispersión

La ecuación adimensional de dispersión se obtiene sustituyendo las ecuaciones (4.84), (4.92) y (4.99) en las ecuaciones (4.51) y (4.52), respectivamente:

$$\alpha(E_1 + E_2 + E_3) + (E_4 + E_5) = 0 \quad (4.100)$$

$$\alpha(F_1 + F_2 + F_3) + (F_4 + F_5) = 0 \quad (4.101)$$

donde $\alpha = \frac{\hat{\eta}_i}{\hat{\eta}_o} e^{i\phi}$

Eliminando α de las dos ecuaciones anteriores, se obtiene la ecuación adimensional de dispersión de cuarto orden:

$$GH_1 - G_1H = 0 \quad (4.102)$$

Los detalles de las expresiones (100-102) están disponibles en el Apéndice II (C).

Por tanto, la ecuación adimensional de dispersión está en función de los parámetros adimensionales de la expresión (4.103):

$$f(\overline{\omega}, \overline{k}, \overline{s}, \overline{g}_i, \overline{g}_o, Z, We_l, We_i, We_o, We_s, We_{si}, We_{so}, h) = 0 \quad (4.103)$$

4.6. ESTUDIO PARAMÉTRICO DEL MODELO DE INESTABILIDAD

Con el objetivo de llevar a cabo un estudio paramétrico completo de inestabilidad, se obtuvieron las soluciones numéricas de la ecuación de dispersión, bajo una amplia variedad de condiciones experimentales de flujo, para investigar el efecto de los caudales de líquido y aire y la viscosidad del líquido en la máxima relación de crecimiento, indicativo de la inestabilidad del sistema.

La ecuación de dispersión se resolvió numéricamente utilizando el programa informático *Mathematica*[™]. Se utilizó el método de la secante donde se requieren dos valores iniciales complejos para determinar las raíces de la ecuación de dispersión. Como valores iniciales se consideraron las soluciones al caso de una hoja líquida no viscosa (Ibrahim et al., 2006; Lian y Lin, 1990; Liao et al., 1999; Lin, 2003; Mehring y Sirignano, 2000; Panchangula et al., 1996; Ponstein, 1959). Para cada condición experimental, variando el valor del número de onda, k , se resolvió la ecuación para la raíz ω con la máxima parte imaginaria que representa la máxima relación de crecimiento de la perturbación, correspondiente al número de onda más inestable.

La onda más inestable es la perturbación que crece más rápidamente, y que por ello domina el proceso de ruptura de la hoja líquida. Por lo tanto, esta onda más inestable está relacionada con el tamaño de las gotas generadas. La máxima relación de crecimiento se puede relacionar con la longitud de ruptura de la hoja líquida. Una mayor relación de crecimiento se traduce en una longitud de ruptura más corta. De esta forma, tanto la onda más inestable como la máxima relación de crecimiento, son dos importantes parámetros que determinarán las características finales del spray generado. Estos parámetros se obtuvieron para diversas condiciones de flujo en los llamados diagramas de dispersión, $\omega = f(k)$, que tienen forma de campana.

El comportamiento teórico predicho por los diagramas de dispersión se comparó con los resultados experimentales obtenidos anteriormente.

4.6.1. Variación del caudal de líquido

La influencia de la variación del caudal de líquido en la relación de máximo crecimiento se muestra en la Figura 4.5. Se utilizaron las siguientes condiciones teóricas de flujo (iguales a las experimentales para poder posteriormente comparar las condiciones teóricas con las experimentales): un caudal de aire constante de 138,000 L/min ($We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 35128$) y un caudal de líquido que se varió desde 0,003 L/min hasta 0,037 L/min (desde $We_l = We_s = 0,01$ hasta $We_l = We_s = 2$). El valor de la viscosidad se mantuvo constante en 64,5 cP ($Z = 0,2$).

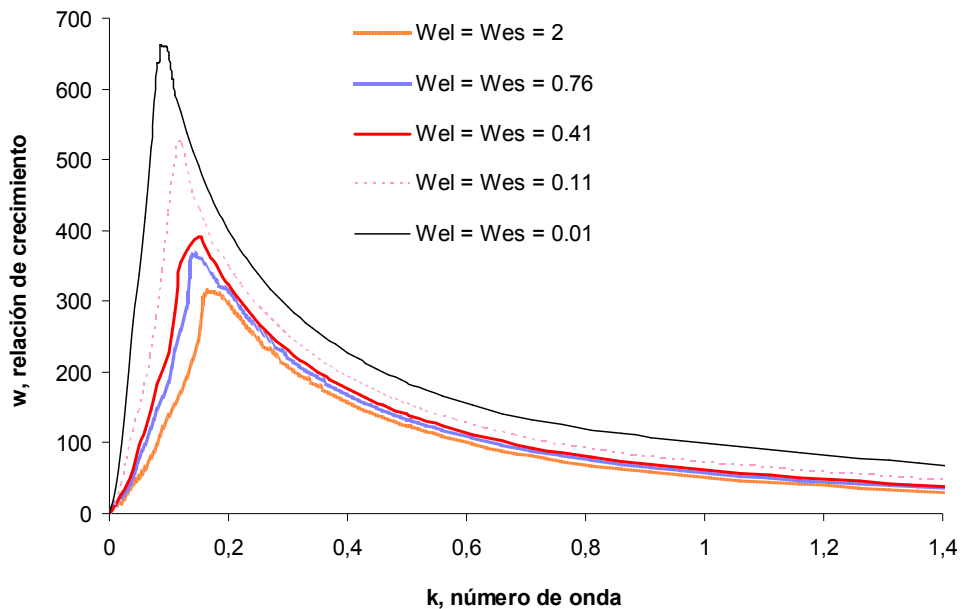


Figura 4.5. Diagrama de dispersión

($We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 35128$; $Z = 0.2$; $We_l = We_s = 0.01 - 2$)

En la figura 4.5. se puede observar que cuando el caudal de líquido decrece la relación de crecimiento aumenta, lo que indica una longitud de ruptura más corta, y por lo tanto gotas más pequeñas debido a una mayor inestabilidad. Este comportamiento predicho por el modelo de inestabilidad está en concordancia con los resultados experimentales obtenidos en el apartado 2.6.1. Para justificar este efecto debe tenerse en cuenta que cuando el caudal de líquido decrece se producen hojas líquidas con un menor espesor que rompen en gotas más pequeñas.

4.6.2. Variación del caudal de aire

La influencia de la variación del caudal de aire en la relación de máximo crecimiento se muestra en la Figura 4.6.

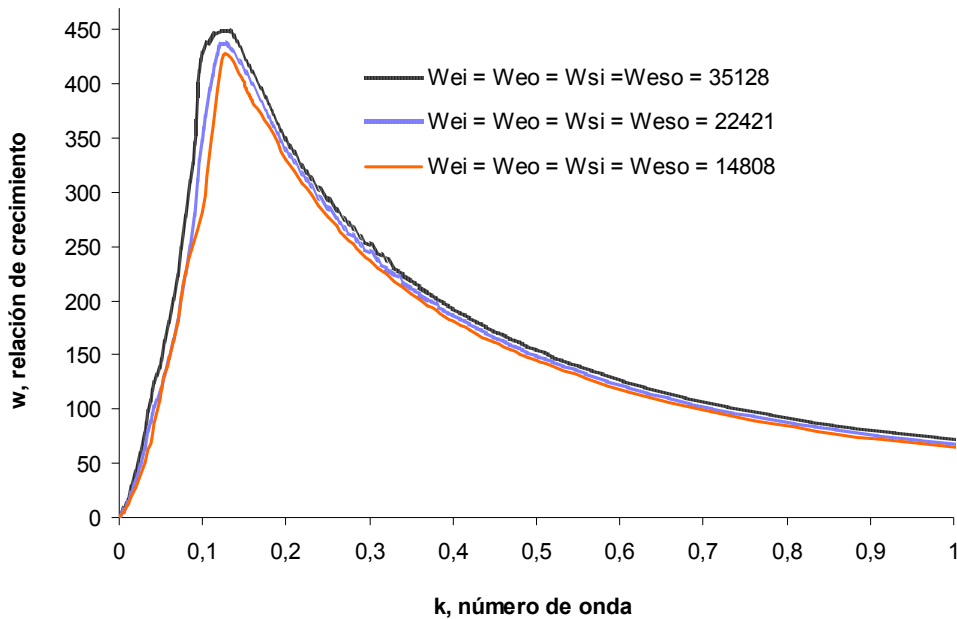


Figura 4.6. Diagrama de dispersión

($We_i = We_s = 0.11$; $Z = 0.2$; $We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 14808 - 35128$)

Se utilizaron las siguientes condiciones teóricas de flujo: un caudal de líquido constante de 0,009 L/min ($We_l = We_s = 0.11$) y un caudal de aire que varió desde 89,600 L/min hasta 138,000 L/min ($We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 14808$ a $We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 35128$). El valor de la viscosidad se mantuvo constante en 64,5 cP ($Z = 0,2$).

En la figura 4.6. se puede observar que cuando el caudal de aire aumenta, la relación de crecimiento aumenta, lo que indica una longitud de ruptura más corta, y por lo tanto gotas más pequeñas debido a una mayor inestabilidad. Este comportamiento predicho por el modelo de inestabilidad está en concordancia con los resultados experimentales obtenidos en el apartado 2.6.2. Para justificar este efecto debe tenerse en cuenta que cuando aumenta el caudal de aire la hoja líquida se rompe en gotas más pequeñas, ya que la interacción líquido-aire produce ondas que se convierten en inestables y desintegran la hoja líquida. Cuando se incrementa la velocidad del aire, la hoja líquida desintegra antes y los ligamentos se forman más cerca de los labios de la boquilla atomizadora. Estos ligamentos tienden a ser más delgados y cortos desintegrándose en gotas más pequeñas. Dado un espesor constante de la hoja líquida, la longitud de ruptura decrece al incrementarse la velocidad relativa entre el aire y el líquido.

4.6.3. Variación de la viscosidad del líquido

La influencia de la variación de la viscosidad del líquido en la relación de máximo crecimiento se muestra en la Figura 4.7. Se utilizaron las siguientes condiciones teóricas de flujo: un caudal de líquido constante de 0,009 L/min ($We_l = We_s = 0.11$) y un caudal de aire constante de 89,600 L/min ($We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 14808$). El valor de la viscosidad se varió desde 64,5 cP hasta 190,0 cP ($Z = 0,2-06$).

En la figura 4.7. se puede observar que cuando la viscosidad del líquido decrece la relación de crecimiento aumenta, lo que indica una longitud de

ruptura más corta, y por lo tanto gotas más pequeñas debido a una mayor inestabilidad. Este comportamiento predicho por el modelo de inestabilidad está en concordancia con los resultados experimentales obtenidos en el apartado 2.6.3. Para justificar este efecto debe tenerse en cuenta que la viscosidad del líquido tiende a evitar el crecimiento de las inestabilidades que provocan la ruptura de la hoja líquida, retrasando por lo tanto, la desintegración del líquido e incrementando el tamaño de las cápsulas. Además, valores bajos de viscosidad producen hojas líquidas más delgadas que rompen en gotas más pequeñas.

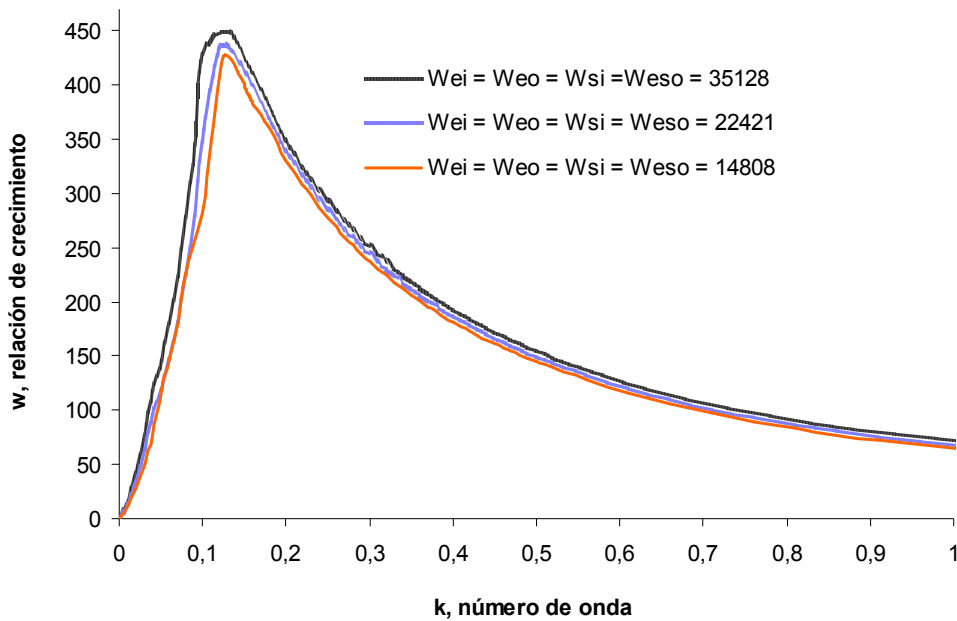


Figura 4.7. Diagrama de dispersión

($W_{ei} = W_{eo} = W_{si} = W_{so} = 14808$; $W_{e_l} = W_{e_s} = 0.11$; $Z = 0.2 - 0.6$)

Por lo tanto, es posible concluir que el modelo propuesto de inestabilidad justifica el comportamiento experimental encontrado en los apartados 2.6.1., 2.6.2., 2.6.3.

4.7. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un análisis de estabilidad temporal para modelar la atomización de una hoja líquida viscosa anular con componentes tangenciales que surge de un atomizador neumático sujeto a corrientes internas y externas de aire no viscosas y con componentes tangenciales. En este estudio se ha modelado el proceso acontecido en la generación de las cápsulas con la nueva técnica desarrollada. Después de las consideraciones teóricas se obtuvo la ecuación de dispersión adimensional que gobierna la inestabilidad del sistema. Una vez obtenida la ecuación de dispersión, se obtuvieron las soluciones numéricas de esta ecuación bajo un amplio intervalo de condiciones de flujo para investigar los efectos del caudal del líquido y del aire, así como de la viscosidad del líquido, en la máxima relación de crecimiento, responsable de la ruptura de un chorro en gotas. Esta máxima relación de crecimiento puede ser relacionada con la longitud de ruptura y con el tamaño final de gota. En este estudio sólo se determinó la tendencia teórica del tamaño de las cápsulas en función de la variación de los parámetros que influyen en el proceso de la generación de las cápsulas.

Las tendencias obtenidas a partir de este estudio teórico de estabilidad son las mismas que las obtenidas en las curvas de comportamiento obtenidas en el Capítulo 2, concluyendo por tanto, que este modelo teórico de inestabilidad propuesto justifica perfectamente el comportamiento experimental del sistema.

4.8. NOMENCLATURA

Símbolo	Descripción	Unidades
A	Fuerza Vortex	m^2/s
D	Diámetro del chorro líquido y de salida de al boquilla	μm
$D_{0.9}$	Diámetro para un percentil del 90%	μm
$D_{0.1}$	Diámetro para un percentil del 10%	μm
$D_{0.5}$	Diámetro para un percentil del 50%	μm
D_a	Diámetro interno de la hoja líquida	μm
D_b	Diámetro externo de la hoja líquida	μm
g	Relación de densidades gas/líquido	adimens.
h	Relación de radios interno/externo	adimens.
I_n	Función de Bessel modificada de orden n de primera clase	
K_n	Función de Bessel modificada de orden n de segunda clase	
k	Número de onda axial	$1/m$
n	Número de onda azimutal	$1/m$
P	Presión media	N/m^2
p'	Perturbación de presión	N/m^2
R_a	Radio interior de la hoja líquida	m
R_b	Radio externo de la hoja líquida	m
Re	Número de Reynolds ($d_p \rho v / \mu$)	adimens.
Z	Número de Ohnesorge, $\mu / (\rho_l \sigma D_b)^{1/2}$	adimens.
r	Coordenada radial	m
t	Tiempo	s
U	Velocidad axial	m/s
u	Velocidad axial de la perturbación	m/s
V	Velocidad radial	m/s
v	Velocidad radial de la perturbación	m/s

Símbolo	Descripción	Unidades
x	Coordenada axial	
W	Velocidad tangencial	m/s
We	Número de Weber ($We = \rho U^2 D_b / \sigma$)	
w	Velocidad tangencial de la perturbación	m/s

Letras griegas

η	Perturbación de desplazamiento	m
μ	Viscosidad	kg/m s
ρ	Densidad	kg/m ³
σ	Tensión superficial	kg/s ²
ω	Frecuencia temporal	1/s
Ω	Velocidad angular	1/s
θ	Ángulo azimutal	radianes
ϕ	Diferencia de fase	radianes

Subíndices

i	Aire interno
l	Fase líquida
o	Aire externo
s	Basado en componentes de velocidad tangenciales

4.9. BIBLIOGRAFÍA

- Arai, M., Shimizu, M., Hiroyasu, H. (1991), "Similarity between the break-up lengths of a high speed liquid jet in atmospheric and pressurized conditions", *ICLASS-91*, 61.
- Bower, G. et al. (1989), "Physical mechanism for atomization of a jet spray: a comparison of models and experiments", *SAE*, **97(6)**, 1663-1679.
- Chen, F. Tsaur, J.Y., Durst, F., Samir, K. (2003), "On the axisymmetry of annular jet instabilities", *J. Fluid Mech.*, **488**, 355-367.
- Clark, C.J., Dombrowski, N. (1972), "Aerodynamic instability and disintegration of inviscid liquid sheets", *Proceeding of Royal Society London A*, **329**, 467-478.
- Cousin, J., Dumouchel, C. (1996), "Effect of viscosity on the linear instability of a flat liquid sheet", *Atomization and Sprays*, **6**, 563-576.
- Dombrowski, N., Hooper, P.C. (1962), "The effect of ambient density on drop formation in sprays", *Chemical Engineering Science*, **17**, 291-305.
- Dombrowski, N., Johns, W.R. (1963), "The aerodynamic instability and disintegration of viscous liquid sheets", *Chemical Engineering Science*, **18**, 203-214.
- Donnelly, R., Glaberson, W. (1966), "Experiments on the capillary instability of a liquid jet", *Proc. Roy. Soc. A*. **209**, 547-556.

- Hagerty, W.W., Shea, J.F. (1955), “A study of the stability of plane fluid sheets”, *Journal of Applied Mechanics*, **22(4)**, 509-514.
- Hiroyasu, H., Arai, M., Shimizu, M. (1991), “Break-up length of a liquid jet and internal flow in a nozzle”, *ICLASS-91*, 123-133.
- Ibrahim, A.A., Jog, M.A., Jeng, S.M. (2006), “Effect of liquid swirl velocity profile on the instability of a swirling annular liquid sheet”, *Atomization and Sprays*, **16**, 237-263.
- Ibrahim, A.A., Jog, M.A. (2006b), “Effect of liquid and air swirl strength and relative rotational direction on the instability of an annular liquid sheet”, *Acta Mechanica*, **186**, 113-133.
- Ibrahim, A.A., Jog, M.A. (2006c), “Nonlinear breakup of a coaxial liquid jet in a swirling gas stream”, *Physics of Fluids*, **18(11)**, 4101-4111.
- Ibrahim, A.A., Jog, M.A. (2008), “Nonlinear instability of an annular liquid sheet exposed to gas flow”, *International Journal of Multiphase Flow*, **34**, 647-664.
- Jazayeri, S.A., Li, X. (2000), “Nonlinear instability of plane liquid sheets”, *J. Fluid Mech.*, **406**, 281-308.
- Jeandel, X., Dumouchel, C. (1999), “Influence of the viscosity on the linear stability of an annular liquid sheet”, *International Journal of Heat and Fluid Flow*, **20**, 499-506.
- Lefebvre, A.H. (1989), “Atomization and sprays”, *Hemisphere, New York*.

- Li, X., Tankin, R.S. (1991), “On the temporal instability of a two-dimensional viscous liquid sheet”, *J. Fluid Mech.*, **226**, 425-443.
- Lian, Z.W., Lin, S.P. (1990), “Breakup of liquid jet in a swirling gas”, *Phys. Fluids*, **2(12)**, 2134-2139.
- Liao, Y., Sakman, A.T., Jeng, S.M., Jog, M.A., Benjamin, M.A.A. (1999), “Comprehensive model to predict simplex atomizer performance”, *Journal of Engineering for gas turbines and power*, **121**, 285-294.
- Liao, Y., Jeng, S.M., Jog, M.A. (2001), “Advanced sub-model for air blast atomizers”, *J. Propul. Power*, **17**, 411-417.
- Lin, S.P. (2003), “Breakup of liquid sheets and jets”, *Cambridge University Press, UK*.
- Mehring, C., Sirignano, W.A. (2000), “Axisymmetric capillary waves on thin annular liquid sheets. I. Temporal Instability”, *Physics of fluids*, **12(6)**, 1417-1439.
- Panchangnula, M.V., Sojka, P.E., Santangelo, P.J. (1996), “On the three-dimensional instability of a swirling, annular, inviscid liquid sheet subject to unequal gas velocities”, *Phys. Fluids*, **8(12)**, 3300-3312.
- Ponstein, J. (1959), “Instability of rotating cylindrical jets”, *Appl. Sci. Res.*, **8**, 425-456.
- Ranz, W.E. (1958), “Some experiments on orifice sprays”, *Can. J. Chem. Eng.*, **36**, 175-181.

- Reitz, R. Bracco, F. (1986), “Mechanisms of break-up of round liquid jets”, *Encyc. Of Fluid Mechanics*, NJ. **3**, 233-249.
- Rizk, N.K., Mongia, H.C. (1991), “Model for air blast atomization”, *J. Propul. Power*, **7**, 305-311.
- Sarasua, L.G., Sicardi, A.C. (2000), “Viscosity influence on the stability of a swirling jet with nonrotating core”, *Phys. Fluids*, **12**, 1607-1610.
- Shen, J., Li, X. (1996), “Instability of an annular viscous liquid jet”, *Acta Mechanica*, **114**, 167-183.
- Squire, H.B. (1953), “Investigation of the instability of a moving liquid film”, *British Journal of Applied Physics*, **4**, 167-169.
- Tharankan, T.J., Ramamurthi, K, Balakrishnan, M. (2002), “Nonlinear breakup of thin liquid sheets”, *Acta Mech.*, **156**, 29-46.
- Wang, D. (1968), “Finite amplitude effect on the stability of a jet of circular cross section”, *J. Fluid. Mech.*, **34(2)**, 299-313.
- Yuen, M. (1968), “Non-linear capillary instability of a liquid jet”, *J. Fluid Mech.*, **33**, 151-163.

4.10. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados derivados del Capítulo 4 se difundieron a través de cuatro congresos internacionales y un artículo internacional:

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, M.A. Galán
Título: *The effect of non-newtonian fluid and flow conditions on the instability of an annular liquid sheet.*
Congreso: *2006 Annual Meeting A.I.Ch.E.*
Ciudad: San Francisco, USA.
Fecha: 12-17 Noviembre 2006.
Participación: Póster (01J10).

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, M.A. Galán
Título: *Instability study of an annular liquid sheet of polymer produced by atomization.*
Congreso: *European Congress of Chemical Engineering - 6.*
Ciudad: Copenhague, Dinamarca.
Fecha: 16-21 Septiembre 2007.
Participación: Póster (T2-5P).

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, M.A. Galán
Título: *Temporal stability análisis of a viscous sheet polymer produced by atomization.*
Congreso: *18th International Congress of Chemical and Process Engineering.*
Ciudad: Praga, República Checa.
Fecha: 24-28 Agosto 2008.
Participación: Comunicación Oral (0217).

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, M.A. Galán
Título: *Solution of instability temporal dimensionless dispersion equation of a viscous sheet polymer produced by atomization.*
Congreso: *11th Mediterranean Congress of Chemical Engineering.*
Ciudad: Barcelona, España.
Fecha: 21-24 Octubre 2008.
Participación: Comunicación Oral (T011-002).

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, M.A. Galán
Título: *Instability study of a swirling annular liquid sheet of polymer produced by air-blast atomization.*
Revista: *Chemical Engineering Journal*, **133** (2007) 69-77.
Impacto: 1,707 (año 2007).

A continuación, se adjunta una copia del artículo publicado en la revista internacional *Chemical Engineering Journal*:



Instability study of a swirling annular liquid sheet of polymer produced by air-blast atomization

Edgar P. Herrero, E.M. Martín Del Valle*, M.A. Galán

Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, P/Los Caidos S/N, 37008 Salamanca, Spain

Received 23 June 2006; received in revised form 17 January 2007; accepted 20 January 2007

Abstract

A temporal stability analysis was carried out to model the atomization of a swirling viscous annular liquid sheet emanating from an air-blast atomizer subject to inner and outer inviscid swirling air streams. The dimensionless dispersion equation that governs the instability of a viscous annular liquid sheet under swirling air streams was obtained. Numerical solutions to the dispersion equation under a wide range of flow conditions were obtained to investigate the effect of the liquid and gas flow on the maximum growth rate and its corresponding unstable wave number. The theoretical behaviour predicted by the dispersion diagrams was compared with the experimental results obtained by the same authors in previous works from the atomization of alginate solution using an air-blast atomizer. It was found that the instability model proposed justify the experimental effects found for the atomization of the fluid and under the work range for alginate flow rate and viscosity and air flow rate.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Polymer; Atomization; Air-blast atomizer; Instability; Growth rate

1. Introduction

The process of transforming bulk liquid into a large number of droplets and dispersing them in the form of a spray in a gaseous environment is called as atomization. Liquid atomization is of importance in numerous applications such as fuel injection in engines, crop spraying, food drying, manufacturing of pharmaceutical products, and lately microencapsulation applications [1].

During the last decade atomization techniques as air-blast or twin-fluid atomization has been widely used [2–4]. In air-blast atomization, low-speed liquid jets are accelerated by the surrounding high-speed gas flow, usually in the spray flow direction. The liquid is subjected to both tensile and shearing stresses. The magnitude of the extension has been shown to be significant for applications involving polymer solutions. Twin-fluid atomizers have a number of advantages over pressure atomizers including lower requirements for the liquid injection pressure and finer sprays. Unfortunately, the process of air-blast atomization is very complex and its physical mechanisms are not fully understood [1].

Theoretical and experimental studies on the mechanism of atomization have been carried out by Rayleigh, Tyler, Weber, Haenlein, Ohnesorge and Castleman [1]. Detailed reviews of earlier work have been published by Giffen and Muraszew [5], and more recently by Chigier [6], and Lefebvre [1] from these studies it can be concluded that the wave mechanism has been found the widest acceptance among the mechanisms of atomization. According to this theory the disintegration of liquid sheets or liquid jets is caused by the growth of unstable waves at the liquid–gas interface due to the aerodynamic interactions between the liquid and the gas. This type of instability is referred to as Kelvin–Helmholtz instability [7] and is characterized by unstable waves that appear in the fluid interface between two superimposed fluids of differing densities and velocities.

The waves are generated by factors such as pressure fluctuations or turbulence in the gas stream or liquid stream [8–9]. Due to aerodynamic interactions, the perturbations grow in magnitude and reach a maximum value. When the dynamic pressure ($\rho_a U_a^2/2$) of the air stream in air-blast atomization is large enough, the amplitude of the surface waves will grow if their wavelength (λ) exceeds a minimum value [8–11]. There exists a dominant or most unstable wave number corresponding to the maximum growth rate and when the amplitude of the disturbance reaches a critical value, the wave detaches from the sheet to form ligaments, which rapidly collapse, forming drops.

* Corresponding author.

E-mail address: emvalle@usal.es (E.M.M. Del Valle).

Nomenclature	
A	vortex strength (m^2/s)
D	injector exit diameter, diameter of liquid jet (μm)
D_a	inner diameter of liquid sheet (μm)
D_b	outer diameter of liquid sheet (μm)
$D_{0.9}$	diameter at the 90th percentile (μm)
$D_{0.1}$	diameter at the 10th percentile (μm)
$D_{0.5}$	diameter at the 50th percentile (μm)
g	gas-to-liquid density ratio
h	ratio of inner and outer radius
I_n	n th order modified Bessel function of first kind
k	axial wave number (m^{-1})
K_n	n th order modified Bessel function of second kind
n	Azimuthal wave number
p'	disturbance pressure (N/m^2)
P	mean pressure (N/m^2)
r	radial coordinate (m)
R_a	inner radius of liquid sheet (m)
R_b	outer radius of liquid sheet (m)
t	time (s)
u	disturbance axial velocity (m/s)
U	mean axial velocity (m/s)
v	disturbance radial velocity (m/s)
V	mean radial velocity (m/s)
w	disturbance tangential velocity (m/s)
W	mean tangential velocity (m/s)
We	Weber number ($We = \rho_l U^2 D_b / \sigma$)
Z	Ohnesorge number, $\mu / (\rho_l \sigma D_b)^{1/2}$
<i>Greek letters</i>	
η	displacement disturbance (m)
μ	fluid viscosity (Ns/m^2)
ρ	fluid density (kg/m^3)
σ	surface tension (kg/s^2)
ω	temporal frequency (s^{-1})
Ω	angular velocity (s^{-1})
θ	Azimuthal angle (radian)
ϕ	phase difference (radian)
<i>Subscripts</i>	
i	inner gas
l	liquid phase
o	outer air
s	based on swirling component

Herrero et al. [12], based on atomization processes, have developed a new technology of production of microcapsules based on a non-Newtonian fluid alginate solutions, which produced microcapsules ranged between 1 and 50 μm , with control size and a particle size distribution with a relative span factor, $(D_{0.9} - D_{0.1})/D_{0.5}$, less than 1.4. They have studied the effect of the alginate solution viscosity and flow rate and air flow rate. They have also developed a mathematical semi-empirical model, based on the wave mechanism, to predict the size of the microcapsules produced by atomization [13].

Therefore, the main aim of this work is to develop a temporal stability analysis to model the atomization of a swirling viscous annular liquid sheet emanating from an air-blast atomizer subject to inner and outer inviscid swirling air streams. The dimensionless dispersion equation that governs the instability of a viscous annular liquid sheet under swirling air streams will be derived. Usually this equation is derived and solved for an inviscid liquid sheet, because this analysis should be used to improve the fuel atomization in aircraft engines. The elimination of the liquid viscosity in the main equations does not affect very much the solution in this case. In microencapsulation application, where polymers are used the viscosity cannot be eliminated because is a very important parameter especially when the polymer has a non-Newtonian behaviour. However, in this work low polymer concentrations have been used, therefore it would be possible to consider the fluid as a Newtonian liquid [14]. For that reason, numerical solutions to the dispersion equation under a wide range of liquid viscosity values, and flow conditions will be carried out to investigate the effects of the liquid and gas on the maximum growth rate and its corresponding unstable wave number. So, the theoretical behaviour predicted by the dispersion diagrams will be compared with the experimental results obtained previously from the atomization of alginate solution, using an air-blast atomizer.

2. Linear stability analysis

2.1. Model assumptions

The stability model considers a swirling viscous annular liquid sheet subject swirling airstreams as shown in Fig. 1. Gas phases are assumed to be inviscid and incompressible. The basic

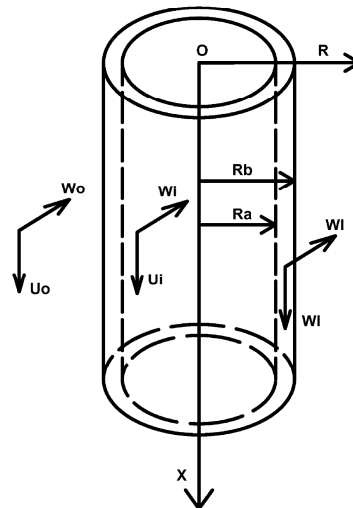


Fig. 1. Annular swirling viscous liquid sheet subject to swirling airstreams.

flow velocities for liquid, inner gas and outer gas are assumed to be $(U_1, 0, A_1/r)$, $(U_i, 0, \Omega r)$, $(U_o, 0, A_o/r)$, respectively. Inner gas swirl profile is assumed to be solid body rotation and outer gas swirl profile is of free vortex type. The assumed velocity profiles are similar to the profiles in an air blast atomizer [15].

Sheet instability occurs due to the growth of unstable waves at the liquid–gas interface. The growth rates of these unstable waves are governed by fluid properties, nozzle geometry and competition of forces acting on the interface including viscous, pressure, inertial, surface tension, and centrifugal force. There exists a dominant or most unstable wave number corresponding to the maximum growth rate. A temporal linear instability analysis is conducted to determine the maximum growth rate and the most unstable wave number.

2.2. Linearized disturbance equations

The governing equations for viscous annular fluid flows are the continuity and Navier–Stokes equations that in cylindrical coordinate system are:

Continuity:

$$\frac{V}{r} + \frac{\partial V}{\partial r} + \frac{1}{r} \frac{\partial W}{\partial \theta} + \frac{\partial U}{\partial x} = 0 \tag{1}$$

Momentum:

$$\begin{aligned} \frac{\partial U}{\partial t} + V \frac{\partial U}{\partial r} + \frac{W}{r} \frac{\partial U}{\partial \theta} + U \frac{\partial U}{\partial x} \\ = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial x} + \nu \left(\frac{\partial^2 U}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial U}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 U}{\partial \theta^2} + \frac{\partial^2 U}{\partial x^2} \right) \end{aligned} \tag{2}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial V}{\partial t} + V \frac{\partial V}{\partial r} + \frac{W}{r} \frac{\partial V}{\partial \theta} + U \frac{\partial V}{\partial x} - \frac{W^2}{r} \\ = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial r} + \nu \left(\frac{\partial^2 V}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial V}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 V}{\partial \theta^2} - \frac{V}{r^2} \right. \\ \left. + \frac{2}{r^2} \frac{\partial W}{\partial \theta} + \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} \right) \end{aligned} \tag{3}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial W}{\partial t} + V \frac{\partial W}{\partial r} + \frac{W}{r} \frac{\partial W}{\partial \theta} + U \frac{\partial W}{\partial x} + \frac{VW}{r} \\ = -\frac{1}{\rho} \frac{\partial p}{\partial \theta} + \nu \left(\frac{\partial^2 W}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial W}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 W}{\partial \theta^2} - \frac{W}{r^2} \right. \\ \left. + \frac{2}{r^2} \frac{\partial V}{\partial \theta} + \frac{\partial^2 W}{\partial x^2} \right) \end{aligned} \tag{4}$$

In order to obtain the linearized disturbance equations, let $U = \bar{U} + u$, $V = \bar{v}$, $W = \bar{W} + w$, $p = \bar{P} + p'$ (5)

where the overbar represents the mean flow quantities and u , v , w and p' indicates disturbances. The disturbances are assumed

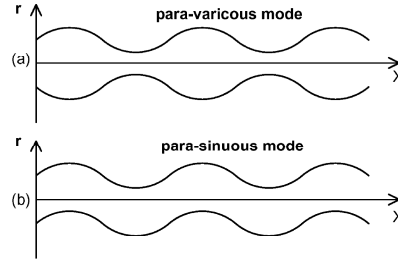


Fig. 2. A schematic description of (a) the para-varicous mode and (b) the para-sinuuous mode.

to be of the form:

$$(u, v, w, p') = (\hat{u}(r), \hat{v}(r), \hat{w}(r), \hat{p}(r)) e^{i(kx+n\theta-\omega t)} \tag{6}$$

where \wedge indicates the disturbance amplitude which is a function for r only. For the temporal analysis, the wave number k and n are real while frequency ω is complex. The maximum value of imaginary ω represents the maximum growth rate of the disturbance, and the corresponding value of k represents the most unstable wave number.

For such an annular jet, unstable waves develop on both the inner and outer surfaces, which may be in phase or out of phase. When the waves develop in phase, the shapes of the waves are antisymmetric with respect to the mid-plane of liquid sheet, and this kind of instability mode is called the para-sinuuous mode (Fig. 2a). When the waves develop out of phase, the waves are symmetric with respect to the mid-plane of the liquid sheet, and this mode is called the para-varicous mode (Fig. 2b) [16].

The displacement disturbances at the inner and outer interfaces are given by the following equations:

$$\eta_i(x, \theta, t) = \eta_i e^{i(kx+n\theta-\omega t)+i\phi} \tag{7}$$

$$\eta_o(x, \theta, t) = \eta_o e^{i(kx+n\theta-\omega t)} \tag{8}$$

Here ϕ indicates the phase difference between the displacement at the inner and the outer interface.

Substituting Eq. (5) into Eqs. (1)–(4), subtracting the mean flow equations and neglecting the second-order terms, it is achieved the linearized equations for velocity and pressure disturbances.

In order to determine the effect of the various forces, properties of fluids and other geometric parameters, the linearized equations are non-dimensionalized by introducing the following dimensionless parameters:

$$\begin{aligned} We_{i1} &= \frac{\rho_i U_1^2 D_b}{\sigma}, & We_{i1} &= \frac{\rho_i U_i^2 D_b}{\sigma}, & We_{o1} &= \frac{\rho_o U_o^2 D_b}{\sigma}, \\ We_{s1} &= \frac{\rho_i W_i^2 D_b}{\sigma}, & We_{si1} &= \frac{\rho_i W_i^2 D_b}{\sigma}, & We_{so1} &= \frac{\rho_o W_o^2 D_b}{\sigma}, \\ Z &= \frac{\mu_1}{(\rho_1 \sigma D_b)^{1/2}}, & g_i &= \frac{\rho_i}{\rho_1}, & g_o &= \frac{\rho_o}{\rho_1}, & \bar{k} &= k R_b, \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \bar{\omega} &= \frac{\omega R_b}{U_1}, & \frac{U_i}{U_1} &= \sqrt{\frac{We_i}{We_1} \frac{1}{g_i}}, & \frac{U_o}{U_1} &= \sqrt{\frac{We_o}{We_1} \frac{1}{g_o}}, \\ \frac{A_i}{U_1 R_b} &= \sqrt{\frac{We_s}{We_1}}, & \frac{A_o}{U_1 R_b} &= \sqrt{\frac{We_{so}}{We_1} \frac{1}{g_o}}, \\ \frac{\Omega R_b}{U_1} &= \sqrt{\frac{We_{si}}{We_1} \frac{1}{g_i}}, & \bar{s} &= (\bar{k}^2 + Z(-i\bar{\omega} + i\bar{k}))^{1/2}, \\ h &= \frac{R_a}{R_b} \end{aligned}$$

As dimensionless parameters it has included the Weber number, which represents the ratio of aerodynamic force to surface tension, and the Ohnesorge number, which contains only the properties of the globules formed in primary atomization before they split up into smaller drops during secondary atomization. Ohnesorge number is sometimes called a stability group because it provides an indication of the resistance of a globule to further disintegration, but it is also called a viscosity group because it accounts for the effect of liquid viscosity on the globule. Ohnesorge number is used in momentum transfer in general and atomization calculations in particular.

Since it is considered three-dimensional perturbations, the two surface waves may also be axi-symmetric ($n=0$) or non-axi-symmetric ($n=1$) with respect to the central axis of the jet. Several studies have examined the disintegration of non-swirling liquid sheets and liquid jets subject to axi-symmetric disturbances. Li and Tankin [17] conducted a temporal instability analysis of a thin viscous liquid sheet in an inviscid gas medium and found axi-symmetrical disturbances to control the instability process for small Weber numbers. Liao et al. [18] reported axi-symmetric mode to be the dominant mode in the absence of air swirl velocity. Chen et al. [19] carried out a linear stability analysis for an annular viscous jet subject to three-dimensional disturbances and showed axi-symmetric mode to be the most unstable mode in the system. As such we have restricted the present analysis to the axi-symmetric mode. Perturbation in the Azimuthal direction is taken as zero, i.e. $\hat{w} = 0$.

After applying these restrictions it is obtained the linearized disturbance equations for the liquid phase and the gas phase.

The disturbance equations for the liquid phase are

$$\hat{u}(i\bar{k}) + \frac{d\hat{v}}{dr} + \frac{v}{r} = 0 \tag{9}$$

$$\hat{u}(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) = -i\bar{k}\hat{p} + Z \left(\frac{d^2\hat{u}}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{u}}{dr} - \frac{\hat{u}}{r^2} (\bar{k}^2 r^2) \right) \tag{10}$$

$$\hat{v}(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) = -\frac{d\hat{p}}{dr} + Z \left(\frac{d^2\hat{v}}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{v}}{dr} - \frac{\hat{v}}{r^2} (\bar{k}^2 r^2 + 1) \right) \tag{11}$$

The disturbance equations for the gas phase are

Inner gas:

$$\hat{u}(i\bar{k}) + \frac{d\hat{v}}{dr} + \frac{v}{r} = 0 \tag{12}$$

$$\hat{u} \left(-i\bar{\omega} + i\bar{k} \sqrt{\frac{We_i}{We_1} \frac{1}{g_i}} \right) = -\frac{1}{g_i} i\bar{k}\hat{p} \tag{13}$$

$$\hat{v} \left(-i\bar{\omega} + i\bar{k} \sqrt{\frac{We_i}{We_1} \frac{1}{g_i}} \right) = -\frac{1}{g_i} \frac{d\hat{p}}{dr} \tag{14}$$

Outer gas:

$$\hat{u}(i\bar{k}) + \frac{d\hat{v}}{dr} + \frac{v}{r} = 0 \tag{15}$$

$$\hat{u} \left(-i\bar{\omega} + i\bar{k} \sqrt{\frac{We_o}{We_1} \frac{1}{g_o}} \right) = -\frac{1}{g_o} i\bar{k}\hat{p} \tag{16}$$

$$\hat{v} \left(-i\bar{\omega} + i\bar{k} \sqrt{\frac{We_o}{We_1} \frac{1}{g_o}} \right) = -\frac{1}{g_o} \frac{d\hat{p}}{dr} \tag{17}$$

2.3. Boundary conditions

In the same way, under the above conditions, the following dimensionless boundary conditions are necessary to solve the linearized disturbance equations. The first boundary condition is the kinematic condition that a particle of fluid on the surface moves with the surface so as to remain on the surface or in other words, the velocity components normal to the interface is continuous across the interface:

Liquid:

$$v_l = \frac{\partial \eta_l}{\partial t} + \frac{\partial \eta_l}{\partial x} \quad \text{at } r = h \tag{18}$$

$$v_l = \frac{\partial \eta_o}{\partial t} + \frac{\partial \eta_o}{\partial x} \quad \text{at } r = 1 \tag{19}$$

Inner gas:

$$v_i = \frac{\partial \eta_i}{\partial t} + \frac{\partial \eta_i}{\partial x} \sqrt{\frac{We_i}{We_1} \frac{1}{g_i}} \quad \text{at } r = h \tag{20}$$

Outer gas:

$$v_o = \frac{\partial \eta_o}{\partial t} + \frac{\partial \eta_o}{\partial x} \sqrt{\frac{We_o}{We_1} \frac{1}{g_o}} \quad \text{at } r = 1 \tag{21}$$

Due to the inviscid assumption for the gas streams in the axial and Azimuthal directions, viscous stress at the liquid–gas interface is zero. This is expressed as

$$\frac{\partial u}{\partial r} + \frac{\partial v}{\partial x} = 0 \quad \text{at } r = h, 1 \tag{22}$$

The last boundary condition considers the balance between the surface stresses on both sides of the liquid–gas interface,

including the pressure jump across the interface due to surface tension and viscous forces. This boundary condition is known as the dynamic boundary condition and is given by

$$p'_1 - p'_i = \frac{1}{h^2 We_1} \left(\eta_i + h^2 \frac{\partial^2 \eta_i}{\partial x^2} \right) + h \frac{We_{si}}{We_1} \eta_i - \frac{We_s \eta_i}{We_1 h^3} + 2Z \frac{\partial v}{\partial r} \quad \text{at } r = h \quad (23)$$

$$p'_1 - p'_0 = -\frac{1}{We_1} \left(\eta_0 + \frac{\partial^2 \eta_0}{\partial x^2} \right) + \frac{We_{s0}}{We_1} \eta_0 - \frac{We_s \eta_0}{We_1} + 2Z \frac{\partial v}{\partial r} \quad \text{at } r = 1 \quad (24)$$

2.4. Pressure disturbance inside the liquid sheet

As the governing equations (Eqs. (9)–(11)) are linear, the solution is decompose into inviscid and viscous parts as

$$\hat{u} = \hat{u}_1 + \hat{u}_2 \quad (25)$$

$$\hat{v} = \hat{v}_1 + \hat{v}_2 \quad (26)$$

Here the subscripts 1 and 2 represent the inviscid and the viscous parts of the velocity perturbations, respectively [20]:

$$\hat{u}_1(i\bar{k}) + \frac{d\hat{u}_1}{dr} + \frac{\hat{v}_1}{r} = 0 \quad (27)$$

$$\hat{u}_1(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) = -i\bar{k} \hat{p} \quad (28)$$

$$\hat{v}_1(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) = -\frac{d\hat{p}}{dr} \quad (29)$$

$$\hat{u}_2(i\bar{k}) + \frac{d\hat{u}_2}{dr} + \frac{\hat{v}_2}{r} = 0 \quad (30)$$

$$\hat{u}_2(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) = Z \left(\frac{d^2 \hat{u}_2}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{u}_2}{dr} - \frac{\hat{u}_2}{r^2} (\bar{k}^2 r^2) \right) \quad (31)$$

$$\hat{v}_2(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) = Z \left(\frac{d^2 \hat{v}_2}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{v}_2}{dr} - \frac{\hat{v}_2}{r^2} (\bar{k}^2 r^2 + 1) \right) \quad (32)$$

Differentiating Eq. (28) with respect to r and eliminating \hat{p} from Eqs. (28) and (29):

$$\hat{v}_1 = -\frac{1}{i\bar{k}} \frac{d\hat{u}_1}{dr} \quad (33)$$

Substituting Eq. (33) in Eq. (27):

$$\left(\frac{d^2 \hat{u}_1}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{u}_1}{dr} - \frac{\hat{u}_1}{r^2} (\bar{k}^2 r^2) \right) = 0 \quad (34)$$

The above equation is a Bessel equation which has a solution of the form:

$$\hat{u}_1 = C_1 I_0(\bar{k}r) + C_2 K_0(\bar{k}r) \quad (35)$$

Substituting Eq. (35) in Eqs. (33) and (28):

$$\hat{v}_1 = -iC_1 I_1(\bar{k}r) + iC_2 K_1(\bar{k}r) \quad (36)$$

$$\hat{p} = \frac{\bar{\omega} - \bar{k}}{\bar{k}} (C_1 I_0(\bar{k}r) + C_2 K_0(\bar{k}r)) \quad (37)$$

Let

$$\bar{s}^2 = (\bar{k}^2 + Z(-i\bar{\omega} + i\bar{k})) \quad (38)$$

Rearranging Eqs. (31) and (32) and using Eq. (38), it is obtained the Bessel equations for \hat{u}_2 and \hat{v}_2 :

$$\left(\frac{d^2 \hat{u}_2}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{u}_2}{dr} - \frac{\hat{u}_2}{r^2} (\bar{s}^2 r^2) \right) = 0 \quad (39)$$

$$\left(\frac{d^2 \hat{v}_2}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\hat{v}_2}{dr} - \frac{\hat{v}_2}{r^2} (\bar{s}^2 r^2 + 1) \right) = 0 \quad (40)$$

The solutions for Eqs. (39) and (40) can be expressed in the following form:

$$\hat{u}_2 = M_1 I_0(\bar{s}r) + M_2 K_0(\bar{s}r) \quad (41)$$

$$\hat{v}_2 = M_3 I_1(\bar{s}r) + M_4 K_1(\bar{s}r) \quad (42)$$

Then, using Eqs. (25) and (26), the total velocity components are expressed as

$$\hat{u} = C_1 I_0(\bar{k}r) + C_2 K_0(\bar{k}r) + M_1 I_0(\bar{s}r) + M_2 K_0(\bar{s}r) \quad (43)$$

$$\hat{v} = -iC_1 I_1(\bar{k}r) + iC_2 K_1(\bar{k}r) + M_3 I_1(\bar{s}r) + M_4 K_1(\bar{s}r) \quad (44)$$

Using the boundary conditions (Eqs. (18), (19) and (22)) and utilizing the solutions from the Bessel equations, the constants C_1, C_2, M_1 to M_4 are determined:

$$C_1 = \frac{i(-i\bar{\omega} + i\bar{k})}{I_{18} I_1(\bar{k}h)} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_{16} - \hat{\eta}_o I_{17}) \quad (45)$$

$$C_2 = \frac{2\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})}{I_{13}} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_1(\bar{k}) I_{14} - \hat{\eta}_o I_{15}) \quad (46)$$

$$M_1 = \frac{2\bar{k}\bar{s} i(-i\bar{\omega} + i\bar{k})}{I_9 I_{11}} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_1(\bar{k}) I_{12} - \hat{\eta}_o I_{10}) \quad (47)$$

$$M_2 = \frac{2\bar{k}\bar{s} i(-i\bar{\omega} + i\bar{k})}{I_{11}} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_1(\bar{k}) I_{14} - \hat{\eta}_o I_9) \quad (48)$$

$$M_3 = \frac{2\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})}{I_9 I_{11}} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_1(\bar{k}) I_{12} - \hat{\eta}_o I_{10}) \quad (49)$$

$$M_4 = -\frac{2\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})}{I_{11}} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_1(\bar{k}) I_{14} - \hat{\eta}_o I_9) \quad (50)$$

The coefficients of the constants are available in Appendix A.

Then, the pressure disturbance inside the liquid sheet (Eq. (37)):

$$p'_1 = \frac{\bar{\omega} - \bar{k}}{\bar{k}} \left(\frac{2\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})}{I_{13}} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_1(\bar{k}) I_{14} - \hat{\eta}_o I_{15}) I_0(\bar{k}r) + \frac{2\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})}{I_{13}} (\hat{\eta}_i e^{i\phi} I_1(\bar{k}) I_{14} - \hat{\eta}_o I_{15}) K_0(\bar{k}r) \right) e^{i(\bar{k}x - \bar{\omega}t)} \quad (51)$$

2.5. Pressure disturbance in inner gas

In the same way that in Section 2.4, from Eqs. (12)–(14) and (20), and considering that for inner gas, as $r \rightarrow 0$, $K_0(\bar{k}r) \rightarrow \infty$ (which is due to the fact that amplitude of the velocity disturbance is bounded at the centreline of the sheet), it is obtained the pressure disturbance in inner gas:

$$p'_i = \left(\frac{g_i(\bar{\omega} - \bar{k}\sqrt{(We_i/We_1)(1/g_i)})^2 \hat{\eta}_i e^{i\phi}}{\bar{k}I_1(\bar{k}h)} \right) I_0(\bar{k}h) e^{i(\bar{k}x - \bar{\omega}t)} \tag{52}$$

2.6. Pressure disturbance in outer gas

In the same way that in Section 2.4, from the Eqs. (15)–(17) and (21), and considering that for outer gas, as $r \rightarrow \infty$, $I_0(\bar{k}r) \rightarrow \infty$ (which is due to the fact that amplitude of the velocity disturbance is bounded at infinity), it is obtained the pressure disturbance in outer gas:

$$p'_o = \left(-\frac{g_o(\bar{\omega} - \bar{k}\sqrt{(We_o/We_1)(1/g_o)})^2 \hat{\eta}_o}{\bar{k}K_1(\bar{k})} K_0(\bar{k}) \right) e^{i(\bar{k}x - \bar{\omega}t)} \tag{53}$$

2.7. Non-dimensional dispersion equation

The final dimensionless dispersion equation is obtained by substitution of Eqs. (52) and (53) into Eqs. (23) and (24), respectively. These lead to the following expressions:

$$\alpha(E_1 + E_2 + E_3) + (E_4 + E_5) = 0 \tag{54}$$

$$\alpha(F_1 + F_2 + F_3) + (F_4 + F_5) = 0 \tag{55}$$

where $\alpha = (\hat{\eta}_i/\hat{\eta}_o) e^{i\phi}$

Eliminating α from the above two equations, it is achieved a fourth-order non-dimensional dispersion equation of the form:

$$GH_1 - G_1H = 0 \tag{56}$$

Details of the expressions in Eqs. (54)–(56) are available in Appendix A. In other words, the non-dimensional dispersion equation can be simply stated as

$$f(\bar{\omega}, \bar{k}, \bar{s}, g_i, g_o, Z, We_1, We_1, We_o, We_s, We_{si}, We_{so}, h) = 0 \tag{57}$$

Unlike the inviscid case, the final dispersion equation does not have a closed form solution and is solved numerically using Mathematica™. The Secant method is used where two starting complex guess values are required to determine the roots of the dimensionless dispersion equation. Results from the inviscid case are taken as starting guess values. By varying the value of k , it is solved for the root with the maximum imaginary part that represents the maximum growth rate of disturbance corresponding to the most unstable wave number.

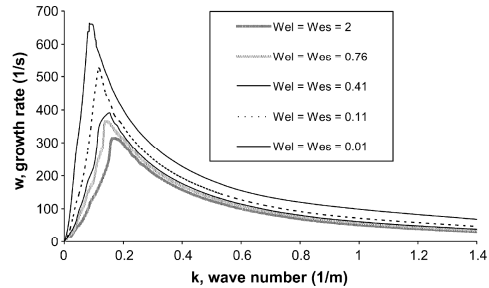


Fig. 3. Dispersion diagram at $We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 35,128$; $Z = 0.2$; $We_1 = We_s = 0.01 - 2$.

3. Results and discussion

In the process of determining the disintegration of the swirling viscous annular liquid sheet emanating from an air-blast prefilmer, the final non-linear dimensionless dispersion equation was derived based on the assumption that the inner and outer gas flows are inviscid moving axially outward with swirling velocity components. A complete parametric study has been conducted to insolate the effect of flow conditions and viscosity on the instability of the liquid sheet. The non-dimensional parameters utilized in the final dispersion equation are the axial Weber numbers, We_1 , We_i , and We_o , swirling Weber numbers, We_s , We_{si} , and We_{so} , Ohnesorge number, Z , axial wave number k , gas to liquid air density ratio, g_i and g_o , and the annular liquid sheet inner and outer radii ratio, h .

The frequency with the maximum imaginary part represents the most unstable wave that is the perturbation that grows more rapidly than any other and for that reason it dominates the liquid sheet breakup process. Therefore, the most unstable wave number is related to the mean drop size. The growth rate can be related to the breakup length of the liquid sheet. Higher growth rate indicates shorter breakup length. As such the most unstable wave number and the maximum growth rate are two important parameters that will determine the resulting spray characteristics. These parameters are obtained for a number of flow geometry conditions and are discussed below. The results are presented in three graphs (Figs. 3–5) $\omega = f(k)$ called dispersion diagrams. These figures show the expected bell shape, commonly encountered in linear theory analysis. In each situation, a finite range of unstable perturbations, i.e. showing a positive growth rate, was obtained.

3.1. Liquid flow rate variation

The influence of the liquid flow rate variation in the growth rate is shown in Fig. 3. These results were obtained for an atomization nozzle of 1.8 mm in previous works conducted by the authors [12]. The experimental conditions were the following: a constant value of pressurized flow air of 138,000 L/min ($We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 35,128$) and the liquid flow rate was modified ranged from 0.003 L/min to 0.037 L/min

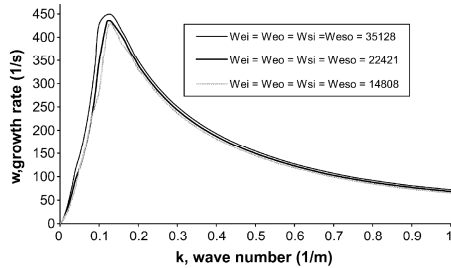


Fig. 4. Dispersion diagram at $We_1 = We_5 = 0.11$; $Z = 0.2$; $We_1 = We_o = We_{si} = We_{so} = 14,808 - 35,128$.

($We_1 = We_5 = 0.01$ to $We_1 = We_5 = 2$). The liquid viscosity was maintained constant at 64.5 mPa s ($Z = 0.2$). It can be seen in Fig. 3 that when the liquid flow decrease, the growth rate increase, which indicates shorter breakup length and smaller drops.

These results are in a very good agreement with the experimental work of Herrero et al. [12], where it was found experimentally that the particle size decreases when it is decreased the liquid flow. To justify this effect it should be taking into account that lower values of liquid flow rate result in thinner films. It was observed that thinner liquid films break down into smaller drops.

3.2. Air flow rate variation

The influence of the air flow rate variation in the growth rate is shown in Fig. 4. These results were obtained for an atomization nozzle of 1.8 mm in previous works conducted by the authors [12]. The experimental conditions were the following: a constant value of liquid flow of 0.009 L/min ($We_1 = We_5 = 0.11$) and the air flow rate was modified ranged from 89,600 L/min to 138,000 L/min ($We_1 = We_o = We_{si} = We_{so} = 14,808$ to $We_1 = We_o = We_{si} = We_{so} = 35,128$). The liquid viscosity was maintained constant at 64.5 mPa s ($Z = 0.2$). It can be seen in Fig. 4 that when the air flow increase, the growth rate increase, which indicates shorter breakup length and smaller drops.

These results are in a very good agreement with the experimental work of Herrero et al. [12], where it was found

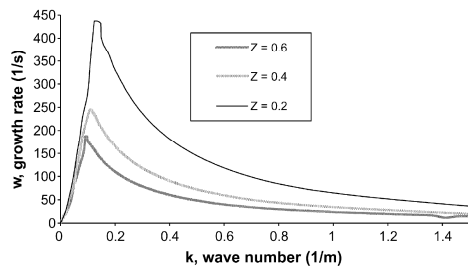


Fig. 5. Dispersion diagram at $We_1 = We_o = We_{si} = We_{so} = 14,808$; $We_1 = We_5 = 0.11$; $Z = 0.2 - 0.6$.

experimentally that the particle size decreases when it is increase the air flow. To justify this effect it should be take into account that the liquid/air interaction produces waves that become unstable and disintegrate into fragments. These fragments then, contract into ligaments, which in turn break down into drops. It has been proved that when the air velocity is increased, the liquid sheet disintegrates earlier and ligaments are formed nearer the lip. These ligaments tend to be thinner and shorter and disintegrate into smaller drops. For a constant liquid sheet thickness the breakup length decreases with increase in the relative velocity between the air and the liquid.

3.3. Liquid viscosity effect

The influence of the liquid viscosity in the growth rate is shown in Fig. 5. These results were obtained for an atomization nozzle of 1.8 mm in previous works conducted by the authors [12]. The experimental conditions were the following: a constant value of pressurized flow air of 89,600 L/min ($We_1 = We_o = We_{si} = We_{so} = 14,808$), a constant value of liquid flow of 0.009 L/min ($We_1 = We_5 = 0.11$) and the liquid viscosity was modified ranged from 64.5 mPa s to 190.0 mPa s ($Z = 0.2 - 0.6$).

It can be seen in Fig. 5 that when the liquid viscosity decrease, the growth rate increase, which indicates shorter breakup length and smaller drops.

These results are in a very good agreement with the experimental work of Herrero et al. [12], where it was found that the particle size increases when it was increased the liquid viscosity. It can be explained if we consider that the liquid viscosity of the fluid to be atomize, tends to avoid the growth of the instabilities that cause the rupture of the jet or liquid sheet, delaying, therefore, the disintegration of the liquid and increasing the size of the microcapsules. In addition, lower values of liquid viscosity result in thinner films that break down into smaller drops.

4. Conclusions

A temporal instability study of a swirling annular liquid sheet of polymer produced by air-blast atomization has been done in order to model an atomization process to generate microcapsules. The dimensionless dispersion equation that governs the instability of a viscous annular liquid sheet under swirling air streams is derived. Numerical solutions to the dispersion equation under a wide range of flow conditions are carried out to investigate the effects of the liquid and gas flow on the maximum growth rate. The growth rate can be related to the breakup length of the liquid sheet.

It has been observed that when the polymer flow decrease, the growth rate increase, which indicates shorter breakup length and smaller drops because of lower values of liquid flow rate result in thinner films that break down into smaller drops.

An analysis of the dispersion diagrams shows that when the air flow increase, the growth rate increase, which indicates shorter breakup length and smaller drops, because of the liquid/air interaction produces waves that become unstable and disintegrate into fragments, and contract into ligaments, which in turn break down into drops.

When the polymer viscosity decrease, the growth rate increases, this indicates shorter breakup length and smaller drops.

The theoretical behaviour predicted by the dispersion diagrams were compared with the experimental results obtained from the atomization of alginate solution using an air-blast atomizer. It was found that the instability model proposed justify the experimental effects found for the atomization of a fluid and under the work range for alginate flow rate and viscosity and air flow rate.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge Prof. Dr. D. Jose Angel Dominguez from the Mathematics Department of the University of Salamanca for the help with Mathematica. This research was supported by funds from the Ministry of Science and Education (MEC). The authors gratefully acknowledge the financial support.

Appendix A. Coefficients of the constants

The expressions for the coefficients used in determining the constants (Eqs. (45)–(50)) are

$$I_1 = 2\bar{k}^2 i I_1(\bar{k}) K_1(\bar{k}h) - 2\bar{k}^2 i K_1(\bar{k}) I_1(\bar{k}h) \tag{A.1}$$

$$I_5 = (\bar{k}^2 - \bar{s}^2) K_1(\bar{s}) \tag{A.5}$$

$$I_6 = 2\bar{k}^2 K_1(\bar{k}) I_1(\bar{k}h) - 2\bar{k}^2 i K_1(\bar{k}h) I_1(\bar{k}) \tag{A.6}$$

$$I_7 = (\bar{s}^2 + \bar{k}^2) I_1(\bar{s}) I_1(\bar{k}h) - (\bar{s}^2 + \bar{k}^2) I_1(\bar{s}h) I_1(\bar{k}) \tag{A.7}$$

$$I_8 = (\bar{s}^2 + \bar{k}^2) K_1(\bar{s}) I_1(\bar{k}h) - (\bar{s}^2 + \bar{k}^2) K_1(\bar{s}h) I_1(\bar{k}) \tag{A.8}$$

$$I_9 = I_2 I_6 - I_1 I_7 \tag{A.9}$$

$$I_{10} = I_3 I_6 - I_1 I_8 \tag{A.10}$$

$$I_{11} = I_5 I_9 - I_{10} I_4 \tag{A.11}$$

$$I_{12} = I_6 I_{11} - I_6 I_4 I_{10} \tag{A.12}$$

$$I_{13} = I_6 I_9 I_{11} \tag{A.13}$$

$$I_{14} = I_8 I_9 I_6 I_4 - I_7 I_{12} \tag{A.14}$$

$$I_{15} = I_8 I_9 I_9 - I_7 I_9 I_{10} \tag{A.15}$$

$$I_{16} = I_{13} I_9 I_{11} - 2\bar{k}^2 i K_1(\bar{k}h) I_1(\bar{k}) I_9 I_{11} I_{14} - 2\bar{k}^2 I_1(\bar{k}) I_1(\bar{s}h) I_{12} I_{13} + 2\bar{k}^2 I_1(\bar{k}) K_1(\bar{s}h) I_9 I_{13} I_6 I_4 \tag{A.16}$$

$$I_{17} = 2\bar{k}^2 K_1(\bar{s}h) I_{13} I_9 I_9 - 2\bar{k}^2 i K_1(\bar{k}h) I_9 I_{11} I_{15} - 2\bar{k}^2 I_1(\bar{s}h) I_9 I_{13} I_{10} \tag{A.17}$$

$$I_{18} = I_{13} I_9 I_{11} \tag{A.18}$$

The expressions involved in Eqs. (54)–(56) are

$$E_1 = -\frac{(-i\bar{\omega} + i\bar{k})^2}{\bar{k} I_{18} I_1(\bar{k}h)} I_0(\bar{k}h) I_{16} + \frac{2i\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})^2}{I_{13}\bar{k}} K_0(\bar{k}h) I_1(\bar{k}) I_{14} - \frac{(-\bar{\omega} + \bar{k}\sqrt{(We_1/We_1)(I/g_i)})^2 g_i I_0(\bar{k}h)}{\bar{k} I_0'(\bar{k}h)} - \frac{2Z(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) I_1'(\bar{k}h)(\bar{k}) I_{16}}{I_{18} I_1(\bar{k}h)} \tag{A.19}$$

$$E_2 = -\frac{4Zi(\bar{k})^3(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) K_1'(\bar{k}h)}{I_{13}} I_1(\bar{k}) I_{14} - \frac{4Z\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) \bar{s} I_1'(\bar{s}h) I_1(\bar{k}) I_{12}}{I_9 I_{11}} + \frac{4Z\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) \bar{s} K_1'(\bar{s}h)}{I_{11}} I_6 I_4 I_1(\bar{k}) \tag{A.20}$$

$$E_3 = -\frac{1}{h^2 We_1} (1 - h^2 \bar{k}^2) - h \frac{We_{si}}{We_1} + \frac{We_s}{We_1} \frac{1}{h^3} \tag{A.21}$$

$$E_4 = \frac{(-i\bar{\omega} + i\bar{k})^2 I_0(\bar{k}h)}{\bar{k} I_{18} I_1(\bar{k}h)} I_{17} - \frac{2i\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})^2}{\bar{k} I_{13}} K_0(\bar{k}h) I_{15} + \frac{2Z(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) \bar{k} I_1'(\bar{k}h)}{I_{18} I_1(\bar{k}h)} I_{17} + \frac{4Z\bar{k}^3 i(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) K_1'(\bar{k}h)}{I_{13}} I_{15} \tag{A.22}$$

$$E_5 = -\frac{4Z\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) \bar{s} I_1'(\bar{s}h) I_{10} I_9}{I_9 I_{11}} - \frac{4Z\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) \bar{s} K_1'(\bar{s}h)}{I_{11}} I_9 \tag{A.23}$$

$$F_1 = -\frac{(-i\bar{\omega} + i\bar{k})^2}{\bar{k} I_{18} I_1(\bar{k}h)} I_0(\bar{k}) I_{16} + \frac{2i\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})^2}{\bar{k} I_{13}} K_0(\bar{k}) I_1(\bar{k}) I_{14} - \frac{2Z(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) I_1'(\bar{k}) \bar{k} I_{16}}{I_{18} I_1(\bar{k}h)} - \frac{4Z\bar{k}^3(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) K_1'(\bar{k})}{I_{13}} I_1(\bar{k}) I_{14} \tag{A.24}$$

$$I_2 = 2\bar{k}^2 I_1(\bar{k}) I_1(\bar{s}h) - (\bar{s}^2 + \bar{k}^2) I_1(\bar{s}) I_1(\bar{k}h) \tag{A.2}$$

$$I_3 = 2\bar{k}^2 I_1(\bar{k}) K_1(\bar{s}h) - (\bar{s}^2 + \bar{k}^2) K_1(\bar{s}) I_1(\bar{k}h) \tag{A.3}$$

$$I_4 = (\bar{k}^2 - \bar{s}^2) I_1(\bar{s}) \tag{A.4}$$

$$F_2 = -\frac{4Z\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) \bar{s} I_1'(\bar{s}) I_1(\bar{k}) I_{12}}{I_9 I_{11}} + \frac{4Z\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) \bar{s} K_1'(\bar{s})}{I_{11}} I_6 I_4 I_1(\bar{k}) \tag{A.25}$$

$$F_3 = -\frac{(-i\bar{\omega} + i\bar{k})^2 I_0(\bar{k})}{\bar{k} I_{18} I_1(\bar{k}h)} l_{17} - \frac{2i\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})^2}{l_{13}\bar{k}} K_0(\bar{k}) l_{15} - \frac{(-\bar{\omega} + \bar{k}\sqrt{(We_0/We_1)(1/g_0)})^2 g_i K_o(\bar{k})}{\bar{k} K'_0(\bar{k}h)} + \frac{2Z(-i\bar{\omega} + i\bar{k})\bar{k} I'_1(\bar{k})}{l_{18} I_1(\bar{k}h)} l_{17} \quad (A.26)$$

$$F_4 = \frac{4Z\bar{k}^3 i(-i\bar{\omega} + i\bar{k}) K'_1(\bar{k})}{l_{13}} l_{15} - \frac{4Z\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})\bar{s} I'_1(\bar{s}) l_{10} l_9}{l_9 l_{11}} - \frac{4Z\bar{k}^3(-i\bar{\omega} + i\bar{k})\bar{s} K'_1(\bar{s})}{l_{11}} l_9 \quad (A.27)$$

$$F_5 = \frac{1}{We_1} (1 - \bar{k}^2) - \frac{We_{s0}}{We_1} + \frac{We_s}{We_1} \quad (A.28)$$

$$\frac{G}{H} = -\frac{E_4 + E_5}{E_1 + E_2 + E_3} \quad (A.29)$$

$$\frac{G_1}{H_1} = -\frac{F_3 + F_4 + F_5}{F_1 + F_2} \quad (A.30)$$

References

[1] A.H. Lefebvre, Atomization and Sprays, Hemisphere, New York, 1989.
 [2] R. Robitaille, J.F. Pariseau, F.A. Leblond, M. Lamoureux, Y. Lepage, J.P. Hallé, Studies on small (<350 μm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. III. Biocompatibility of smaller versus standard microcapsules, J. Biomed. Mater. Res. 44 (1999) 116–120.
 [3] G. Orive, R.M. Hernández, A.R. Gascón, M. Igartua, J.L. Pedraz, Development and optimisation of alginate-PMCG-alginate microcapsules for cell immobilisation, Int. J. Pharm. 259 (2003) 57–68.

[4] S. Sugiura, T. Oda, Y. Izumida, Y. Aoyagi, M. Satake, A. Ochiai, N. Ohkohchi, M. Nakajima, Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array, Biomaterials 26 (2005) 3327–3331.
 [5] E. Giffen, A. Muraszew, The Atomization of Liquid Fuels, John Wiley, New York, 1953.
 [6] N. Chigier, Energy Combustion and the Environment, McGraw-Hill, New York, 1981.
 [7] R.L. Panton, Incompressible Flow, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1995.
 [8] M. Adelberg, Breakup rate and penetration of a liquid jet in a gas stream, AIAA J. 5 (1967) 1408–1415.
 [9] M. Adelberg, Mean drop size resulting from the injection of a liquid jet into a high-speed gas stream, AIAA J. 6 (1968) 1143–1147.
 [10] H. Jeffreys, On the formation of water waves by wind, Proc. R. Soc. London A 107 (1925) 189.
 [11] E. Mayer, ARS J. 31 (1961) 1783–1785.
 [12] E.P. Herrero, E.M.M. Del Valle, M.A. Galán, Development of a new technology for the production of microcapsules based in atomization processes, Chem. Eng. J. 117 (2006) 137–142.
 [13] E.P. Herrero, E.M.M. Del Valle, M.A. Galán, Modelling prediction of the microcapsule size of polyelectrolyte complexes produced by atomization, Chem. Eng. J. 121 (2006) 1–8.
 [14] Y. Jia, Y. Kanno, Z.-p. Xie, New gel-casting process for alumina ceramics based on gelation of alginate.
 [15] N.K. Rizk, H.C. Mongia, Model for air blast atomization, J. Propul. Power 7 (1991) 305–311.
 [16] J. Shen, X. Li, Instability of an annular viscous liquid jet, Acta Mech. 114 (1996) 167–183.
 [17] X. Li, R.S. Tankin, On the temporal instability of a two-dimensional viscous liquid sheet, J. Fluid Mech. 226 (1991) 425–443.
 [18] Y. Liao, S.M. Jeng, M.A. Jog, Advanced sub-model for air blast atomizers, J. Propul. Power 17 (2001) 411–417.
 [19] F. Chen, J.Y. Tsaur, F. Durst, K. Samir, On the axisymmetry of annular jet instabilities, J. Fluid Mech. 488 (2003) 355–367.
 [20] L.G. Sarasua, A.C. Sicardi, Viscosity influence on the stability of a swirling jet with nonrotating core, Phys. Fluids 12 (2000) 1607–1610.

**CAPÍTULO 5: PREDICCIÓN DEL TAMAÑO DE LAS
CÁPSULAS PRODUCIDAS POR ATOMIZACIÓN NEUMÁTICA A
PARTIR DEL ANÁLISIS TEMPORAL DE ESTABILIDAD**

5. PREDICCIÓN DEL TAMAÑO DE LAS CÁPSULAS PRODUCIDAS POR ATOMIZACIÓN NEUMÁTICA A PARTIR DEL ANÁLISIS TEMPORAL DE ESTABILIDAD

Con el análisis temporal de estabilidad desarrollado previamente (Capítulo 4) se obtiene una predicción del comportamiento del sistema en los diagramas de dispersión, sin embargo, la ecuación de dispersión no predice el tamaño final de las microcápsulas generadas. Existen numerosos estudios similares (Ibrahim & Jog (Acta Mechanica 2006); Liao et al. 2000; Liao et al 2001; Shen & Li, 1996; Sirignano & Mehring, 2000; Tharakan et al. 2002), donde se estudia la tendencia de diferentes sistemas de atomización en función de los parámetros característicos del estudio de inestabilidad, el número de onda más inestable y la máxima relación de crecimiento, pero sin llegar a predecir el tamaño final de las cápsulas.

En este apartado se pretende predecir el tamaño final de las cápsulas a partir de los dos parámetros característicos del modelo de inestabilidad, la máxima relación de crecimiento, y su correspondiente número de onda más inestable, cuyos valores fueron obtenidos de los diagramas de dispersión, teniendo en cuenta los mecanismos de atomización primaria y secundaria.

5.1. ATOMIZACIÓN PRIMARIA

En este trabajo se ha adoptado el mecanismo físico de desintegración de la hoja líquida propuesto por Dombrowski y Johns (1963) con el objetivo de predecir el tamaño de las gotas generadas en la atomización primaria a partir del número de onda más inestable, obtenido del análisis temporal de estabilidad desarrollado previamente. Según este mecanismo, la desintegración se produce por el crecimiento de ondas en la superficie provocado por la acción de las fuerzas aerodinámicas sobre la hoja líquida. Una vez que las ondas alcanzan una amplitud crítica, el líquido rompe formando ligamentos cilíndricos que se supone que se mueven en dirección normal al eje del ligamento. Las fuerzas capilares provocan la ruptura de los ligamentos en gotas.

Senecal et al. (1999) desarrolló un análisis lineal de estabilidad para una hoja líquida que incluye los efectos del aire de alrededor, la tensión superficial y la viscosidad del líquido en el proceso del crecimiento de ondas. Estos autores concluyeron que el crecimiento de las ondas cortas domina al crecimiento de ondas largas cuando el número de Weber es mayor que 27/16. En el caso de las ondas cortas el diámetro del ligamento resultante está dado por:

$$d_L = \sqrt{\frac{16\delta}{K_S}} \quad (5.1)$$

donde δ es el espesor de la hoja líquida, y K_S es el número de onda más inestable obtenido de los diagramas de dispersión.

La determinación de la velocidad inicial y el espesor de una hoja líquida producida en un atomizador neumático vienen dados por (Raju, 2006):

$$V_{hoja} = \alpha V_l + (1 - \alpha)V_g \quad (5.2)$$

$$\delta = r \left[1 - \sqrt{1 - \frac{m}{\pi r^2 \rho V_{hoja}}} \right] \quad (5.3)$$

donde α tiene un valor de 0,12 a 1 dependiendo de las características de la boquilla atomizadora (en el caso de la boquilla utilizada en este trabajo, el fabricante suministró un valor de $\alpha = 0,38$), r es el radio del orificio de la boquilla, y m es el caudal de líquido.

Teniendo en cuenta que la perturbación que produce la ruptura de la hoja líquida se asume en la forma de una onda, y que el máximo valor de la parte imaginaria de la frecuencia representa la máxima relación de creci-

miento de la perturbación, la perturbación superficial en el momento de la ruptura (tiempo de ruptura) de la hoja líquida, η_b , se puede expresar como:

$$\eta_b = \eta_0 \exp(\omega_m \tau) \quad (5.4)$$

de donde se puede obtener el tiempo de ruptura, τ :

$$\eta_b = \eta_0 \exp(\omega_m \tau) \Rightarrow \tau = \frac{1}{\omega_m} \ln \left(\frac{\eta_b}{\eta_0} \right) \quad (5.5)$$

donde η_0 es la amplitud de la perturbación, y ω_m es la máxima relación de crecimiento.

Por tanto, la hoja líquida romperá a una longitud dada por la ecuación:

$$L = V\tau = \frac{V}{\omega} \ln \left(\frac{\eta_b}{\eta_0} \right) \quad (5.6)$$

donde V es la velocidad absoluta del líquido

La expresión $\ln (\eta_b / \eta_0)$ tiene el valor de 12 según el trabajo de Dombrowski y Hooper (1962). Blaisot & Adeline (2000 y 2003) obtuvieron valores de $\ln (\eta_b / \eta_0)$ en función de la distancia a lo largo del chorro líquido desde la boquilla. Sin embargo, un gran número de autores (Chryssakis, 2003; Lienemann, 2007; Senecal, 1999; Raju, 2005) siguen utilizando en la actualidad el clásico valor constante del factor de Dombrowski y Hooper (1962), que proporciona valores suficientemente precisos de la longitud de ruptura.

Basado en el trabajo de Dombrowski y Johns (1963), si se asume que la ruptura se produce cuando la amplitud de las ondas inestables sea igual al radio del ligamento producido, se formará una gota por longitud de onda. Por tanto, un balance de materia a la gota formada resulta en la ecuación (5.7):

$$d_D^3 = \frac{3\pi d_L^2}{K_L} \quad (5.7)$$

donde K_L se determina a partir de:

$$K_L d_L = \left[\frac{1}{2} + \frac{3\mu_L}{2(\rho_L \sigma d_L)^{1/2}} \right]^{-1/2} \quad (5.8)$$

que es el resultado propuesto por Weber para el número de onda correspondiente a la máxima relación de crecimiento para la ruptura de una columna líquida cilíndrica y viscosa (Dombrowski y Johns, 1963).

Substituyendo la ecuación (5.8) en el balance de materia a la gota, la ecuación (5.7), se obtiene para el tamaño de gota después de la atomización primaria:

$$d_D = 1.88 d_L (1 + 3Z)^{1/6} \quad (5.9)$$

donde $Z = \mu / (\rho_l \sigma d_L)^{1/2}$ es el número de Ohnesorge.

Por lo tanto, a partir de las ecuaciones (5.1)-(5.9) y de los parámetros característicos del modelo de inestabilidad, la máxima relación de crecimiento y su correspondiente número de onda más inestable obtenidos previamente, se puede obtener la predicción del tamaño final de las gotas producidas después de la atomización primaria, para diferentes condiciones de flujo.

5.1.1. Predicción del tamaño de gota resultante de la atomización primaria

a) Variación del caudal de líquido

La influencia de la variación del caudal de líquido en el tamaño final de las gotas se muestra en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1.: Predicción del tamaño final de las gotas y de los principales parámetros implicados en el proceso de atomización primaria

	Número de Weber del líquido (We_l)					
	2,00	1,20	0,76	0,41	0,11	0,01
$h, \mu m$	$1,95 \times 10^{-1}$	$1,53 \times 10^{-1}$	$1,21 \times 10^{-1}$	$8,94 \times 10^{-2}$	$4,73 \times 10^{-2}$	$1,58 \times 10^{-2}$
$L, \mu m$	34,66	29,01	28,79	27,68	20,53	16,28
$d_D, \mu m$ (VALOR TEÓRICO)	287,01	270,51	258,29	216,94	184,93	125,62
$d_D, \mu m$ (VALOR EXPERIMENTAL)	30,56	28,39	27,03	23,43	23,75	18,48

Se utilizaron las siguientes condiciones teóricas de flujo (iguales a las experimentales para poder posteriormente comparar la predicción teórica con los resultados experimentales): un caudal de aire constante de 138,000 L/min ($We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 35128$) y un caudal de líquido que varió desde 0,003 L/min hasta 0,037 L/min (desde $We_l = We_s = 0,01$ hasta $We_l = We_s = 2$). El valor de la viscosidad se mantuvo constante en 64,5 cP ($Z = 0,2$). En la

tabla 5.1. se puede, además, observar la predicción del espesor de la hoja líquida, y de la longitud de ruptura para los diferentes caudales de líquido utilizados.

En la Tabla 5.1. se puede observar que cuando el caudal de líquido decrece, se produce un menor espesor de la hoja líquida y una longitud de ruptura más corta, y por lo tanto gotas más pequeñas, debido a una mayor inestabilidad ya predicha por el modelo de inestabilidad en el apartado 4.5. a). Este comportamiento predicho está en concordancia con los resultados experimentales obtenidos en el apartado 2.6.1., donde se encontró que el tamaño de partícula disminuía al disminuirse el caudal de líquido.

Rizt y Lefebvre (1980) estudiaron la influencia del espesor inicial de la hoja líquida en las características de la atomización. Se encontró que para los valores más bajos del caudal del líquido se producen las hojas líquidas de menor espesor, que rompen en gotas más pequeñas. Anteriormente, se obtuvieron relaciones similares. Por ejemplo, el análisis de York et al. (1953), Hagerty y Shea (1955), y Dombrowski y Johns (1963) sugiere que el tamaño de partícula es aproximadamente proporcional a la raíz cuadrada del espesor de la hoja líquida. Además, los estudios fotográficos sobre la desintegración de las hojas líquidas llevados a cabo por Fraser et al. (1963) muestran que, para la ruptura de las hojas líquidas a través de la formación de ligamentos inestables, el diámetro de los ligamentos depende principalmente del espesor de la hoja líquida.

Aria y Hashimoto (1985) estudiaron la desintegración de hojas líquidas inyectadas en corrientes de aire a contracorriente. Las longitudes de ruptura fueron determinadas mediante valores medios obtenidos a partir de fotografías. Se mostró que la longitud de ruptura aumentaba al hacerlo la velocidad del líquido.

Sin embargo, como se muestra en la Tabla 5.1., la predicción del tamaño final de las gotas después de la atomización primaria, no refleja el tamaño final de las microcápsulas obtenido previamente de forma experi-

mental en el capítulo 2. Por tanto, puede postularse que tiene lugar un mecanismo posterior que genera una ruptura adicional de estas gotas formadas en la atomización primaria por el efecto del aire de alrededor.

b) Variación del caudal de aire:

La influencia de la variación del caudal de aire en el tamaño final de las gotas se muestra en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2.: Predicción del tamaño final de las gotas y de los principales parámetros implicados en el proceso de atomización primaria

	Número de Weber del aire ($We_{i,o}$)		
	35128	22421	14808
$h, \mu m$	$4,73 \times 10^{-2}$	$5,93 \times 10^{-2}$	$7,29 \times 10^{-2}$
$L, \mu m$	24,07	24,86	25,29
$d_D, \mu m$ (VALOR TEÓRICO)	172,17	191,30	214,73
$d_D, \mu m$ (VALOR EXPERIMENTAL)	23,75	28,03	32,87

Se utilizaron las siguientes condiciones teóricas de flujo: un caudal de líquido constante de 0,009 L/min ($We_l = We_s = 0,11$) y un caudal de aire que varió desde 89,600 L/min hasta 138,000 L/min ($We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 14808$ a $We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 35128$). El valor de la viscosidad se mantuvo

constante en 64,5 cP ($Z = 0,2$). En la tabla 5.2 se puede, además, observar la predicción del espesor de la hoja líquida, y de la longitud de ruptura para los diferentes caudales de aire utilizados.

En la Tabla 5.2. se puede observar que cuando el caudal de aire aumenta, se produce un menor espesor de la hoja líquida y una longitud de ruptura más corta, y por lo tanto gotas más pequeñas, debido a una mayor inestabilidad ya predicha por el modelo de inestabilidad en el apartado 4.5. b). Este comportamiento predicho está en concordancia con los resultados experimentales obtenidos en el apartado 2.6.2., donde se encontró que el tamaño de partícula disminuía al aumentarse el caudal de aire.

Rizk y Lefebvre (1980) estudiaron el mecanismo de ruptura de hojas líquidas así como la formación de las gotas. Mostraron que la interacción líquido/aire produce ondas que se convierten en inestables y desintegran en fragmentos. Éstos se contraen formando ligamentos que rompen en gotas. Estos autores probaron que cuando se incrementa la velocidad del aire, la hoja líquida desintegra antes y los ligamentos se forman más cerca de los labios de la boquilla atomizadora, es decir, la longitud de ruptura disminuye al aumentar la velocidad del aire. Los ligamentos formados tienden a ser más delgados y cortos, desintegrándose en gotas más pequeñas debido a la formación de hojas líquidas de menor espesor.

Aria y Hashimoto (1985) estudiaron la desintegración de hojas líquidas inyectadas en corrientes de aire a contracorriente. Las longitudes de ruptura se determinaron mediante valores medios obtenidos a partir de fotografías. Estos autores mostraron que, dado un espesor constante de la hoja líquida, la longitud de ruptura decrece al incrementarse la velocidad relativa entre el aire y el líquido.

Sin embargo, como se muestra en la Tabla 5.2., la predicción del tamaño final de las gotas después de la atomización primaria, no refleja el tamaño final de las microcápsulas obtenido previamente de forma experimental en el capítulo 2. Por tanto, puede postularse que tiene lugar un mecanismo posterior que genera una ruptura adicional de estas gotas formadas en la atomización primaria por el efecto del aire de alrededor.

c) Variación de la viscosidad del líquido:

La influencia de la variación de la viscosidad del líquido en el tamaño final de las gotas se muestra en la Tabla 5.3. Se utilizaron las siguientes condiciones teóricas de flujo: un caudal de líquido constante de 0,009 L/min ($We_l = We_s = 0.11$) y un caudal de aire constante de 89,600 L/min ($We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 14808$). El valor de la viscosidad se varió desde 64,5 cP hasta 190,0 cP ($Z = 0,2-06$). En la tabla 5.3. se puede, además, observar la predicción del espesor de la hoja líquida, y de la longitud de ruptura para los diferentes caudales de aire utilizados.

En la Tabla 5.3. se puede observar que cuando la viscosidad del líquido disminuye, se produce un menor espesor de la hoja líquida y una longitud de ruptura más corta, y por lo tanto gotas más pequeñas, debido a una mayor inestabilidad ya predicha por el modelo de inestabilidad en el apartado 4.5. c). Este comportamiento está en concordancia con los resultados experimentales obtenidos en el apartado 2.6.3., donde se encontró que el tamaño de partícula se incrementaba cuando se aumentaba la viscosidad del líquido, ya que la viscosidad del líquido tiende a impedir el crecimiento de las inestabilidades que provocan la ruptura de la hoja líquida, retrasando, por lo tanto, la desintegración del líquido y aumentando el tamaño de las microcápsulas.

Tabla 5.3.: Predicción del tamaño final de las gotas y de los principales parámetros implicados en el proceso de atomización primaria.

	<i>Número de Ohnesorge (Z)</i>		
	<i>0,2</i>	<i>0,4</i>	<i>0,6</i>
<i>h, μm</i>	$7,29 \times 10^{-2}$	$8,69 \times 10^{-2}$	$1,08 \times 10^{-1}$
<i>L, μm</i>	25,29	44,12	57,76
<i>d_D, μm</i> (VALOR TEÓRICO)	214,73	273,61	342,68
<i>d_D, μm</i> (VALOR EXPERIMENTAL)	32,87	37,4	46,5

Rizt y Lefebvre (1980) estudiaron la influencia del espesor inicial de la hoja líquida en las características de la atomización. Se encontró que para los valores más bajos de la viscosidad del líquido se producen las hojas líquidas de menor espesor que rompen en gotas más pequeñas.

Dombrowski y Fraser (1954) mostraron que la desintegración se produce más alejada de la boquilla al incrementarse la viscosidad del líquido, es decir, la longitud de ruptura aumenta al incrementarse la viscosidad del líquido.

Sin embargo, como se muestra en la Tabla 5.3., la predicción del tamaño final de las gotas después de la atomización primaria, no refleja el tamaño final de las microcápsulas obtenido previamente de forma experimental en el capítulo 2. Por tanto, puede postularse que tiene lugar un

mecanismo posterior que genera una ruptura adicional de estas gotas formadas en la atomización primaria por el efecto del aire de alrededor.

5.2. ATOMIZACIÓN SECUNDARIA

Dado que el tamaño de gota predicho por la atomización primaria es mayor que el tamaño final de la microcápsulas obtenido previamente de forma experimental, es obvio que, en el proceso de pulverización que se está estudiando existe un segundo mecanismo de atomización, donde las gotas formadas en la atomización primaria se desintegrarán de nuevo por el efecto del aire de alrededor por el mecanismo denominado atomización secundaria.

Las teorías de atomización demuestran que, después de la desintegración del líquido inyectado por el atomizador y la formación de las gotas se produce la rotura de las gotas cuando estas penetran en el aire de alrededor. Es decir, se produce una rotura inducida aerodinámicamente. Este fenómeno se conoce en la literatura como ruptura de gota o atomización secundaria. El movimiento relativo entre una gota y el aire de su alrededor provoca una distribución no uniforme de presión y un esfuerzo cortante en la superficie de la gota. Estas fuerzas externas deforman la gota y provocan su desintegración siempre y cuando superen a la fuerza opuesta de tensión superficial. Las gotas de nueva formación pueden sufrir una mayor desintegración hasta conseguir un diámetro estable para el cual la fuerza de tensión superficial sea mayor que las fuerzas externas (Faeth y Hsiang, 1995).

Se asume que el proceso es controlado por el número de Weber que expresa la relación entre las fuerzas inerciales y de tensión superficial (Faeth et al., 1995) y que se define como:

$$We = \frac{\rho_g d_D V_{hoja}^2}{\sigma_l} \quad (5.10)$$

Se han obtenido diferentes correlaciones para estimar las características finales de las gotas generadas en la atomización secundaria (Faeth et al, 1995; Hsiang y Faeth, 1992, 1993). Estas correlaciones definen el diámetro

medio de gota y el proceso de deformación hasta completar la rotura de la gota en el tiempo de ruptura. Los resultados experimentales indican que el proceso de fragmentación puede clasificarse en diferentes modos de ruptura basados en el número de Weber de gota (Reitz y Diwakar, 1987):

$We < 12$	Vibracional
$12 \leq We < 18$	En forma de bolsa
$8 < We \leq 45$	En forma de bolsa y vapor
$45 < We \leq 100$	Caótico
$100 < We \leq 350$	En forma de ligamentos
$350 < We \leq 1000$	“Wave crest stripping”
$1000 < We \leq 2670$	Catastrófico

El mecanismo de ruptura de corte engloba los modos de ruptura en forma de ligamentos y de “wave crest stripping” y es dominante para números de Weber comprendidos entre 80 y 800 (Chou et al., 1997). Después de una fase inicial de deformación, el proceso de desintegración de la gota incluye un amplio sistema de ligamentos saliendo de la periferia de la gota madre, con numerosas gotas individuales cerca del final de los ligamentos aguas abajo.

El mecanismo de ruptura catastrófico se observa de forma general para números de Weber mayores de 800 y tiene ciertas similitudes con el mecanismo anterior de ruptura. En el modo catastrófico está presente un mecanismo de estiramiento de la capa límite de la gota, combinado con grandes ondas en la superficie de la gota. El crecimiento de las inestabilidades junto con la deformación de la gota en finos discos es suficiente para romper la gota madre en una nube de fragmentos, los cuales son todavía más grandes comparados con el espesor de la capa límite de la gota. Los fragmentos resultantes sufren una mayor desintegración a través del mecanismo de estiramiento de la capa límite de la gota, de modo que la desintegración de la

gota se acelera en una pequeña nube de pequeñas gotas. Estos dos mecanismos fueron estudiados de forma experimental por Ranger y Nicholls (1969).

Una expresión de la correlación para el tamaño de partícula una vez producida la atomización secundaria se puede obtener teniendo en cuenta la similitud entre la ruptura primaria de líquidos no turbulentos y el mecanismo de ruptura de gotas por corte (Hsiang y Faeth, 1992). En ambos casos, las gotas o ligamentos son extraídos de las capas límites en la fase líquida que se forman cerca de la superficie líquida: en el lado de barlovento de las ondas a lo largo de la superficie del líquido para la ruptura primaria de líquidos no turbulentos (Wu et al., 1991); y en el lado de barlovento de las gotas para la ruptura secundaria en el modo de ruptura de corte (Hsiang y Faeth, 1992).

Se asume pues, que la velocidad relativa en el momento de la ruptura se puede representar por la velocidad relativa inicial de la hoja líquida, V_{hoja} , y que el tamaño de las gotas después de la ruptura es comparable con el espesor de la capa límite de las gotas cuando se alcanza la periferia de la gota. La distribución de tamaño de partícula final está dominada por los tamaños de gota mayores (Hsiang y Faeth, 1992), de tal forma que el desarrollo final de la capa límite de líquido se tomará como proporcional al tamaño de gota después de la atomización primaria. Finalmente, se asume que la capa límite de líquido es laminar, debido a los valores relativamente pequeños de la velocidad del líquido y del tamaño de gota después de la atomización primaria (Hsiang y Faeth, 1992).

Por tanto, el tamaño final de las microcápsulas, después de la atomización secundaria puede expresarse como (Hsiang y Faeth, 1992):

$$\frac{SMD}{d_D} = C_S \left(\frac{\rho_L}{\rho_G} \right)^{1/4} \left[\left(\frac{\mu_L}{(\rho_L d_D V_{hoja})} \right)^{1/2} \right] \quad (5.11)$$

donde C_S es una constante empírica en la que están implicados diferentes factores de proporcionalidad. Reordenando la ecuación (5.11) e introduciendo el número de Weber, se obtiene la ecuación final para el tamaño de partícula después de la atomización secundaria para los regímenes de ruptura de corte y catastrófico (Hsiang y Faeth, 1992):

$$\frac{\rho_G SMD V_{sheet}^2}{\sigma} = C_S \left(\frac{\rho_L}{\rho_G} \right)^{1/4} \left[\left(\frac{\mu_L}{(\rho_L d_D V_{hoja})} \right)^{1/2} \right] We \quad (5.12)$$

Esta última correlación permite la predicción de los tamaños de partícula después de la atomización secundaria para las diferentes condiciones de operación.

5.2.1. Predicción del tamaño de gota resultante de la atomización secundaria

a) Variación del caudal de líquido

La distribución final del tamaño de las cápsulas se obtuvo a partir de la ecuación 5.12, y del tamaño de gota de la atomización primaria, d_D , obtenido en el apartado 5.1.1. a). La velocidad de la hoja se obtuvo según la ecuación 5.2.

La comparación entre el tamaño final predicho y experimental con la variación del caudal de líquido se muestra en la Figura 5.1. Se utilizaron las condiciones teóricas de flujo del apartado 5.1.1. a).

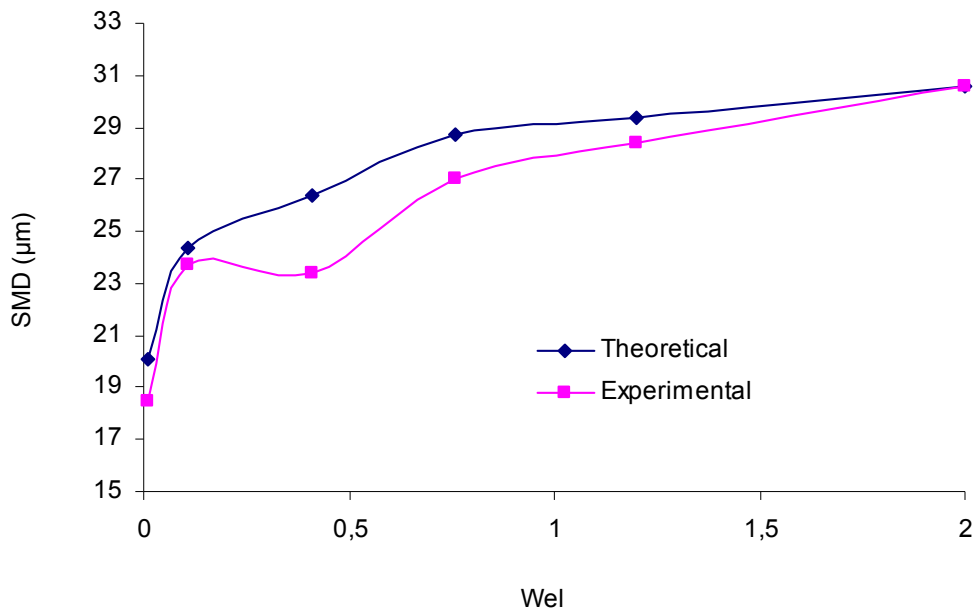


Figura 5.1. Comparación entre el tamaño final teórico y experimental

($We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 35128$; $Z = 0.2$; $We_l = We_s = 0.01 - 2$)

b) Variación del caudal de aire:

La distribución final del tamaño de las cápsulas se obtuvo a partir de la ecuación 5.12, y del tamaño de gota de la atomización primaria, d_D , obtenido en el apartado 5.1.1. b). La velocidad de la hoja se obtuvo según la ecuación 5.2.

La comparación entre el tamaño final predicho y experimental con la variación del caudal de líquido se muestra en la Figura 5.2. Se utilizaron las condiciones teóricas de flujo del apartado 5.1.1. b).

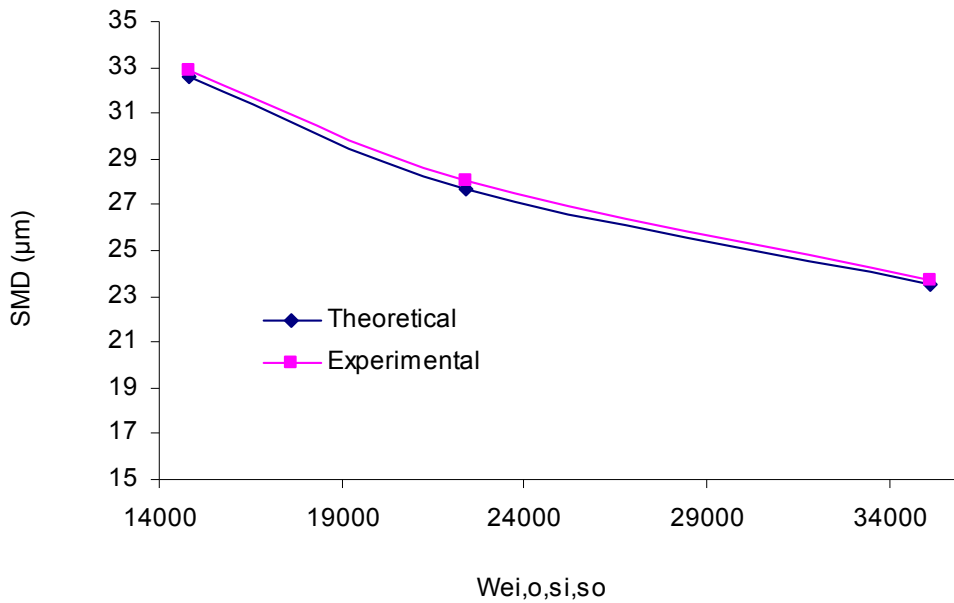


Figura 5.2. Comparación entre el tamaño final teórico y experimental
 ($We_l = We_s = 0.11$; $Z = 0.2$; $We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 14808 - 35128$)

c) Variación de la viscosidad del líquido:

La distribución final del tamaño de las cápsulas se obtuvo a partir de la ecuación 5.12, y del tamaño de gota de la atomización primaria, d_D , obtenido en el apartado 5.1.1. c). La velocidad de la hoja se obtuvo según la ecuación 5.2.

La comparación entre el tamaño final predicho y experimental con la variación del caudal de líquido se muestra en la Figura 5.3. Se utilizaron las condiciones teóricas de flujo del apartado 5.1.1. c).

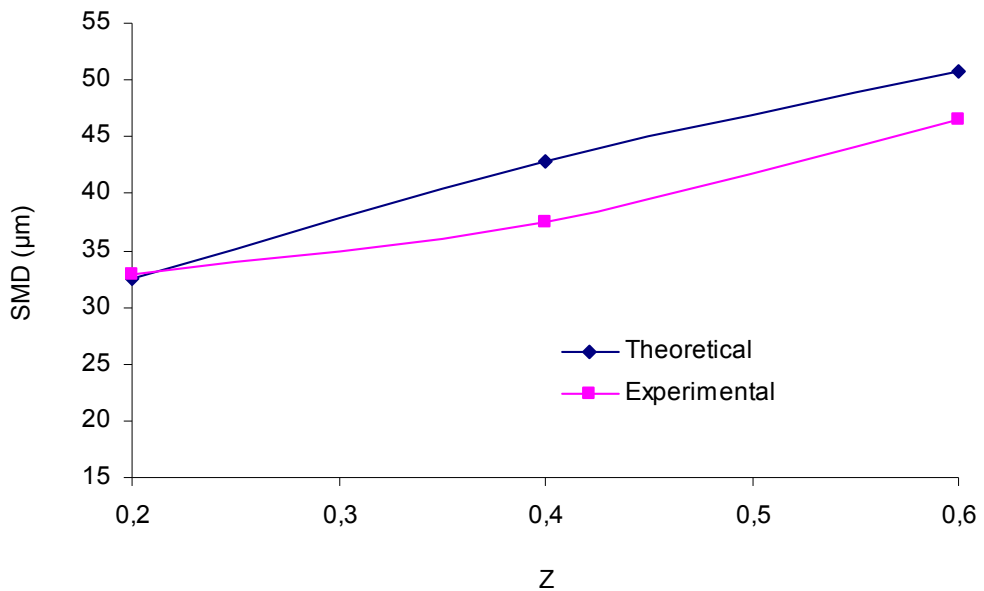


Figura 5.3. Comparación entre el tamaño final teórico y experimental

$$We_i = We_o = We_{si} = We_{so} = 14808; We_l = We_s = 0.11; Z = 0.2 - 0.6$$

A partir de las Figuras 5.1., 5.2., y 5.3. es posible concluir que se produce una buena predicción del tamaño final de las microcápsulas a partir del modelo de inestabilidad desarrollado en este trabajo bajo un amplio rango de condiciones de flujo.

5.3. CONCLUSIONES

Con el análisis temporal de estabilidad desarrollado previamente se obtuvo una predicción del comportamiento del sistema, sin embargo, no se obtuvo una predicción del tamaño final de las microcápsulas generadas. En este capítulo se predice el tamaño final de las cápsulas a partir de los dos parámetros característicos del modelo de inestabilidad, la máxima relación de crecimiento y su correspondiente número de onda más inestable, teniendo en cuenta los mecanismos de atomización primaria y secundaria.

Los tamaños finales de las cápsulas obtenidos teniendo en cuenta los mecanismos de atomización primaria y secundaria, fueron comparados con los obtenidos experimentalmente, obteniéndose valores muy cercanos.

Por lo tanto, con este capítulo, se puede comprobar que el modelo de inestabilidad, desarrollado en el capítulo anterior, puede ser utilizado para predecir con precisión el tamaño final de las cápsulas generadas.

Además, comparando la predicción realizada con el modelo semi-empírico (Capítulo 3) y la predicción del estudio de inestabilidad (Capítulos 4 y 5), se puede observar que el modelo real del proceso (modelo de inestabilidad) se ajusta con mayor precisión a los datos experimentales que el modelo semi-empírico que se puede utilizar como una primera aproximación para describir tanto la tendencia como el tamaño final de las microcápsulas.

5.4. NOMENCLATURA

Símbolo	Descripción	Unidades
A	Fuerza Vortex	m^2/s
d_D	Diámetro de gota después de la atomización primaria	μm
d_L	Diámetro del ligamento	μm
D_a	Diámetro interno de la hoja líquida	μm
D_b	Diámetro externo de la hoja líquida	μm
g	Relación de densidades gas/líquido	
h	Relación de radios interno/externo	
k	Número de onda axial	$1/m$
K_S	Número de onda más inestable	$1/m$
K_L	Número de onda definido por la Eq. (5.8)	$1/m$
\dot{m}_i	Flujo másico del líquido	kg/s
n	Número de onda azimutal	
P	Presión media	N/m^2
p'	Perturbación de presión	N/m^2
R_a	Radio interior de la hoja líquida	m
R_b	Radio externo de la hoja líquida	m
Z	Número de Ohnesorge, $\mu / (\rho_l \sigma D_b)^{1/2}$	adimens.
r	Radio	m
t	Tiempo	s
U	Velocidad axial	m/s
u	Velocidad axial de la perturbación	m/s
V	Velocidad radial	m/s
v	Velocidad radial de la perturbación	m/s
W	Velocidad tangencial	m/s
We	Número de Weber ($We = \rho U^2 D_b / \sigma$)	adimens.
w	Velocidad tangencial de la perturbación	m/s

Símbolo	Descripción	Unidades
<i>Letras griegas</i>		
δ	Espesor de la hoja líquida	μm
η	Perturbación de desplazamiento	m
η_b	Perturbación superficial en el momento de la ruptura de la hoja líquida	m
η_0	Amplitud de la perturbación	m
μ	Viscosidad	kg/m s
ρ	Densidad	kg/m^3
σ	Tensión superficial	kg/s^2
ω	Frecuencia temporal	1/s
ω_m	Máxima relación de crecimiento	1/s
Ω	Velocidad angular	1/s
θ	Ángulo azimutal	radianes
τ	Tiempo de ruptura	s
ϕ	Diferencia de fase	radianes

Subíndices

i	Aire interno
g	Fase gas
l	Fase líquida
o	Aire externo
s	Basado en componentes de velocidad tangenciales

5.5. BIBLIOGRAFÍA

- Arai, T., Hashimoto, H. (1985), “Disintegration of a thin liquid film sheet in a concurrent gas stream”, in: *Proceedings of the 3rd international conference of liquid atomization and spray systems*, VIB/1/1-7.
- Chou, W.H., Hsiang, L.P., Faeth, G.M. (1997), “Temporal properties of drop breakup in the shear breakup regime”, *Int. J. Multiphase Flow*, **23(4)**, 651-669.
- Chryssakis, C.A., Assanis, D.N., Lee, J-K., Nishida, K. (2003), “Fuel spray simulation of high-pressure swirl-injector for DISI engines and comparison with laser diagnostic measurements”, *Society of Automotive Engineers, Inc.* (2003).
- Dombrowski, N., Fraser, R.P. (1954), Photographic investigation into the disintegration of liquid sheets”, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A., Math. Phys. Sci.*, **247(924)**, 101-130.
- Dombrowski, N., Hooper, P.C. (1962), “The effect of ambient density on drop formation in sprays”, *Chem. Eng. Sci.*, **17**, 291-305.
- Dombrowski, N., Johns, W.R. (1963), “The aerodynamic instability and disintegration of viscous liquid sheets”, *Chem. Eng. Sci.*, **18**, 203-214.
- Faeth, G.M., Hsiang, L.P. (1995), “Drop deformation and breakup due to shock wave and steady disturbances”, *Int. J. Multiphase Flow*, **21(4)**, 545-560.
- Faeth, G.M, Hsiang, L.P., Wu, P.K. (1995), “Structure and breakup properties of sprays”, *Int., J. Multiphase Flow*, **21.**, 99-127.

- Fraser, R.P., Dombrowski, N., Routley, J.H. (1963), “The atomization of a liquid sheet by an impinging air stream”, *Chem. Eng. Sci.*, **18**, 339-353.
- Hagerty, W.W., Shea, J.F. (1955), “A study of the stability of plane fluid sheets”, *J. Appl. Phys.*, **22**, 509-514.
- Hsiang, L.P., Faeth, G.M. (1992), “Near-limit drop deformation and secondary breakup”, *Int. J. Multiphase Flow*”, **18**, 635-652.
- Hsiang, L.P., Faeth, G.M. (1993), “Drop properties after secondary breakup”, *Int. J. Multiphase Flow*”, **19(5)**, 721-735.
- Ibrahim, A.A., Jog, M.A. (2006), “Effect of liquid and air swirl strength and relative rotational direction on the instability of an annular liquid sheet”, *Acta Mech.*, **186**, 113-133.
- Liao, Y., Jeng, S.M., Jog, M.A., Benjamin, M.A. (2000), “Instability of an annular liquid sheet surrounded by swirling airstreams”. *AIAA J.* **38**, 453-460.
- Liao, Y., Jeng, S.M., Jog, M.A., Benjamin, M.A. (2001), “Advanced sub-model for airblast atomizers”. *J. Prop. Power*, **17**, 411-417.
- Lienemann, H., Shrimpton, J. (2007), “A study on the aerodynamic instability of attenuating liquid sheets”, *Exp. Fluids.*, **42**, 241-258.
- Raju, M.S. (2006), “Numerical investigation of various atomization models in the modelling of a spray flame”, *AIAA-2006-0176*, NASA.

- Ranger, A.A., Nicholls, J.A. (1969), “The aerodynamic shattering of liquid drops“, *AIAA JI*, **7**, 285-290.
- Reitz, R.D., Diwakar, R. (1987), “Structure of high-pressure fuel sprays“, *SAE Paper 870598*.
- Rizz, N.K., Lefebvre, A.H. (1980), “Influence of liquid film thickness on airblast atomization“, *J. Eng. Power-T ASME*, **102**, 706-710.
- Senecal, P.K. et al. (1999), “Modelling high-speed viscous liquid sheet atomization“, *Int. J. Multiphase Flow*, **25**, 1073-1097.
- Shen, J., Li, X. (1996), “Instability of an annular viscous liquid jet“, *Acta Mech.*, **114**, 167-183.
- Sirignano, W.A., Mehring, C. (2000), “Review of theory of distortion and disintegration of liquid streams“. *Prog. Energy Comb. Sci.*, **26**, 609-655.
- Tharakan, T.J., Ramamurthi, K., Balakrishnan, M. (2002), “Nonlinear breakup of thin liquid sheets“, *Acta Mech.*, **156**, 29-46.
- Wu, P.K., Ruff, G.A., Faeth, G.M. (1991), “Primary breakup in liquid/gas mixing layers“, *Atomiz. Sprays*, **1**, 421-440.
- York, J.L., Stubbs, H.F., Tek, M.R. (1953), “The mechanism of disintegration of liquid sheets“, *T. ASME*, **75**, 1279-1286.

5.6. DIFUSIÓN DE RESULTADOS.

Los resultados derivados del Capítulo 5 se difundieron a través de un artículo internacional pendiente de publicación:

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, M.A. Galán
Título: *Prediction of microcapsule size produced by a new technology of microencapsulation base on air-blast atomization.*
Revista: *Journal of Aerosol Science* (enviado para publicación, 2010).
Impacto: 2,239 (año 2008).

CAPÍTULO 6: ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA DE MATERIA EN BIOMEDICINA

6. ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA DE MATERIA EN BIOMEDICINA

Con el objetivo de conocer el comportamiento real de las microcápsulas en el cuerpo humano, para su utilización posterior en cualquiera de sus múltiples aplicaciones en el campo de la medicina, es necesario realizar estudios “in vitro” de transferencia de materia y así conocer las condiciones de liberación de las sustancias o activos terapéuticos inmovilizados en el interior de las microcápsulas a través de los poros de la membrana de las mismas.

Para abordar de forma general los casos más importantes de aplicación de las microcápsulas en el cuerpo humano, se ha simulado la liberación de proteínas desde el interior de las cápsulas hacia medios fisiológicos. Además, se ha simulado la transferencia de materia de proteínas a través de tejidos, o la filtración terapéutica desde las cavidades de almacenamiento y el consiguiente transporte a través del órgano.

Para llevar a cabo estas simulaciones se ha realizado, primeramente, un estudio de transferencia de materia de proteínas desde el interior de las cápsulas hasta medios externos de volumen finito. Se debe considerar la condición de volumen externo finito cuando la concentración del activo en el medio circundante al dispositivo de liberación se incrementa de forma apreciable, como ocurre en los sistemas en discontinuo. Esto puede ocurrir en medios fisiológicos, tales como, los ojos (Kimura et al., 1992; Martin, 1994; Peyman y Ganiban, 1995), los huesos (Otsuka et al., 1994a, 1994b), o las cavidades periodontales (Greenstein y Polson, 1998; Needleman, 1991; Rams y Slots, 2000). Además, se han realizado, posteriormente, estudios de transferencia de materia en continuo para simular la transferencia de materia de proteínas a través de órganos y tejidos.

De forma macroscópica, tanto los medios fisiológicos como los tejidos y órganos, se consideran de forma ideal como medios porosos isotrópicos (Figura 8.1.), ya que se estudia la liberación de proteínas desde una cápsula

hacia un lecho poroso, simulado mediante las otras partículas esféricas, es decir, las otras cápsulas (Figura 6.1.).

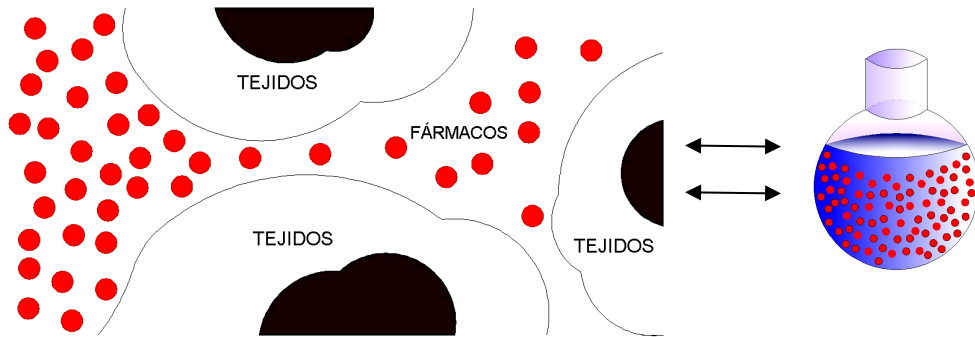


Figura 6.1. Simulación del transporte de fármacos en tejidos vivos, asumiendo un medio isotrópico poroso

Para desarrollar estos estudios se utilizó un método novedoso para este tipo de análisis basado en la utilización de una sustancia coloreada, la rodamina B isotiocianato dextrano, RBID, que se puede utilizar para simular la liberación de las proteínas del interior de las cápsulas poliméricas, ya que simula el comportamiento de las mismas.

RBID es un colorante anfótero que normalmente se cataloga como básico debido a su carga total positiva. La estructura de la rodamina B se muestra en la Figura 6.2.

La principal característica de la estructura de este colorante es su nitrógeno cuaternario, pero también debe tenerse en cuenta la existencia de un grupo carboxilo que daría a la molécula un carácter anfótero para valores altos de pH (Cumbal et al., 2003).

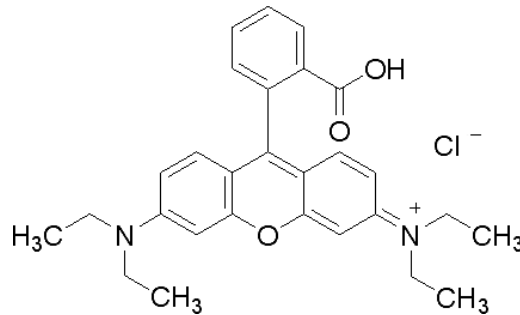


Figura 6.2. Estructura de la rodamina B

El dextrano es un polisacárido hidrofílico, complejo y ramificado formado por numerosas cadenas de glucosa, caracterizado por su alto peso molecular, buena solubilidad en agua, baja toxicidad, y relativa inactividad (Haugland, 2005).

Las moléculas de rodamina B pueden funcionalizarse con un grupo isotiocianato ($-N=C=S$) reemplazando un átomo de hidrógeno en el anillo superior de la estructura (ver Figura 6.3.). El dextrano se une a la molécula de rodamina B mediante el grupo isotiocianato, dejando libre el grupo carboxilo (Figura 6.3.).

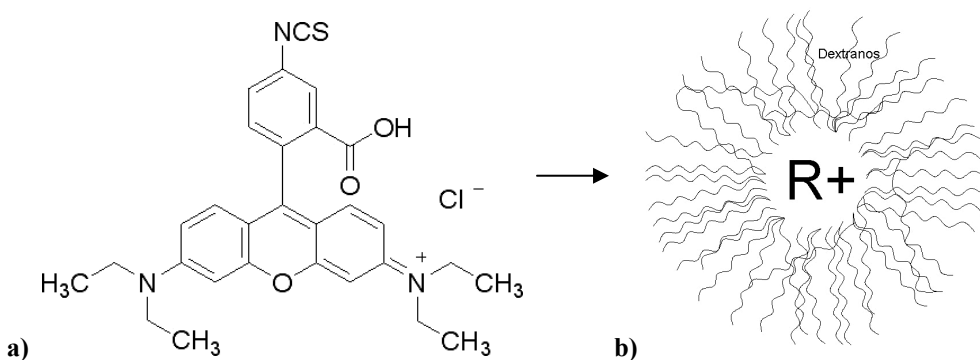


Figura 6.3. Estructura química de la rodamina B isotiocianato (a) y de la RBID (b)

Como puede apreciarse en la Figura 6.3, la rodamina B isotiocianato dextrano, RBID, mantiene la misma carga efectiva que la rodamina B, ya que, la RBID conserva el grupo carboxilo que da a la molécula su carácter anfótero a altos valores de pH. Además, RBID es una biomacromolécula disponible en tres pesos moleculares diferentes, 10, 40 y 70 KDa, debido a las moléculas de dextrano.

6.1. ESTUDIO EXPERIMENTAL DE TRANSFERENCIA DE MATERIA

6.1.1. Descripción de los procedimientos utilizados en el estudio

a) Descripción del proceso de calibración de RBID

La RBID es una sustancia coloreada que permite seguir su liberación empleando espectrofotometría a 555 nm (pico máximo de absorbancia de la RBID). Con el objetivo de transformar los valores obtenidos de absorbancia en concentraciones de proteína, se realizaron las calibraciones absorbancia /concentración correspondientes a los tres pesos moleculares de RBID utilizados en el trabajo, como se muestra en las Figuras 6.4.-6.6.

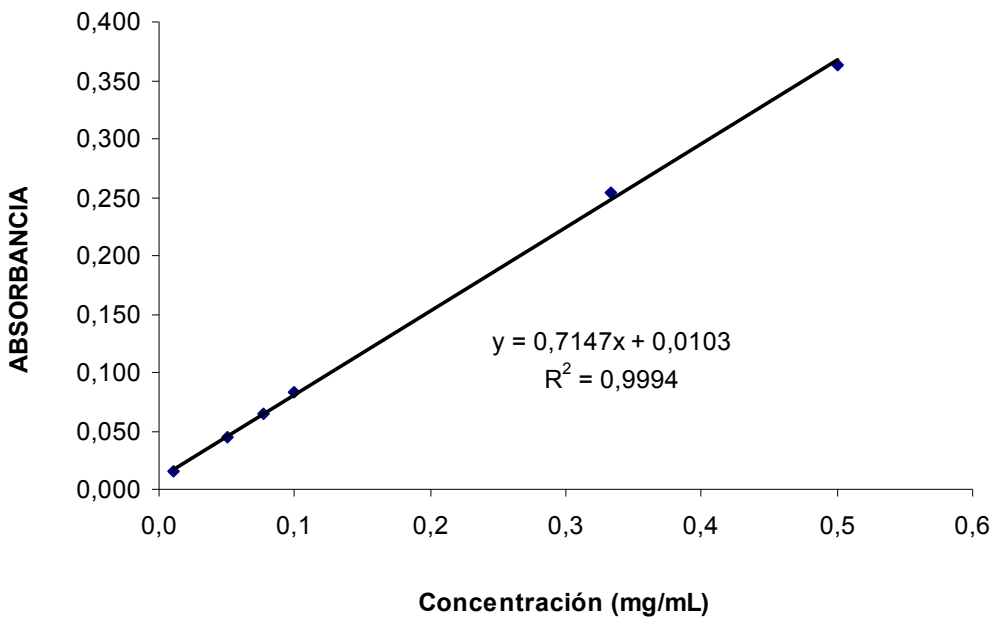


Figura 6.4. Calibración de RBID con peso molecular de 10 KDa

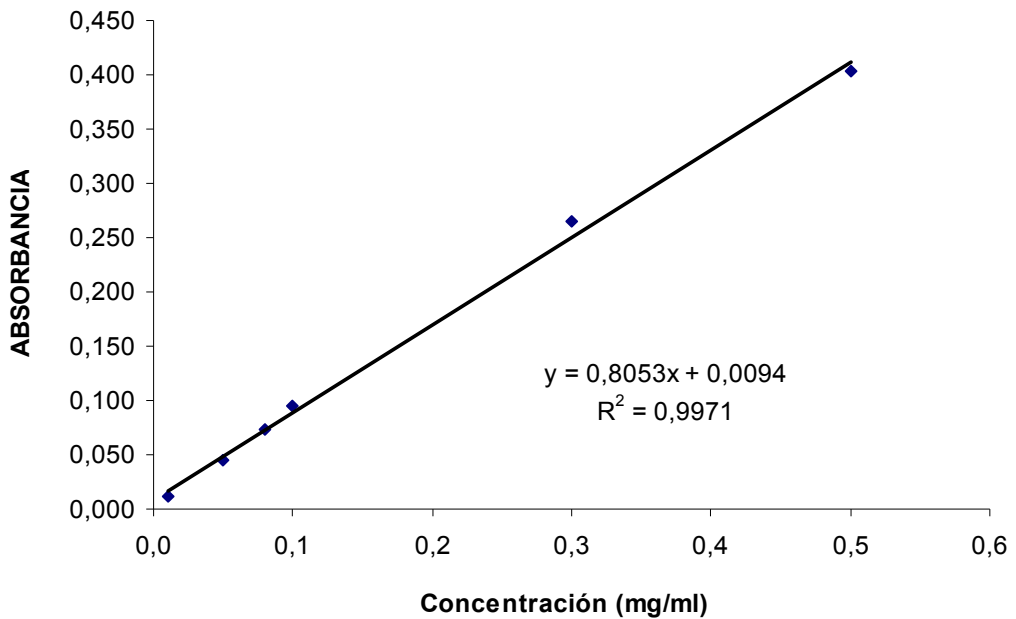


Figura 6.5. Calibración de RBID con peso molecular de 40 KDa

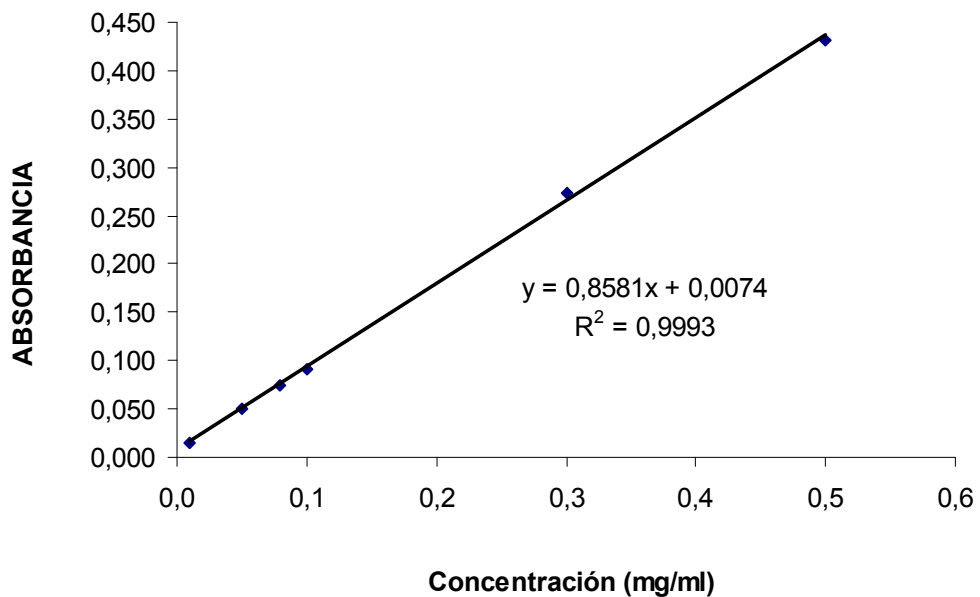


Figura 6.6. Calibración de RBID con peso molecular de 70 KDa

b) Descripción del procedimiento utilizado en el estudio en discontinuo

Con el fin de simular el fenómeno difusional en discontinuo, se dispuso un gramo de cápsulas en un reactor esférico de 25 mL con 5 mL de agua desionizada. El reactor se dispuso sobre un agitador orbital con una velocidad constante de 110 RPM. Esta velocidad de agitación intenta simular el movimiento del cuerpo humano en el proceso de liberación de una proteína en un medio fisiológico (Comunicación personal, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Salamanca). El dispositivo experimental se muestra en la Figura 6.7.

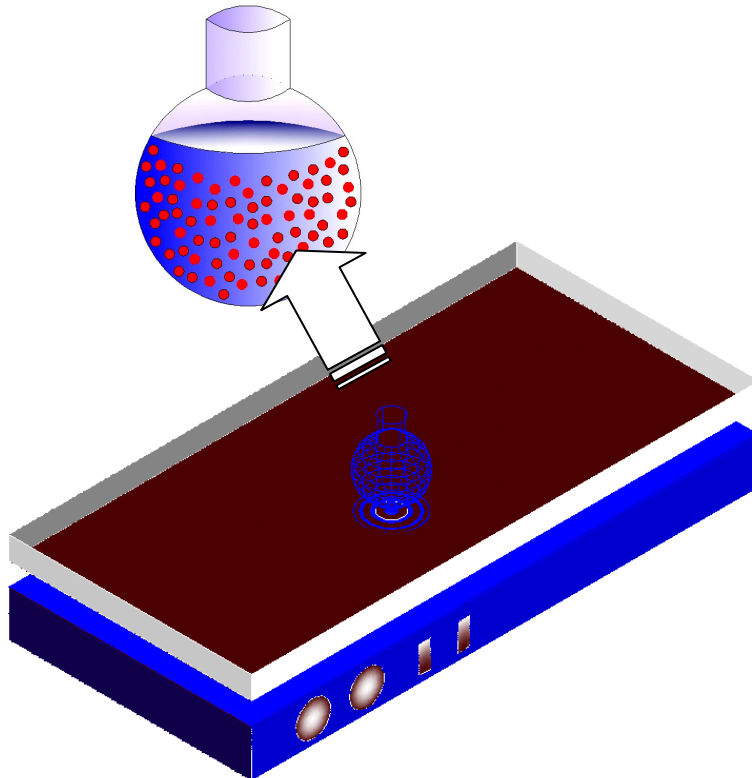


Figura 6.7. Instalación utilizada para simular la transferencia de materia en discontinuo

c) Descripción del procedimiento utilizado en el estudio en continuo

Con el objetivo de simular el fenómeno difusional en continuo, se dispuso un gramo de cápsulas en un reactor esférico de 25 mL con 5 mL de agua desionizada, que hace las veces de sobrenadante.

El reactor se colocó sobre un agitador orbital con una velocidad constante de 110 RPM. Esta velocidad de agitación fue seleccionada con el fin de simular el movimiento del cuerpo humano en el proceso de liberación de una proteína a través de órganos y tejidos (Comunicación personal, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Salamanca).

Con el objetivo de mantener un caudal constante a través del reactor se utilizaron dos bombas peristálticas, que además, suministran el efecto de la convección al sistema.

Se utilizó un espectrofotómetro conectado al sistema en continuo para determinar la cantidad de RBID liberada desde las cápsulas, que suministra datos de absorbancia en continuo cada minuto.

El esquema del dispositivo experimental se muestra en la Figura 6.8.

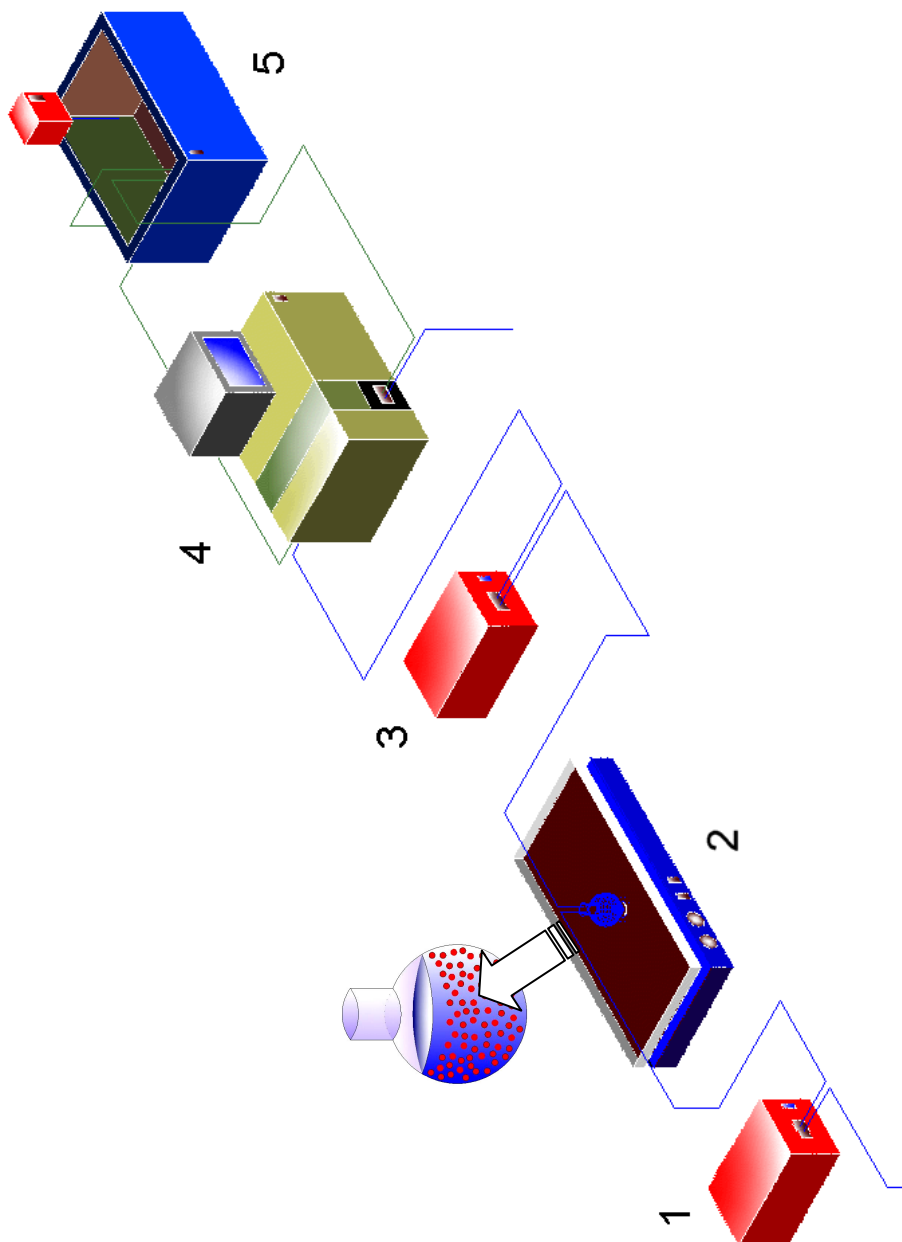


Figura 6.8. Instalación utilizada para simular la transferencia de materia en continuo
 (1) y (3) bombas peristálticas; (2) reactor sobre un agitador orbital; (4) espectrofotómetro; (5) baño termostatzado

d) Descripción del procedimiento de preparación de las cápsulas

A la hora de realizar estudios de transferencia de materia las micro-cápsulas generadas según la técnica desarrollada en este trabajo generan ciertos problemas operacionales, que llevó a buscar un sistema equivalente que resolviera estos problemas, pero que no variara los resultados finales.

Para llevar a cabo los estudios de transferencia de materia con las cápsulas de tamaño comprendido entre 20-50 micrómetros se necesitaría una gran cantidad de cápsulas para que la RBID liberada fuera espectrofotométricamente detectable y las cápsulas formaran un lecho poroso isotrópico. Además, con estas cápsulas de tamaño micrométrico, debido a su pequeño peso, es muy difícil tomar muestras del sobrenadante tanto en el sistema en continuo, como en el discontinuo, ya que al hacerlo es muy probable que se extraigan cápsulas. Por último, en el sistema en continuo es muy difícil mantener un caudal a través del reactor, ya que las bombas peristálticas pueden absorber las cápsulas, perdiéndose la RBID contenida en su interior.

Por tanto, las cápsulas necesarias para los estudios de transferencia de materia fueron generadas según el siguiente procedimiento. Se prepararon disoluciones de RBID-alginato con diferentes concentraciones (1,2 y 3,0 % en peso) disolviendo la cantidad apropiada de alginato en una disolución de 1 mg/mL de RBID. Las disoluciones RBID-alginato se añadieron por extrusión, gota a gota, utilizando jeringuillas estériles de aguja de 25G, sobre disoluciones del 2 % en peso de cloruro de bario bajo una agitación constante de 30 RPM. Después de dos minutos en la solución gelificante, las cápsulas se extrajeron por filtración con filtros de Nylon de 0,45 micras. Esta técnica de generación de cápsulas produce tamaños comprendidos entre 1-3 mm, resolviéndose todos y cada uno de los problemas planteados con las cápsulas micrométricas.

Sin embargo, las cápsulas grandes deben ser representativas de las cápsulas pequeñas, es decir, se debe asegurar que se produce el mismo fenómeno de transferencia de materia con ambos sistemas. Para ello, se compararon los perfiles de liberación de RBID para ambos sistemas, manteniendo las mismas condiciones experimentales, y variando solamente el proceso de generación de las cápsulas. Un ejemplo puede observarse en la Figura 6.9.

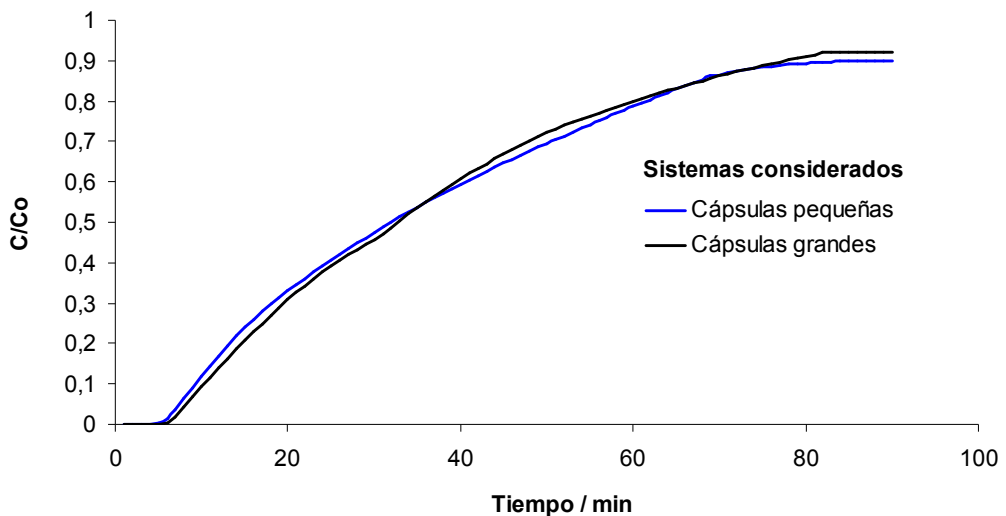
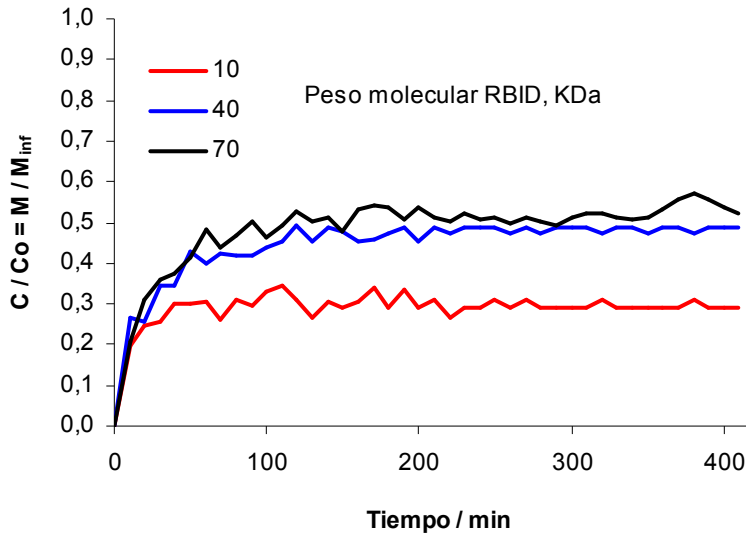


Figura 6.9. Comparación de los perfiles de liberación de los dos sistemas considerados

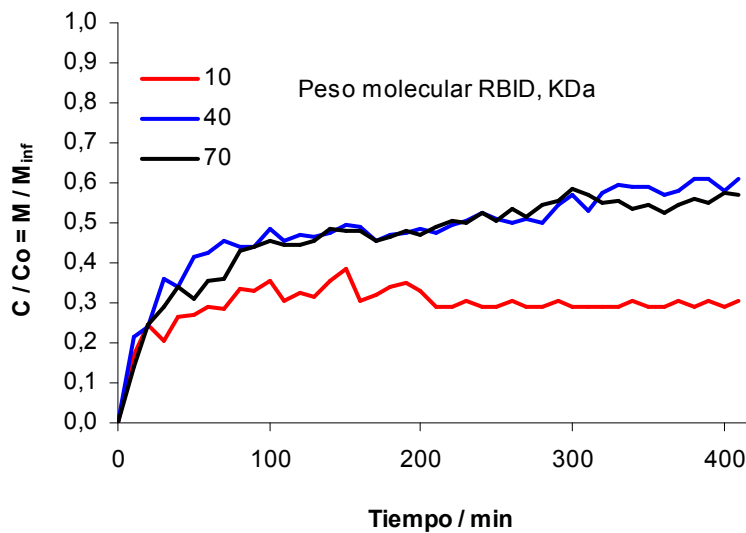
Peso molecular de RBID: 40 KDa; Concentración de alginato: 3,0 % en peso;
Concentración de BaCl₂: 2,0 % en peso; Sistema en continuo.

6.1.2. Resultados experimentales de la transferencia de materia

Los perfiles de liberación de proteína, es decir, los datos de liberación acumulada para los tres pesos moleculares de RBID utilizados (10, 40 y 70 KDa) se muestran en las Figuras 6.10. y 6.11. para los procesos en discontinuo y continuo, respectivamente. Estos datos se obtuvieron para dos concentraciones diferentes de alginato (1,2 y 3,0 % en peso).



a)



b)

Figura 6.10. Liberación acumulada en el proceso discontinuo para los tres pesos moleculares de RBID y para las dos concentraciones de alginato

a) 1.2 % wt. b) 3.0 % wt.

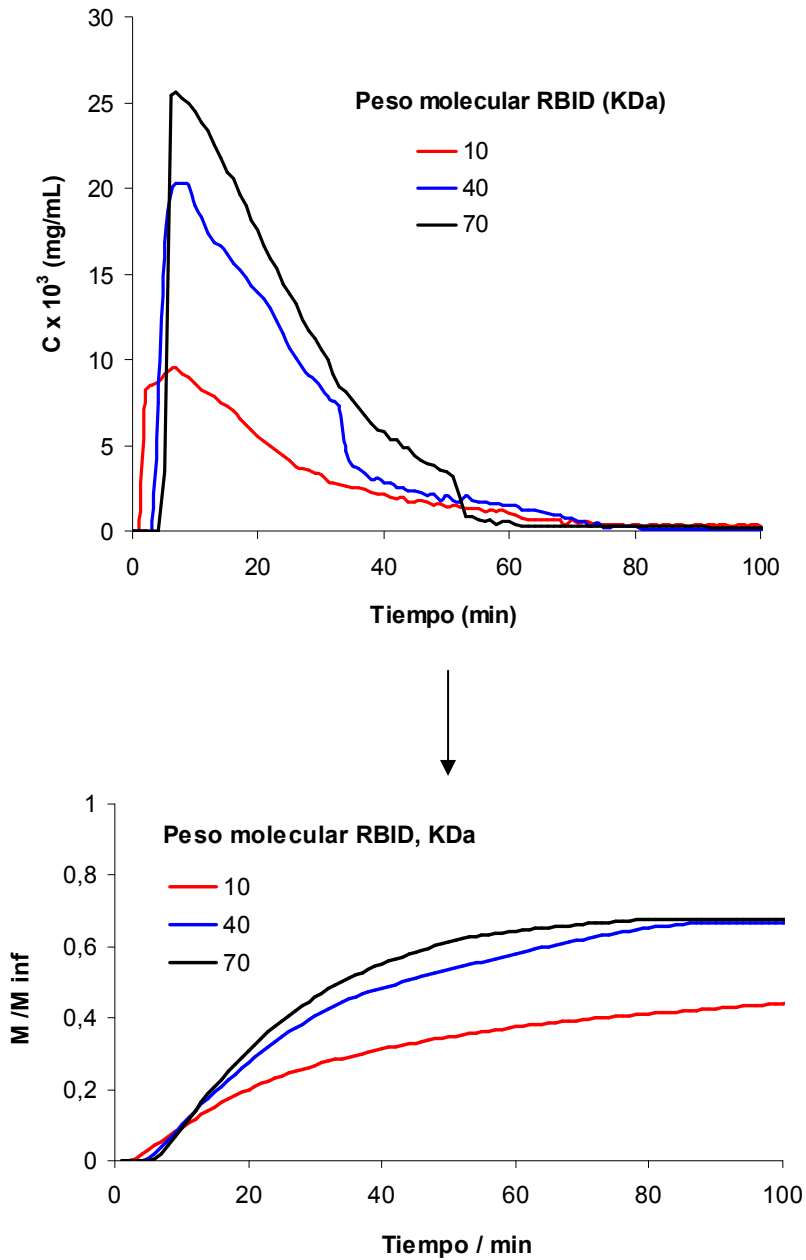


Figura 6.11a. Liberación acumulada en el proceso continuo para los tres pesos moleculares de RBID (Concentración alginato: 1,2 % en peso)

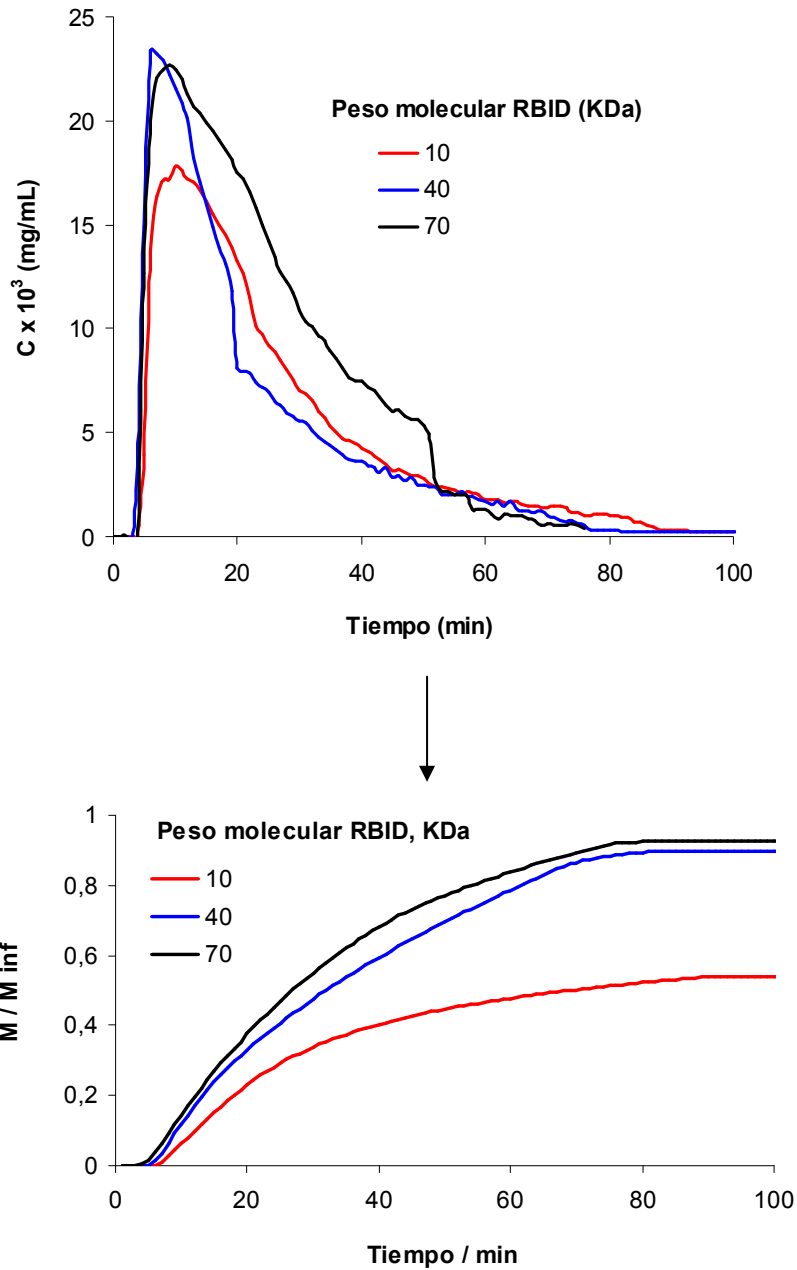


Figura 6.11 b. Liberación acumulada en el proceso continuo para los tres pesos moleculares de RBID (Concentración alginato: 3,0 % en peso)

En estas gráficas la cantidad de RBID liberada se ha adimensionalizado dividiendo por la cantidad cargada inicialmente en las cápsulas, siendo el valor de uno una liberación total de RBID. De esta forma se estandarizan los tres pesos moleculares de RBID, pudiéndose comparar de esta manera los resultados.

Las Figuras 6.10. y 6.11. muestran que las moléculas más pequeñas de RBID producen la menor liberación acumulada, tanto en los sistemas en continuo, como en discontinuo, a pesar de su pequeño peso molecular. Este comportamiento se produce para las dos concentraciones de alginato utilizadas. Además, se observa que las cápsulas producidas con una mayor concentración de alginato (3,0 % en peso) llevan a una mayor liberación acumulada de RBID. Estos comportamientos se pueden observar de forma cuantitativa en las Tablas 6.1. y 6.2.

Tabla 6.1.: Valores de liberación acumulada para el proceso en discontinuo

Concentración alginato (% en peso)	Peso molecular de RBID (KDa)		
	10	40	70
	Liberación acumulada, $C/Co = M/M_{\infty}$ (%)		
1,2	28	49	52
3,0	31	61	57

Tabla 6.2.: Valores de liberación acumulada para el proceso en continuo

Concentración alginato (% en peso)	Peso molecular de RBID (KDa)		
	10	40	70
	Liberación acumulada, M/M_{∞} (%)		
1,2	44	67	68
3,0	54	90	92

a) *Efecto del peso molecular de la RBID en la liberación acumulada:*

A partir de los datos mostrados se observa un comportamiento de la RBID contrario al esperado, ya que las moléculas más pequeñas de RBID producen la menor liberación acumulada en las dos concentraciones de alginato utilizadas, a pesar de su pequeño peso molecular.

Con el fin de explicar este comportamiento, debe tenerse en cuenta la existencia de interacciones o fuerzas electrostáticas (Figura 6.12.) entre los grupos protonados amino de la RBID (positivamente cargados) y los grupos carboxilo del alginato (negativamente cargados), que son directamente proporcionales a las cargas, q y q' e indirectamente proporcionales al cuadrado de la distancia, d , entre las cargas según la expresión:

$$f = K \frac{q q'}{d^2} \quad (6.1)$$

donde K , es la constante de Coulomb

Como se comentó anteriormente, el peso molecular de la RBID se debe al tamaño de las moléculas de dextrano. En este trabajo se han utilizado tres pesos moleculares diferentes de RBID, 10, 40 y 70 KDa. La RBID es un núcleo, la rodamina B, que está unida a cadenas de dextrano mediante el grupo isotiocianato. Cuanto mayor es el tamaño de las moléculas de dextrano, menores son las fuerzas electrostáticas de atracción, debido a que las moléculas de dextrano obstaculizan estéricamente el núcleo positivo de la rodamina B, separando con una mayor distancia, d , las cargas positivas del núcleo de la RBID, la rodamina B, y las cargas negativas del alginato (Figura 6.13.). Es decir, las moléculas de dextrano tienen una conformación aleatoria en espiral que cubre todo el núcleo de la RBID en mayor o en menor medida, dependien-

do del tamaño de las moléculas de dextrano, impidiendo las interacciones electrostáticas (Figura 6.13.).

Por lo tanto, las moléculas de RBID más grandes serán atraídas en menor medida por el alginato, ya que basándonos en la ecuación (1), la distancia entre las cargas será mayor, produciéndose una mayor liberación acumulada de RBID (Kawaguchi y Hasegawa, 2000; Peng et al., 2007).

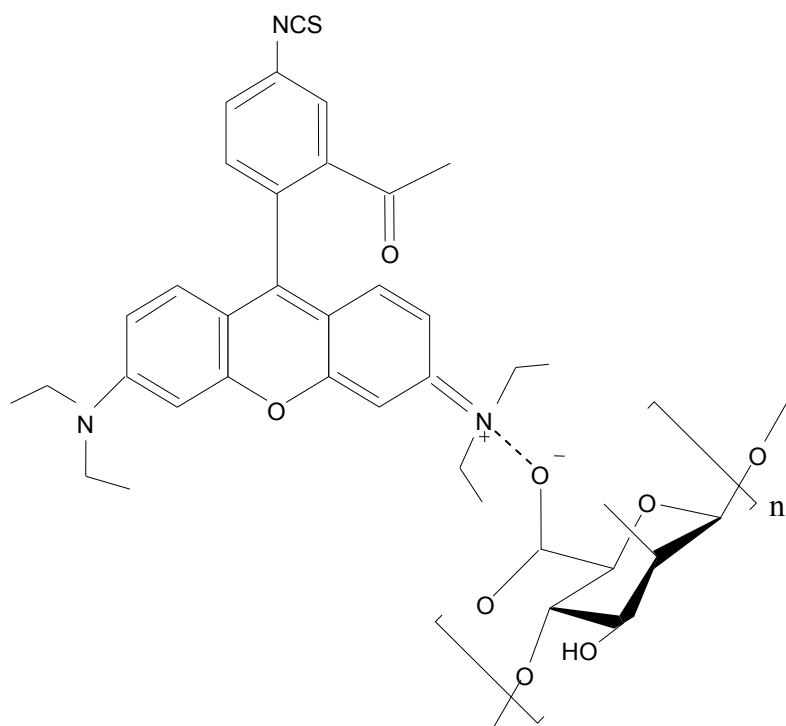


Figura 6.12. Interacciones electrostáticas entre la RBID y el alginato

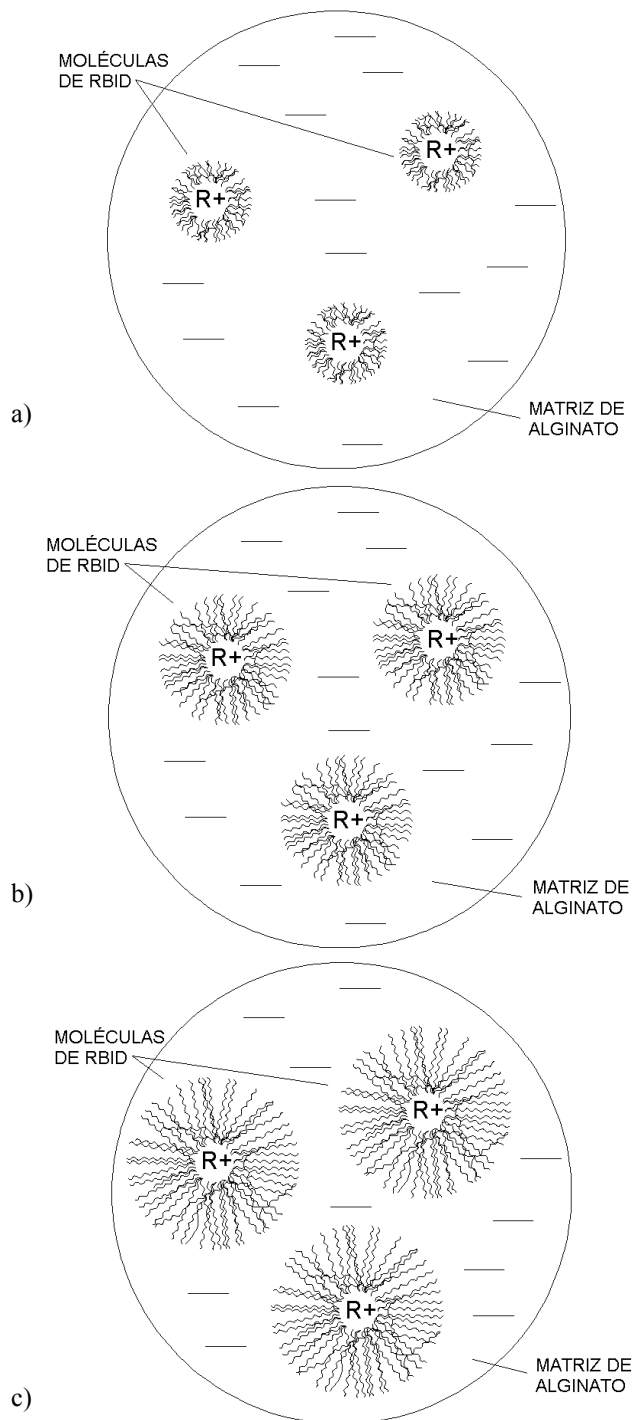


Figure 6.13. Simulación de la conformación de las moléculas de RBID en las capsulas

Peso molecular RBID: a) 10 KDa, b) 40 KDa, c) 70 KDa.

Este hecho justifica que el número de moléculas libres de RBID dentro de las microcápsulas sea mayor a medida que las interacciones electrostáticas sean menores. Es decir, es como si la concentración efectiva para una misma concentración inicial de RBID fuera mayor a medida que aumenta el peso molecular de la RBID. Para la cuantificación de las interacciones electrostáticas entre la RBID y el alginato deben tenerse en cuenta los experimentos realizados en continuo. En las Figuras 6.14. y 6.15. puede observarse que una vez finalizado el proceso, la concentración en el sobrenadante es cero.

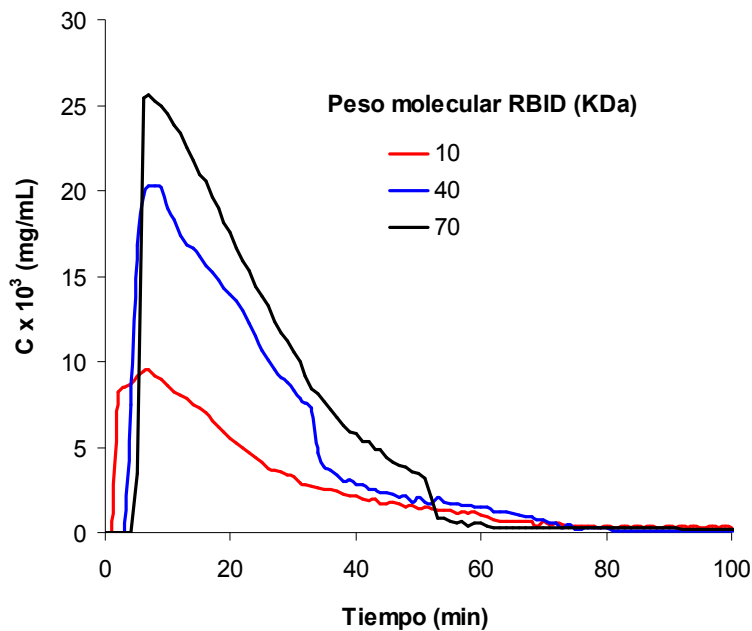


Figure 6.14. Variación de la concentración con el tiempo en el proceso en continuo
(Concentración alginato: 1,2 % wt.)

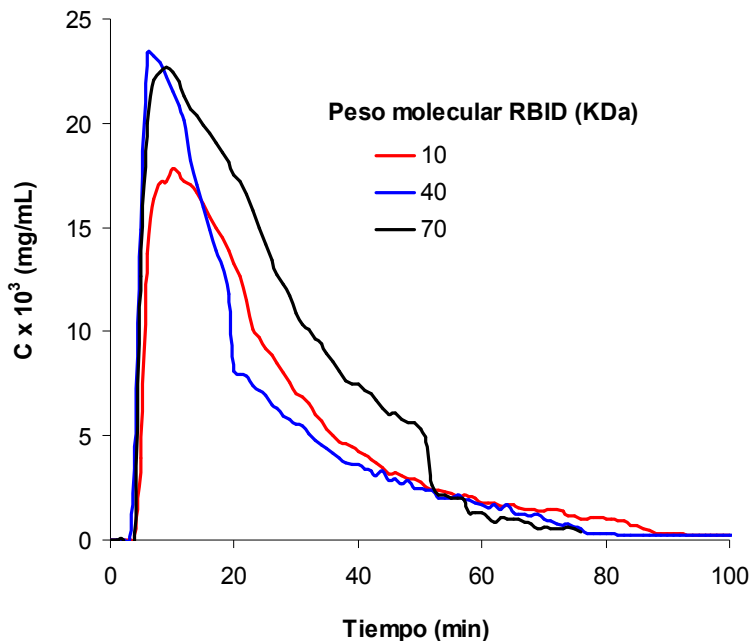


Figure 6.15. Variación de la concentración con el tiempo en el proceso en continuo
(Concentración alginato: 3,0 % wt.)

Esto quiere decir, que al final del proceso ya no existen más moléculas libres susceptibles de ser liberadas de las cápsulas, y por lo tanto las moléculas de RBID que no se liberan estarán unidas por enlaces electrostáticos a las moléculas de alginato. Así realizando un balance de materia a las cápsulas, pueden cuantificarse los enlaces electrostáticos, valores que se recogen en la Tabla 6.3. En esta tabla, además, se muestra un resumen de la influencia de las interacciones electrostáticas en la liberación acumulada de RBID.

En la Tabla 6.3. es posible observar que para las dos concentraciones de alginato, al aumentar el peso molecular de RBID, disminuyen las posibles interacciones electrostáticas entre el alginato y la RBID, de tal forma que al aumentar el peso molecular de la RBID, aumentan las moléculas libres de RBID dentro de las cápsulas, de tal forma que aumenta la liberación acumulada.

Tabla 6.3.: Tabla resumen de la influencia de las interacciones electrostáticas en la liberación acumulada de RBID

			Peso molecular de RBID (KDa)		
			10	40	70
Interacciones electrostáticas			>>>	>>	>
Liberación acumulada			+	++	+++
Concentración alginato (% wt.)	1,2	% interacciones electrostáticas	56	33	32
	3,0		46	10	8

Este comportamiento encontrado para la RBID abre nuevas vías de aplicación de las microcápsulas generadas, si se tiene en cuenta que el pK_a de las moléculas de RBID, desconocido en la actualidad, determinará la carga y el comportamiento ácido-base de los isómeros en función del pH. En el caso de que el valor de pH sea alto, la atracción de las moléculas de RBID con respecto del alginato puede verse disminuida como resultado de interacciones electrostáticas desfavorables, cuando el grupo carboxilo, debido a los altos valores de pH, proporcione a las moléculas de RBID el carácter anfótero. Jugando con este aspecto, es posible conseguir una liberación controlada dependiente del pH, resultando en procesos de reconocimiento de proteínas.

Este comportamiento de la RBID hace a esta macromolécula muy similar a las proteínas. En particular, la RBID imita el comportamiento de un tipo muy especial de proteínas, las glicoproteínas. Estas sustancias son proteínas que contienen varias cadenas de oligosacáridos unidas de forma covalente a cadenas laterales específicas de polipéptidos. Es decir, las glicoproteínas están compuestas por un núcleo, la proteína, unido de forma covalente a cadenas de polisacáridos, por tanto, esta estructura es muy similar a la de la RBID,

que es un núcleo, la rodamina B, unido a las cadenas de dextranos (polisacáridos) mediante el grupo isotiocianato (Figura 6.16.).

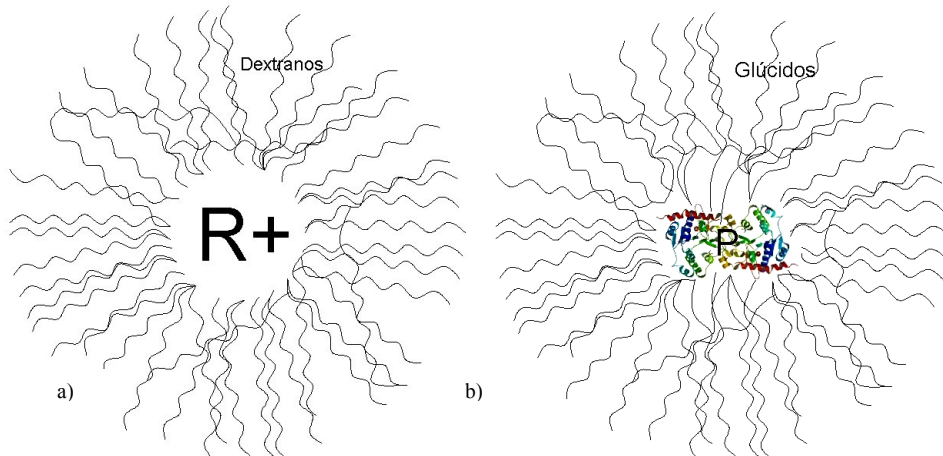


Figura 6.16. Analogía entre las moléculas de RBID y las Glicoproteínas

a) RBID; b) Glicoproteína.

Varias hormonas, anticuerpos, enzimas, receptores de proteínas, proteínas de adhesión celular, factores de crecimiento, etc., son glicoproteínas. Este hecho es realmente importante, ya que es posible estudiar la liberación controlada de varios factores de crecimiento mediante la utilización de la RBID, que es mucho más barata que los factores de crecimiento, y que imita perfectamente el comportamiento de éstos. Por ejemplo, los monocitos producen factores de crecimiento, tales como el VEGF (vascular endothelial growth factor, factor de crecimiento vascular endotelial), que es una glicoproteína homodimérica de peso molecular de 45 KDa (Sharon y Puleo, 2008). Por lo tanto, para conseguir estudiar la liberación de factores de crecimiento, tales como VEGF, segregados por monocitos inmovilizados dentro de cápsulas, es suficiente con estudiar la liberación de la RBID desde las cápsulas.

b) Efecto de la concentración de alginato en la liberación acumulada de RBID:

Como puede observarse en las Tablas 6.1. y 6.2., el aumento de la concentración de alginato desde el 1 al 3 % en peso, lleva a una mayor liberación de RBID. Este hecho puede ser explicado por el mecanismo de formación de las cápsulas. La formación de la membrana de las cápsulas comienza de forma instantánea cuando las gotas de disolución de alginato toman contacto con la disolución catiónica de cloruro de bario. Dada una mayor concentración de alginato se aumenta el número de moléculas del biopolímero por unidad de volumen disponibles para reaccionar con los cationes divalentes del cloruro de bario, formándose de forma muy rápida una red de gel mucho más densa (Blandino et al., 2000). Como resultado, existirá un menor número de cargas efectivas de alginato disponibles para interaccionar con la RBID, quedando un mayor número de moléculas de RBID libres, produciéndose así una mayor liberación de RBID hacia el sobrenadante.

c) Efecto de la convección forzada en la liberación acumulada:

En este apartado se compararon los resultados experimentales de los procesos en discontinuo y continuo para observar el efecto de la convección forzada en el proceso de transferencia de materia (Tabla 6.4.). Como se observa en la Tabla 6.4., los valores de liberación acumulada de RBID en el proceso en continuo, para todas las variables estudiadas, son superiores a los obtenidos para el proceso en discontinuo.

Tabla 6.4.: Valores de la liberación acumulada (en continuo y en discontinuo)

<i>Peso molecular de RBID (KDa)</i>	Estudio de transferencia de material <i>en discontinuo</i>		Estudio de transferencia de material <i>en continuo</i>	
	<i>Concentración de alginato (% en peso)</i>			
	1,2	3,0	1,2	3,0
	<i>Liberación acumulada, M/M₀ (%)</i>			
10	28	31	44	54
40	49	61	67	90
70	52	57	68	92

En el proceso en continuo, además de la transferencia de materia por difusión, las bombas peristálticas suministran un flujo que genera procesos convectivos que hacen que se libere una mayor cantidad de proteína al sobrenadante, ya que tiene un doble efecto. Por un lado, está continuamente arrastrando la RBID del interior de las cápsulas, y por otra parte, se está llevando continuamente el sobrenadante del reactor, llevando a cero la concentración de RBID en el sobrenadante, aumentando continuamente el gradiente de concentración entre la cápsula y el sobrenadante.

6.2. ESTUDIO TEÓRICO DE TRANSFERENCIA DE MATERIA

Debido a las dificultades encontradas en la validación de la transferencia de materia en pacientes (in vivo), el modelaje juega un importante papel a la hora de buscar un perfil de liberación apropiado para optimizar la eficiencia terapéutica de una sustancia inmovilizada (Arafin et al., 2006).

Las soluciones analíticas para cualquier proceso físico refuerzan el conocimiento y la comprensión sobre los mecanismos en dicho proceso. Además, se genera información y se profundiza en los procesos, algo que no es posible con las soluciones numéricas. Las soluciones analíticas obtenidas para un problema determinado, tienen la ventaja de poder ser utilizadas para resolver un problema más complejo.

Por todo ello, en este trabajo, basados en los resultados experimentales, se desarrolló un modelo que simulara los procesos de transferencia de materia de la liberación de proteínas en diferentes medios y condiciones.

6.2.1. Estudio teórico de transferencia de materia en discontinuo

Basados en el trabajo de Lewinska et al. (2002) se desarrolló un modelo matemático que simulara la transferencia de materia de una proteína desde cápsulas hasta un volumen finito externo, es decir, un proceso de transferencia de materia en discontinuo.

Se consideran las siguientes suposiciones:

- a) Los efectos de la gravedad y de flotación no se consideran.
- b) La concentración inicial de RBID en el sobrenadante se considera cero.
- c) No existe gradiente de concentración dentro de la cápsula.

La última suposición implica que cada cápsula es considerada como un reactor ideal de mezcla completa con una concentración de RBID, C_S , idéntica en cualquier sitio dentro de la cápsula en un momento dado de tiempo.

Un esquema del proceso considerado se describe en la Figura 6.17., donde inicialmente, toda la RBID está dentro de la cápsula, es decir, la concentración de RBID dentro de la cápsula, C_S , es la misma que la concentración inicial, C_0 . Sin ninguna pérdida de generalidad, se considera que la concentración inicial de RBID en el sobrenadante es cero ($C = 0$). Al comienzo del proceso ($t = 0$) la RBID comienza a salir de la cápsula, es decir, comienza el proceso de transferencia de materia en discontinuo, desde la cápsula hacia el sobrenadante del reactor, donde se irá acumulando con el tiempo hasta alcanzar un estado de equilibrio ($t = t_{eq}$), con una concentración de equilibrio, C_{eq} , donde se igualarán las concentraciones, y el proceso de liberación de la proteína se detendrá.

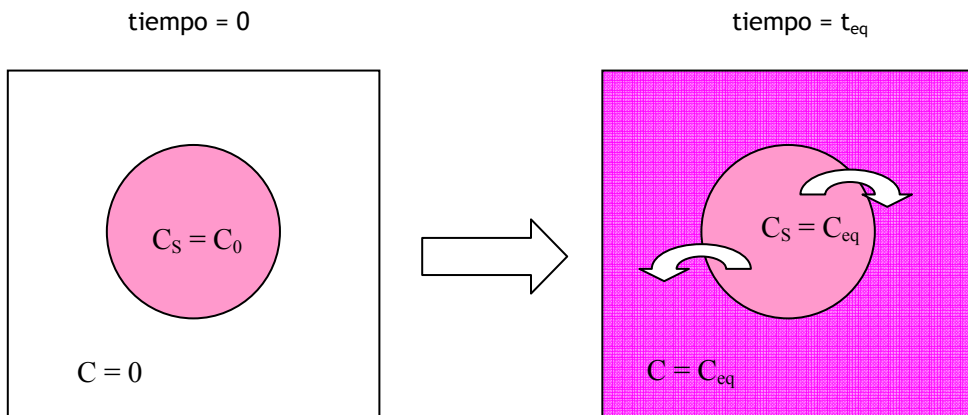


Figura 6.17. Condiciones iniciales y evolución del sistema con el tiempo

El proceso de transferencia de materia desde las cápsulas hasta el sobrenadante que las rodea puede ser descrito por la ecuación (6.2), donde la variación de la concentración en el sobrenadante se debe a la transferencia de materia desde las cápsulas hacia el sobrenadante:

$$V_0 \frac{dC}{dt} = -hA (C_S - C) \quad (6.2)$$

donde C es la concentración de la RBID en el sobrenadante fuera de las cápsulas, C_S es la concentración de RBID dentro de las cápsulas, A designa el área superficial total externa de las cápsulas, h representa el coeficiente de transferencia de materia, V_0 representa el volumen del sobrenadante que rodea a las cápsulas, y V_C es el volumen de las cápsulas. El coeficiente de transferencia de materia, h , describe la resistencia externa a la transferencia de materia, $1/h$, en la capa límite de la superficie de la cápsula. La fuerza impulsora de la transferencia de materia es el gradiente de concentración de RBID en el reactor discontinuo.

Teniendo en cuenta la condición de contorno de que en el estado de equilibrio hay una concentración de equilibrio, C_{eq} , en ambas fases, dentro y fuera de las cápsulas, $C_S(t = \infty) = C(t = \infty) = C_{eq}$, la ecuación (6.2) puede ser complementada mediante un balance de materia (8.3) de la forma:

$$V_0 C + V_C C_S = (V_0 + V_C) C_{eq} \quad (6.3)$$

de donde es posible despejar la relación directa entre las concentraciones C y C_S , representada por la ecuación (6.4):

$$C = \left(\frac{V_0 + V_C}{V_0} \right) C_{eq} - \frac{V_C}{V_0} C_S \quad (6.4)$$

Substituyendo el valor de C (ecuación 6.4) en la ecuación que describe el proceso de transferencia de materia, ecuación (6.2), y obteniendo la solución de esta ecuación resultante con la condición inicial, $C_S(t = 0) = C_0$, se produce una expresión general (ecuación 6.5), que describe la concentración de trazador, C_S , dentro de las cápsulas con respecto a la concentración inicial, en función del tiempo:

$$\frac{C_S}{C_0} = \frac{C_{eq}}{C_0} + \left(1 - \frac{C_{eq}}{C_0}\right) e \left[-\left(\frac{1}{V_0} + \frac{V_C}{V_0^2}\right) hAt \right] \quad (6.5)$$

En dicha ecuación, V_0 , y V_C , son conocidos para cada experimento, ya que representan el valor del volumen del sobrenadante y el volumen total de las cápsulas, respectivamente. Conociendo el valor experimental del diámetro medio de las cápsulas (D) en una muestra, mediante observación con un microscopio óptico (Leica DM 1000), el área superficial externa total de las cápsulas (A) puede aproximarse a partir de su superficie geométrica. Para las cápsulas con una dispersión del tamaño de partícula pequeña (menos del 10 %), las muestras pueden ser representadas mediante N esferas de diámetro d_p , siendo su área superficial total, A :

$$A = N \left(4\pi \left(\frac{d_p}{2} \right)^2 \right) \quad (6.6)$$

El volumen total de las capsulas, V_C :

$$V_C = N \left(\frac{4}{3} \pi \left(\frac{d_p}{2} \right)^3 \right) \quad (6.7)$$

Los datos experimentales correspondientes a los perfiles de liberación acumulada fueron correlacionados mediante el programa informático *Mathematica*TM, de acuerdo con la ecuación (6.5), utilizando como parámetro de ajuste el coeficiente de transferencia de materia, h .

Con el fin de comprobar el ajuste conseguido con los coeficientes de transferencia de materia obtenidos, se compararon los perfiles de liberación teóricos obtenidos a partir de estos coeficientes de ajuste, con los experimentales, en la Figura 6.18.

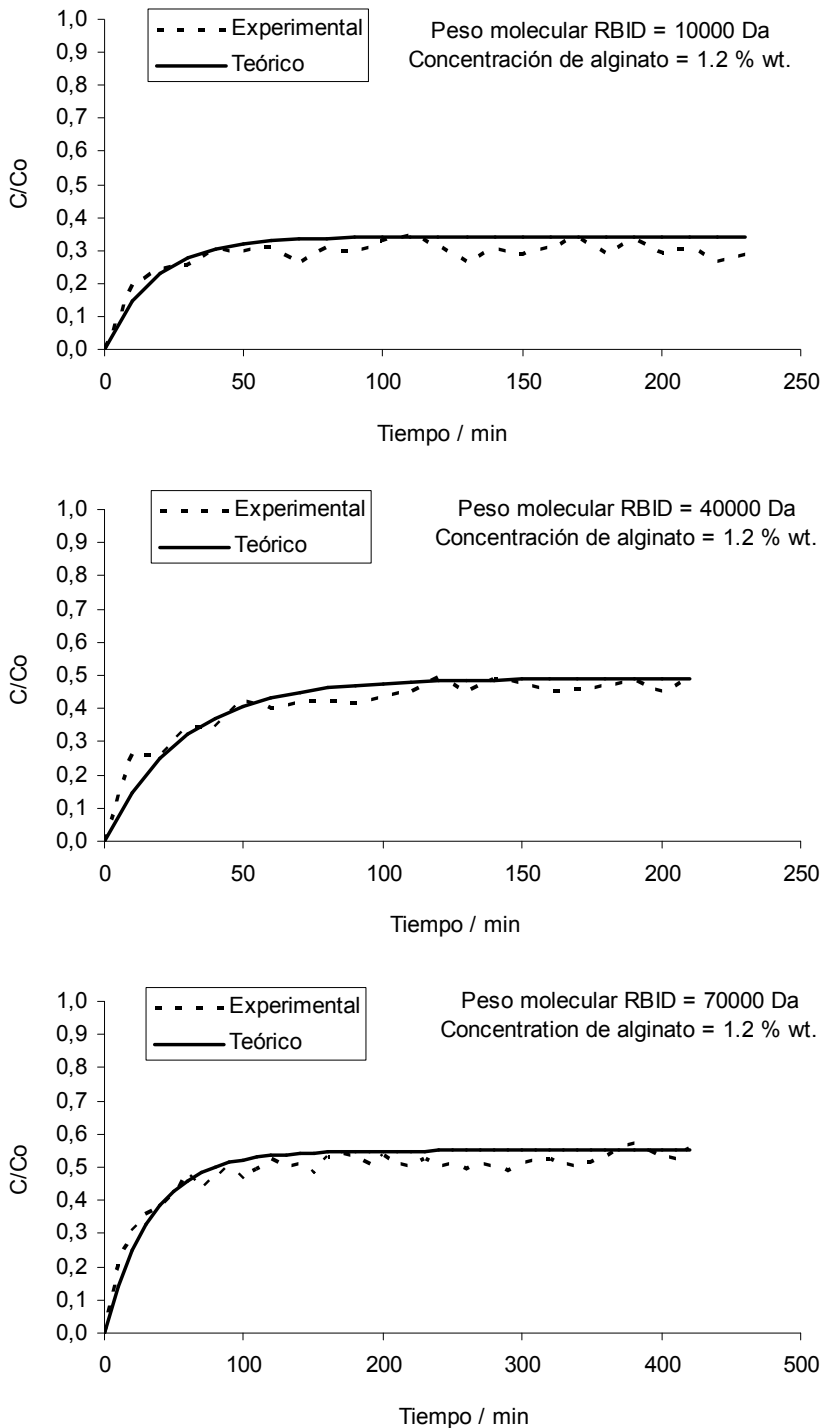


Figura 6.18a. Perfiles de liberación acumulada teóricos y experimentales

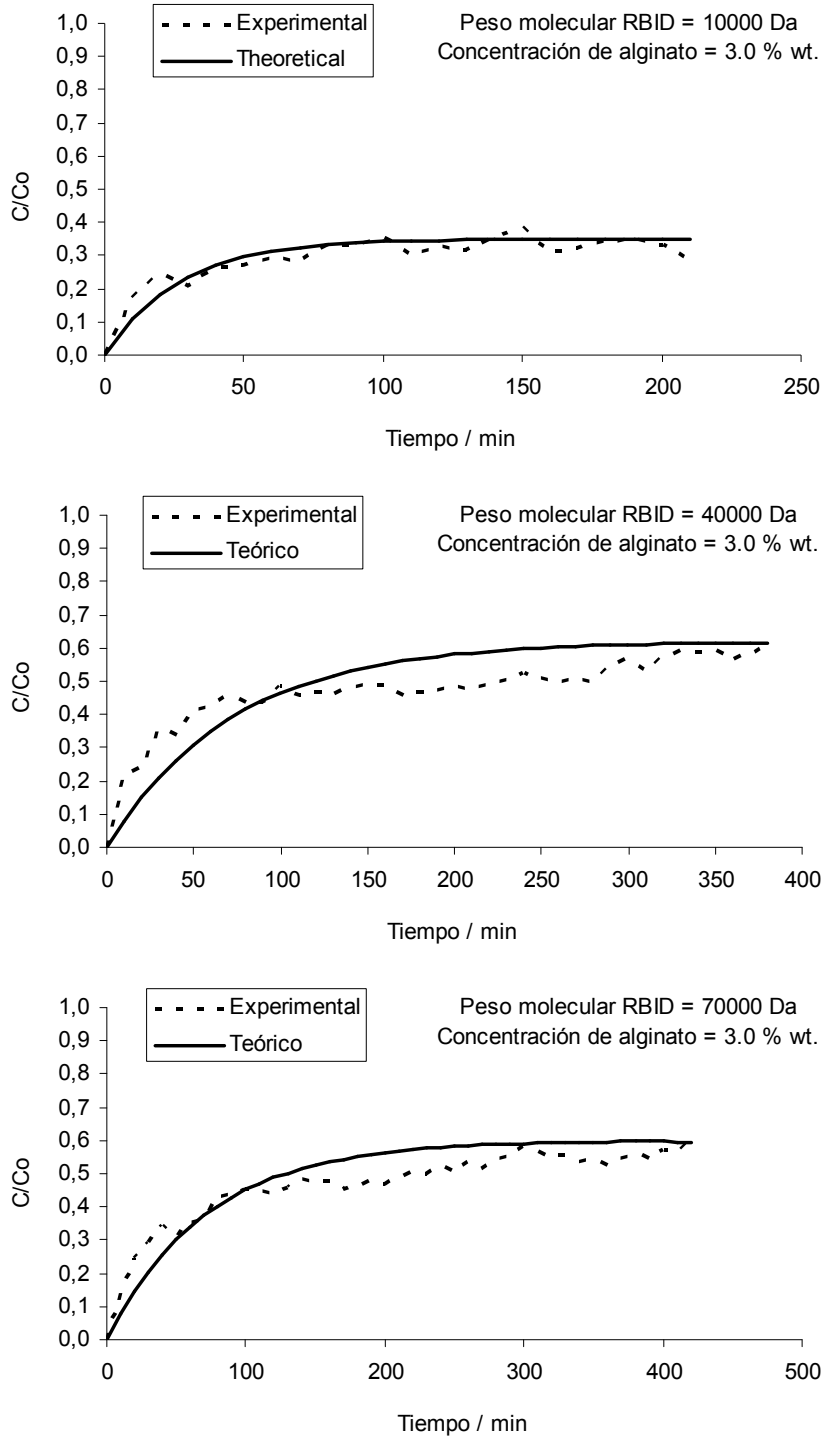


Figura 6.18b. Perfiles de liberación acumulada teóricos y experimentales

En la Figura 6.18. se comprueba el buen ajuste del modelo de transferencia de materia propuesto. A partir de estas gráficas se observa el fenómeno de la transferencia de materia en discontinuo, donde la liberación acumulada aumenta de forma exponencial con el tiempo hasta una concentración de equilibrio. El gradiente de concentración decrece a medida que pasa el tiempo, ya que la RBID se acumula en el sobrenadante (medio externo finito) que rodea a las cápsulas, hasta que se alcanza el estado de equilibrio y el proceso de liberación se detiene (Abdekhodaie, 2002; Crank, 1975).

Como se dijo anteriormente, la correlación de los datos experimentales de acuerdo con el modelo permite obtener los valores del coeficiente de transferencia de materia, h , para las diferentes condiciones experimentales estudiadas, que se recogen en la Tabla 6.5. Además, en ésta se recogen los valores del coeficiente de difusividad efectiva, D_e , calculados a partir de los valores del coeficiente de transferencia de materia, h , y el número de Swerwood (ver cuadro explicativo 1), de tal forma que se pueda observar el efecto de la difusión en el proceso global.

Tabla 6.5.: Valores del coeficiente de transferencia de materia y de la difusividad efectiva para el proceso en discontinuo

<i>Peso molecular de RBID (Da)</i>	<i>Concentración de alginato (% wt.)</i>			
	<i>1,2</i>	<i>3,0</i>	<i>1,2</i>	<i>3,0</i>
	<i>Coficiente de transferencia de materia, h (cm/s)</i>		<i>Difusividad efectiva, D_e, (cm²/s)</i>	
10000	$3,10 \times 10^{-4}$	$9,62 \times 10^{-5}$	$2,12 \times 10^{-8}$	$4,69 \times 10^{-9}$
40000	$1,66 \times 10^{-4}$	$3,76 \times 10^{-5}$	$8,33 \times 10^{-9}$	$1,15 \times 10^{-9}$
70000	$1,43 \times 10^{-4}$	$3,20 \times 10^{-5}$	$6,66 \times 10^{-9}$	$9,00 \times 10^{-10}$

Cuadro explicativo 1: obtención de la difusividad efectiva

El número adimensional de Swerwood, Sh , relaciona la resistencia a la transferencia de materia con la resistencia a la difusión molecular, es decir, mide la velocidad del flujo de transferencia de materia con respecto a la fuerza impulsiva de la difusión.

$$Sh = \frac{h d_p}{D_M} \quad (6.8)$$

donde d_p es el diámetro de las cápsulas, D_M es el coeficiente de difusión molecular, y h es el coeficiente de transferencia de materia.

El número de *Sherwood* puede expresarse mediante dos números adimensionales, el número de *Reynolds* de partícula, Re_p , y el número de *Schmidt*, Sc , utilizando las siguientes correlaciones empíricas (Waked y Funazkri, 1978):

$$Sh = 2 + 1.1 Re_p^{0.6} Sc^{\frac{1}{3}} \quad (6.9)$$

donde

$$Re_p = \frac{d_p \rho v}{\mu} \quad (6.10)$$

$$Sc = \frac{\mu}{\rho D_M} \quad (6.11)$$

La correlación empírica de la ecuación (6.9) se aplica en el caso de partículas esféricas con un número de Reynolds de partícula de entre 3 y 10000 (Wakao y Funazkri, 1978).

El coeficiente de difusión molecular, D_M , se obtiene a partir de las ecuaciones 6.8-6.11. El coeficiente de difusión efectiva, D_e se obtiene a partir del coeficiente de difusión molecular, D_M , y la porosidad de la partícula, ε_p , teniendo en cuenta que cada cápsula está inmersa en un lecho poroso formado por las otras cápsulas, resultando en un medio poroso isotrópico. De acuerdo con el modelo de Wakao y Smith (1962), la difusividad efectiva puede calcularse a partir de la ecuación (6.23):

$$D_e = D_M \varepsilon^2 \quad (6.12)$$

donde la porosidad, ε , se calcula de acuerdo con:

$$\varepsilon = \frac{V_{\text{vacío}}}{V_{\text{total}}} = \frac{V_{\text{total}} - V_{\text{cápsulas}}}{V_{\text{total}}} = 0,82 \quad (6.13)$$

En la Tabla 6.5. se observa que tanto los valores del *coeficiente de transferencia de materia externo*, como los de la *difusividad efectiva* obtenidos, decrecen al aumentar tanto el peso molecular del RBID como la concentración de alginato, es decir, la velocidad de transferencia de materia disminuye.

Los *coeficientes de difusión efectiva* recogidos en la Tabla 6.5. contabilizan la difusión efectiva de la RBID dentro de la estructura de la cápsulas, que es diferente al que se obtendría en disolución, ya que en el caso que nos ocupa la RBID no está libre, sino dentro de la red entrecruzada del gel.

A efectos comparativos se adjuntan datos de coeficientes de difusión obtenidos por Koutsopoulos et al. (2009) para la liberación controlada de diferentes proteínas desde redes entrecruzadas de gel, tanto en disolución como a través de los geles, incluyendo una estimación de la difusión Browniana a través de la ecuación de Stokes-Einstein (Tabla 6.6.).

Tabla 6.6.: Valores de los coeficientes de difusión obtenidos para la liberación de diferentes proteínas

<i>Proteína</i>	Peso molecular (KDa)	<i>Coefficientes de difusión ($10^{-10} m^2/s$)</i>		
		Estimacion (Ec. Stokes-Einstein)	Difusión efectiva en disolución	Difusion efectiva en gel
Lisozima	14,3	1,15	0,96	0,50
Inhibidor de tripsina	20,1	0,91	0,72	0,32
BSA	66,0	0,61	0,51	0,24
IgG	150,0	0,40	0,40	0,07

(Koutsopoulos et al., 2009)

a) *Efecto del peso molecular de RBID en el coeficiente de transferencia de materia, h , y el coeficiente de difusividad efectiva, D_e :*

Los valores del coeficiente de transferencia de materia externo, h , y del coeficiente de difusividad efectiva, D_e , mostrados en la Tabla 6.5. decrecen al aumentar el peso molecular de RBID. Esto es, para un mayor peso molecular de RBID, el proceso se produce a una velocidad menor, ya que existe una mayor resistencia a la transferencia de materia.

Para altos pesos moleculares de RBID, las moléculas de RBID libres existentes tendrán una gran dificultad a la hora de salir por los poros de la membrana, debido a los impedimentos estéricos de las moléculas de dextrano de gran tamaño, de ahí su menor velocidad de transferencia.

Cuando disminuye el peso molecular de la RBID, los impedimentos estéricos de las moléculas de dextrano disminuyen, y por lo tanto la velocidad de liberación de las moléculas de RBID libres será mayor, ya que existe una menor resistencia a la transferencia de materia.

El coeficiente de difusión efectiva, D_e , debe disminuir al aumentar el tamaño de las moléculas, ya que por la ecuación que describe la difusión Browniana, la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 6.14), el tamaño de las moléculas es indirectamente proporcional al coeficiente de difusión Browniano (Hoyos, 2003), como se observa en los valores obtenidos en este trabajo, reflejados en la Tabla 6.5. Este efecto también fue reflejado en el trabajo de Koutsopoulos et al. (2009), como puede verse en la Tabla 6.6.

$$D_b = \frac{kT}{3\pi\mu d} \quad (6.14)$$

donde, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura en grados Kelvin, μ es la viscosidad del líquido, y d es el diámetro de las moléculas.

b) Efecto de la concentración de alginato en el coeficiente de transferencia de materia, h , y el coeficiente de difusividad efectiva, D_e :

Como puede observarse en la Tabla 6.5., los valores del coeficiente de transferencia de materia externo, h , y del coeficiente de difusividad efectiva, D_e , para moléculas del mismo peso molecular, decrecen al aumentar la concentración de alginato. Esto es, para una mayor concentración de alginato, el proceso se produce a una velocidad menor, ya que existe una mayor resistencia a la transferencia de materia. Este fenómeno puede explicarse por el mecanismo de formación de las cápsulas previamente descrito. La formación de la membrana de las cápsulas comienza de forma instantánea cuando las gotas de disolución de alginato y RBID toman contacto con la disolución catiónica de cloruro de bario. La membrana crece desde fuera hacia dentro.

Al aumentar la concentración de alginato, aumenta el número de moléculas de alginato por unidad de volumen disponibles para reaccionar con los cationes divalentes del cloruro bórico en la reacción de gelificación iónica (Blandino et al., 2000). Por lo tanto, se formará rápidamente una membrana muy densa, haciéndose difícil la difusión de cationes hacia dentro de la cápsula para incrementar el espesor de la membrana. Esta densa membrana ofrecerá una mayor resistencia a la difusión de las moléculas de RBID, es decir, las cápsulas tendrán una menor porosidad, un tamaño de poro más pequeño, disminuyéndose la velocidad de transferencia de materia.

De hecho, estas explicaciones se comprobaron de forma cualitativa, ya que las cápsulas formadas con una mayor concentración de alginato eran más resistentes desde el punto de vista mecánico, debido a la estructura más densa del gel.

En la Tabla 6.6. (Koutsopoulos et al., 2009) se recogen los valores de los coeficientes de difusión para diferentes proteínas calculados en solución y a través del gel, así como los estimados a través de la ecuación de Stokes-Einstein. Los resultados muestran que la estimación a través de la ecuación de

Stokes-Einstein sobrestima ligeramente los coeficientes de difusión efectiva en solución en un 10-20 %, pero se aleja de forma significativa de los calculados a través del gel. Esto significa que la difusión Browniana predice el comportamiento de redes de geles muy poco densas que se pueden asemejar a la difusión de la proteína en solución. Se observa que los coeficientes de difusión calculados para la difusión de las proteínas a través de una red polimérica son muy inferiores a los calculados para la difusión de la proteína en solución. Este hecho refleja la importancia del entrecruzamiento de la red del gel en el coeficiente de difusión, es decir, cuanto más densa sea la red del gel, menor será el coeficiente de difusión, ya que habrá una mayor resistencia a la difusión. Este comportamiento reflejado en los resultados de Koutsopoulos et al. (2009) puede observarse de la misma forma en los resultados presentados en este trabajo a través de la Tabla 6.5., es decir, el coeficiente de difusión efectiva disminuye al aumentar la concentración de alginato, es decir, al hacerse más densa la red del gel.

6.2.2. Estudio teórico de transferencia de materia en continuo

Como se comentó al principio del capítulo, de forma macroscópica los tejidos se pueden considerar de forma ideal como medios porosos isotrópicos (ya que se estudia una cápsula en un lecho empacado con partículas esféricas, es decir, las otras cápsulas), que están descritos por la ley de Darcy (Arifin et al., 2006).

Basados en los estudios de transferencia de materia de Feng y Michaelides (1999), se desarrolló un modelo matemático similar que simula la liberación de una proteína desde una cápsula en un medio poroso.

Se consideraron las siguientes suposiciones:

- a) Se omiten los efectos del empuje y la gravedad en el fluido.

- b) Se considera que el diámetro de las cápsulas se mantiene constante con el tiempo (no se produce ni encogimiento ni hinchamiento).
- c) No hay gradiente de concentración dentro de la esfera.
- d) El campo de velocidades dentro del medio poroso está gobernado por la ley de Darcy y se considera unidireccional lejos de la cápsula.
- e) Se considera flujo torsional.
- f) La concentración inicial de RBID en la solución que rodea a la cápsula es cero.
- g) El perfil de velocidad alrededor de las esferas es una solución al flujo potencial.

La suposición (c) implica que se considera cada cápsula como un reactor ideal de mezcla completa, donde la concentración para un tiempo determinado en cualquier punto del reactor es la misma.

La suposición (d) implica que puede haber deslizamiento (slip) en la superficie de la cápsula. Sin embargo, en este trabajo se ha aplicado el modelo de Brinkman (que es una extensión del modelo de Darcy que incluye el término inercial) que tiene en cuenta la condición de no deslizamiento (no slip condition) en la superficie de la cápsula, ya que varios trabajos anteriores han establecido que la ley de Darcy pura no produce resultados satisfactorios cuando se requiere tomar en cuenta la condición de contorno de no deslizamiento (Jecl et al., 2001). Sin embargo, después de varias consideraciones es posible concluir que el espesor de la capa límite es la millonésima parte del radio de las esferas (Feng y Michaelides, 1999). Dentro de la capa límite hay un gradiente de velocidad muy grande en la dirección tangencial, donde la velocidad se incrementa desde cero hasta el valor calculado por la ley de Darcy. Debido al espesor relativamente pequeño de la capa límite, es aceptable despreciarla y considerar que hay un cambio de velocidad en escalón desde cero (condición de no deslizamiento) hasta la velocidad de deslizamiento de Darcy en la dirección tangencial a la superficie (Feng y Michaelides, 1999).

Por lo tanto, el espesor de la capa límite del fluido en la superficie de la esfera es muy pequeña en comparación con el radio de la esfera y el efecto de la capa límite en el perfil de velocidades puede ser despreciado. Así, la concentración de RBID en la superficie de la esfera es la misma que dentro de la esfera, y es posible despreciar la resistencia a la transferencia de materia en la capa límite.

Un esquema del proceso y del sistema de coordenadas se describe en la Figura 6.19. La existencia de la esfera crea una perturbación en el perfil de velocidades que se limita esencialmente a los alrededores de la esfera. En puntos alejados de la cápsula el perfil es unidireccional.

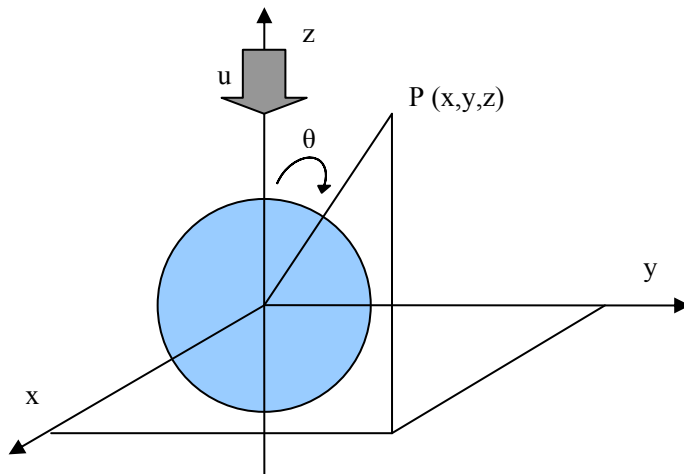


Figura 6.19. Esquema del sistema de coordenadas y dirección del flujo del proceso

Al comienzo del proceso ($t = 0$), la RBID comienza a salir de la cápsula, es decir, comienza el proceso de transferencia de materia en continuo desde la cápsula hacia el exterior. La RBID se transfiere a través del agua existente en el reactor y que rodea a las cápsulas. Los dos fluidos (agua y disolución de RBID) se mezclan y difunden a través del medio poroso. Sin ninguna pérdida de generalidad, se considera que la concentración inicial de RBID en el medio poroso es cero (inicialmente se tiene un medio libre de RBID). Después del

comienzo del proceso de liberación de RBID ($t > 0$) se debe considerar la condición de contorno en la superficie de las cápsulas, es decir, la concentración de RBID en la superficie de las cápsulas, C_{s0} , es constante, o lo que es lo mismo, la concentración de RBID en la superficie de la cápsula es idéntica que dentro de la misma, ya que se comporta como un reactor ideal de mezcla completa.

Por lo tanto, las condiciones de contorno para el fluido situado alrededor de las cápsulas son:

$$\begin{aligned} v \cdot n &= 0 & \text{at } r &= 0 \\ v &= -U \cdot e_z & \text{at } r &\rightarrow \infty \end{aligned} \quad (6.8)$$

A partir del campo de velocidades en el medio poroso y utilizando las condiciones de contorno para el fluido externo (que inicialmente satura el medio poroso) en la superficie y en el infinito, se obtiene el campo de velocidades para las cápsulas, que es una solución al problema de flujo potencial. Es decir (Bird et al., 2002),

$$v_r = U_\infty \left[1 - \left(\frac{a}{r} \right)^3 \right] \cos \theta \quad (6.9)$$

$$v_\theta = -U_\infty \left[1 + \frac{1}{2} \left(\frac{a}{r} \right)^3 \right] \sin \theta \quad (6.10)$$

Por conveniencia, se introducen las siguientes variables adimensionales, que se expresan mediante un asterisco (*).

Se considera el radio de la esfera, a , como longitud característica del proceso, y el tiempo de difusión, $\tau_D = a^2/D_e$, como tiempo característico:

$$\begin{aligned}
 (x^*, y^*, z^*) &= \left(\frac{x}{a}, \frac{y}{a}, \frac{z}{a} \right), & r^* &= \frac{r}{a}, & t^* &= \frac{tD_e}{a^2}, \\
 c^*(x^*, t^*) &= \frac{c(x, t)}{C_{s0}}, & v^* &= \frac{v}{U_\infty}, & Pe &= \frac{U_\infty a}{D_e}
 \end{aligned} \tag{6.11}$$

Cabe destacar entre estas expresiones adimensionales el número de Peclet, Pe , que se refiere a la velocidad relativa del proceso de convección con respecto al proceso de difusión.

Sustituyendo las variables adimensionales en las ecuaciones (6.9) y (6.10), se obtiene el perfil de velocidad adimensional en coordenadas esféricas:

$$v_{r^*} = - \left[1 - \frac{1}{(r^*)^3} \right] \cos \theta \tag{6.12}$$

$$v_{\theta^*} = \left[1 + \frac{1}{2(r^*)^3} \right] \sin \theta \tag{6.13}$$

U_∞ es la velocidad del fluido en puntos alejados de la cápsula, es decir, el flujo suministrado a través del reactor mediante las bombas peristálticas. Sin embargo, como se pretenden simular sistemas reales vivos (por ejemplo, el corazón está en un movimiento continuo de contracción-relajación), se introdujo agitación en el sistema mediante un agitador orbital, por esta razón se asumió la existencia de flujo torsional en la suposición (e). El flujo torsional se produce por la rotación del reactor que produce el movimiento de las cápsulas en contacto con el líquido que rodea a dichas cápsulas. El líquido que rodea las cápsulas, debido a la condición de no deslizamiento en la pared de las cápsulas, sigue el movimiento de las cápsulas, generándose el flujo torsional alrededor de las cápsulas. Por tanto, U_∞ será calculada su-

mando a la velocidad generada por las bombas, la velocidad debida al flujo torsional (suministrada por la velocidad de agitación del agitador orbital).

La velocidad a nivel macroscópico debido al flujo torsional se calculará como sigue (Papanastasiou, 1994):

$$\bar{V} = a^2 \Omega z_0 + \frac{4a^4 \Omega^3}{g} \quad (6.14)$$

La ecuación que gobierna el proceso de transporte de la RBID debe ser expresada en forma adimensional (Crank, 1975):

$$\frac{\partial c^*}{\partial t^*} + Pe v^* \cdot \nabla^* c^* = \nabla^{*2} c^* \quad (6.15)$$

con las siguientes condiciones iniciales y de contorno:

$$\begin{aligned} c^*(x^*, t^*) &= 0 & \text{at } |x^*| > 1, & \quad t^* = 0 \\ c^*(x^*, t^*) &= H(t^*) & \text{at } |x^*| = 1, & \quad t^* > 0 \\ c^*(x^*, t^*) &\rightarrow 0 & \text{as } |x^*| \rightarrow \infty. & \end{aligned} \quad (6.16)$$

Las ecuaciones (6.12)-(6.16) representan el problema planteado de difusión-convección en continuo. Se espera que a bajos números de Peclet el proceso de difusión domine en las proximidades de la esfera. Sin embargo, en puntos más alejados de la cápsula habrá regiones donde el proceso de convección sea significativo.

Según mostraron los resultados experimentales (Figura 6.11.), el proceso de transporte de materia se produce dentro de los cien primeros minutos en todas las condiciones experimentales. Este tipo de procesos se suelen producir, como media, durante varias horas, pudiéndose considerar, por lo tanto, este proceso como un proceso rápido. La solución en este tipo de procesos

suele ser obtenida en base a las condiciones de contorno en la superficie y en el infinito.

Por conveniencia, en las ecuaciones que siguen se omitirá el superíndice (*) de las variables adimensionales. Pero, debe ser recordado, sin embargo, que las variables utilizadas hasta ahora son adimensionales.

La concentración de RBID en el fluido puede expresarse como un desarrollo normal de la función de concentración $c(x,t)$ como sigue (Feng y Michaelides, 2001):

$$c = c_0 + Pe \cdot c_1 + \dots \quad (6.17)$$

Un desarrollo de la función de concentración de primer orden es suficiente para el desarrollo de la solución.

La expresión analítica final para la concentración de RBID para procesos de transferencia de materia en continuo rápidos es (Feng y Michaelides, 2001):

$$\begin{aligned} c(r, \zeta, t) = & \frac{1}{r} \operatorname{erfc} \left(\frac{r-1}{2\sqrt{t}} \right) + \\ & + Pe \left[\left(-\frac{1}{2} + \frac{3}{4r^2} - \frac{1}{4r^3} \right) \operatorname{erfc} \left(\frac{r-1}{2\sqrt{t}} \right) + \right. \\ & \left. + \frac{3}{4} \left(\frac{1}{r} - \frac{1}{r^2} \right) e^{r-1+t} \operatorname{erfc} \left(\frac{r-1}{2\sqrt{t}} + \sqrt{t} \right) \right] P_1(\zeta) \quad (6.18) \end{aligned}$$

6.2.2.1. *Perfiles de distribución de concentración*

Para las aplicaciones prácticas de este problema de transporte de materia como la reparación de tejidos (terapia celular), es importante conocer información sobre la distribución de la concentración del activo encapsulado alrededor de las cápsulas durante todo el proceso de difusión a una determinada distancia del punto de aplicación, para poder diseñar terapias más eficaces en la curación de ciertas enfermedades.

A partir del modelo descrito por la ecuación (6.18) es posible generar una predicción de las distribuciones de concentración en función del radio, y las coordenadas angulares, a diferentes tiempos. Para ello, la ecuación (6.18) del modelo se representó en coordenadas paramétricas, y el radio adimensional (definido como coordenada radial/radio de las cápsulas) se varió desde 0 hasta 3 en ambas direcciones de las cápsulas (direcciones “z” e “y”). La condición inicial de concentración en la superficie de la esfera es una respuesta instantánea, es decir, la liberación de RBID se produce desde el inicio del proceso ($t = 0$) de forma instantánea (Feng y Michaelides, 2001). Para la generación de las distribuciones de concentración se fijaron diferentes números de Peclet ($Pe = U_a a / D_e$) que tiene en cuenta la relación entre el proceso de convección y de difusión. Basados en los datos de velocidad proporcionados por las bombas peristálticas, y los datos de difusividad efectiva obtenidos previamente en el proceso en discontinuo, se fijaron diferentes números de Peclet para cada condición experimental.

En las Figuras 6.20., 6.21., 6.22., 6.23., 6.24., y 6.25., se muestran los gráficos de contorno que definen las distribuciones de concentración para las diferentes condiciones experimentales de concentración de alginato y peso molecular de RBID.

Las Figuras 6.20. y 6.21. muestran los gráficos de contorno que definen las distribuciones de concentración para bajos pesos moleculares de RBID (10 KDa) para las dos concentraciones de alginato estudiadas (1,2 y 3,0 % en peso).

En estas gráficas se puede observar que cerca de la superficie de la cápsula ($r < 1,2$) la distribución de concentración no varía significativamente durante los minutos que dura el proceso de transferencia de materia.

Sin embargo, se observa un cambio significativo en las líneas de la distribución de concentración más lejos de la superficie ($r > 1,5$). Esto es una indicación de que se alcanza rápidamente la condición de equilibrio en las proximidades de la esfera, y que sin embargo, la RBID se transfiere a una mayor velocidad en regiones más exteriores debido a la influencia del flujo suministrado por las bombas peristálticas. El aspecto (desde arriba hacia abajo) de la Figura 6.20a y 6.21a para tiempos cortos subraya la poca importancia de la convección que se produce por el flujo vertical del fluido externo. A mayores tiempos (Figura 6.20b, 6.20c, 6.21b, 6.21c) el proceso de convección se hace algo más importante, como la simetría de las líneas de la distribución de concentración muestran, debido al flujo vertical del fluido externo. Pero sin embargo, para este peso molecular no se aprecia una influencia de la convección en el proceso global de la transferencia de materia.

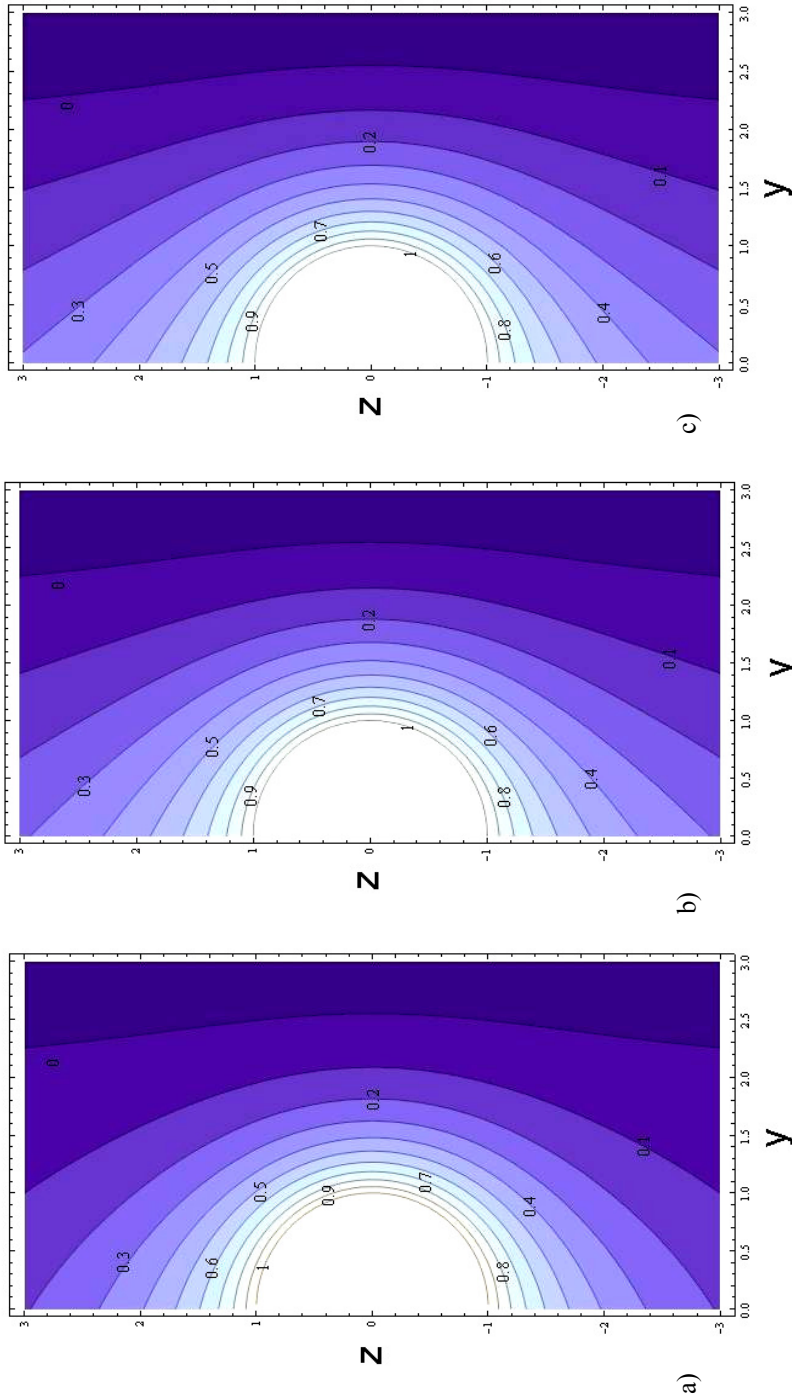


Figura 6.20. Perfiles de distribución de concentración ($Pe = 0,98$)

(Peso molecular de RBID = 10000 / concentración de alginato = 1,2 % en peso);

a) 5 minutos. b) 22 minutos. c) 88 minutos

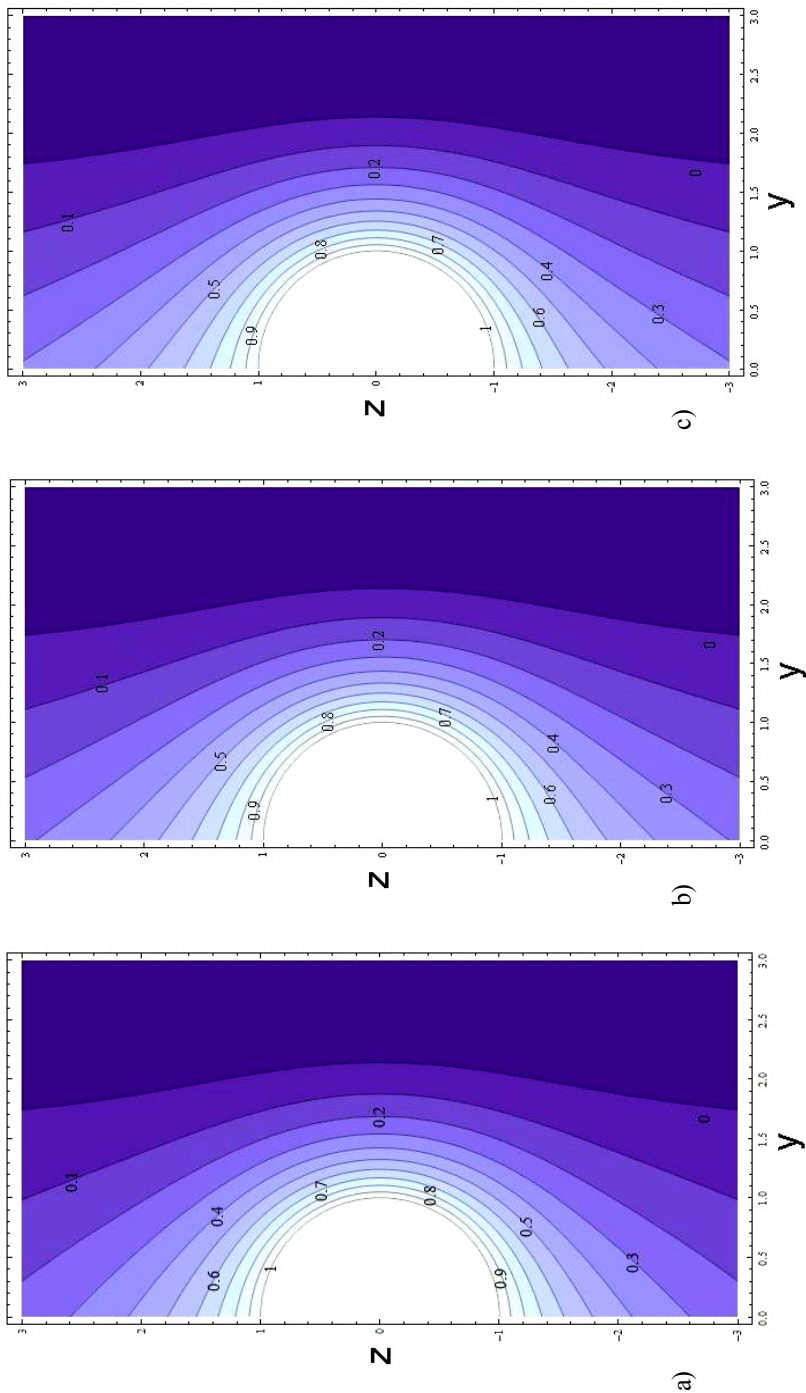


Figura 6.21. Perfiles de distribución de concentración ($Pe = 1,29$)

(Peso molecular de RBID = 10000 / concentración de alginato = 3,0 % en peso);

a) 5 minutos, b) 22 minutos, c) 88 minutos

Las Figuras 6.22. - 6.25. muestran los gráficos de contorno que definen las distribuciones de concentración para altos pesos moleculares de RBID (40 y 70 KDa) para las dos concentraciones de alginato estudiadas (1,2 y 3,0 % en peso).

A partir de las Figuras 6.22.- 6.25. es posible observar que las líneas de concentración no varían de forma significativa de izquierda a derecha (dirección y) durante el tiempo total que tarda en producirse el proceso de transferencia de materia.

Sin embargo, es posible observar una mayor variación en el gradiente de concentración en la dirección del flujo (desde arriba hacia abajo, dirección z) desde el principio del proceso de transferencia de materia. Para altos pesos moleculares de la RBID, ésta se transfiere en la dirección del flujo suministrado por las bombas, y no en la dirección opuesta. Esto muestra la importancia de la convección con respecto al proceso de difusión a altos pesos moleculares de la RBID. Un incremento en la liberación acumulada de RBID debe ser producido por una reducción de la velocidad de difusión para que pueda incrementarse el efecto relativo de la convección con respecto al proceso de difusión, reflejado en el número de Peclet.

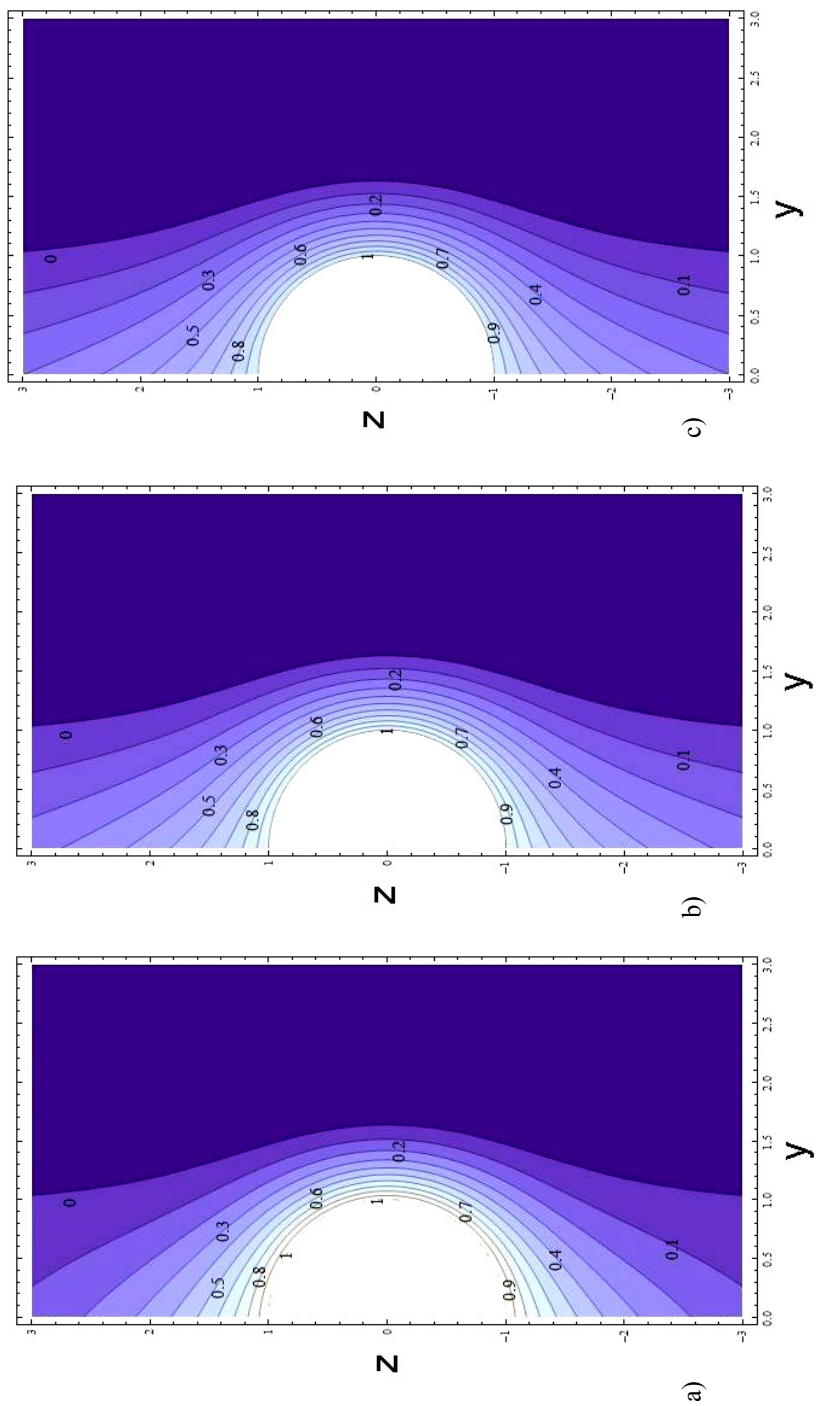


Figura 6.22. Perfiles de distribución de concentración ($Pe = 2,23$)

(Peso molecular de RBID = 40000 / concentración de alginato = 1,2 % en peso);

a) 5 minutos, b) 22 minutos, c) 88 minutos

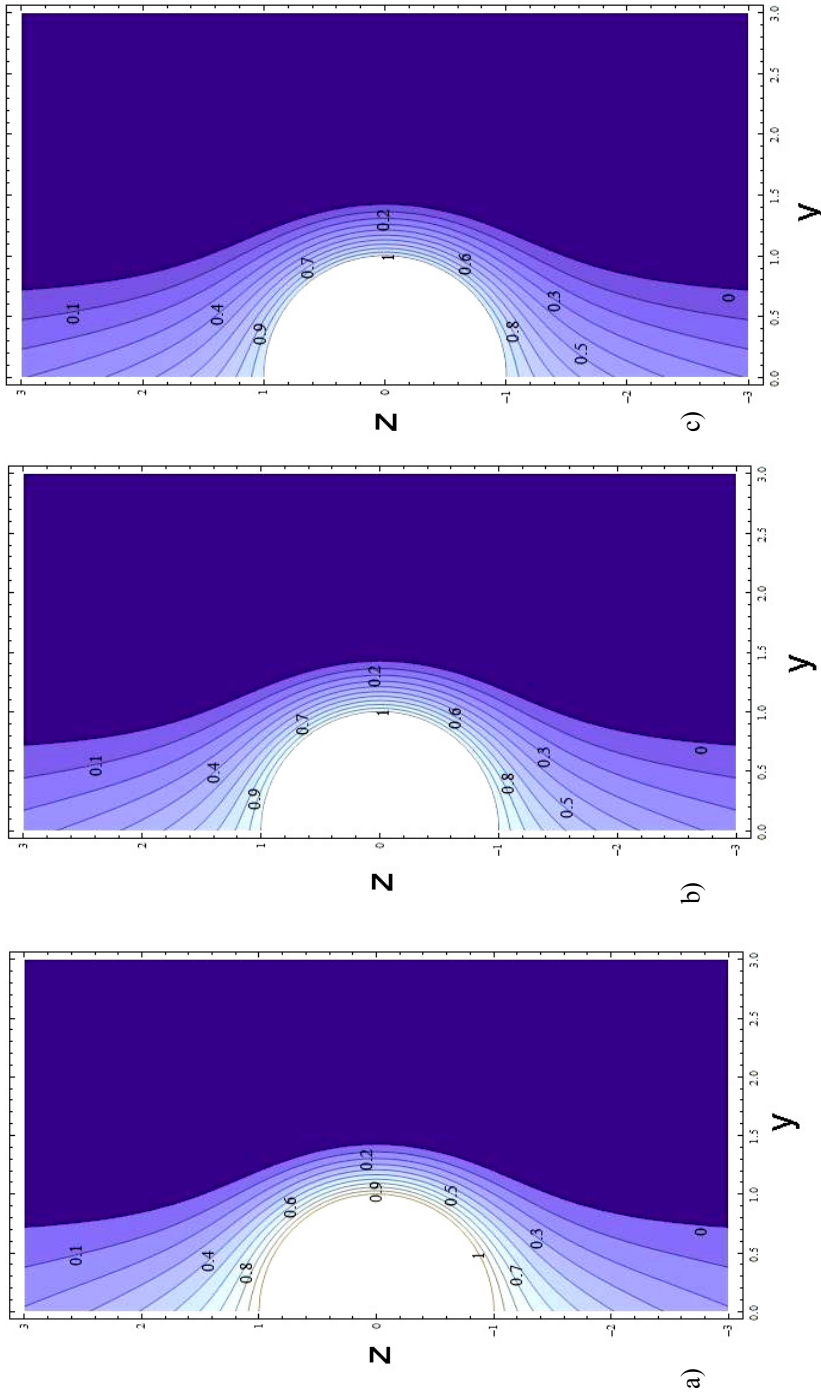


Figura 6.23. Perfiles de distribución de concentración ($Pe = 3,24$)

(Peso molecular de RBID = 40000 / concentración de alginato = 3,0 % en peso);

a) 5 minutos, b) 22 minutos, c) 88 minutos

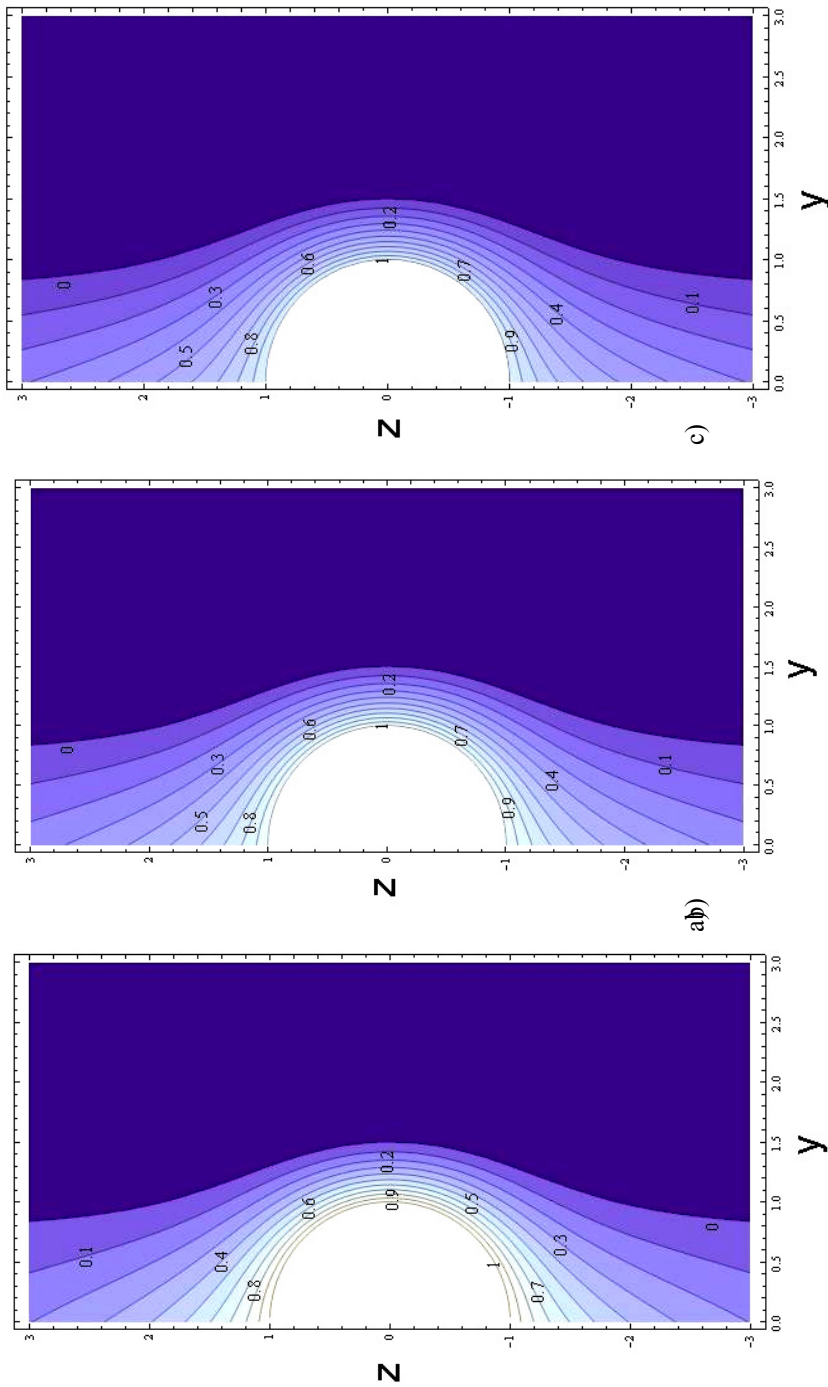


Figura 6.24. Perfiles de distribución de concentración ($Pe = 2,78$)

(Peso molecular de RBID = 70000 / concentración de alginato = 1,2 % en peso);

a) 5 minutos, b) 22 minutos, c) 88 minutos

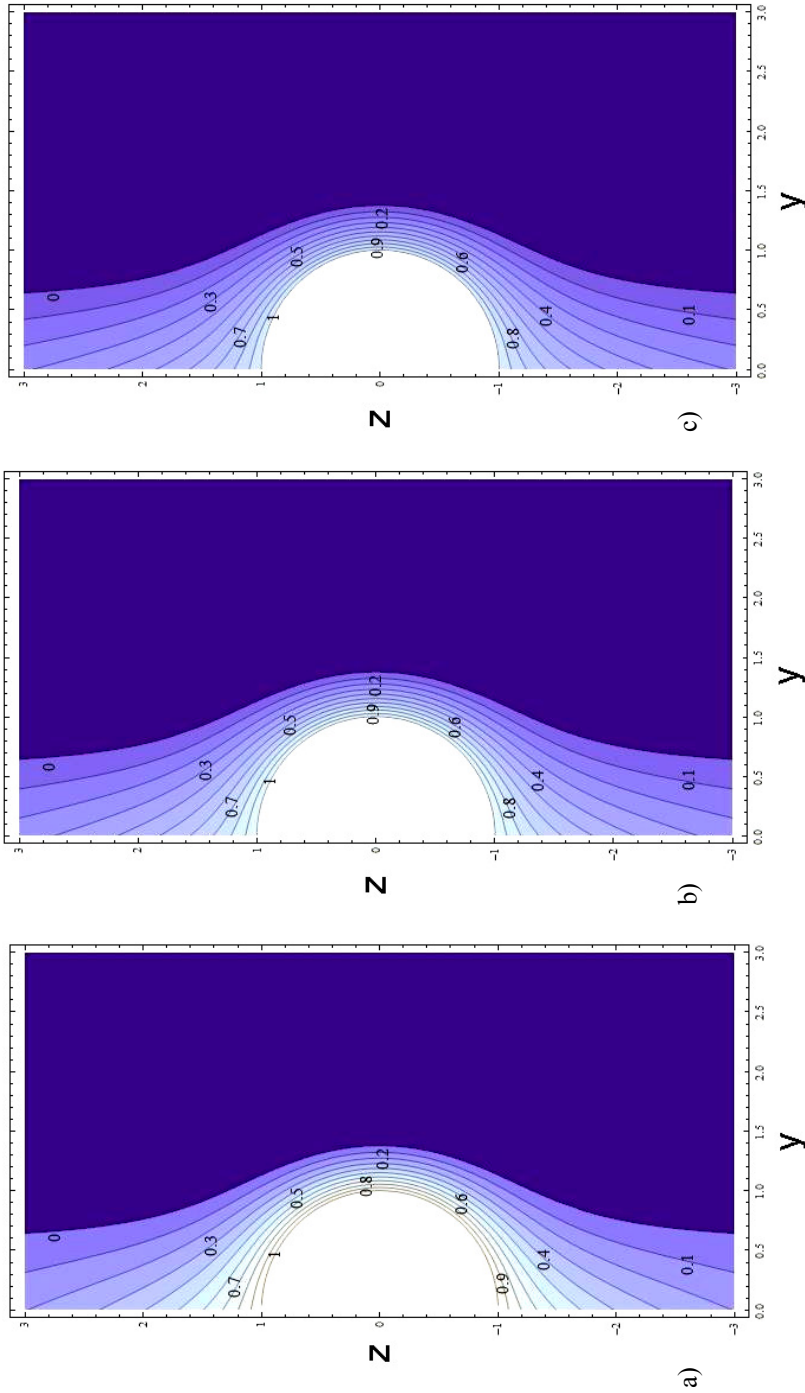


Figura 6.25. Perfiles de distribución de concentración ($Pe = 3,64$)

(Peso molecular de RBID = 70000 / concentración de alginato = 3,0 % en peso);

a) 5 minutos, b) 22 minutos, c) 88 minutos

A partir de la Figura 6.26. se observa la evolución de los perfiles de distribución con el aumento del peso molecular de la RBID, pudiéndose observar un aumento de la contribución de la convección en la transferencia de materia, a medida que se va aumentando el peso molecular de la RBID.

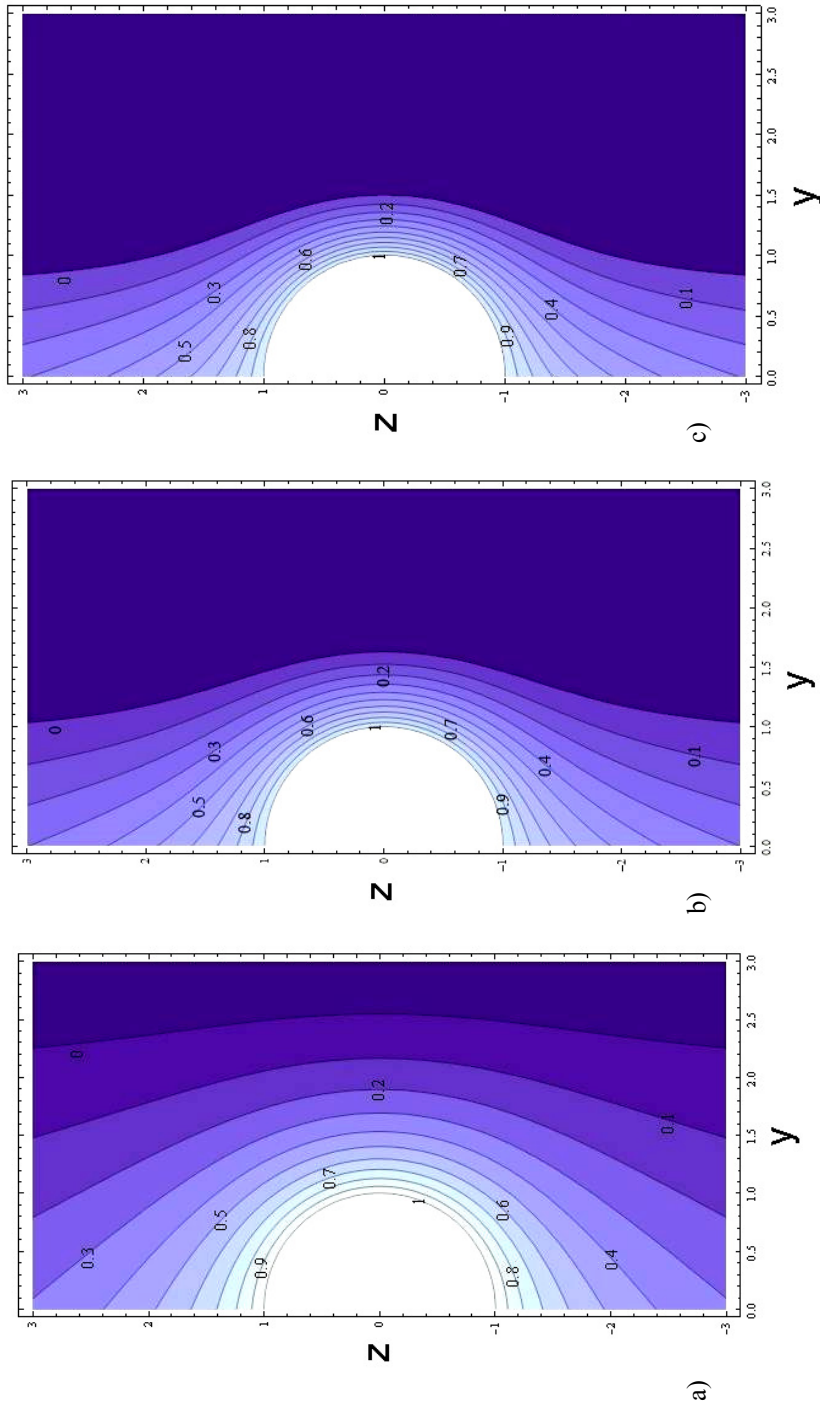


Figura 6.26. Perfiles de distribución de concentración

($t = 88$ minutos; concentración de alginato = 1,2 % en peso)

Peso molecular de RBID: a) 10000 Da, b) 40000 Da, c) 70000 Da

6.3. CONCLUSIONES

Con el objetivo de simular la liberación de proteínas en medios fisiológicos y el transporte de proteínas a través de un tejido o un órgano desde cápsulas poliméricas, se llevaron a cabo estudios de transferencia de materia en discontinuo y continuo, respectivamente, mediante un novedoso método basado en una perturbación simple generada con RBID, que simula el comportamiento de las proteínas.

A partir del trabajo experimental, es posible concluir que las interacciones electrostáticas juegan un papel muy importante en la liberación acumulada de la RBID desde las cápsulas poliméricas. A partir de los datos experimentales se puede observar una liberación de RBID contraria a la esperada, ya que las moléculas con menor peso molecular muestran la menor liberación acumulada. Este comportamiento se puede asignar a la presencia de interacciones electrostáticas. Debido al carácter anfótero de la RBID, la atracción de la RBID con el alginato puede verse disminuida en el caso de altos valores de pH como resultado de interacciones electrostáticas desfavorables. Jugando con este aspecto es posible conseguir dispositivos de liberación controlada dependientes del pH, resultando en procesos de reconocimiento de proteínas.

Este comportamiento de la RBID hace que esta macromolécula sea muy similar a las proteínas, pero en particular la RBID imita el comportamiento de una clase especial de proteínas, las glicoproteínas, con una estructura química realmente similar con la RBID. Varios factores de crecimiento, tales como el VEGF, son glicoproteínas. Por lo tanto, el estudio de la liberación de VEGF desde cápsulas poliméricas puede ser simulado mediante la RBID, que es mucho más barata que los factores de crecimiento.

Además, los datos experimentales también muestran que las concentraciones altas de alginato llevan a mayores liberaciones acumuladas de RBID, debido al mecanismo de formación de las cápsulas.

Basado en el trabajo experimental, y en estudios teóricos de transferencia de materia de varios autores, fueron predichos los coeficientes de

transferencia de materia para el proceso en discontinuo y los perfiles de concentración en el caso del proceso en continuo.

A partir del estudio de transferencia de materia en discontinuo, se puede concluir que disminuye la velocidad de transferencia de materia desde las cápsulas cuando se incrementa el peso molecular de la RBID, debido al mayor tamaño de las moléculas, que tendrán una mayor resistencia al liberarse por los poros de la membrana de las cápsulas. Además, la velocidad de transferencia de materia disminuye al aumentar la concentración de alginato, debido al mecanismo de formación de la membrana de las cápsulas.

A partir de la expresión analítica final para el proceso de transferencia de materia en continuo, es posible generar una predicción de las distribuciones de concentración en función del radio y las coordenadas angulares, a diferentes tiempos, para diferentes números de Peclet, que relacionan el proceso de convección con respecto a la difusión.

Las distribuciones de concentración en el caso de bajos pesos moleculares de RBID muestran que se alcanza rápidamente la condición de equilibrio en las proximidades de la cápsula, y que sin embargo, la RBID se transfiere a una mayor velocidad en regiones más exteriores.

Sin embargo, las distribuciones de concentración para la RBID de alto peso molecular muestran la importancia de la convección con respecto al proceso de difusión. Un incremento en la liberación acumulada de RBID debe ser producido por una reducción de la velocidad de difusión, para que pueda incrementarse el efecto relativo de la convección con respecto al proceso de difusión.

6.4. NOMENCLATURA

Símbolo	Descripción	Unidades
a	Radio de la cápsula	cm
A	Área superficial externa total	cm ²
c	Función de concentración	mg/ml
C	Concentración de RBID en el sobrenadante	mg/ml
C_{eq}	Concentración de equilibrio	mg/ml
C_S	Concentración de RBID dentro de las cápsulas	mg/ml
d	Distancia entre cargas	m
d_p	Diámetro de partícula	cm
D_M	Coefficiente de difusión molecular	cm ² /s
D_e	Coefficiente de difusividad efectiva	cm ² /s
e_r, e_z, e_θ	Vectores unitarios	
$erfc$	Función de error complementario	
f	<i>Fuerza electrostática</i>	N
g	Gravedad	m/s ²
h	Coefficiente de transferencia de materia	cm/s
$H(t)$	Función de escalón unitario (Heaviside)	
K	Constante de Coulomb	Nm ² /C ²
n	Vector externo	
N	Número de cápsulas	
P_n	Polinomio de Legendre	
Pe	Número de Peclet	adimens.
q	<i>Carga electrostática</i>	C
r	Coordinada radial	cm
Re_p	Número de Reynolds de partícula ($d_p \rho v / \mu$)	adimens.
Sc	Número de Schmidt ($\mu / \rho D_M$)	adimens.
Sh	<i>Número de Sherwood</i> ($h d_p / D_M$)	adimens.
t	Variable temporal	s
U_∞	Velocidad lejos de la cápsula	cm/s
v	vector de velocidad	

Símbolo	Descripción	Unidades
V_c	Volumen de las cápsulas	cm^3
V_0	Volumen del sobrenadante	cm^3
x, y, z	Coordenadas	cm
z_0	Distancia entre las cápsulas y el fondo del reactor	cm

Letras griegas

ρ	Densidad del fluido	kg/m^3
ε	Porosidad de las cápsulas	adimens.
ζ	$\text{Cos } \theta$	radianes
Ω	Velocidad angular	radianes/s
τ_D	Tiempo de difusión	adimens.
θ	Coordenada angular	radianes
μ	Viscosidad del fluido	kg/m s

6.5. BIBLIOGRAFÍA

- Abdekhodaie, M.J. (2002), “Diffusional release of a solute from a spherical reservoir into a finite external volume”, *J. Pharm. Sci.*, **91(8)**, 1803-1809.
- Arifin, D.Y. et al. (2006), “Mathematical modelling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems”, *Adv. Drug. Delivery. Rev.*, **58**, 1274-1325.
- Bird, R.B., Stewart, W.E., Lighfoot, E.N. (2002), “Transport phenomena”, *John Wiley & Sons, Inc, New York*.
- Blandino, A., Macías, M., Cantero, D. (2000), “Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules”, *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 319-324.
- Crank, J. (1975), “The mathematics of diffusion”, *Clarendon Press, Oxford*.
- Cumbal, L., SanGupta, A.K., Greenlead, J., Leun, D. (2003), “Polymer supported subcolloidal particles: characterization and environmental application”. En “Role of interfaces in environmental protection (Barany, S.)”, *Kluwer Academics Publishers, The Netherlands*.
- Feng, Z-G, Michaelides, E.E. (1999), “Unsteady mass transport from a sphere immersed in a porous medium at finite Peclet numbers”, *Int. J. Heat Mass Transfer*, **42**, 535-546.
- Goubergrits, L., Affeld, K., Debaene, P. (2001), “Investigation of transport phenomena inside a microcapsule”, *4th International Symposium on Particle Image Velocimetry. Paper P1172. Germany*.

-
- Greenstein, G., Polson, A. (1998), “The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: A comprehensive review”, *J. Periodontal*, **69**, 507-520.
 - Haugland, R.P. (2005), “The handbook - A guide to florescent probes and labelling technologies”, *Molecular Proves Inc., Invitrogen*.
 - Hoyos, M. (2003), “Separación hidrodinámica de macromoléculas, partículas y células”, *Acta Biológica Colombiana*, **8(1)**, 11-24
 - Jecl, R. et al. (2001), “Boundary domain integral method for transport phenomena in porous media”, *Int. J. Numerical Methods Fluids*, **35**, 39-54.
 - Kawaguchi, T., Hasegawa, M. (2000), “Structure of dextran-magnetite complex: relation between conformation of dextran chains covering core and its molecular weight”, *J. Mater. Sci.*, **11**, 31-35.
 - Kimura, H. et al. (1992), “Injectable microspheres with controlled drug release for glaucoma filtering surgery”, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **33**, 3436-3441.
 - Koutsopoulos, S., Unsworth, L.D., Nagai, Y., Zhang, S. (2009), “Controlled release of functional proteins through designer self-assembling peptide nanofiber hydrogel scaffold”, *PNAS*, **106(12)**, 4623-4628.
 - Lewinska, D., Rosinski, S., Hunkeler, D., Poncelet, D., Werynski, A. (2002), “Mass transfer coefficient in characterization of gel beads and microcapsules”, *J. Membr. Sci.*, **209**, 533-540.
-

- **Martin, D.F. (1994)**, “Treatment of cytomegalovirus retinitis with an intraocular sustained release ganciclovir implant: a randomized controlled clinical trail”, *Arch. Ophthalmol.*, **112**, 1531-1539.
- **Needleman, I.G. (1991)**, “Controlled drug release in periodontics: A review of new therapies”, *Br. Dent. J.*, **170**, 405-407.ç
- **Otsuka, M. et al. (1994a)**, “A novel skeletal drug delivery system using a self-setting calcium phosphate cement. 4. Effects of the mixing solution volume on the drug release rate of heterogeneous aspirin-loaded cement”, *J. Pharm. Sci.*, **83**, 259-268.
- **Otsuka, M. et al. (1994b)**, “A novel skeletal drug delivery system using a self-setting calcium phosphate cement. 5. Drug release behaviour from a heterogeneous drug loaded cement containing an anticancer drug”, *J. Pharm. Sci.*, **83**, 1565-1568.
- **Papanastasiou, T.C. (1994)**, “Applied fluid mechanics”, *PTR Prentice Hall, New Jersey*.
- **Peng, P., Voelcker, N.H., Kumar, S., Griesser, H.J. (2007)**, “Nanoscale eluting coatings based on alginate/chitosan hydrogels”, *Bioinerphases*, **2(2)**, 95-104.
- **Peyman, G.A., Ganiban, G.J. (1995)**, “Delivery systems for intraocular routes”, *Adv. Drug. Del. Rev.*, **16**, 107-123.
- **Rams, T.E., Slots J. (1996)**, “Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket”, *Periodontal 2000*, **10**, 139-159.

- Sharon, J.L., Puleo, D.A. (2008), “Immobilization of glycoproteins, such as VEGF, on biodegradable substrates”, *Acta Biomaterialia*, **4**, 1016-1023.

- Wakao, N., Funazkri, T. (1978), “Effect of fluid dispersion coefficients on particle-to-fluid mass transfer coefficients in packed beds: correlation of Sherwood numbers”, *Chem. Eng. Sci.*, **33**, 1375-1384.

- Wakao, N., Smith, J.M. (1962), “Diffusion in catalyst pellets”, *Chem. Eng. Sci.*, **17**, 825-834.

6.6. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados derivados del Capítulo 6 se difundieron a través de cuatro congresos internacionales y un artículo internacional:

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, M.A. Galán
Título: *Modelling and simulation of unsteady mass transfer in living tissues.*
Congreso: *11th Mediterranean Congress of Chemical Engineering.*
Ciudad: Barcelona, España.
Fecha: 21-24 Octubre 2008.
Participación: Comunicación Oral (T033-002).

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, M.A. Galán
Título: *Steady and unsteady mass transfer studies from alginate-barium capsules to simulate glycoproteins controlled released.*
Revista: *A.I.Ch.E. Journal (enviada para publicación)*
Impacto: 1,883 (año 2008).

**CAPÍTULO 7: APLICACIÓN I: INMOVILIZACION DE
CÉLULAS MADRE PARA TERAPIA CELULAR**

7. APLICACIÓN I: INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE PARA TERAPIA CELULAR

Una vez desarrollada y modelada la técnica de producción de microcápsulas en el intervalo de 20-50 micras, que permita su administración mediante inyección Hamilton, se procederá a comprobar la viabilidad y proliferación de diferentes líneas celulares inmovilizadas en estas microcápsulas.

El objetivo de la terapia celular es reemplazar, reparar, o mejorar la función de tejidos u órganos dañados. Las células madre adultas pueden ser la solución para el tratamiento de muchas enfermedades, ya que pueden diferenciarse en los diferentes tipos de células, permitiendo regenerar los tejidos dañados. La utilización de células madre embrionicas presenta dificultades éticas que pueden ser evitadas con la utilización de células madre adultas.

Uno de los factores más importantes que pueden complicar el desarrollo de las terapias celulares es la protección de las células implantadas del sistema inmunitario. Una solución no deseada al inmuno-rechazo es la administración de un cóctel de inmuno-supresores que puede producir serios efectos secundarios.

Sin embargo, en este trabajo se propone como solución al inmuno-rechazo la encapsulación de las células en membranas biocompatibles y selectivamente semipermeables, que aseguran la protección mecánica y bloquean la entrada de los mediadores inmunes, pero que permiten la difusión hacia el exterior de las moléculas activas (factores tróficos) producidas por las células, consiguiendo el tratamiento de las enfermedades. Además, este tipo de membranas admiten la entrada de nutrientes y oxígeno, y la salida de los desechos (Angelova y Hunkeler, 1999; Benoit et al., 1996; De Vos et al., 2002; Orive et al., 2003, 2004).

Las células encapsuladas ofrecen la ventaja de ser capaces de sintetizar y segregar de forma continua las proteínas específicas, así como de responder a las señales fisiológicas que regulan la secreción. La membrana de las

cápsulas actúa como una barrera permeable para las moléculas más grandes, como los anticuerpos y componentes complementarios, responsables del rechazo celular, de tal forma que el trasplante en un huésped inmunológicamente incompatible se haga posible. Con la apropiada permeabilidad a moléculas de bajo peso molecular tales como nutrientes, metabolitos, y factores de crecimiento, se espera que las células encapsuladas mantengan su funcionalidad dentro de su barrera permeable y segreguen el repertorio normal de proteínas.

La esclerosis múltiple es una enfermedad desmielinizante, neurodegenerativa, crónica y no contagiosa del sistema nervioso central.

Envolviendo y protegiendo los axones de las fibras nerviosas (o neuronas) de las dos partes principales del sistema nervioso central (cerebro y médula espinal) hay un material compuesto por proteínas y grasas llamado mielina que facilita la conducción de los impulsos eléctricos entre las neuronas (Figura 7.1.). La mielina actúa a modo de cobertura de un cable eléctrico, permitiendo, además, que los nervios transmitan sus impulsos rápidamente.

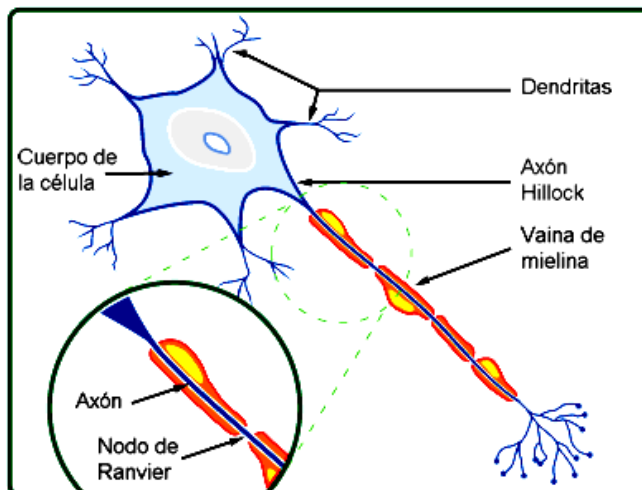


Figura 7.1. Esquema de una neurona

En la esclerosis múltiple la mielina se pierde en múltiples áreas dejando en ocasiones cicatrices (esclerosis). Estas áreas lesionadas se conocen también con el nombre de placas de desmielinización o escleróticas. Si la mielina se destruye o se lesiona, la habilidad de los nervios para conducir impulsos eléctricos desde y hacia el cerebro se interrumpe y este hecho produce la aparición de los síntomas de la enfermedad.

No existe cura y las causas exactas son desconocidas. A causa de sus efectos sobre el sistema nervioso central puede tener como consecuencia una movilidad reducida e invalidez en los casos más severos. Los devastadores efectos de esta enfermedad se deben a la muerte de neuronas que no pueden ser reemplazadas, y a la incapacidad de las neuronas supervivientes para regenerar sus axones.

El sistema nervioso central de un mamífero adulto es prácticamente incapaz de regenerar espontáneamente las estructuras dañadas tras una lesión.

Están siendo investigadas diferentes estrategias para el tratamiento de esta enfermedad, siendo una de las más prometedoras conseguir llevar hasta la zona de lesión progenitores neurales que se diferencien “in situ” a oligodendrocitos mielinizantes que puedan reparar la vaina de mielina dañada y/o aportar factores que faciliten esta reparación. La aplicación de factores neurotróficos ha mostrado la prevención de la muerte de neuronas y la estimulación de la regeneración de los axones dañados (Genain et al., 1995; Linington et al., 1988; Pluchino et al., 2003; Weisser et al., 1998). El enfoque actual de este tratamiento implica el trasplante de diferentes líneas celulares (células madre mesenquimales, monocitos y células monoclonales) que producen un factor trófico en el lugar dañado.

Las células madre mesenquimales (MSC) se caracterizan por su capacidad para expresar los marcadores fenotípicos de múltiples líneas celulares,

incluyendo osteoblastos, condroblastos, adipositos, células endoteliales, neuronas, células musculares lisas, mioblastos esqueléticos, y mioblastos cardíacos. La capacidad de las MSC para auto renovarse y diferenciarse en numerosas líneas celulares, hace de estas células el enfoque clínico más prometedor para la reparación o reemplazo de tejidos dañados. Las células madre mesenquimales tienen la capacidad de producir el factor de crecimiento, SCGF- β (stem cell growth factor- β) que ejerce su acción en los progenitores hematopoyéticos primitivos. Este tipo de citoquina tiene un peso molecular de 25 KDa (Batorsky et al., 2005; Gehling et al., 2000; Ito et al., 2003).

Un monocito es un leucocito, parte del sistema inmune del cuerpo humano, que protege contra los patógenos transportados por la sangre y que se mueve con rapidez hacia los sitios de infección en los tejidos. Los monocitos son producidos por la médula ósea a partir de los precursores hematopoyéticos, y generan factores de crecimiento tales como el factor endotelial vascular, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), el factor fibroblástico básico, bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor), y el factor de necrosis tumoral alfa (tumor necrosis factor- α) con unos pesos moleculares de 42, 16, y 27 KDa, respectivamente (Gerber et al., 1999; Montrucchio, 1994; Shaulian, 1997). El método ideal para obtener monocitos es el aislamiento por adherencia a partir de células mononucleadas procedentes de la sangre periférica (Bennett y Breit, 1994).

Para conseguir el tratamiento de la esclerosis múltiple, mediante el trasplante de estas líneas celulares que producen los factores tróficos, es necesario la administración de las microcápsulas vía inyección (jeringa Hamilton con un tamaño de aguja de 100 μm), que requiere distribuciones de tamaño de partícula comprendidos entre 20 y 50 μm . Microcápsulas con una distribución de tamaño inferior a 20 micras no permiten la encapsulación del número mínimo de células que es necesario para permitir el contacto entre ellas y su proliferación.

Como se vió en el capítulo 2, apartado 2.2., la mayoría de métodos de microencapsulación implican la utilización de condiciones drásticas (contacto con disolventes orgánicos y/o calentamiento durante el proceso), que normalmente son un gran problema, especialmente para el manejo de biomateriales. Además, los trabajos realizados con anterioridad en microencapsulación sin la utilización de condiciones desfavorables obtienen partículas con tamaños de partícula muy superior al requerido para esta estrategia de terapia celular (300-1000 μm).

Muchos autores han intentado el proceso de la inmovilización celular. En particular, para la aplicación que se trata en este trabajo, las microcápsulas de alginato-poli-L-lisina-alginato (APA) se han utilizado ampliamente, aunque también se ha dedicado mucho esfuerzo en intentar identificar un sistema alternativo de encapsulación a las clásicas microcápsulas APA (Uludag et al., 2000). Este sistema clásico proporciona suficiente inmunogenicidad y mantiene la viabilidad celular; sin embargo, producen problemas asociados con el trasplante directo, que resulta en necrosis celular. Otra desventaja de las microcápsulas APA es que su membrana es un complejo electrolítico débil, dando a la microcápsula unas propiedades mecánicas relativamente pobres. Además, en condiciones “in vivo” a largo plazo surgen serios problemas relativos con la viabilidad mecánica (Strand et al., 2001). Los mecanismos por los que se pierde la integridad mecánica a largo plazo pasan por pérdidas en la membrana de calcio (Sefton et al., 2000) y por la respuesta inmune (Rihova, 2000). Finalmente, esta inestabilidad mecánica a largo plazo y la posible inmunogenicidad se asocian con los altos costes, la inherente citotoxicidad de la poli-L-lisina (PLL) (De y Robinson, 2003), y la tendencia de la cápsula de romper en vez de deformar como respuesta a una carga mecánica crítica (Bartkowiak, 1999).

Las microcápsulas de hidroxietil metacrilato-metil metacrilato (HEMA-MMA) han sido investigadas durante un largo tiempo como alternativa a las cápsulas APA, sin embargo la preparación de este polímero sintético puede

requerir la exposición a disolventes orgánicos, así como irradiación, que no es deseable para este tipo de aplicaciones.

El quitosano es otra alternativa a las convencionales microcápsulas APA y por ello se ha estudiado para la encapsulación de fármacos (Gaserod et al., 1998, 1999; Liu et al., 2004; Zielinski y Aebischer, 1994). Recientemente, la adición de poli(etilén glicol) (PEG) ha significado un incremento en la biocompatibilidad de las microcápsulas (Chandy et al., 1999). La adición de PEG a la membrana de quitosano mejora ligeramente la resistencia de las microcápsulas alginato-quitosano, sin embargo, reduce la resistencia de la membrana APA. La integración del PEG puede, por lo tanto, llevar a una mejora de la membrana para soportar los cambios fisiológicos del exterior, sin embargo, no mejora la resistencia mecánica de las microcápsulas (Haque et al., 2005).

Las cápsulas producidas por gelificación iónica con calcio tienen la desventaja de ser sensibles a agentes quelantes tales como, citrato, fosfato, y lactato. Además, a largo plazo la supervivencia de las cápsulas alginato-Ca²⁺ es limitada. El bario se utiliza normalmente para aumentar la estabilidad mecánica, y la experimentación ha demostrado que incluso a bajas concentraciones de bario en la solución gelificante se consigue disminuir sustancialmente el “swelling” de las cápsulas (Peirone et al., 1998; Zekorn et al., 1992). Además, la generación de cápsulas bario-alginato es una técnica simple que consiste en una encapsulación de un único paso de entrecruzamiento de alginato con bario, sin la adición de la tradicional capa permselectiva de PLL.

Por tanto, hasta ahora no existe una tecnología de inmovilización de células que permita obtener microcápsulas biocompatibles con una distribución de tamaño controlada y uniforme en el intervalo entre 20 y 50 micras, con la suficiente estabilidad mecánica, producidas por la técnica biocompatible de la gelificación iónica, que permita la administración vía inyección Hamilton.

Como se describió en los apartados 2.5. y 2.7., este grupo de investigación ha desarrollado una técnica nueva de encapsulación basada en procesos de atomización y en soluciones poliméricas no-newtonianas de alginato, que genera microcápsulas en el intervalo de 20-50 micras, con un tamaño controlado y uniforme, con un factor de dispersión, $(D_{0,9}-D_{0,1})/D_{0,5}$, menor de 1,4.

Por tanto, el objetivo de esta parte del trabajo, será lograr la viabilidad celular todas las líneas celulares utilizadas, utilizando la técnica de encapsulación desarrollada.

7.1. PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS

Primeramente, las células madre mesenquimales y los monocitos, suministrados por el servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, fueron tratados con tripsina y centrifugadas (Internacional Equipment Co., IEC Centra MP4R) a 1000 rpm durante 10 minutos a 20 °C. El medio de cultivo fue decantado y las células fueron mezcladas con 4,0 mL de medio fresco y 50 mL de una solución de alginato estéril consiguiendo una concentración final del 0,7 % en peso. Se utilizaron $1,8 \times 10^6$ y $5,7 \times 10^6$ de células madre mesenquimales y monocitos, respectivamente. Por tanto, la concentración celular final fue de $3 - 11 \times 10^4$ células/mL.

La generación de las microcápsulas se desarrolló según el procedimiento descrito en el Capítulo 2. Se preparó una suspensión de células-alginato al 0,7 % en peso, y se añadió en forma de spray sobre una solución gelificante de cloruro bórico al 2,0 % en peso. Las condiciones experimentales para la generación de las microcápsulas fueron las siguientes:

- Caudal de líquido: 0,006 L/min
- Caudal de aire comprimido: 95 L/min
- Tiempo de gelificación: 5 minutos

Las cápsulas resultantes fueron recogidas mediante filtración con filtros estériles de nylon de 0,45 micras de tamaño de poro y fueron lavadas con 30 mL de buffer fosfato salino (PBS). Las microcápsulas con células inmovilizadas se almacenaron en placas Petry con medio completo de cultivo DMEM complementado con un 10% de suero fetal bovino, y un 1% de penicilina/estreptomicina, para cultivo a 37 °C y 5% de CO₂ en un incubador (Forma direct heat CO₂ incubator, Thermo Electron Corp., Hucoa-Erloss, Model 311). El medio se cambió a diario.

Se realizaron dos producciones de microcápsulas para cada línea celular. Una de ellas fue dispersada mediante ultrasonidos, y la otra no fue dispersada. De esta forma se pudo comprobar el efecto de los ultrasonidos y la dispersión en la viabilidad celular.

Todas las disoluciones utilizadas, cloruro de bario, alginato sódico, y PBS fueron autoclavadas utilizando un autoclave de vapor (P-Selecta, Autester-E) a 121 °C durante 10 minutos. Todo el equipamiento utilizado, incluido todo el material de vidrio, fue autoclavado a 121 °C durante 20 minutos. Después del autoclavado la solución de alginato sódico de una viscosidad de 362 cP pasa a tener una viscosidad de 85 cP, equivalente a una solución de alginato sódico al 0,7 % en peso. El aire utilizado para producir la atomización fue aire sintético. La instalación utilizada para la generación de las microcápsulas fue esterilizada por completo, autoclavando los componentes que lo posibilitaban y el resto mediante una solución al 70 % en peso de alcohol. El proceso entero fue desarrollado en una campana de flujo laminar de tipo II (Nuair, Model NO-UN-425-40DE), bajo condiciones completamente estériles.

7.2. VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS ENCAPSULADAS

El objetivo principal de esta parte es conseguir la supervivencia de las células inmovilizadas en las microcápsulas micrométricas generadas con la nueva técnica basada en procesos de atomización. Hasta ahora ningún autor ha conseguido la inmovilización de células en estas condiciones particulares.

Después de realizar la inmovilización de las diferentes líneas celulares en las microcápsulas, se comprobó su supervivencia cada día mediante el método de la sal de tetrazolio o ensayo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-bromuro 2,5-difeniltetrazolio], descrito dentro del Apéndice I, “Materiales y Métodos”, en el apartado D). Todos los ensayos se realizaron durante 15 días.

La figura 7.2. muestra la viabilidad celular diaria de las células madre mesenquimales inmovilizadas en las microcápsulas contenidas en 100 μL de medio de cultivo, volumen representativo del total de la muestra, ya que este fue dispersado perfectamente. En esta figura se muestra también el efecto de la dispersión por ultrasonidos de las microcápsulas.

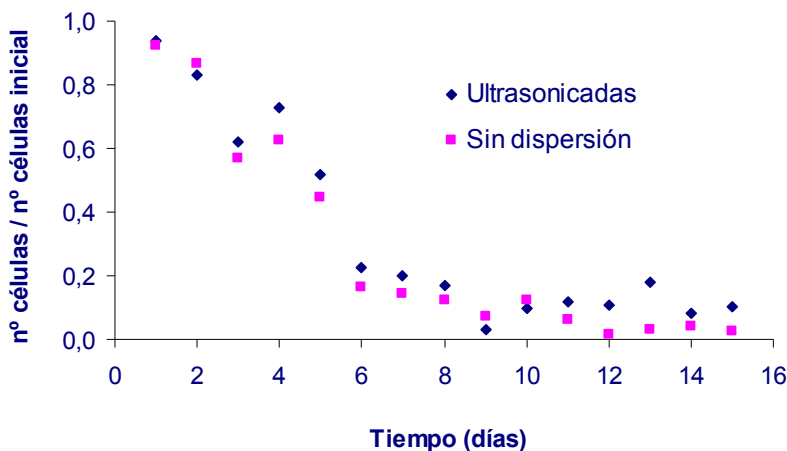


Figura 7.2. Viabilidad celular para las células madre mesenquimales

En el caso de las microcápsulas ultrasonificadas, se observó una disminución gradual de la viabilidad en los 6 primeros días del estudio. A partir del sexto día la viabilidad permaneció prácticamente constante, aproximadamente un 15-20 % de las células dentro de las cápsulas se mantuvieron vivas.

En cuanto al caso de las microcápsulas que no fueron dispersadas el comportamiento fue ligeramente diferente. Se observó una disminución gradual de la viabilidad dentro de los 6 primeros días del estudio, pero, en este caso, la viabilidad continuó disminuyendo en una proporción menor hasta el noveno día, manteniéndose a partir de aquí constante en el 5-10 %.

En cuanto a lo que se refiere a la línea celular de los monocitos, su comportamiento se muestra en la Figura 7.3. que muestran la viabilidad celular diaria de los monocitos inmovilizados en las microcápsulas contenidas en 100 μ L de medio de cultivo, volumen representativo del total de la muestra, ya que este fue dispersado perfectamente. También, se llevó a cabo el estudio del efecto de la dispersión por ultrasonidos en la viabilidad celular.

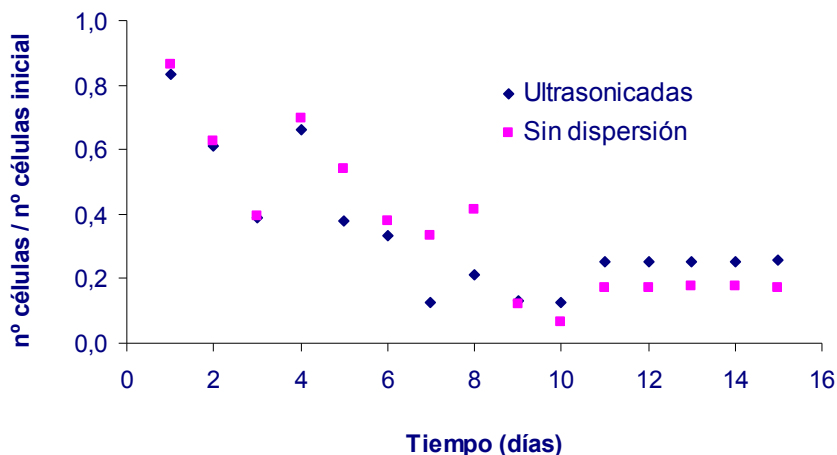


Figura 7.3. Viabilidad celular para los monocitos inmovilizados en las microcápsulas

En el caso de las microcápsulas dispersadas fue observada una disminución gradual de la viabilidad celular dentro de los 3 primeros días del estudio. Después del tercer día la viabilidad permaneció constante en un 25-40 %.

En el caso de las cápsulas sin dispersión su comportamiento fue ligeramente diferente. Se observó una disminución gradual en la viabilidad durante los primeros 9 días. Después del noveno día la viabilidad permaneció constante en un 10-20 %.

En todos los casos, inmediatamente después de la encapsulación la mayoría de las células fueron viables (93% células madre mesenquimales y 85 % monocitos). La reducción de la viabilidad celular dentro de los primeros días de estudio puede ser debido a que las células necesitan un periodo de acomodación a las nuevas condiciones dentro de las microcápsulas. Pero sin embargo, cabe pensar que la disminución es demasiado drástica, quedando el nivel de supervivencia en niveles muy bajos.

Entre los motivos de esta drástica disminución en la viabilidad celular cabe destacar las siguientes posibles causas:

- Se ha partido de un número inicial de células muy pequeño, y teniendo en cuenta que se necesita un número mínimo de células para su proliferación, es posible que este pequeño número de células de partida no sea suficiente para obtener un buen contacto entre ellas que posibilite su proliferación.
- Dentro de las microcápsulas, debido a su pequeño tamaño, es posible que no exista el espacio suficiente para albergar el mínimo número de células para su proliferación.
- Se ha utilizado como método de esterilización del alginato sódico el autoclavado, utilizando 121 °C durante 20 minutos, lo que puede provocar una debilitación de la red del alginato, produciéndose una

débil gelificación con el cloruro bórico. Esta resistencia mecánica tan debilitada puede no ser el soporte óptimo para la proliferación de las células, ya que es muy posible que parte de las cápsulas, por su débil estructura, se desintegren con el tiempo.

La dispersión mejora la viabilidad celular. En los casos en los que no existe la dispersión se observa una reducción de la viabilidad, esto puede ser debido a que las microcápsulas necesitan un espacio para que su membrana permita la entrada de nutrientes y oxígeno, y la salida de desechos. La dispersión de las microcápsulas por ultrasonidos las proporciona el espacio requerido para el intercambio bidireccional. Por lo tanto, la ultrasonicación no solo permite la viabilidad celular, sino que la incrementa.

La variación de los datos en los periodos constantes es debido a que no todas las muestras tomadas de las cápsulas contienen células, por lo tanto, las medidas espectrofotométricas dependen de la muestra tomada.

7.3. MODIFICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS

Con el fin de conseguir aumentar la viabilidad celular se introdujeron las siguientes variaciones en el proceso antes descrito de inmovilización de las células:

- Se incrementó el número inicial de células llegando hasta el millón de células por mililitro de disolución.
- El alginato sódico fue esterilizado mediante radiación ultravioleta, evitando el autoclavado, para mantener intacta la resistencia mecánica de las cápsulas.
- Se utilizaron disoluciones de alginato sódico y de cloruro bórico de mayor concentración en peso, 2 % y 3 %, respectivamente, para incrementar la resistencia mecánica de las cápsulas.
- Se generaron cápsulas de gran tamaño, en el orden de milímetros, para observar el comportamiento de las células en un soporte de mayores dimensiones, que en principio, no limitara su proliferación por problemas de espacio.

En este caso sólo se utilizó una única línea celular, los monocitos, para el proceso de inmovilización.

7.3.1. Descripción de la generación de las microcápsulas

Primeramente, los monocitos, suministrados por el servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, fueron tratados con tripsina y centrifugadas (Internacional Equipment Co., IEC Centra MP4R) a 1000 rpm durante 10 minutos a 20 °C. El medio de cultivo fue decantado y las células fueron suspendidas en 2,0 mL de medio de cultivo DMEM complementado con un 10 % de suero fetal bovino, y un 1% de penicilina/estreptomicina. Se utilizaron $12,0 \times 10^6$ de monocitos.

Se quiere obtener una concentración final de células de $1,0 \times 10^6$ de células por mL de solución, para ello el volumen inicial, los 2 mL de medio-células, tienen que ser llevados a un volumen final de 12,0 mL. Para evitar una agitación excesiva de las células, que puede romper las membranas celulares, se prepararon previamente 10,0 mL de disolución alginato-medio a los que posteriormente se les añadieron los 2 mL de la suspensión de células en medio de cultivo completo. Los 10,0 mL de solución de alginato-medio se prepararon disolviendo la cantidad de reactivo (previamente irradiado con luz ultravioleta para su esterilización), necesario para obtener 12,0 mL de solución al 2,0 % en peso, en medio.

a) Generación de microcápsulas por procesos de atomización

La generación de las microcápsulas por procesos de atomización se desarrolló según el procedimiento modificado descrito en el apartado 2.7. Se tomaron 11 mL de la suspensión de células-alginato-medio al 2 % en peso (de los cuales se aprovecharon 10 mL, descontando las pérdidas), y se añadió en forma de spray sobre una solución gelificante de cloruro bórico al 3 % en peso. Las condiciones experimentales para la generación de las microcápsulas fueron las siguientes:

- Caudal de líquido: 0,018 L/min
- Caudal de aire comprimido: 21 L/min
- Tiempo de gelificación: 5 minutos

Las cápsulas resultantes fueron recogidas mediante filtración con filtros estériles de nylon de 0,45 micras de tamaño de poro y fueron lavadas con 30 mL de buffer fosfato salino (PBS). Las microcápsulas con células inmovilizadas se almacenaron en placas Petry con 20 mL de medio completo de cultivo DMEM complementado con un 10% de suero fetal bovino, y un 1% de penicilina/estreptomicina, para cultivo a 37 °C y 5% de CO₂ en un incubador

(Forma direct heat CO₂ incubator, Thermo Electron Corp., Hucoa-Erloss, Model 311). El medio se cambió a diario.

Las disoluciones utilizadas, cloruro de bario y PBS fueron autoclavadas utilizando un autoclave de vapor (P-Selecta, Autester-E) a 121 °C durante 10 minutos. Todo el equipamiento utilizado, incluido todo el material de vidrio, fue autoclavado a 121 °C durante 20 minutos. El aire utilizado para producir la atomización es aire sintético. La instalación utilizada para la generación de las microcápsulas fue esterilizada por completo, autoclavando los componentes que lo posibilitaban y el resto mediante una solución al 70 % en peso de alcohol. El proceso entero fue desarrollado en una campana de flujo laminar de tipo II (Nuair, Model NO-UN-425-40DE), bajo condiciones completamente estériles.

b) Generación de microcápsulas mediante extrusión

La generación de las microcápsulas se produjo por el proceso de extrusión. Se tomó 1 mL de la suspensión de células-alginato al 2 % en peso (del cual se aprovecharon 0,7 mL, descontando las pérdidas), y se añadió en forma de gotas con una jeringuilla estéril de aguja de 25 G sobre una solución convenientemente agitada de cloruro de bario al 3 % en peso. Para permitir que se complete en su totalidad la reacción de gelificación iónica, las capuz-las se mantuvieron 2 minutos con agitación continua. Se produjeron cápsulas con un tamaño de 2,5 mm.

Las cápsulas resultantes fueron recogidas mediante filtración con filtros estériles de nylon de 0,45 micras de tamaño de poro y fueron lavadas con 30 mL de buffer fosfato salino (PBS). Las cápsulas con células inmovilizadas se almacenaron en placas Petry, con 20 mL de medio completo de cultivo DMEM complementado con un 10% de suero fetal bovino, y un 1% de penicilina/estreptomicina, para cultivo a 37 °C y 5% de CO₂ en un incubador

(Forma direct heat CO₂ incubator, Thermo Electron Corp., Hucoa-Erloss, Model 311). El medio se cambió a diario.

Las disoluciones utilizadas, cloruro de bario y PBS fueron autoclavadas utilizando un autoclave de vapor (P-Selecta, Autester-E) a 121 °C durante 10 minutos. Todo el equipamiento utilizado, incluido todo el material de vidrio, fue autoclavado a 121 °C durante 20 minutos. El proceso entero fue desarrollado en una campana de flujo laminar de tipo II (Nuair, Model NO-UN-425-40DE), bajo condiciones completamente estériles.

7.3.2. Viabilidad de las células encapsuladas

Después de realizar la inmovilización de las células en las cápsulas generadas por procesos de atomización (micrométricas) y de extrusión (milimétricas), se comprobó su supervivencia cada día mediante el ensayo MTT, descrito en el Apéndice I, “Materiales y Métodos”, en el apartado D). Los ensayos se realizaron durante 15 días.

Se realizó un calibrado absorbancia-número de células, con el objetivo de conocer el número exacto de células que había en cada momento.

Calibración absorbancia-número de células:

El ensayo MTT, como puede verse en el apéndice I, “Materiales y Métodos”, proporciona diferentes valores de absorbancia en función de la viabilidad celular. Esta absorbancia debe ser asociada a una cantidad fija de células. Por ello, se realizó una calibración previa con el objeto de transformar los valores obtenidos de absorbancia en número de células vivas. Se partió de un número conocido de células y se analizaron diferentes volúmenes, con una concentración de células conocida, mediante el método MTT, a través de un lector de placas ELISA (Expert Plus, ASYS).

A partir de una suspensión inicial de monocitos de $1,180 \times 10^6$ en 1235 μL de medio completo de cultivo, se tomaron diferentes volúmenes con número conocido de células, y se diluyeron hasta 200 μL rellenando el volumen restante con medio fresco de cultivo. A partir de aquí se realizó el ensayo MTT en un lector de placas ELISA para obtener las medidas de la absorbancia para las diferentes muestras. En la tabla 7.1. se pueden ver los volúmenes tomados a partir de la suspensión inicial, el número de células que contienen, así como su absorbancia. Para cada volumen se tomaron 4 medidas.

Tabla 7.1: Datos experimentales para la obtención de la curva de calibrado

V [μL]	Nº células	Absorbancia _{media}
200	191000	0,2423
160	153000	0,2168
140	134000	0,2024
120	115000	0,1938
100	96000	0,1735
80	76000	0,1608
60	57000	0,1248
40	38000	0,0805
20	19000	0,0460
10	9500	0,0185
5	4800	0,0018

La curva de calibrado obtenida muestra claramente dos zonas bien diferenciadas (Figura 7.4.). Por lo tanto, con el objetivo de minimizar los errores a la hora de calcular el número de células a partir de medidas de absorbancia, se optó por separar la curva de calibrado en dos rectas, para concentraciones inferiores y superiores a 80000 células (Figura 7.4.).

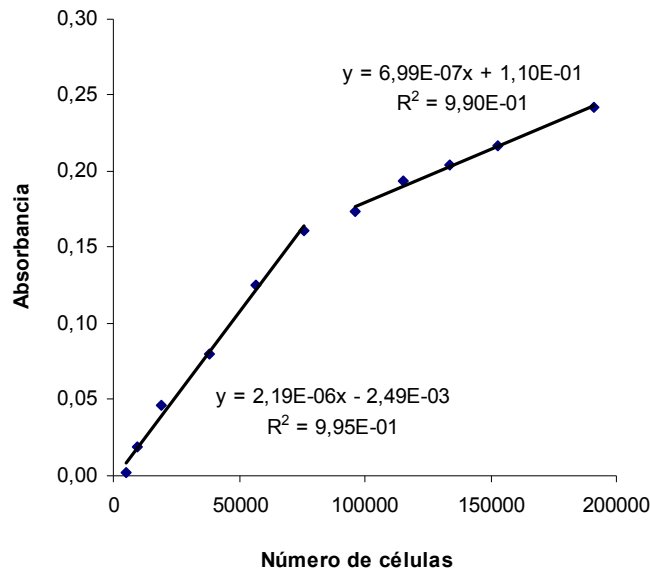


Figura 7.4. Rectas de calibrado

Viabilidad de las células encapsuladas:

La figuras 7.5. y 7.6. muestran la viabilidad celular total de los monocitos inmovilizados en las cápsulas micrométricas y grandes, respectivamente.

En la Figura 7.5. se puede observar que la viabilidad celular en las cápsulas micrométricas aumenta hasta 3 veces la inicial. Durante los 6 primeros días se produce un aumento constante, para después mantenerse aproximadamente constante hasta el final del test.

En la figura 7.6. se puede comprobar que la viabilidad celular crece, al igual que en el anterior caso, hasta 3 veces. En este caso el aumento es constante durante los 15 días, produciéndose un mayor aumento en los últimos días.

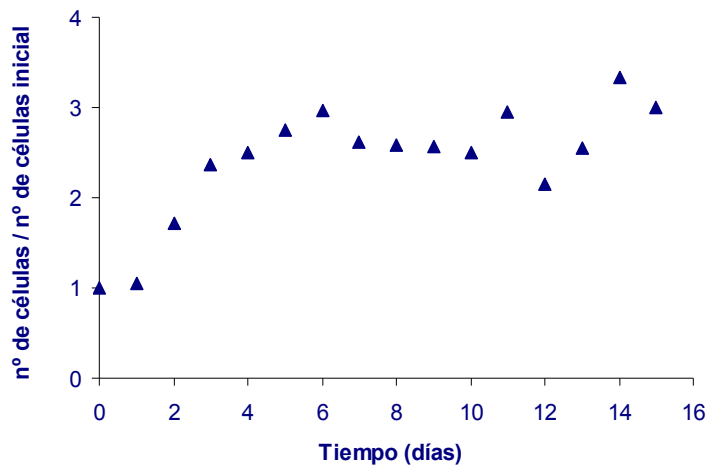


Figura 7.5. Viabilidad celular para los monocitos inmovilizados en las cápsulas micrométricas

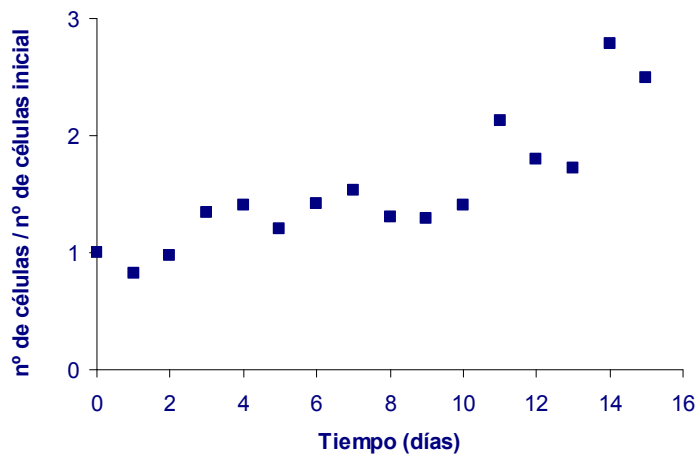


Figura 7.6. Viabilidad celular para los monocitos inmovilizados en las cápsulas grandes

Es posible observar que la viabilidad es aproximadamente la misma para ambos soportes, no influyendo por lo tanto el tamaño de las cápsulas en la viabilidad celular, es decir, el tamaño no limita la proliferación por problemas de espacio.

La variación de los datos es debido a que no todas las cápsulas contienen células, dependiendo por lo tanto, las medidas espectrofotométricas de la muestra tomada.

Con la modificación del método inicial de inmovilización de las células se ha conseguido sin duda mejorar la viabilidad celular, ya que no solo se mantiene sino que existe proliferación celular, cosa que no ocurría con el primer método, en el que la viabilidad se reducía de forma drástica en los primeros días, para luego mantenerse constante en niveles mínimos.

7.4. CONCLUSIONES

Se ha conseguido la inmovilización de células madre mesenquimales y monocitos dentro de las cápsulas generadas según la técnica desarrollada en este trabajo. Este hecho es un éxito en los avances del tratamiento de la enfermedad de la esclerosis múltiple, ya que estas cápsulas con las células inmovilizadas pueden ser administradas sin ningún problema mediante inyecciones Hamilton o aerosol, debido al reducido tamaño de las cápsulas generadas con la nueva técnica desarrollada.

De esta investigación se puede concluir que los factores que influyen en la viabilidad celular son:

- Las células necesitan contacto entre sí para conseguir la proliferación, y por ello al aumentar la concentración celular hasta un millón de células por mililitro de disolución, se aumenta la proliferación de las mismas.
- El método de esterilización del polímero influye de manera significativa en la resistencia mecánica de las cápsulas, dependiendo de este factor la proliferación de las células. Se comprobó que es preferible la irradiación con luz ultravioleta antes que el autoclavado.
- Las cápsulas con tamaño comprendido entre 20 y 50 micras no ofrecen limitaciones espaciales para la proliferación de las células. Se ha comprobado que al pasar de 20-50 micras a 2,5 mm no aumenta significativamente la proliferación.
- La dispersión por ultrasonidos mejora la viabilidad celular, ya que proporciona el espacio requerido para el intercambio bidireccional de nutrientes, oxígeno y productos de desecho.

7.5. BIBLIOGRAFÍA

- Angelova, N., Hunkeler, D. (1999), “Rationalizing the design of polymeric biomaterials”, *Trends Biotechnol.*, **17**, 409-421.
- Bartkowiak, A. (1999), “New multicomponent capsules for immunoisolation”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **875**, 135-145.
- Batorsky, A., Liao, J., Lund, A.W., Plopper, G.E., Stegemann, J.P. (2005), “Encapsulation of adult human mesenchymal stem cells within collagen-agarose microenvironments”, *Biotechnol. Bioeng.*, **92**, 492-500.
- Bennett S., Breit, S.N. (1994), “Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV”, *J. Leukoc. Biol.*, **56**, 236-240.
- Benoit et al. (1996), “Microencapsulation methods and industrial applications”, *Marcel Dekker, New York*.
- Chandy, T., Mooradian, D.L., Rao, G.H.R. (1999), “Evaluation of modified alginate-chitosan-polyethylene glycol microcapsules for cell encapsulation”, *Artif. Organs*, **23**, 894-903.
- De, S., Robinson, D.J. (2003), “Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-L-Lysine-alginate nanospheres”, *J. Controlled Release*, **89**, 101-112.
- De Vos, P, Hamel, A.F., Tatarkiewicz, K. (2002), “Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets”, *Diabetología*, **45**, 159-173.

- Gaserod, O., Jolliffe, I.G., Thompson, F.C., Dettmar, P.W., Skjak-Braek, G. (1998), “The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan”, *Int. J. Pharm.*, **175**, 237-246.
- Gaserod, O., Sannes, A., Skjak-Braek, G. (1999), “Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability”, *Biomaterials*, **20**, 773-783.
- Gehling, U.M. et al. (2000), “In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells”, *Blood*, **95(10)**, 3106-3112.
- Genain, C.P. et al. (1995), “Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in nonhuman primate”, *J. Clin. Invest.*, **96**, 2966-2974.
- Gerber, H.P. et al. (1999), “VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation”, *Nat. Med*, **5**, 623-628.
- Haque, T. et al. (2005), “Superior cell delivery features of poly(ethylene glycol) incorporated alginate, chitosan and poly-L-lysine microcapsules”, *Mol. Pharm.*, **1**, 29-36.
- Ito, C. et al. (2003), “Serum stem cell growth factor for monitoring hematopoietic recovery following stem cell transplantation”, *Bone Marrow Transplant*, **32(4)**, 391-398.

- Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C., Vass, K., (1988), “Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein”, *Am. J. Pathol.*, **130**, 433-454.
- Liu, X.D. et al. (2004), “Swelling behaviour of alginate-chitosan microcapsules prepared by external gelation or internal gelation technology”, *Carbohydr. Polym.*, **56**, 459-464.
- Montrucchio, G. (1994), “Tumor necrosis factor α -induced angiogenesis depends on in situ platelet-activating factor biosynthesis”, *J. Exp. Med.*, **180**, 377-382.
- Orive, G. et al. (2003), “Cell encapsulation: promise and progress”, *Nat. Med.*, **9**, 104-107.
- Orive, G. et al. (2004), “History, challenges and promises of cell microencapsulation”, *Trends Biotechnol.*, **22**, 87-92.
- Peirone, M., Ross, C.J., Hortelano, G., Brash, J.L., Chang, P.L. (1998), “Encapsulation of various recombinant mammalian cell types in different alginate microcapsules”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 587-596.
- Pluchino, S. et al. (2003), “Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis”, *Nature*, **422**, 688-684.
- Rihova, B. (2000), “Immunocompatibility of cell delivery systems”, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **42**, 65-80.

- Sefton, M.V., May, M.H., Lahooti, S., Babensee, J.E. (2000), “Making microencapsulation work: conformal coating, immobilization gels and in vivo performance”, *J. Controlled Release*, **65**, 173-186.
- Shaulian, E. (1997), “Induction of Mdm2 and enhancement of cell survival by bFGF”, *Oncogene*, **15(22)**, 2717-2725.
- Strand, B.L. et al. (2001), “Poly-L-Lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines”, *Cell Transplant*, **10**, 263-275.
- Uludag, H., De Vos, P., Tresco, P.A. (2000), “Technology of mammalian cell encapsulation”, *Av. Drug. Delivery Rev.*, **42.**, 29-64.
- Weisser, R. et al. (1998), “MHC Haplotype-dependent regulation of MOG-induced EAE in rats”, *J. Clin. Invest.*, **6**, 1265-1273.
- Zekorn, T. et al. (1992), “Barium-alginate beads for immunoisolated transplantation of islets of Langerhans”, *Transplant. Proc.*, **24**, 937-939.
- Zielinski, B.A., Aebischer, P. (1994), “Chitosan as a matrix for mammalian-cell encapsulation”, *Biomaterials*, **15**, 1049-1056.

7.6. DIFUSIÓN DE RESULTADOS.

Los resultados derivados del Capítulo 7 se difundieron a través de un congreso internacional y un artículo internacional:

Autores: Eva M.M. Del Valle, Edgar P. Herrero, M.A. Galán
Título: *Development of a new technology of microencapsulation to cell therapy based on air-blast atomizers.*
Congreso: *XVII International Conference on Bioencapsulation*
Ciudad: Groningen, Netherlands.
Fecha: 24-26 Septiembre 2009.
Participación: Comunicación Oral (03-4).

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, M.A. Galán
Título: *Immobilization of mesenchymal stem cells and monocytes in bio-compatible microcapsules to cell therapy.*
Revista: *Biotechnology Progress*, **23** (2007) 940-945.
Impacto: 2,224 (año 2007).

A continuación, se adjunta una copia del artículo publicado en la revista internacional *Biotechnology Progress*:

Immobilization of Mesenchymal Stem Cells and Monocytes in Biocompatible Microcapsules to Cell Therapy

Edgar P. Herrero, Eva M. Martín Del Valle,* and Miguel A. Galán

Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, P/Los Caídos S/N, 37008 Salamanca, Spain

The aim of cell therapy is to replace, repair, or enhance the function of damaged tissues or organs. Several factors complicate the development of cellular therapies. Of primary importance is protection of the implanted cells from the host's immune system. Cells are encapsulated in selectively semipermeable and biocompatible membranes that block entry of immune mediators but allow outward diffusion of active molecules produced by the cells. The immobilization of mesenchymal stem cells and monocytes, in micrometric (30–60 μm) alginate–barium microcapsules based on atomization processes, has been achieved successfully. This size is necessary to the administration of microcapsules via injection (Hamilton syringe with a needle size of 100 μm) and aerosol. Microencapsulated cells survive at least 2 weeks after preparation *in vitro*.

Introduction

Cell therapy is one of the most exciting fields in translational medicine. It stands at the intersection of a variety of rapidly developing scientific disciplines: stem cell biology, immunology, tissue engineering, molecular biology, biomaterials, transplantation biology, regenerative medicine, and clinical research. Cell-based therapy may develop into a new therapeutic platform to treat a vast array of clinical disorders.

The aim of cell therapy is to replace, repair, or enhance the function of damaged tissues or organs. The adult stem cells could be the solution to the treatment of the most devastating diseases of Humanity since they can differentiate the different types of cells, allowing us to regenerate damaged tissues. Mesenchymal stem cells (hMSC) are characterized by their ability to express phenotypic markers of multiple cell lineages, including osteoblasts, chondroblasts, adipocytes, endothelial cells, neurons, smooth muscle cells, skeletal myoblasts, and cardiac myocytes. The ability to self-renew and differentiate into numerous cell types makes the use of hMSC to repair or replace damaged tissues a promising approach to many clinical problems. hMSC have the ability to produce a growth factor, SCGF- β (stem cell growth factor- β) that exerts its action on primitive hematopoietic progenitor cells. In combination with other hematopoietic growth factors, such as granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and erythropoietin, SCGF stimulates the formation of erythroid and granulocyte–macrophage colonies. This novel cytokine has a molecular weight of 25 KDa (1–3).

A monocyte is a leukocyte, part of the immune system of the human body, that protect against blood-borne pathogens and moves quickly to sites of infection in the tissues. Monocytes are produced by the bone marrow from hematopoietic stem cell precursors and produce growth factors, such as VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), and TNF- α (tumor necrosis factor- α) with

molecular weights of 42, 16, and 27 KDa, respectively, that are very important to the angiogenesis (4–6).

Several factors complicate the development of cellular therapies. Of primary importance is protection of the implanted cells from the host's immune system to prevent the freshly grafted cells from attack by native killer cells. A highly undesirable solution to immunorejection is the regular administration of a cocktail of immunosuppressants that can result in serious side effects. The natural mechanisms for identification and elimination of foreign bodies are well-understood.

Then, in this work the cells will be encapsulated in selectively semipermeable and biocompatible membranes that block entry of immune mediators but allow outward diffusion of active molecules produced by the cells that will allow the treatment of the diseases and assures the mechanical protection. In addition, this membrane permits the entry of nutrients and oxygen, and the exit of waste (7–11). Finally, to achieve the cell therapy, the administration of the microcapsules is needed via injection (Hamilton syringe with a needle size of 100 μm) and aerosol that requires particle diameters between 30 and 60 μm . Microcapsules smaller than 30 μm do not permit the encapsulation of the minimal number of cells that are needed to allow the contact between cells and proliferate.

Most methods of microencapsulation involve one of two harsh conditions (contact with an organic solvent and/or heating during processing) which usually is a problem, especially for biomaterials handling (12–16). The previous work done on microencapsulation without harsh conditions produced capsules with diameters ranging between 300 and 1000 μm (17–23).

Many authors have tried the cell immobilization. In particular, alginate–poly-L-lysine–alginate (APA) microcapsules had been extensively used for this application, while much effort had also been focused on identifying an alternative encapsulation system to the classical APA microcapsules (24). This classical system provides sufficient immunogenicity and supports cell viability; however, it produces problems associated with direct transplantation resulting in cell necrosis. Another disadvantage of APA microcapsules is that the alginate–polylysine membrane, a weak polyelectrolyte complex, gives the microcapsules relatively poor

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: emvalle@usal.es.

mechanical properties. In addition, serious questions regarding mechanical viability arise over long-term "in vivo" conditions (25). Possible mechanisms for a loss of long-term mechanical integrity include membrane calcium loss (26) and host immune responses (27). Finally, this long-term mechanical instability and possible immunogenicity is coupled with high costs, the inherent cytotoxicity of PLL (28), and the tendency for the capsule to rupture instead of deform in response to a critical mechanical load (29).

Hydroxyethyl methacrylate–methyl methacrylate (HEMA–MMA) has long been investigated as an alternative to APA microcapsules, but the preparation of this synthetic polymer can require exposure to organic solvents, toxic monomers, high temperatures, and irradiation, which may be undesirable for this applications.

Chitosan is another alternative to the conventionally studied APA microcapsules and has been studied for the encapsulation of drugs (30–33). More recently, the addition of poly(ethylene glycol) (PEG) has been suggested as a means of increasing biocompatibility of microcapsules (34). The addition of PEG to the chitosan membrane slightly improved the strength of the alginate–chitosan microcapsules; however, it reduces the strength of the APA membrane. The integration of PEG may therefore lead to improvements of the membrane to sustain exterior physiological changes; however, it does not improve the mechanical strength of the microcapsules (35).

Ca²⁺ cross-linked beads have the disadvantage of being sensitive to chelators such as citrate, phosphate, and lactate. Thus, long-term survival of solid Ca²⁺ cross-linked alginate microcapsules is limited. Barium is commonly used to increase the mechanical stability, and experiments have shown that even low molar concentrations of barium in the gelling solution can substantially decrease the capsule swelling (36, 37). In addition, the production of barium–alginate microcapsules is a simple technique that consists of one-step encapsulation with alginate cross-linked with barium, without a traditional permselective layer such as PLL.

Until now there is not a described cell immobilization technology that allows one to obtain micrometric biocompatible microcapsules (30–60 μm) with enough mechanical stability, of controlled size and uniformity, on the basis of the reaction of ionic gelification of barium–alginate, to achieve the administration of the microcapsules via injection and aerosol to cell therapy.

However, previous studies of this investigation group (38), based on atomization processes, have developed a new technology of production of microcapsules based on a non-Newtonian fluid alginate solutions, which produced alginate–barium microcapsules ranging between 1 and 50 μm , with controlled size and a particle size distribution with a relative span factor, (D0.9–D0.1)/D0.5, less than 1.4. The effect of the alginate solution viscosity and flow rate and the air flow rate were studied. Smaller microcapsules were produced at lower alginate flows, higher air flow rates, and lower alginate viscosity. Also, a mathematical semiempirical model, based on the wave mechanism, was developed to predict the size of the microcapsules produced by atomization (39).

The encapsulated cells offer the advantages of being able to continuously synthesize and secrete cell-specific proteins as well as respond to physiological signals by regulating the secretion. The capsule membrane acts as a permeability barrier for large molecules, such as antibodies and complementary components, responsible for cell rejection so that transplantation into an immunologically incompatible host becomes feasible. With the

appropriate permeability to lower molecular weight nutrients, metabolites, and growth factors, the encapsulated cells are expected to remain functional within this permeability barrier and secrete the normal repertoire of proteins.

This investigation has been carried out through several studies on the size of pores of the microcapsules by the molecular weight cutoff. Del Pozo et al. (40) considered an innovating technique that consists of the microencapsulation of a colored substance that is available in several molecular weights (10–70 KDa), rhodamine B isothiocyanate–dextran. This allows the monitoring of its release by spectrophotometer measure, and because it is available in diverse molecular weights, it allows one to simulate different kinds of molecules that are of interest. This study shows the best work conditions to achieve a controlled release of the biosubstances that secrete the cell immobilized in the microcapsules. The sodium alginate concentration (1–3 wt %) is the bigger influencing factor. When sodium alginate concentration increases or his molecular weight decreases, the rhodamine release increases and then the pore size is bigger. This study revealed that microcapsules produced with calcium have a pore size bigger than those produced with barium. When cations concentration (2–4 wt %) decreases, the rhodamine release increases and then the pore size is bigger.

On the basis of this new technology of producing very small microcapsules with a high mechanical stability, the main aim of this work is to achieve the cell immobilization of two different cell lines, mesenchymal stem cells and monocytes, using this technology. Cell viability will be investigated using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay.

Materials and Methods

Materials. Sodium alginate from *Macrocystis pyrifera* (medium viscosity) was purchased from Sigma Chemicals, barium chloride dihydrate, reagent grade, was purchased from Scharlau, and 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT solution) and 0.1 N HCl in anhydrous isopropyl alcohol (MTT solvent) were purchased from Sigma Chemicals; 0.45 μm filters were obtained from Millipore. Air ALPHAGAZ pure air was supplied by Air Liquide.

Cell Lines. Two different cell lines were used in this study; mesenchymal stem cells and monocytes from bone marrow were obtained from the Hematology Service of the University Hospital of Salamanca.

Complete growth medium consisting of Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin was provided for the Hematology Service of the University Hospital of Salamanca.

Production of Microcapsules. Mesenchymal stem cells and monocytes were treated with trypsin and then centrifuged (International Equipment Co., IEC Centra MP4R) at 1000 rpm for 10 min at 20 °C. The medium was decanted, and the cells were mixed with 4.0 mL of fresh medium and 50 mL of sterile alginate solution to attain a concentration of 0.7%. The amounts of 1.8×10^6 and 5.7×10^6 of mesenchymal stem cells and monocytes, respectively, were used.

The generation of the microcapsules is described by Herrero et al. (38) and can be described briefly as follows. Sodium alginate (0.7% (w)) was fed from a beaker to an atomization nozzle of 1.8 mm by air intake. After that, sodium alginate is sprayed at 0.006 L/min into a crystallizer containing 1000 mL of hardening solution and 2% (w) barium chloride solution, which induces the gelation. The device to the atomization works with pressurized air that mixes with the liquid, forcing liquid

droplets out through the orifice of the nozzle. The air flow and pressure were set at 95 L/min and 2 bar, respectively. The distance between the orifice of the atomization nozzle and the pan was fixed at 0.14 m. The microbeads were kept 5 min under cross-linked conditions to form a semipermeable membrane. The resultant microbeads were collected by filtration (0.45 μm filters) and washed with 30 mL of phosphate buffered saline (PBS). The microcapsules were stored in a plate dish with complete growth media DMEM supplemented with 10% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin for culturing at 37 °C and 5% CO₂ in an incubator (Forma direct heat CO₂ incubator, Thermo Electron Corp., Huco-Erlöss, Model 311). The medium was changed once every day.

Two productions of each cell line encapsulation were prepared: one was dispersed by ultrasonication, and the other was not dispersed to find out the ultrasonication effect on the cell viability.

All solutions used, barium chloride, sodium alginate, and PBS, were autoclaved using a steam sterilizer (P-Selecta, Autester-E) at 121 °C for 10 min. All the equipment used, including all the glassware, was autoclaved at 121 °C for 20 min. After sterilization, the sodium alginate solution of 362 cP of viscosity turns into a solution of 85 cP. The air used to atomize the sodium alginate—cells suspension is pure air. The device to the microcapsule production was sterilized by passing a 70% alcohol solution through it. The whole process was performed under sterile conditions in a class II laminar flow hood (Nuair, Model NO-NU-425-40DE).

Particle Size Analysis. We have obtained the particle size distribution of the microcapsules produced with laser diffraction. To do that, we have used a Mastersizer 2000 particle size analyzer. This device utilizes the phenomenon of scattered light from a laser beam projected through a stream of particles.

The droplet size distribution is frequently characterized by its Sauter mean diameter (SMD), which is the diameter of that drop whose volume/surface ratio value is the same as the arithmetic mean of volume/surface values on the total number of drops belonging to the sample spray under examination. Usually the concept of SMD is defined as

$$\text{SMD} = \frac{\int_0^{\infty} D^3 dN}{\int_0^{\infty} D^2 dN} \quad (1)$$

where D is the droplet diameter and dN stands for the percentage of the total number of droplets with a diameter contained in the interval $[D, D+dD]$.

The SMD is influenced by the properties of the atomized and atomizing fluids and by the nozzle design and operating conditions.

Image Analysis. The photographs of the microcapsules were taken with a scientific digital firewire color camera system Leica DFC280 connected to an optical microscope Leica DM1000.

Method of Testing Viability of Encapsulated Cells. Encapsulated cell viability was assessed using the MTT assay, first described by Mosmann in 1983 (41). Previously established procedures as described by Uludag and Sefton were used with some modifications (42). The reduction of tetrazolium salts is widely accepted as a reliable way to examine the cell viability in microcapsules. This viability test is based on the ability of a mitochondrial dehydrogenase enzyme from viable cells to cleave the tetrazolium rings of the pale yellow MTT and form dark blue formazan crystals which are largely impermeable to cell membranes, thus resulting in their accumulation within healthy

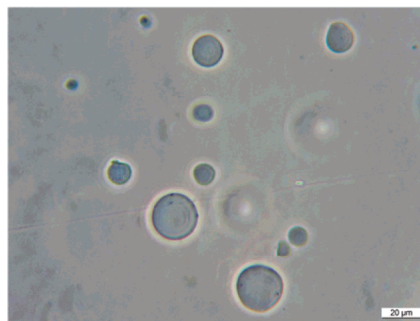


Figure 1. Alginate-barium microcapsules (40 \times objective \times 3 \times optical zoom).

cells. Solubilization of the cells by the addition of a detergent results in the liberation of the crystals which are solubilized. The number of surviving cells is directly proportional to the level of the formazan product created. The color can then be quantified using a simple colorimetric assay. The results can be quantified by spectrophotometric means.

The viability tests were carried out using 100 μL of culture medium with microcapsules per well of a 96-well microplate. Aseptically 20 μL of MTT solution (Sigma-Aldrich, 5 mg/mL in RPMI-1640) were added to each well and incubated at 37 °C for 3.5 h. After the incubation period, cultures were removed from the incubator, and the resulting MTT formazan crystals were dissolved by adding the MTT solvent (0.1 N HCl in anhydrous isopropyl alcohol) directly to the culture in an amount equal to the original culture volume (100 μL). Wells were read within 1 h after adding the MTT solvent. Pipetting up and down (trituration) is required to completely dissolve the MTT formazan crystals. Absorbance of each well was then measured in a spectrophotometer using a wavelength of 570 nm, with the reference wavelength set at 690 nm. Blanks consisting of complete culture medium without cells were also analyzed.

Results and Discussion

Preliminary Characterization. Microcapsules were studied before cell immobilization to its characterization. On the basis of the previous studies, the best conditions were chosen to produce the microcapsules, with a good mechanical strength, in the range between 30 and 60 μm so they can be administered via injection and aerosol. Also, the size of the pores of the capsules should be in the range between 16 and 42 kDa to allow the release of the growth factors that secrete the mesenchymal stem cells and the monocytes. A low alginate concentration (0.7 wt %), a barium concentration of 2.0 wt %, and a high air flow rate (95.0 L/min) were chosen. A medium molecular weight sodium alginate and a low alginate flow rate (0.006 L/min) were used that, as well as producing smaller microcapsules, help to save the high added value products used in this work (mesenchymal stem cells and monocytes). With these conditions microcapsules with a Sauter mean diameter of 53.46 μm are achieved, as is shown in Figure 1. Microcapsules displayed a consistent appearance of spheres.

Finally, an exhaustive study of the tensile strength of the microcapsules was carried out by the Ceramics Technology Institute (Castellón, Spain), obtaining satisfactory results of mechanical strength of the microcapsules.

Viability of Encapsulated Cells. The main aim in the present work is to achieve the viability of cells immobilized in

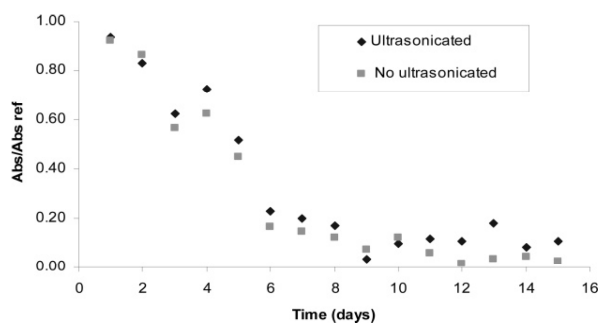


Figure 2. Cell viability for mesenchymal stem cell microcapsules.

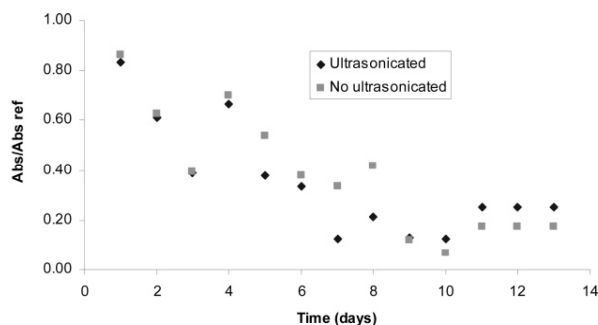


Figure 3. Cell viability for monocyte microcapsules.

micrometric microcapsules (30–60 μm) produced by atomization processes. Nobody has achieved the cell immobilization in these conditions before.

To test whether the cells could survive within the micrometric alginate–barium microcapsules, the cell viability was monitored every day for a period of 13–15 days using an MTT assay. Figure 2 represents the mesenchymal stem cells viability for the microcapsules contained in 100 μL of culture medium. Figure 3 represents the monocytes viability for the microcapsules contained in 100 μL of culture medium. Both figures show, as well, the effect of the dispersion of the microcapsules by ultrasonication. Figures 2 and 3 show similar behavior, but with some differences.

Mesenchymal stem cells line behavior is shown in Figure 2. The influence of the dispersion was also tested by ultrasonication in the cell viability (Figure 2 (■)). The cell viability was monitored daily for 15 days. In the ultrasonicated microcapsules was observed, within the first 6 days after encapsulating, a gradual decrease in cell viability. After the sixth day the cell viability remained almost constant. At this point approximately 15–20% of the cells within the beads were alive. With regard to the microcapsules without dispersion the behavior was slightly different. Within the first 6 days after encapsulating was observed a gradual decrease in cell viability, but, in this case, the cell viability continued to decrease until the ninth day, where it remained constant at 5–10%.

With regard to the monocytes line, its behavior is shown in Figure 3. The influence of the dispersion was also tested by ultrasonication in the cell viability (Figure 3 (■)). The cell viability was monitored daily for 13 days. In the ultrasonicated microcapsules was observed, within the first 3 days after encapsulating, a gradual decrease in cell viability. After the third

day the cell viability remained almost constant. At this point approximately 25–40% of the cells within the beads were alive. With regard to the microcapsules without dispersion, the behavior was slightly different. Within the first 9 days after encapsulating was observed a gradual decrease in cell viability. After the ninth day the cell viability remained almost constant. At this point approximately 10–20% of the cells within the beads were alive.

Immediately after encapsulation most of the stem cells and monocytes (93 and 85%) were viable in both microcapsule productions (with and without dispersion).

The reduction of the cell viability within the first days is due to the cells needing a period of accommodation for the new conditions within the microcapsules. After this period of accommodation the cell viability remained almost constant because of cells needing a minimal number to proliferate. Within the microcapsules there are only a few cells because of the small size of the microcapsules, and this causes the absence of proliferation.

The dispersion improves the cell viability. Symbols ■ of Figures 2 and 3 show a reduction in cell viability in the final period (cell viability constant) in comparison with the symbols ♦ of Figures 2 and 3 (microcapsules ultrasonicated). It may be speculated that this reduction may be due to the microcapsules requiring space to permit entry of nutrients and oxygen into the membrane, and the exit of waste. The microcapsules dispersion by ultrasonication gives them the required space to allow the bidirectional exchange. Therefore, ultrasonication not only permits the cell viability but increases it.

The data variation in the constant period is due to not all the microcapsules contain cells, and the spectrophotometric measure depends on the sample chosen.

Conclusions

Stem cells could be the solution to the treatment of the most devastating diseases of Humanity since they can differentiate different types of cells, allowing damaged tissues to regenerate. The aim of cell therapy is to replace, repair, or enhance the function of damaged tissues or organs. Several factors complicate the development of cellular therapies. Of primary importance is protection of the implanted cells from the host's immune system. Cells are encapsulated in selectively semipermeable and biocompatible membranes that block entry of immune mediators but allow outward diffusion of active molecules produced by the cells.

The immobilization of mesenchymal stem cells and monocytes has been achieved successfully, in micrometric (30–60 μm) alginate–barium microcapsules based on atomization processes. This size is necessary for the administration of microcapsules via injection Hamilton and aerosol.

Immediately after encapsulation most of the stem cells and monocytes were viable in both microcapsule productions (with and without dispersion).

The reduction of the cell viability observed within the first days was due to the cells needing a period of accommodation for the new conditions within the microcapsules. After this period of accommodation, the cell viability remained almost constant because of cells needing a minimal number to proliferate. Within the microcapsules there were only a few cells because of the small size of the microcapsules, and this caused the absence of proliferation.

The dispersion improved the cell viability. The microcapsules dispersion by ultrasonication gave them the required space to allow the bidirectional exchange.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge Prof. Consuelo del Cañizo and Prof. Natalia Lopez Holgado from the Hematology Service of the University Hospital of Salamanca for the cells provided. This research was supported by funds from the Ministry of Science and Education (MEC), Junta de Castilla y León and the Program Cell Therapy of the Savings Bank Federation of Castilla y León. The authors gratefully acknowledge the financial support.

References and Notes

- Batorsky, A.; Liao, J.; Lund, A. W.; Plopper, G. E.; Stegemann, J. P. Encapsulation of adult human mesenchymal stem cells within collagen-agarose microenvironments. *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, *92*, 492–500.
- Gehling, U. M.; et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* **2000**, *95* (10), 3106–3112.
- Ito, C.; et al. Serum stem cell growth factor for monitoring hematopoietic recovery following stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **2003**, *32* (4), 391–398.
- Gerber, H. P.; et al. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 623–628.
- Shaulian, E. Induction of Mdm2 and enhancement of cell survival by bFGF. *Oncogene* **1997**, *15* (22), 2717–2725.
- Montrucchio, G. Tumor necrosis factor α -induced angiogenesis depends on in situ platelet-activating factor biosynthesis. *J. Exp. Med.* **1994**, *180*, 377–382.
- Benoit, et al. *Microencapsulation methods and industrial applications*; Dekker: New York, 1996.
- Orive, G.; et al. Cell encapsulation: Promise and progress. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 104–107.
- Angelova, N.; Hunkeler, D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 409–421.
- Orive, G.; et al. History, challenges and promises microencapsulation. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*.
- De Vos, P.; Hamel, A. F.; Tatariewicz, K. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetologia* **2002**, *45*, 159–173.
- Sato, T.; Kanke, M.; Schroeder, H.; DeLuca, P. Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery. I. Assessment of processing conditions and solvent removal techniques. *Pharm. Res.* **1988**, *5*, 21–30.
- Burgess, D. J.; Davis, S. S.; Tomlinson, E. Potential use of albumin microspheres as a drug delivery system. I. Preparation and in vitro release of steroids. *Int. J. Pharm.* **1987**, *39*, 129–136.
- Mi, F.-L.; Wong, T.-B.; Shyu, S.-S.; Chang, S.-F. Chitosan microspheres: Modification of polymeric chem-physical properties of spray-dried microspheres to control the release of antibiotic drug. *J. Appl. Polym. Sci.* **1999**, *71*, 747–759.
- Burgess, D. J.; Carless, J. E. Manufacture of gelatine/gelatine coacervate microcapsules. *Int. J. Pharm.* **1987**, *27*, 61–70.
- Benita, S.; Benoit, J. P.; Puisieux, F.; Thies, C. Characterization of drug-loaded poly(D,L-lactide) microspheres. *J. Pharm. Sci.* **1984**, *73*, 1721–1724.
- Senuma, Y.; Lowe, C.; Zweifel, Y.; Hilborn, J. G.; Marison, I. Alginate hydrogel microspheres and microcapsules prepared by spinning disk atomization. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67*, 616–622.
- Serp, D.; Cantana, E.; Heinzen, C.; von Stockar, U.; Marison, I. W. Characterization of an encapsulation device for the production of monodisperse alginate beads for cell immobilization. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *70*, 41–53.
- Shwinger, C.; Klemenz, A.; Busse, K.; Kressler, J. Encapsulation of living cells with polymeric systems. *Macromol. Symp.* **2004**, *210*, 493–499.
- Canaple, L.; Rehor, A.; Hunkeler, D. Improving cell encapsulation through size control. *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.* **2002**, *13*, 783–796.
- Robitaille, R.; et al. Studies on small (<350 μm) alginate-poly-L-lysine microcapsules. III. Biocompatibility of smaller versus standard microcapsules. *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *44*, 116–120.
- Orive, G.; Hernández, R. M.; Gascón, A. R.; Igartua, M.; Pedraz, J. L. Development and optimisation of alginate-PMCG-alginate microcapsules for cell immobilisation. *Int. J. Pharm.* **2003**, *259*, 57–68.
- Sugiura, S.; et al. Size control of calcium alginate beads containing living cells using micro-nozzle array. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3327–3331.
- Uludag, H.; De Vos, P.; Tresco, P. A. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv. Drug. Delivery Rev.* **2000**, *42*, 29–64.
- Strand, B. L.; et al. Poly-L-Lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines. *Cell Transplant.* **2001**, *10*, 263–275.
- Sefton, M. V.; May, M. H.; Lahooti, S.; Babensee, J. E. Making microencapsulation work: conformal coating, immobilization gels and in vivo performance. *J. Controlled Release* **2000**, *65*, 173–186.
- Rihova, B. Immunocompatibility of cell delivery systems. *Adv. Drug. Delivery Rev.* **2000**, *42*, 65–80.
- De, S.; Robinson, D. J. Polymer relationships during preparation of chitosan-alginate and poly-L-lysine-alginate nanospheres. *J. Controlled Release* **2003**, *89*, 101–112.
- Bartkowiak, A. New multicomponent capsules for immunisation. *Ann N. Y. Acad. Sci.* **1999**, *875*, 135–145.
- Gaserod, O.; Jolliffe, I. G.; Thompson, F. C.; Dettmar, P. W.; Skjak-Braek, G. The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan. *Int. J. Pharm.* **1998**, *175*, 237–246.
- Gaserod, O.; Sannes, A.; Skjak-Braek, G. Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability. *Biomaterials* **1999**, *20*, 773–783.
- Liu, X. D.; et al. Swelling behaviour of alginate-chitosan microcapsules prepared by external gelation or internal gelation technology. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *56*, 459–464.
- Zielinski, B. A.; Aebischer, P. Chitosan as a matrix for mammalian-cell encapsulation. *Biomaterials* **1994**, *15*, 1049–1056.

- (34) Chandy, T.; Mooradian, D. L.; Rao, G. H. R. Evaluation of modified alginate-chitosan-polyethylene glycol microcapsules for cell encapsulation. *Artif. Organs* **1999**, *23*, 894–903.
- (35) Haque, T.; et al. Superior cell delivery features of poly(ethylene glycol) incorporated alginate, chitosan, and poly-L-lysine microcapsules. *Mol. Pharm.* **2005**, *1*, 29–36.
- (36) Peirone, M.; Ross, C. J.; Hortelano, G.; Brash, J. L.; Chang, P. L. Encapsulation of various recombinant mammalian cell types in different alginate microcapsules. *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *42*, 587–596.
- (37) Zekorn, T.; et al. Barium-alginate beads for immunisolated transplantation of islets of Langerhans. *Transplant. Proc.* **1992**, *24*, 937–939.
- (38) Herrero, E. P.; Del Valle, E. M. M.; Galán, M. A. Development of a new technology for the production of microcapsules based in atomization processes. *Chem. Eng. J.* **2006**, *117*, 137–142.
- (39) Herrero, E. P.; Del Valle, E. M. M.; Galán, M. A. Modeling prediction of the microcapsule size of polyelectrolyte complexes produced by atomization. *Chem. Eng. J.* **2006**, *121*, 1–8.
- (40) Del Pozo, A.; Del Valle, E. M. M.; Galán, M. A. Kinetic diffusion studies of alginate-calcium and alginate barium microcapsules and determination of influence of factors implied in their production using doe. Submitted for publication in *J. Membr. Sci.*
- (41) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- (42) Uludag, H.; Sefton, M. V. Microencapsulated human hepatoma (Hepg2) cells-in vitro growth and protein release. *J. Biomed. Mater. Res.* **1993**, *27*, 1213–1224.

Received February 12, 2007. Accepted June 4, 2007.

BP070047P

**CAPÍTULO 8: APLICACIÓN II: RECONOCIMIENTO DE
PROTEÍNAS MEDIANTE CÁPSULAS DE ALGINATO-CALCIO**

8. APLICACIÓN II. RECONOCIMIENTO DE PROTEÍNAS MEDIANTE CÁPSULAS DE ALGINATO-CALCIO

Como resultado de la estancia de investigación de cinco meses en Austin, Texas, USA, en el laboratorio de biomateriales, liberación de fármacos, bionanotecnología y reconocimiento molecular, dirigido por el Dr. Nicholas A. Peppas, se desarrolló una nueva aproximación al reconocimiento de proteínas, basado en la técnica desarrollada en esta tesis.

8.1. RECONOCIMIENTO MOLECULAR

El reconocimiento molecular ha recorrido un largo camino desde sus modestos comienzos hace más de setenta años. Desde el trabajo del grupo de Polyakov en los años treinta (1931), utilizando matrices de sílice, el concepto de polímeros de reconocimiento molecular ha evolucionado hasta incluir una amplia serie de polímeros orgánicos. En 1931 el grupo de Polyakov en Kiev informó de unas propiedades inusuales de adsorción en partículas de sílice preparadas utilizando un nuevo procedimiento de síntesis (Polyakov, 1931). Éste polimerizó silicatos de sodio en agua utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ como agente de gelificación. Después de dos semanas se añadió un aditivo (benceno, tolueno o xileno). La sílice se dejó secar durante 20-30 días, después de lo cual el aditivo se eliminó lavando abundantemente con agua caliente. Después de esto se llevaron a cabo estudios de adsorción, revelándose una alta capacidad de la sílice para ingresar el aditivo, es decir, se produjo una especie de efecto memoria con el aditivo, al menos para los casos del benceno o el tolueno.

Existen numerosas revisiones bibliográficas que versan sobre la tecnología del reconocimiento molecular y que han relatado el desarrollo de esta especialidad durante las dos últimas décadas (Alexander et al., 2006; Komiyama et al., 2003; Sellergren, 2001; Yan y Ramstrom, 2005). El brutal incremento en el volumen de literatura científica que describe el diseño,

desarrollo y aplicaciones de los polímeros de reconocimiento molecular (MIPs) en los últimos años refleja la maduración de este campo de estudio y el amplio interés despertado en la comunidad científica en general.

La naturaleza ha sido siempre una inagotable fuente de inspiración para el hombre. Los fenómenos que en ella acontecen y sus características no han dejado indiferentes a los científicos, que a lo largo de la historia han tratado de explicarlos e imitarlos. A través de los años se ha buscado comprender cómo transcurren los procesos biológicos, en particular aquellos relacionados con actividades catalíticas y/o de reconocimiento molecular de un sustrato.

El reconocimiento molecular puede describirse como la unión ESPECÍFICA de una molécula a un receptor molecular. Entre los sistemas biológicos en los que se da este tipo de procesos están los enzimas, anticuerpos o Receptores hormonales capaces de identificar selectivamente a un sustrato, antígeno u hormona, respectivamente. Por supuesto, estos sistemas de identificación química selectiva son de un enorme interés en la ciencia actual en campos como la química analítica, médica o farmacéutica.

Ya en 1894 Emil Fischer (1894) empleó la analogía “llave-cerradura” para esquematizar el modo en que los sustratos interaccionan con los enzimas. Según esta propuesta los enzimas están provistos de “grietas” y/o “depressiones” superficiales que son complementarias al sustrato, de modo que encajan sobre estos sitios activos del enzima como si se tratase de una llave en su cerradura. Con el paso del tiempo, los científicos han dedicado gran parte de su esfuerzo investigador al desarrollo de procesos *biomiméticos*, que hoy en día han sido definidos por la IUPAC como aquéllos que se refieren a un procedimiento de laboratorio diseñado para imitar un proceso químico natural (Bolster, 1997), o dicho de manera más coloquial, aquellos procesos de imitación de la naturaleza. Uno de los que recientemente está recibiendo un gran impulso es el conocido como *reconocimiento molecular* (molecular imprinting en inglés).

La tecnología de reconocimiento molecular crea “materiales inteligentes” recurriendo al simple principio de utilizar una molécula como molde o plantilla (template) para la creación de un sitio de reconocimiento. Esto se consigue mediante la formación de una matriz polimérica altamente entrecruzada alrededor de dicha molécula molde (o de un análogo estructural de la misma). La clave del éxito de este proceso reside en maximizar el número de interacciones entre los grupos funcionales de la molécula molde seleccionada y los de la matriz, tal como ocurre en la naturaleza. La liberación posterior de la plantilla permite al material mostrar una “memoria” selectiva con respecto al molde, simulando el reconocimiento molecular típico de los sistemas biológicos. De esta forma, la información a nivel molecular es transferida desde la plantilla a los polímeros en forma de una “memoria” tri-dimensional de la forma del molde y otras características. Por lo tanto, los polímeros de reconocimiento molecular (MIPs), que son el producto del proceso de reconocimiento molecular, son materiales sintéticos capaces de reconocer, selectivamente, a la molécula plantilla frente a la cual han sido obtenidos.

Como los MIPs pueden ser adaptados para unirse específicamente a una molécula específica, estos materiales inteligentes son una promesa para aplicaciones tales como:

- **Separaciones químicas y biológicas** (Pichon y Haupt, 2006; Sellergren, 1997) e **inmuno ensayos** (Haupt et al., 1998; Vlatakis et al., 1993): la química analítica es la aplicación más común, como por ejemplo, separaciones enantioméricas (Adbo y Nicholls, 2001; Sellergren, 2001b), extracciones de fase sólida (Lanza y Sellergren, 2001), catálisis (Anderson et al., 2005; Volkmann y Bruggmann, 2006; Wulff, 2002), enzimas artificiales (Nicholls et al., 1996), así como la imitación de anticuerpos y receptores (Haupt, 2003; Svitel et al., 2001). Los MIPs son los sustitutos perfectos de los anticuerpos naturales que son caros y de un solo uso. Los anticuerpos artificiales ofrecen una mayor estabilidad a largo plazo, condiciones de trabajo más flexibles, así como un costo significativamente

inferior, aunque es cierto que su selectividad y sensibilidad en algunos casos no son tan buenas como las de los materiales biológicos.

- **Sensores** (Haupt y Mosbach, 2000; Kriz et al., 1997; Piletsky et al., 2002; Syu et al., 2006; Whitcombe et al., 1997). Un sensor es un dispositivo que debe responder de forma sensible, selectiva, continua, reversible y, en la medida de lo posible, rápida a los cambios espaciales y temporales de concentración de una(s) determinada(s) especie(s) en una muestra. En esta aplicación está el potencial de tener un solo sensor equipado con múltiples MIPs que pueden cada uno reconocer un analito. Una unidad multifuncional como ésta podría ser de ayuda para la limpieza del medio ambiente, o para la producción de agua segura para beber mediante la detección y eliminación de contaminantes en el tratamiento de aguas residuales. Si bien los materiales biológicos se emplean con cierta frecuencia como elementos de reconocimiento en los sensores (biosensores), presentan también las desventajas de tener un tiempo de vida muy limitado y unas condiciones físico-químicas (pH, temperatura, concentración salina, disolventes) muy estrictas para su correcto funcionamiento y/o almacenamiento. Por esta razón siempre ha sido deseable el desarrollo de materiales artificiales que, teniendo una selectividad similar a la biológica, no presenten tales limitaciones, siendo los MIP una alternativa ideal en este sentido.

- **Nanotecnología.**

- **Industria alimentaria.**

- **Aplicaciones biomédicas y farmacéuticas**, tales como, el descubrimiento, la purificación y la liberación de fármacos (Allender et al., 1997; Mosbach, 2006; Norell et al., 1998; Spivak, 2005; Yu et al., 2002). La aplicación más sencilla de estos materiales es como dispensador de medicamentos de forma controlada. La habilidad del MIP para unirse al analito

(fármaco) de interés con elevada afinidad ha permitido su aplicación, por ejemplo como excipiente (Allender et al., 2000). La permeabilidad a través del MIP será más lenta que la que ocurre si se utilizase uno que no sea MIP; de esta forma, es posible extender el perfil de liberación del principio activo modificando la composición del polímero empleado (Shinkai y Takeuchi, 2004). Pero el potencial de estos materiales va más allá. Recientemente se están llevando a cabo investigaciones que pretenden utilizar MIPs como portadores inteligentes de medicamentos. Una de las formas más sencillas de hacerlo consiste en liberar el producto mediante un desplazamiento competitivo del mismo con una molécula estructuralmente análoga, que actuaría como activador de la dosificación. Alternativamente, podrían diseñarse MIPs con capacidad de liberar el medicamento al reaccionar con una molécula diferente, que sería el activador en este caso. En teoría sería incluso posible que este diseño permitiera la liberación del medicamento en el interior de determinadas células, convirtiéndose en una poderosa herramienta contra enfermedades como las producidas por algunos virus o el cáncer (Sellergren y Allender, 2005). Por lo tanto, los MIPs pueden ayudar a mantener una liberación sostenida debido a la afinidad del molde con respecto al polímero, incrementando por tanto, el tiempo de residencia del fármaco dentro del cuerpo. Con esto se evita la administración tradicional de los fármacos, que requiere de un tipo de administración por pulso, en la cual se requieren dosis de alta concentración, resultando en posibles efectos secundarios tóxicos. No obstante, las aplicaciones biomédicas están siendo investigadas recientemente.

Los compuestos utilizados actualmente en estas aplicaciones suelen ser moléculas biológicas, tales como anticuerpos y enzimas. Mientras, estas moléculas biológicas muestran una buena especificidad hacia un gran número de moléculas, los polímeros de reconocimiento molecular tienen propiedades mejoradas tales como:

- Estabilidad ante disolventes orgánicos y acuosos y altas temperaturas.
- Facilidad, rapidez y bajo coste de fabricación para cualquier volumen.

Sin embargo, los anticuerpos y los enzimas se desnaturalizan bajo condiciones tales como, calor, disolventes orgánicos, ácidos y bases, etc. Además, el desarrollo de moléculas biológicas es generalmente caro y a menudo viene de fuentes animales y no puede ser almacenado.

Una tercera ventaja de los MIPs es que pueden ser almacenados durante varios años sin la pérdida de rendimiento, a diferencia de las moléculas biológicas.

El enfoque actual al reconocimiento de moléculas implica un proceso de cuatro pasos. Primeramente, se escogen los constituyentes dependiendo de la aplicación final. Se escogen los monómeros funcionales que muestren las estructuras químicas adecuadas, de tal forma que interaccionen con las moléculas molde mediante enlaces covalentes o no covalentes. También debe ser elegido el tipo y la cantidad del monómero de entrecruzamiento, que proporciona el soporte estructural a la red polimérica, además de ayudar a definir el tamaño de poro para la difusión del molde fuera y dentro de la matriz polimérica. Una vez seleccionados, estos ingredientes son disueltos, con un molde, en un disolvente apropiado. En segundo lugar, se produce la formación de un complejo de pre-polimerización entre la molécula molde y monómeros funcionales, que será la base del reconocimiento molecular. En tercer lugar, una vez que se ha formado este complejo, se produce la reacción de polimerización, normalmente por radicales libres iniciada mediante la acción de radiación ultra violeta o el empleo de reacciones redox. Y por último, en cuarto lugar, el molde se elimina dejando una red polimérica con cavidades específicas tridimensionales, que permite el reconocimiento molecular.

Existen normalmente dos tipos de MIPs, **covalentes y no covalentes**, los cuales sólo se diferencian en la formación inicial del complejo de pre-polymerización. En la mayoría de los casos, los sistemas no-covalentes son los más favorecidos, ya que la extracción de la molécula molde es más fácil, y por lo tanto, son los casos más estudiados (Komiyama et al., 2003). De todas formas, aunque los sistemas no-covalentes son más fáciles de fabricar, se alcanza un mayor reconocimiento en el caso de los métodos covalentes.

Reconocimiento molecular mediante sistemas covalentes:

Los sistemas de reconocimiento covalente difieren de los sistemas no-covalentes, únicamente, en la formación del complejo polímero-molde y en la posterior extracción del molde. Este procedimiento fue desarrollado por primera vez por Wulff et al. (1977, 1977b). En este método, el molde se une de forma covalente a los monómeros funcionales (Komiyama et al., 2003). El éxito del reconocimiento covalente recae en la unión química que se produce en el complejo entre el molde y el monómero. Esta unión debe de ser estable bajo las condiciones de reacción, pero sin embargo, debe poder ser rota fácilmente para que se produzca la eliminación del molde. La ruptura de este enlace se debe producir en condiciones suaves, de tal forma que no se vea afectada la estructura de la red de reconocimiento molecular. Desafortunadamente, solo unos cuantos enlaces covalentes cumplen estos requerimientos, y como resultado, el estudio del reconocimiento covalente no está tan extendido como su homólogo el no-covalente. Los monómeros que se pueden utilizar en estos sistemas son los ésteres de ácido bórico, cetales, puentes disulfuro, y acetales. Además de la limitación de la elección del monómero, el reconocimiento del molde conseguido en estos sistemas es mucho más lenta que el conseguido en el reconocimiento no-covalente (Komiyama et al., 2003).

Reconocimiento molecular mediante sistemas no-covalentes:

Arshady y Mosbach mostraron (1981) que los enlaces covalentes no eran necesarios para conseguir con éxito el reconocimiento molecular. En este método se producen interacciones no covalentes entre los grupos funcionales del molde y los monómeros funcionales. Las moléculas molde se pueden unir con los monómeros funcionales mediante enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y fuerzas electrostáticas. Los monómeros funcionales y el molde se mezclan en un disolvente adecuado, y sobre la mezcla, se auto ensamblan para formar el complejo pre-polimerización. Una vez producida la polimerización, la plantilla puede ser eliminada por simple difusión, normalmente en un disolvente polar o ácido que es capaz de superar las interacciones no covalentes entre el polímero y el molde. Además, el proceso de reconocimiento es mucho más rápido ya que no es necesaria la formación de enlaces covalentes. No es sorprendente, pues, que este método sea considerado mucho más simple que el enfoque covalente, y que por lo tanto, la mayoría de las investigaciones en el área del reconocimiento molecular, ESPEcialmente en el caso de biomacromoléculas como las proteínas, utilicen esta técnica.

a) Moldes y monómeros funcionales utilizados en el reconocimiento no covalente:

El éxito de un sistema de reconocimiento depende de la habilidad de la estructura del polímero para poseer una alta afinidad por la molécula molde, además de la interacción molde polímero (Bures et al., 2001). El molde debe tener una serie de características que favorezcan el reconocimiento. Una de las más importantes, es tener grupos químicos que puedan complejar con los monómeros funcionales elegidos. Finalmente, el molde debe permanecer estable bajo las condiciones de reacción. Por ejemplo, si se elige un iniciador térmico de polimerización, el molde no se debe degradar

bajo elevadas temperaturas o en el caso de una polimerización iniciada con radiación ultravioleta, no se debe degradar bajo este tipo de radiación. Las proteínas son especialmente susceptibles a las condiciones de reacción, y por lo tanto se debe escoger con sumo cuidado el medio de reacción y los monómeros funcionales. Además, el disolvente no debe degradar la molécula a reconocer.

La elección de los monómeros funcionales es una de las características más importantes en el reconocimiento de una determinada molécula. Durante la polimerización, los monómeros funcionales suelen utilizarse con una relación molar en exceso con respecto al molde, normalmente comenzando en 4:1 e incrementándose (Cormack y Elorza, 2004). Se han investigado muchos tipos de monómeros funcionales con una amplia selección de moldes, y el número de monómeros funcionales disponibles sigue creciendo (Cormack y Elorza, 2004).

Los monómeros funcionales que se han utilizado últimamente con más éxito para el reconocimiento molecular se pueden clasificar según:

- **Ácidos:** ácido metacrílico (MAA) (Vlatakis et al., 1993), ácido acrílico (AA) (Venkatesh et al., 2007), y ácido 4-vinilbenzoico (Andersson et al., 1984).
- **Básicos:** 2-(dimetilamino) etil metacrilato (DMAEMA) (Ou et al., 2004), 2-(dietilamino) etil metacrilato (DEAEMA) (Tarbin y Sharman, 2001), 4-vinilpiridino (Haginaka y Sanbe, 1999).
- **Neutros:** acrilamida (Aam) (Byme et al., 2008), N-vinil pirrolidona (Lin et al., 2006), y 2-hidroxiethylmetacrilato (HEMA) (Álvarez-Lorenzo et al., 2006).

b) Disolventes utilizados en el reconocimiento no covalente.

Ya que los disolventes se utilizan para disolver todos los agentes en la reacción de formación del polímero de reconocimiento molecular, sus efectos

deben ser considerados. Además, el disolvente puede actuar como porógeno. Los poros son necesarios para permitir la difusión del molde fuera de la red polimérica, y su posterior difusión de vuelta al polímero durante la fase de reconocimiento. Además, el disolvente puede utilizarse para disipar el calor generado en la polimerización, especialmente, en las que utilizan metacrilatos y acrilatos. La presencia de este calor puede dañar directamente el complejo monómero-molde, ya que puede degradar o desnaturalizar la molecular a reconocer. Finalmente, el monómero debe ser escogido de tal forma que no interfiera con el complejo monómero-molde, y por ello se rechazan los disolventes polares, como el agua, y en vez de ello se utilizan los no polares para maximizar la atracción del molde por los monómeros funcionales. Históricamente, se ha considerado el cloroformo como un buen disolvente, termodinámicamente hablando (Komiyama et al., 2003). Además, se han investigado otros disolventes, tales como dimetil sulfóxido (Byrne et al., 2002), tolueno (Cormack y Elorza, 2004) y benceno (Komiyama et al., 2003). El agua como disolvente es una elección bastante desafortunada para generar MIPs, ya que tiene una naturaleza altamente polar y por el hecho de que la mayoría de los MIPs funcionan solo en disolventes orgánicos.

c) Agentes de entrecruzamiento utilizados en los sistemas no covalentes

El agente de entrecruzamiento no solo “congela” el complejo molde-monómero en el proceso de polimerización para formar el hueco que servirá de reconocimiento, sino que también proporciona la columna vertebral polimérica que lleva a la estabilidad mecánica del polímero. Como agentes de entrecruzamiento se han utilizado comúnmente polímeros tales como, PEG o HEMA.

8.2. RECONOCIMIENTO MOLECULAR DE MACROMOLÉCULAS

Actualmente, existe un desafiante campo dentro del reconocimiento molecular que está llamando la atención de científicos, el reconocimiento molecular de biomacromoléculas, en particular de proteínas. Por ello, se han escrito recientemente varias excelentes revisiones sobre el tema (Bergmann y Peppas, 2008; Bossi et al., 2007; Ge y Turner, 2008; Hansen, 2007; Turner et al., 2006). Sin embargo, se ha tenido poco o limitado éxito en este apasionante campo debido a las propiedades inherentes a las proteínas y a las macromoléculas en general, incluyendo esto, el tamaño, la complejidad y la conformación de estas moléculas (Turner et al., 2006).

La aplicación potencial del reconocimiento de macromoléculas, como por ejemplo de proteínas, son los biosensores. Estos sensores biomiméticos, que incorporan elementos sintéticos, tales como los polímeros de reconocimiento molecular, son alternativas viables a las entidades biológicas, tales como los anticuerpos, porque están diseñados para imitar el reconocimiento biológico, al mismo tiempo que muestran propiedades tales como una gran estabilidad ante ambientes hostiles. La habilidad de reconocer de forma selectiva una proteína específica en una solución compleja, como por ejemplo la sangre, podría tener múltiples aplicaciones, como servir de herramienta de diagnóstico.

En el ámbito del reconocimiento de proteínas la práctica diaria en el laboratorio es prácticamente dependiente de los anticuerpos (Dhal et al., 2001), sin embargo, estos sistemas son muy caros y a menudo sólo están indicados para un único uso debido a su fragilidad y naturaleza lábil de las proteínas. Por tanto, existe una fuerte demanda de alternativas baratas, robustas y reutilizables a estas moléculas biológicas (Mallik et al., 1994) que nos permitan tener una selectividad y especificidad similares a los anticuerpos, tal y como se ha mostrado en el reconocimiento molecular de moléculas pequeñas (Ansell et al., 1996; Chianella et al., 2002; Ramstrom et al., 1996).

Hasta la fecha se han desarrollado con éxito materiales de reconocimiento molecular para una amplia variedad de aplicaciones, pero, sin embargo, en general, se han utilizado moléculas molde de bajo peso molecular, ya que cuanto mayor es el tamaño y menor la rigidez del compuesto a reconocer, menor es la probabilidad de crear una cavidad bien definida y selectiva para la molécula. Por otra parte, dado que los procesos de reconocimiento y extracción de la molécula molde del polímero implican fundamentalmente la difusión de la misma a través de los poros de la matriz polimérica hacia y desde la cavidad creada, una molécula de gran tamaño encontrará impedimentos estéricos más importantes que una de menor tamaño. Por todo ello, el desarrollo de MIPs capaces de reconocer macromoléculas, tales como péptidos y proteínas, se ha encontrado con muchos problemas y dificultades (Kimhi y Bianco-Peled, 2007). Así la bibliografía encontrada en este nuevo campo no es muy extensa (Zhao et al., 2008). Esto es debido a que a diferencia de los moldes o plantillas pequeñas, las proteínas son complejos biopolímeros compuestos de secuencias lineales de aminoácidos, que presentan un gran número potencial de sitios para su reconocimiento, así como un gran número de grupos funcionales en su superficie, produciendo esta complejidad un incremento de la probabilidad de que se produzcan interacciones no específicas entre la proteína y los MIPs, llevando a una pobre selectividad y una reactividad cruzada. Además, las proteínas son sensibles a la temperatura, al pH, y a la fuerza iónica, cuyos valores extremos pueden resultar en la desnaturalización de las mismas, o en cambios conformacionales. Todos estos factores, junto con los altos costes de la sintetización de algunas proteínas, hacen tortuoso el camino hacia el reconocimiento efectivo de las proteínas.

Como se ha visto anteriormente, los procesos de reconocimiento molecular actuales implican normalmente reacciones de polimerización por radicales libres iniciadas por radiación ultravioleta, reacciones redox o térmi-

camente. Además, la mayoría de los MIPs son sintetizados mediante disolventes orgánicos que son a menudo incompatibles con las proteínas.

Por lo tanto, todas estas tecnologías utilizadas hasta ahora son incompatibles con la diagnosis y el reconocimiento macromolecular en las aplicaciones que tienen que ver con las ciencias de la vida, tales como las aplicaciones biomédicas, y los aditivos alimentarios que requieren de productos biocompatibles o alimentarios, respectivamente.

A pesar de que es bien conocida la biocompatibilidad y biodegradabilidad del alginato, existe escasa literatura que describa la utilización de las cápsulas de alginato para conseguir el reconocimiento de proteínas. El alginato sódico es un compuesto totalmente adecuado para el reconocimiento de proteínas, ya que dispone de un significativo número de grupos hidroxilo y carbonilo que permiten interacciones dipolo/dipolo y enlaces de hidrógeno entre el alginato y las moléculas a reconocer. La propiedad más importante del alginato es su capacidad de formar geles por reacción con cationes divalentes, tales como calcio o bario. Por tanto, después del proceso de entrecruzamiento entre el alginato sódico y el catión divalente, las moléculas de proteína quedan atrapadas dentro de la red y pueden ser eliminadas para su posterior reconocimiento (Luzinov, 2008).

Sin embargo, los pocos trabajos existentes hasta la fecha que versan sobre la utilización de alginato en el reconocimiento de proteínas utilizan el método de suspensión inversa que implica la utilización de disolventes orgánicos, tales como el cloroformo y el hexano, que son incompatibles con los propósitos médicos y alimentarios que nos ocupan.

El trabajo de Zhang et al. (2006) fue el primer intento de reconocimiento molecular de proteínas utilizando microcápsulas basadas en alginato cálcico mediante el método de suspensión inversa. Este grupo mejoró el rendimiento de los hidrogeles de alginato cálcico utilizando una pequeña cantidad de hidroxietil celulosa (HEC), consiguiendo reconocer 0,46 mg de

albúmina de suero bovino (BSA) por gramo de cápsulas. Zhao et al. (2008) utilizó cápsulas híbridas de alginato y fosfato cálcico generadas mediante suspensión inversa. Este sistema consiguió mejorar las cápsulas de alginato cálcico, reconociendo 0,66 mg de BSA por gramo de cápsulas.

En este trabajo se pretende desarrollar una nueva tecnología de reconocimiento de proteínas basada en cápsulas de alginato cálcico producidas mediante la reacción de gelificación iónica y el proceso de generación de gotas por extrusión, sin ningún producto químico añadido, fuera del alginato sódico y el cloruro de calcio, con el objetivo de producir MIPs que sirvan para el diagnóstico de enfermedades en aplicaciones biomédicas, así como para la detección en la industria alimentaria. Este método, además de producir rápidamente polímeros de reconocimiento molecular de forma sencilla, permite controlar el tamaño de poro y de las propias cápsulas. Este proceso permite ahorrar mucho tiempo con respecto a los métodos tradicionales de polimerización, además, genera los MIPs sin utilizar ninguna condición desfavorable, como calor, radiación UV o disolventes orgánicos.

A pesar de las múltiples aplicaciones que puede llegar a tener esta nueva tecnología de reconocimiento de proteínas, una de las más importantes es el diagnóstico de la esclerosis múltiple a través del reconocimiento de una proteína denominada osteopontina (OPN).

La osteopontina es una glicoproteína fosforilada con un peso molecular de 60 kDa y con una estructura homóloga a las proteínas de la matriz extracelular, y que puede unirse a un gran número de receptores. La OPN se encuentra distribuida en diversos tejidos. Es abundante en la matriz ósea, y está presente en multitud de órganos como el riñón y el cerebro, así como en el tracto gastrointestinal, sistema vascular, músculo liso, páncreas, pulmón, glándulas salivales y placenta. La OPN también se encuentra como citocina en fluidos corporales (sangre, orina, leche, líquido seminal, etc.) (Fisher et al., 2001; Sodek et al., 2000). La OPN está sintetizada por diferentes células no inmunes, como las células óseas (osteoblastos, osteoclastos), células epite-

liales y células endoteliales. A nivel del sistema inmune, existen diversas células inmunes que sintetizan la OPN como los macrófagos activados, las células T activadas y las células NK activadas. Además, existe una gran variedad de mediadores inflamatorios y factores de crecimiento que estimulan la transcripción de OPN.

La OPN es una proteína con diversas funciones (Denhardt y Guo, 1993). La OPN se encuentra en el tejido óseo, en condiciones normales y participa en la biomineralización, regulando el depósito de calcio y la actividad de los osteoclastos (Giachelli y Steitz, 2000). También se asocia a la reparación de tejidos, fibrosis y calcificaciones distróficas tras lesiones inmunológicas (Miyazaki et al., 1995). En el riñón, la OPN se expresa en condiciones fisiológicas en neuronas y epitelio tubulointersticial. Se asocia a diferentes patologías como glomerulonefritis, formación de cálculos, etc. También tiene un papel en la regeneración del tejido renal, por ejemplo tras la isquemia (Xie et al., 2001). Otras funciones de la OPN son: participar en el crecimiento tumoral, y en el desarrollo de cáncer y metástasis (Shijubo et al., 2000; Singhal et al., 1997; Zhang et al., 2001). Participa en la patogenia de la arteriosclerosis, estimulando la migración de células endoteliales. La OPN interviene en la resolución de diversas infecciones y participa en el reclutamiento de macrófagos y linfocitos como respuesta a infecciones virales y bacterianas. Ésta también participa en la formación de granulomas celulares (O'Regan y Berman, 2000). La respuesta granulomatosa característica de la sarcoidosis y de la tuberculosis se asocia a una elevada expresión de OPN.

Las funciones inmunes de la OPN son diversas. La OPN es una citocina proinflamatoria que participa en la activación temprana de linfocitos T. Por tanto, actúa en la iniciación de la respuesta inmune (Ashkar et al., 2000; O'Regan et al., 2000b).

Pero sin duda, la característica de la osteopontina que más llama la atención, por razones obvias, es la relación de ésta con la patogenia de la esclerosis múltiple (EM). La hipótesis de que la OPN podría jugar un papel

importante en la patogenia de la enfermedad surgió a partir de una Publicación donde se investigó la función de la OPN en la esclerosis múltiple a través de un modelo animal de esclerosis múltiple, la encefalitis autoinmune experimental (EAE) (Chabas et al., 2001). Este estudio mostró, a través del análisis de microarrays de ADN de la médula espinal de ratas paralizadas mediante el modelo animal EAE, un incremento en la transcripción de OPN. Asimismo, ratones deficientes en OPN eran resistentes a una EAE progresiva, con un desarrollo de la enfermedad más moderado comparado con los ratones de genotipo salvaje (Chabas et al., 2001).

Según el estudio de Braitch et al. (2008) los niveles de la citocina pro-inflamatoria osteopontina se encuentran elevados en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple. Estos niveles elevados de OPN se encuentran incluso aunque el paciente esté clínicamente en remisión, lo que significa que incluso en esta fase quiescente existe cierto nivel de daños. En este trabajo se estudiaron a 27 pacientes con esclerosis múltiple, a 11 pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias y a 23 pacientes con enfermedades neurológicas no inflamatorias. Los niveles de osteopontina fueron elevados en los pacientes con esclerosis múltiple y en los que sufrían otras enfermedades neurológicas inflamatorias (415 y 563 ng/mL, respectivamente) en comparación con los que no tenían este tipo de enfermedades (286 ng/mL) (Braitch et al., 2008). En el caso de los enfermos de esclerosis múltiple los niveles de osteopontina en el líquido cefalorraquídeo eran ligeramente superiores que en el plasma, lo que significa que parte de estos niveles proceden del sistema nervioso central, indicando la activación de células del sistema inmune en el cerebro y, probablemente, daños en el sistema nervioso (Braitch et al., 2008).

Según el estudio de Chowdhury et al. (2008) en 30 pacientes con esclerosis múltiple y 36 con otras enfermedades neurológicas y no neurológicas, los niveles de osteopontina en el fluido cerebroespinal no se correlaciona con la discapacidad en los pacientes con esclerosis múltiple, aunque están aumentados en los pacientes con la enfermedad activa. Dada la

dificultad en el pronóstico de esta enfermedad, es difícil determinar el nivel apropiado de terapia, por lo que estos autores investigaron la utilidad de los niveles de la OPN en el fluido cerebroespinal para predecir la futura gravedad de la enfermedad. Los datos sugirieron que un incremento en el grado de actividad de la enfermedad se asociaba con altos niveles de osteopontina intracraneal, por lo que podría usarse eventualmente como un biomarcador de eficacia terapéutica en los tratamientos con fármacos (Chowdhury et al., 2008).

Por tanto, en este trabajo se pretende desarrollar un sistema de reconocimiento de proteínas que permita reconocer la osteopontina, para el diagnóstico precoz de la enfermedad de la esclerosis múltiple en las primeras fases. Debido al elevado precio de la osteopontina, se simulará el reconocimiento de esta con otra proteína, la albúmina de suero bovino de peso molecular (66430 Da) y características similares, pero de precio mucho más razonable a la hora de hacer los estudios.

8.3. CALIBRACIÓN DE LA PROTEÍNA

Se llevó a cabo la calibración absorbancia/concentración de la albúmina de suero bovino (BSA) para saber la concentración de ésta con el tiempo mediante mediciones con un espectrofotómetro.

La calibración se basó en una solución inicial de 20 mL de BSA con una concentración inicial de 10 mg/mL. Se tomaron diferentes volúmenes de la solución inicial para obtener diferentes concentraciones conocidas de proteína (ver Tabla 8.1.), y todos ellos fueron llevados a 1,5 mL rellenando con agua destilada. La figura 8.1. muestra los diagramas de calibración.

Tabla 8.1.: valores volumen/concentración utilizados en el proceso de calibración

V, μL	1500	1200	1050	900	750	675	600	525
Conc., mg/mL	10.0000	8.0000	7.0000	6.0000	5.0000	4.5000	4.0000	3.5000
V, μL	450	375	345	300	255	225	187.50	93.75
Conc., mg/mL	3.0000	2.5000	2.3000	2.0000	1.7000	1.5000	1.2500	0.6250
V, μL	46.88	23.44	11.72	5.86	2.93	1.47	0.73	
Conc., mg/mL	0.3125	0.1563	0.0782	0.0391	0.0195	0.0098	0.0049	

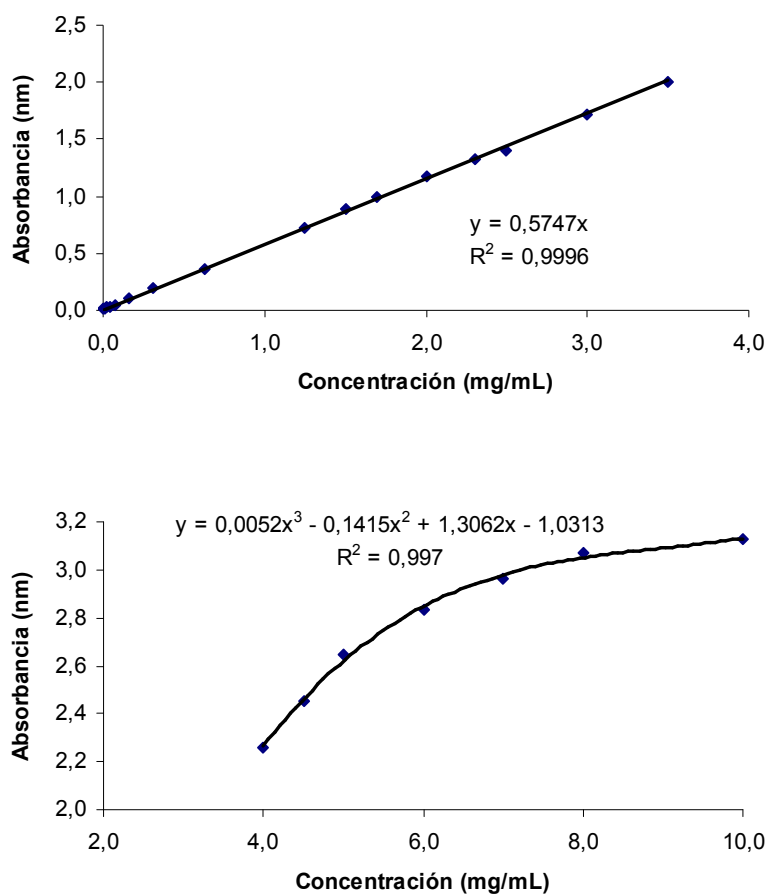


Figura 8.1. Curvas de calibrado del BSA

8.4. GENERACIÓN DE LAS CÁPSULAS

(Cápsulas basadas en alginato cálcico para el reconocimiento molecular de BSA embebido)

El alginato sódico es un compuesto adecuado para el reconocimiento de proteínas, ya que dispone de un significativo número de grupos hidroxilo y carbonilo que permiten interacciones dipolo/dipolo y enlaces de hidrógeno entre el alginato y la molécula a reconocer, en este caso el BSA. Para conseguir cápsulas con un buen reconocimiento de la proteína, es necesario unir los grupos carbonilos del alginato, cargados negativamente, con la proteína. La BSA, como toda proteína, tiene carácter anfótero, es decir, que puede comportarse como ácido (aceptando electrones) o como base (donando electrones). Para que la proteína se una sin problemas mediante fuertes interacciones electrostáticas a los grupos carbonilo del alginato (negativamente cargados), ésta debe comportarse como una molécula cargada positivamente, y para ello se debe trabajar por debajo de su punto isoeléctrico ($pI = 4,7$). Por ello, la disolución de BSA se preparó con un pH ajustado de 4,2 mediante el uso de ácido clorhídrico.

Para generar las cápsulas de reconocimiento molecular (MIPs) se siguieron los siguientes pasos. Primero, una cantidad específica de BSA se disolvió en agua destilada (el pH de la disolución se ajustó a 4,2 mediante una disolución de ácido clorhídrico) hasta una concentración de 10 mg BSA/mL disolución. Para después añadir una cantidad específica de alginato sódico en la disolución de BSA hasta una concentración del 2 % wt.

Después de la preparación de las disoluciones, se añadieron gota a gota 3 mL de la mezcla a una disolución del 2 % wt. de cloruro cálcico. Las cápsulas que se formaron se mantuvieron en la disolución gelificante durante dos minutos, para después recolectarlas mediante filtración con filtros de nylon de 0.2 micras de poro.

Se tomó una muestra del sobrenadante para analizar las pérdidas en el proceso de generación de las cápsulas. Para conocer el peso exacto de las

cápsulas se pesó la jeringuilla antes y después de la generación de las cápsulas.

Después de este proceso, las cápsulas generadas fueron dispuestas en un reactor para, posteriormente, llevar a cabo el proceso de liberación de la proteína.

Además, se prepararon cápsulas sin la proteína para generar las cápsulas sin reconocimiento molecular (NIPs) y las cápsulas control. El procedimiento fue el mismo que para las MIPs, pero en este caso se disolvió una cantidad específica de alginato sódico sobre agua destilada hasta llegar a una concentración del 2 % wt.

Todos los trabajos presentados hasta la fecha, basados en cápsulas de alginato para el reconocimiento de proteínas, implican la utilización del método de suspensión inversa para la generación de las cápsulas, lo que implica la utilización de disolventes orgánicos, tales como cloroformo y hexano que son incompatibles con las aplicaciones biomédicas y alimentarias. Sin embargo, como se puede observar con el procedimiento anteriormente presentado para la generación de las cápsulas, la tecnología aquí descrita para el reconocimiento de proteínas, basada en cápsulas de alginato cálcico, no utiliza más productos químicos que alginato sódico y cloruro cálcico, pudiendo ser ésta el futuro de las tecnologías de reconocimiento de proteínas basadas en aplicaciones científicas relativas a la vida. Además, esta tecnología puede ahorrar mucho tiempo, con respecto a la preparación de las cápsulas, ya que el tiempo de preparación (de varios minutos) decrece significativamente si se compara con los métodos tradicionales de polimerización (pudiendo llegar a ser de varios días).

8.5. MÉTODO PARA GENERAR LAS GOTAS

(Generación de gotas por extrusión)

La disolución de alginato/BSA o de alginato fue añadida gota a gota por extrusión, utilizando una jeringuilla estéril, en la disolución gelificante bajo agitación. Esta técnica genera cápsulas con un tamaño que puede variar entre los 2 y 3 mm. Es importante tener en cuenta que el tamaño puede controlarse variando la viscosidad del alginato sódico.

8.6. ELIMINACIÓN DE LA PROTEÍNA (MOLDE O PLANTILLA)

Con el objetivo de eliminar la proteína (molde) de las cápsulas es necesario romper los enlaces creados entre las moléculas del BSA y las cadenas de alginato. Para ello, las cápsulas se lavaron con una disolución de elución compuesta por una mezcla de CaCl_2 al 1 % en peso, y una solución Tris Buffer (0,05 M, pH = 7,4). El BSA es una proteína que se une fácilmente a los iones Ca^{2+} , Na^+ , y K^+ , por tanto, como la solución de elución está compuesta por cloruro de calcio, esta solución interacciona con la proteína, forzando a esta a difundir fuera de las cápsulas (Liu et al., 2003). Además, la solución de elución se preparó a un pH de 7,4, lo que fuerza al BSA a comportarse como una molécula negativamente cargada, debido a su carácter anfótero, rompiéndose los enlaces creados entre el alginato y la proteína, facilitando esto la difusión de la proteína fuera de las cápsulas.

a) Preparación de la disolución de elución

Para preparar la disolución de elución, primero se disolvió una cantidad específica de Tris Buffer en agua destilada hasta conseguir una disolución del 0,05 M. El pH de la solución buffer se fijó en 7,4, añadiendo ácido clorhídrico 1 N. Después de esto, se añadió a la disolución de Tris Buffer una cantidad específica de polvo de cloruro cálcico hasta llegar a una concentración del 1 % en peso.

b) Eliminación de la proteína

Las cápsulas generadas fueron dispuestas en un reactor que contenía la disolución de elución: una mezcla de CaCl_2 al 1 % en peso y Tris Buffer (0,05M, pH = 7,4).

Una vez hecho esto, se siguieron los siguientes pasos para la eliminación de la proteína:

- Primero, la muestra fue agitada durante cierto tiempo.
- Posteriormente, la solución de elución fue renovada continuamente mediante un sistema en continuo, hasta que el sistema no fuera capaz de extraer más proteína (absorbancia cero). Un esquema del sistema de extracción se muestra en la Figura 8.2.
- Después de esto, el proceso entero fue repetido (mezclado y sistema en continuo).
- Finalmente, el proceso fue repetido la última vez, reduciendo el tiempo del proceso de mezclado.

Después del proceso de eliminación de la proteína, las cápsulas se almacenaron en el frigorífico durante varios días en agua destilada para permitir que se produjera el proceso de hinchamiento en las cápsulas. Durante el proceso de generación de las cápsulas y liberación de la proteína, las cápsulas están en contacto con disoluciones de cloruro de calcio que producen un engrosamiento de la membrana de las cápsulas por la difusión de los cationes desde el exterior al interior de las cápsulas, disminuyendo el espacio interior de las mismas, reduciendo el espacio disponible para acomodar de nuevo a la proteína en el proceso de reconocimiento molecular. El proceso de hinchamiento permitirá la recuperación del tamaño original del interior las cápsulas, permitiendo así, que se pueda producir el proceso de reconocimiento molecular sin problemas.

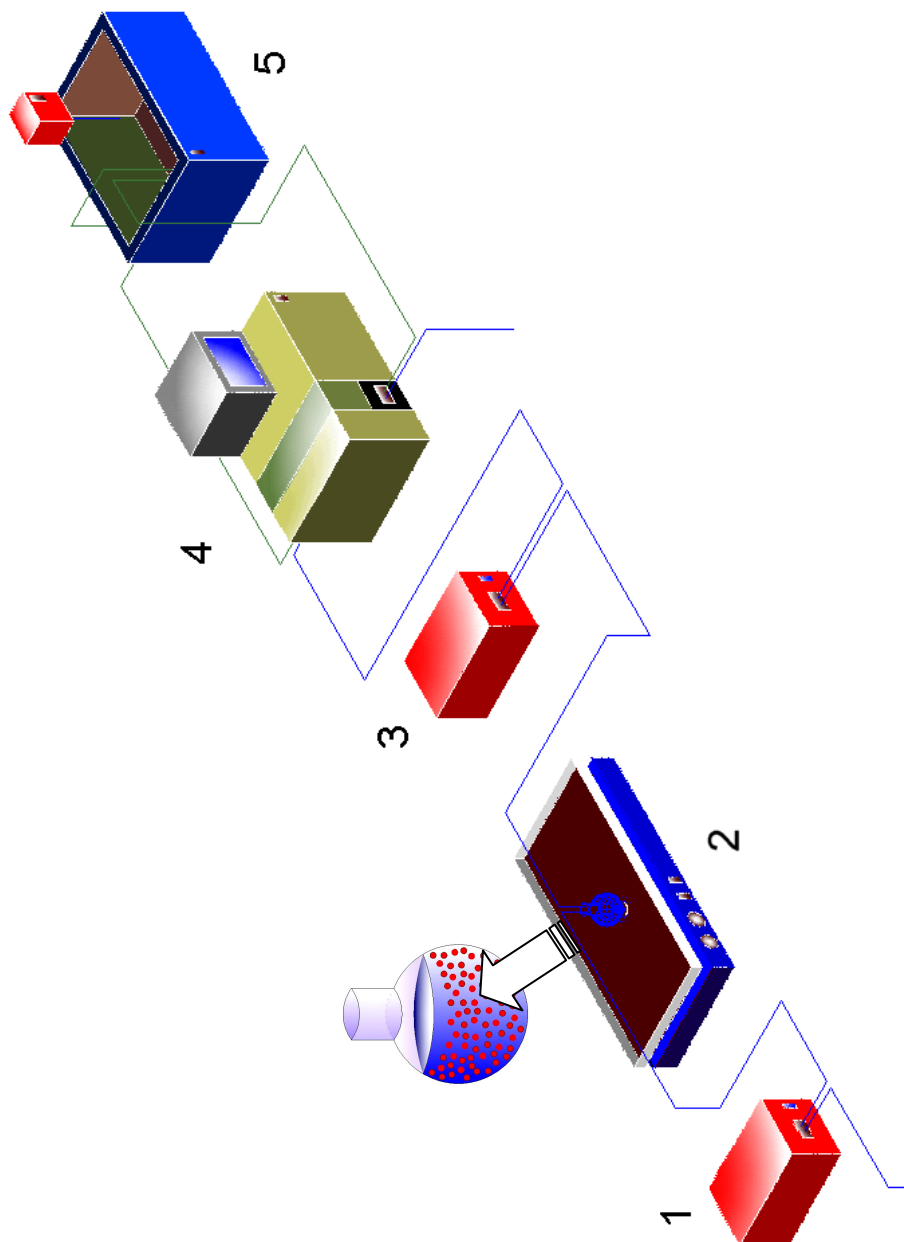


Figura 8.2. Instalación utilizada para la eliminación de la proteína
(1) y (3) bombas peristálticas; (2) reactor sobre un agitador orbital; (4) espectrofotómetro; (5) baño termostático.

En estos días de almacenaje, aparte de producir el proceso de hinchamiento, se permitió la liberación de la cantidad remanente de proteína. El agua destilada se cambió cada día por filtración. El sobrenadante fue analizado para conocer la cantidad de proteína liberada en esos días, y poder así calcular la cantidad total de proteína que ha sido eliminada en el proceso.

Las cápsulas NIP y control se sometieron al mismo proceso para mantener las mismas condiciones que las cápsulas MIP.

En los trabajos de investigación, basados en el reconocimiento de proteínas mediante cápsulas de alginato, realizados hasta la fecha, el procedimiento de eliminación de BSA de las cápsulas se produce en unas 48 horas de sucesivos lavados con agitación, siendo éste un proceso discontinuo. Sin embargo en el presente trabajo, es posible conseguir la liberación del 87-90 por ciento de la proteína en tan solo 5 horas, combinando un proceso en discontinuo con otro en continuo (Figuras 8.3. y 8.4.).

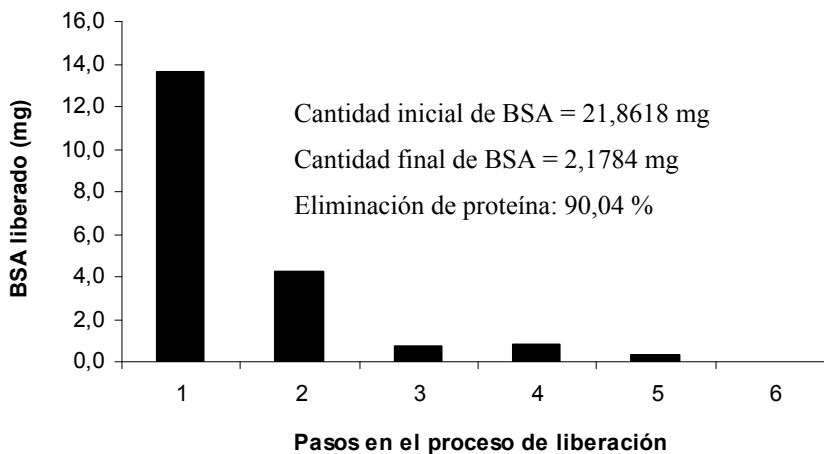


Figura 8.3. Eliminación de la proteína (90,04 %)

El proceso de eliminación de la proteína fue llevado a cabo siguiendo los siguientes pasos:

- 1.- Agitación = 3h 04' / Proceso continuo = 1h 42';
- 2.- Agitación = 2h 30' / Proceso continuo = 0h 20';
- 3.- Agitación = 0h 35' / Proceso continuo = 0h 09';
- 4.- Filtrado; 5.- Almacenamiento = 1d; 6.- Almacenamiento = 1d.

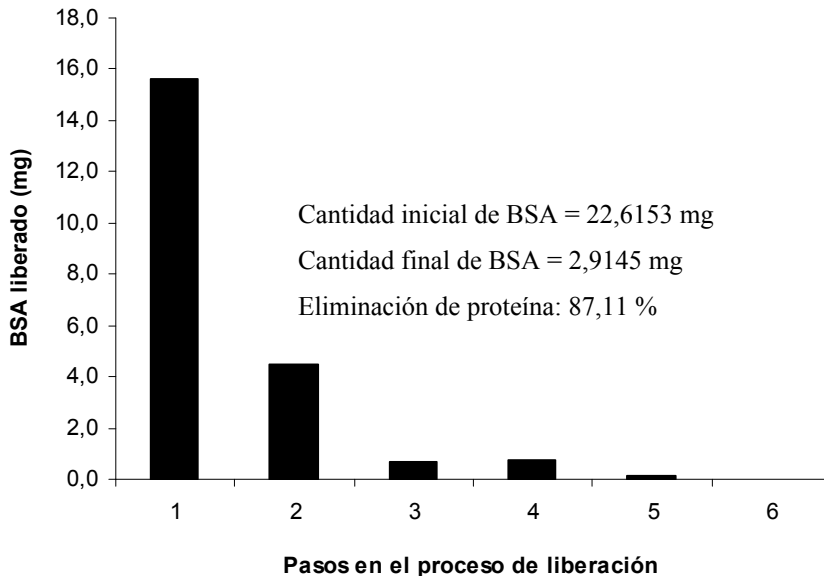


Figura 8.4. Eliminación de la proteína (87,11 %)

El proceso de eliminación de la proteína fue llevado a cabo siguiendo los siguientes pasos:

- 1.- Agitación = 2h 28' / Proceso continuo = 30';
- 2.- Agitación = 1h 40' / Proceso continuo = 10';
- 3.- Agitación = 0h 40' / Proceso continuo = 08';
- 4.- Filtrado; 5.- Almacenamiento = 1d; 6.- Almacenamiento = 1d.

Es importante poder reducir el tiempo de liberación de proteína de 48 a 5 horas, porque como se comentó antes, durante este proceso las cápsulas se lavan con una disolución de elución compuesta de cloruro de calcio, y debido al mecanismo de formación de las cápsulas por gelificación iónica, la membrana de las cápsulas crece desde fuera hacia dentro por difusión de los cationes a través de la membrana. Por tanto, es necesario reducir al máximo el tiempo que pasan las cápsulas en contacto con la disolución de cloruro de calcio, de tal forma que no se reduzca el espacio disponible para acomodar de nuevo a la proteína en el proceso posterior de reconocimiento molecular.

A pesar de que se ha conseguido la liberación total de la proteína desde las cápsulas (Figura 8.5.), el proceso se desarrolla en más de cinco horas, ya que son necesarios tres ciclos de agitación-extracción, llevándose a

cabo el último durante la noche, y esto no es deseable, ya que, como se dijo antes, cuanto más tiempo pasen las cápsulas con la disolución de cloruro de calcio, más gruesa se hace la membrana, y no queda suficiente espacio interior para el posterior reconocimiento de la proteína.

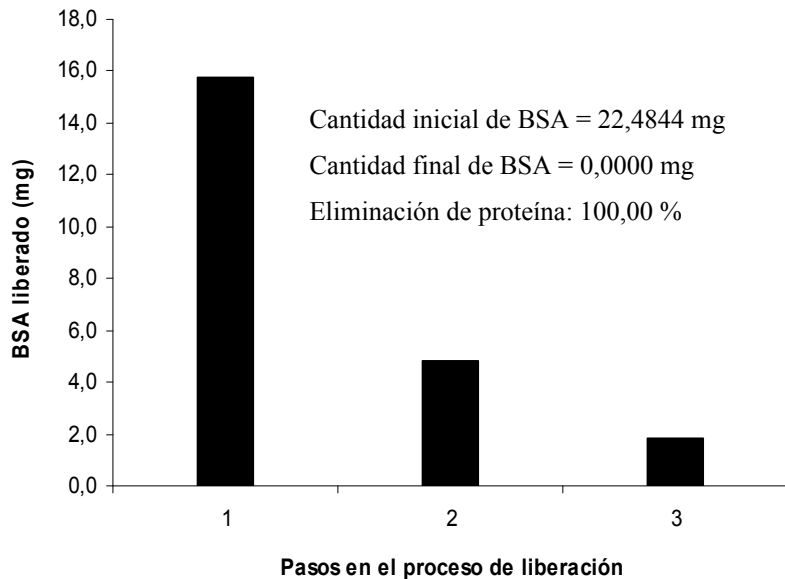


Figura 8.5. Eliminación de la proteína (100 %, agitación durante la noche)

El proceso de eliminación de la proteína fue llevado a cabo siguiendo los siguientes pasos:

- 1.- Agitación = 2h 30' / Proceso continuo = 30';
- 2.- Agitación = 4h 30' / Proceso continuo = 22';
- 3.- Agitación = 12h 48' (toda la noche) / Proceso continuo = 13'.

Una solución a este problema, es hacer tan solo dos ciclos de agitación/proceso en continuo, y mantener después las cápsulas en agua destilada durante cinco días, renovando esta agua cada día mediante filtrado (Figura 8.6.). Durante este tiempo, además de producirse el hinchamiento de las cápsulas, se produce la liberación de la cantidad remanente de la proteína, pero sin la presencia del cloruro de calcio.

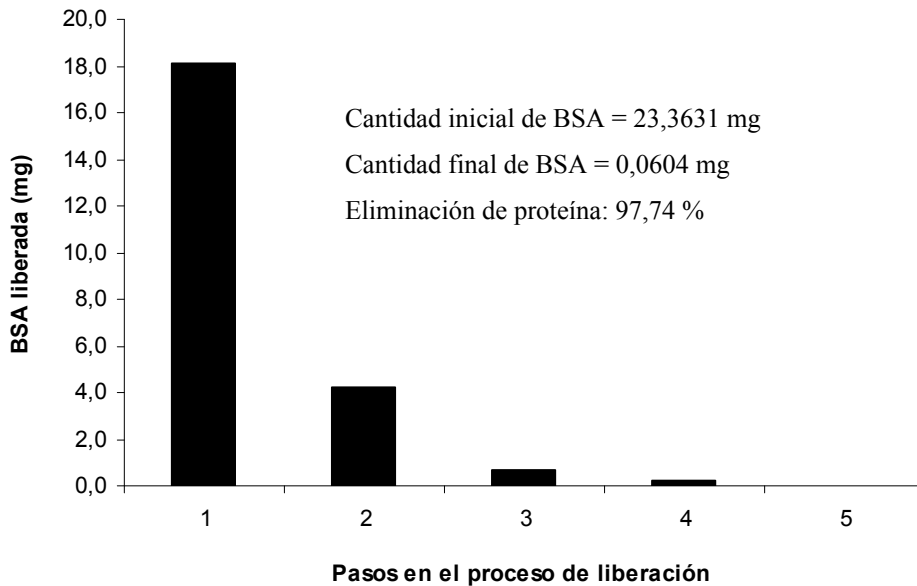


Figura 8.6. Eliminación de la proteína (100 %, almacenaje durante 5 días)

El proceso de eliminación de la proteína fue llevado a cabo siguiendo los siguientes pasos:

1.- Agitación = 3h 04' / Proceso continuo = 1h 42';

2.- Agitación = 2h 30' / Proceso continuo = 0h 20';

3.- Almacenamiento = 3d; **4.-** Almacenamiento = 1 d; **5.-** Almacenamiento = 1d.

De todas formas, como se mostrará posteriormente en los datos de reconocimiento de la proteína, no es necesario conseguir la liberación total de la proteína para conseguir unos resultados de reconocimiento satisfactorios. Es decir, es preferible utilizar los procesos de eliminación de proteína mostrados en las figuras 8.3. y 8.4., ya que ahorran tiempo y permiten mantener el espacio interior de las cápsulas, que permitirá un mejor reconocimiento de la proteína.

8.7. PROCESO DE RECONOCIMIENTO DE LA PROTEÍNA

Para el proceso de reconocimiento de la proteína, se utilizó una disolución de BSA en agua destilada de concentración 1 mg/mL, disolviendo una cantidad específica de BSA en agua destilada. Cuarenta mililitros de esta disolución de proteína fueron introducidos en un tubo de centrifuga, junto con una cantidad determinada de las cápsulas MIP anteriormente generadas (absorbiendo el agua superficial con papel de filtro). La concentración de proteína se evaluó con el tiempo utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm. La detección espectrofotométrica de proteína se alargó en el tiempo hasta que el cambio de concentración en el sobrenadante fue indetectable, llegándose a la capacidad de reconocimiento de proteína de equilibrio.

Para conseguir realizar el proceso de reconocimiento con éxito, es necesario tener en cuenta que las cápsulas de alginato cálcico son biodegradables, y que por ello se desintegran con el tiempo, por tanto, es necesario filtrar el sobrenadante antes de considerar el resultado final de absorbancia.

El proceso se repitió con las cápsulas NIP y control, siendo el mismo que el relatado anteriormente.

Los resultados para las cápsulas MIP y NIP fueron comparados, siendo entonces posible conocer la cantidad de proteína reconocida por las cápsulas. Las cápsulas control se utilizaron para conocer la absorbancia del alginato con el tiempo, ya que éste absorbe también a 280 nm (Yu et al, 2006).

Para los experimentos con las cápsulas control, las cápsulas generadas sin proteína fueron simplemente dispuestas en tubos de centrifuga con agua destilada.

Las cápsulas MIP presentadas en este trabajo son capaces de reconocer una mayor cantidad de proteína que las tecnologías existentes hasta el

momento, teniendo una formulación muy simple, sin más productos añadidos que alginato sódico y cloruro cálcico. Zhang et al. (2006) y Zhao et al. (2008) consiguieron reconocer 0,46 y 0,66 mg de BSA por gramo de cápsulas, respectivamente, utilizando la suspensión inversa como método de generación de las cápsulas. Ambas tecnologías fueron métodos mejorados con respecto a los basados en cápsulas de alginato cálcico vía suspensión inversa.

Este trabajo es el primer intento de reconocimiento molecular utilizando cápsulas de alginato cálcico generadas mediante la reacción de gelificación iónica, sin más productos químicos añadidos que el alginato sódico y el cloruro cálcico, y permitiendo reconocer entre 1,5 y 3,0 mg de BSA por gramo de cápsulas (Figuras 8.7. y 8.8.).

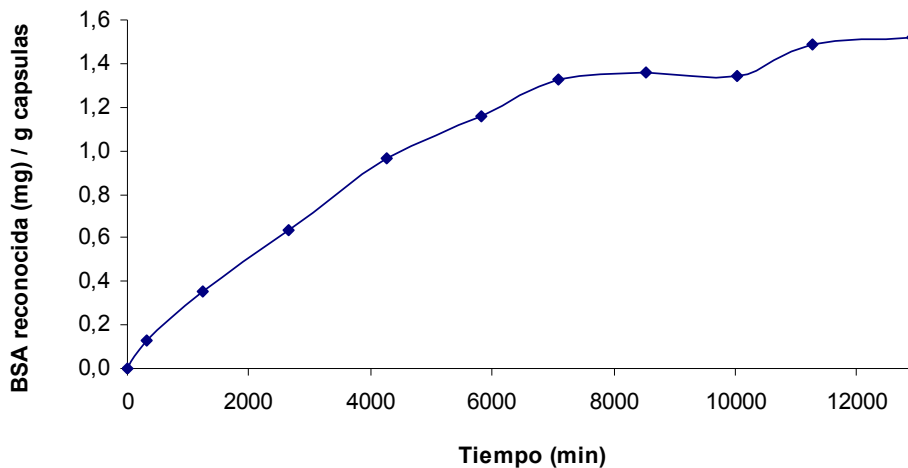


Figura 8.7. Estudios de reconocimiento de proteína

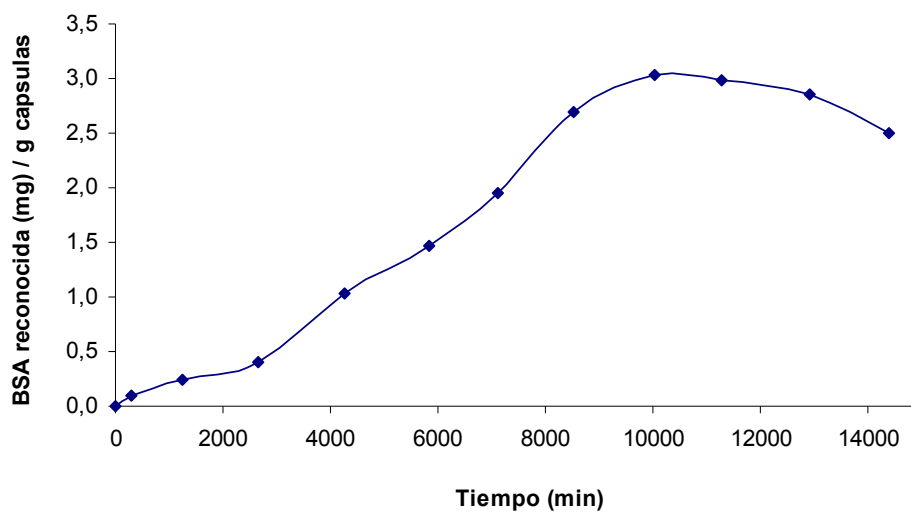


Figura 8.8. Estudios de reconocimiento de proteína

8.8. CONCLUSIONES

El reconocimiento molecular es una tecnología prometedora debido a sus numerosas aplicaciones en todo tipo de campos, pero a pesar de que hasta la fecha se ha conseguido sin problemas el reconocimiento de pequeñas moléculas, se han encontrado numerosas dificultades a la hora de reconocer moléculas de gran tamaño, como por ejemplo las proteínas. Las tecnologías utilizadas hasta ahora para lograr el reconocimiento macromolecular son incompatibles con la diagnosis y el reconocimiento en numerosas aplicaciones que tiene que ver con la vida, tales como aplicaciones biomédicas, aditivos alimentarios, y liberación de fármacos, que requieren productos totalmente biocompatibles.

En este trabajo, se ha desarrollado una novedosa tecnología biocompatible de reconocimiento de proteínas basada en cápsulas de alginato cálcico generadas mediante gelación iónica, sin más productos químicos añadidos que alginato sódico y cloruro cálcico.

Sólamente varios autores han intentado el reconocimiento macromolecular mediante la utilización de alginato, sin embargo, todos estos trabajos utilizan la suspensión inversa como método para la generación de las cápsulas de reconocimiento molecular, que implica la utilización de productos químicos orgánicos, tales como el cloroformo y el hexano, que son incompatibles con los propósitos médicos y alimentarios de este trabajo.

Sin embargo, las cápsulas desarrolladas en este trabajo son capaces de reconocer mayores cantidades de proteína que las tecnologías existentes hasta ahora, con una formulación realmente sencilla. La tecnología presentada en este trabajo, es capaz de reconocer hasta 3,0 mg de BSA por gramo de cápsulas, frente a los 0,7 mg por gramo de cápsulas conseguidos hasta la fecha con las tecnologías existentes.

Dada la relevancia de este trabajo, la técnica de reconocimiento de proteínas desarrollada fue protegida mediante Patente Americana (US 61/241,994).

8.9. BIBLIOGRAFÍA.

- Adbo, K., Nicholls, I.A. (2001), “Enantoselective solid-phase extraction using Troger’s base molecularly imprinted polymers”, *Anal. Chim. Acta*, **435**, 115-120.
- Alexander, C. et al. (2006), “Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003”, *J. Molec. Recog.*, **19**, 106-180.
- Allender, C.J., Brain, K.R., Heard, C.M., Pellet, M.A. (1997), “Imprinted polymers, novel excipients in controlled delivery systems”, *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.*, **24**, 585-586.
- Allender C.J., Richardson, C., Woodhouse, B., Heard, C.M., Brain, K.R. (2000), “Pharmaceutical applications for molecularly imprinted polymers”, *International Journal of Pharmaceutics*, **195**, 39-43.
- Alvarez-Lorenzo, C., Yañez, F., Barreiro-Iglesias, R., Concheiro, A. (2006), “Imprinted soft contact lenses as norfloxacin delivery systems”, *J. Controlled Release*, **113**, 236-244.
- Anderson, L., Sellergren, B., Mosbach, K. (1984), “Imprinting of amino-acid derivatives in macroporous polymers”, *Tetrahedron. Lett.*, **25**, 5211-5214.
- Anderson, C.D., Shea, K.J., Rychnovsky, S.D. (2005), “Strategies for the generation of molecularly imprinted polymeric nitroxide catalysts”, *Org. Lett.*, **7**, 4879-4882.

- Ansell, R.J., Ramstrom, O., Mosbach, K. (1996), “Towards artificial antibodies prepared by molecular imprinting”, *Clin. Chem.*, **42**, 1506-1512.
- Arshady, R., Mosbach, K. (1981), “Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization”, *Makromol. Chem.*, **182**, 687-692.
- Ashkar, S. et al. (2000), “Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity”, *Science*, **287**, 860-864.
- Bergmann, N., Peppas, N.A. (2008), “Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins”, *Prog. Polym. Sci.*, **33**, 271-288.
- Bolster, M.W.G. (1997), “Glossary of terms used in bioinorganic chemistry (IUPAC recommendations 1997)”, *Pure & Appl. Chem.*, **69(6)**, 1251-1303.
- Bossi, A., Bonini, F., Turner, A.P.F., Piletsky, S.A. (2007), “Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: the state of the art”, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 1131-1137.
- Braitch, M. et al. (2008), “Increased osteopontin levels in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis”, *Arch. Neurol.*, **65(5)**, 633-635.
- Bures, P., Huang, Y.B., Oral, E., Peppas, N.A. (2001), “Surface modifications and molecular imprinting of polymers in medical and pharmaceutical applications”, *J. Controlled Release*, **72**, 25-33.

- [Byrne, M.E., Hilt, J.Z., Peppas, N.A. \(2008\)](#), “Recognitive biomimetic networks with moiety imprinting for intelligent drug delivery”, *J. Biomed. Mater., Res. Part. A*, **84A**, 137-147.
- [Byrne, M.E., Park, K., Peppas, N.A. \(2002\)](#), “Molecular imprinting within hydrogels”, *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, **54**, 149-161.
- [Chavas, D. et al. \(2001\)](#), “The influence of the proinflammatory cytokine osteopontin, on autoimmune demyelinating disease”, *Science*, **23**, 1731-1735.
- [Chianella, I. et al. \(2002\)](#), “Rational design of a polymer specific for microcystin-LR using a computational approach”, *Anal Chem.*, **74**, 1288-1293.
- [Chowdhury, S.A., Lin, J, Sadiq, S.A. \(2008\)](#), “Specificity and correlation with disease activity of cerebrospinal fluid osteopontin levels in patients with multiple sclerosis”, *Arch. Neurol.*, **65(2)**, 232-235.
- [Cormack, P.A.G., Elorza, A.Z. \(2004\)](#), “Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation”, *J. Chromatogr. B.*, **804**, 173-182.
- [Denhardt, D., Guo, X. \(1993\)](#), “Osteopontin: a protein with diverse functions”, *FASEB J.*, **7**, 1475-1482.
- [Dhal, P.K., Kulkarni, M.G., Mashelkar, R.A. \(2001\)](#), “Bio-imprinting: polymeric receptors with and for biological macromolecules”. En “Molecularly imprinted polymers: man-made mimics of antibodies and their applications on analytical chemistry”, *Elsevier, New York*.

- Fischer, E. (1894), "Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme", *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **27**, 2985-2993.
- Fisher, L.W., Torchia, D.A., Fohr, B., Young, M.F., Fedarko, N.S. (2001), "Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **280**, 460-465.
- Ge, Y., Turner, A.P.F. (2008), "Too large to fit? Recent developments in macromolecular imprinting", *Trends Biotechnol.*, **26**, 218-224.
- Giachelli, C.M., Steitz, S. (2000), "Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization", *Matrix Biol.*, **19**, 615-622.
- Haginaka, J., Sanbe, H. (1999), "Uniform-sized molecularly imprinted polymers from bisphenol A", *Chem. Lett.*, **28**, 757-758.
- Hansen, D.E. (2007), "Recent developments in the molecular imprinting of proteins", *Biomaterial*, **28**, 4178-4191.
- Haupt, K., Mayes, A.G., Mosbach, K. (1998), "Herbicide assay using an imprinted polymer based system analogous to competitive fluoroimmunoassays", *Anal. Chem.*, **70**, 3936-3939.
- Haupt, K., Mosbach, K. (2000), "Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors", *Chem. Rev.*, **100**, 2495-2504.
- Haupt, K. (2003), "Imprinted polymers-tailor-made mimics of antibodies and receptors", *Chem. Commun.*, **2**, 171-177.

- Kimhi, O. and Bianco-Peled, H. (2007), “Study of the interactions between protein-imprinted hydrogels and their templates”, *Langmuir*, **23**, 6329-6335.
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, H. (Eds) (2003), “Molecular imprinting: from fundamentals to application”, *Wiley-VCH, New York*.
- Kriz, D., Ramstrom, O., Mosbach, K. (1997), “Molecular imprinting: new possibilities for sensor technology”, *Anal. Chem.*, **69**, 345A-349A.
- Lanza, F., Sellergren, B. (2001), “Molecularly imprinted extraction materials for highly selective sample cleanup and analyte enrichment”, *Adv. Chromotogr.*, **41**, 137-173.
- Lin, H.Y. et al. (2006), “The microcontact imprinting of proteins: the effect of cross-linking monomers for lysozyme, ribonuclease A and myoglobin”, *Biosens. Bioelectron.*, **22**, 534-543.
- Liu, Y. et al., (2003), “Proteins incorporated into biomimetically prepared calcium phosphate coatings modulate their mechanical strength and dissolution rate”, *Biomaterials*, **24**, 65-70.
- Luzinov, I. (2008), “Molecularly imprinted fibers with recognition capability”, National textile center annual report, November 2008, NTC Project: C05/CL01.
- Mallik, S. et al. (1994), “Towards materials for the specific recognition and separation of proteins”, *New J. Chem.*, **18**, 299-304.

- Miyazaki, Y. et al. (1995), “Expression of osteopontin in a macrophage cell line and in transgenic mice with pulmonary fibrosis resulting from the lung expression of a tumor necrosis factor-alpha transgene”, *Ann. New York Acad. Sci.*, **760**, 334-341.
- Mosbach, K. (2006), “The promise of molecular imprinting”, *Sci. Am.*, **295**, 86-91.
- Nicholls, I.A., Matsui, J., Krook, M., Mosbach, K. (1996), “Some recent developments in the preparation of novel recognition systems: a recognition site for the selective catalysis of an aldol condensation using molecular imprinting and specific affinity motifs for α -chymotrypsin using a phage display peptide library”, *J. Mol. Recognit.*, **9**, 652-657.
- Norell, M.C., Andersson, H.S., Nicholls, L.A. (1998), “Towards molecularly imprinted polymer based controlled release materials”, *J. Mol. Recogn.*, **11**, 98-102.
- O’Regan, A., Berman, J.S. (2000), “Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation”, *Int. J. Exp. Pathol.*, **81**, 373-390.
- O’Regan, A.W., Nau, G.J., Chupp, G.L., Berman, J.S. (2000b), “Osteopontin (Eta-1) in cell-mediated immunity: teaching and old dog new tricks”, *Immunol. Today*, **21**, 475-478.
- Ou, S.H., Wu, M.C., Chou, T.C., Liu, C.C. (2004), “Polyacrylamide gels with electrostatic functional groups for the molecular imprinting of lysozyme”, *Anal Chim. Acta*, **504**, 163-166.

- Pichon, V., Haupt, K. (2006), “Affinity separations on molecularly imprinted polymers with special emphasis on solid-phase extraction”, *J. Liquid Chromatogr. Related Technol.*, **29**, 989-1023.
- Piletsky, S.A., Turner, Anthony, P.F. (2002), “New materials based on imprinted polymers and their application in optical sensors”, En “Optical biosensors: present and future (Ligler, F.S., Rowe Taitt, C.A.)”, *Elsevier, Amsterdam*.
- Polyakov, M.V. (1931), “Adsorption properties and structure of silica gel”, *Zhur. Fiz. Khim.*, **2**, 799-805.
- Ramstrom, O., Ye, L., Mosbach, K. (1996), “Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting”, *Chem. Biol.*, **3**, 471-477.
- Sellergren, B. (1997), “Imprinted polymers: stable, reusable antibody-mimics for highly selective separations”, *Am. Lab.*, **14**, 163-167.
- Sellergren, B. (Eds) (2001), “Molecularly imprinted polymers: man made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry”, *Elsevier, Amsterdam*.
- Sellergren, B. (2001b), “Enantiomer separations using designed imprinted chiral phases”, En “Chiral separations techniques (Subramanian, G.)”, *Wiley, Weinheim*, 153-184.
- Sellergren, B., Allender, C.J. (2005), “Molecularly imprinted polymers: a bridge to advanced drug delivery”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57(12)**, 1733-1741.

- Shijubo, N., et al. (2000), “Vascular endothelial growth factor and osteopontin in tumor biology”, *Crit. Rev. Oncog.*, **11**, 135-146.
- Shinkay, S. (2004), “Molecular design of synthetic receptors with dynamic, imprinting, and allosteric functions”, *Biosensors and Bioelectronic*, **20(6)**, 1250-1259.
- Singhal, H. et al. (1997), “Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival”, *Clin., Cancer Res.*, **3**, 605-611.
- Sodek, J., Ganss, B., McKee, M.D. (2000), “Osteopontin”, *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **11**, 279-303.
- Spivak, D.A. (2005), “Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers”, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **57**, 1779-1794.
- Svitel, J. et al., (2001), “Functionalized surfaces for optical biosensors: applications to in vitro pesticide residual analysis”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **12**, 1075-1078.
- Syu, M.J., Chiu, T.C., Lai, C.Y., Chang, Y.S. (2006), “Amperometric detection of bilirubin from a micro-sensing electrode with a synthetic bilirubin imprinted poly(MAA-co-EGDMA) film”, *Biosens. Bioelectron*, **22**, 550-557.
- Tarbin, J.A., Sharman, M. (2001), “Development of molecularly imprinted phase for the selective retention of stilbene-type estrogenic compounds”, *Anal Chim. Acta*, **433**, 71-79.

- Turner, N.W. et al. (2006), “From 3D to 2D: a review of the molecular imprinting of proteins”, *Biotechnol. Prog.*, **22**, 1474-1489.
- Venkatesh, S., Sizemore, S.P., Byrne, M.E. (2007), “Biomimetic hydrogels for enhanced loading and extended release of ocular therapeutics”, *Biomaterials*, **28**, 717-724.
- Vlatakis, G., Andersson, I.I., Muller, R., Mosbach, K. (1993), “Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting”, *Nature*, **361**, 645-647.
- Vlokmann, A., Bruggmann, O. (2006), “Catalysis of an ester hydrolysis applying molecularly imprinted polymer shells based on an immobilised chiral template”, *React. Funct. Polym.*, **66**, 1725-1733.
- Whitcombe, M.J., Alexander, C., Vulfson, E.N. (1997), “Smart polymers for the food industry”, *Trends Food Sci. Technol.*, **8**, 140-145.
- Wulff, G., Vesper, W., Grobeeinsler, R., Sarhan, A. (1977), “Enzyme-analogue built polymers: 4. Synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for resolution of racemates”, *Makromol. Chem.*, **178**, 2799-2816.
- Wulff, G., Grobeeinsler, R., Vesper, W., Sarhan, A. (1977b), “Enzyme-analogue built polymers: 5. Specificity distribution of chiral cavities prepared en synthetic-polymer”, *Makromol. Chem.*, **178**, 2817-2825.
- Wulff, G. (2002), “Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers”, *Chem. Rev.*, **102**, 1-28.

- Xie, J. et al. (2001), “Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney”, *Kidney Int.*, **60**, 1645-1657.
- Yan, M., Ramstrom, O. (Eds) (2005), “Molecularly imprinted materials: science and technology”, *Mercel Dekker, New York*.
- Yu, Y., Ye, L., Haupt, K., Mosbach, K. (2002), “Formation of a class of enzyme inhibitors (drugs), including a chiral compound, by using imprinted polymers or biomolecules as molecular-scale reaction vessels”, *Angew. Chem.*, **114**, 4660-4643.
- Yu, Y. et al. (2006), “Facile synthesis of polyaniline-sodium alginate nanofibers”, *Langmuir*, **22**, 3899-3905.
- Zhang, FJ, Cheng, GX, Ying, XG (2006), “Emulsion and macromolecules templated alginate based polymer microspheres”, *React. Funct. Polym.* **66**, 712-719.
- Zhang, J. et al. (2001), “Differential osteopontin expression in lung cancer”, *Cancer Lett.*, **171**, 215-222.
- Zhao, K., Cheng, G., Huang, J., Ying, X. (2008), “Rebinding and recognition properties of protein-macromolecularly imprinted calcium phosphate/alginate hybrid polymer microspheres”, *React. Funct. Polym.*, **68**, 732-741.

8.10. DIFUSIÓN DE RESULTADOS.

Los resultados derivados del Capítulo 8 se difundieron a través de una patente americana, y dos artículos internacionales:

Autores: Edgar P. Herrero, Eva M.M. Del Valle, Nicholas A. Peppas.
Título: *Protein imprinting by means of alginate based polymer microcapsules.*
Revista: *Process biochemistry*, enviado para su publicación (2010).
Impacto: 2,414 (año 2008).

Autores: Carolyn L. Bayer, Edgar P. Herrero, Nicholas A. Peppas.
Título: Alginate Films as macromolecularly imprinted matrices
Revista: *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, enviado para publicación.
Impacto: 2,150 (año 2008).

Autores: Nicholas A. Peppas, Edgar Pérez-Herrero.
Título: Protein imprinting by means of alginate-based polymer microcapsules.
Nº registro: Patente americana, *US 61/241,994*.
Institución: Universidad de Texas en Austin.
Fecha: 21/09/2009
País: Estados Unidos.

A continuación, se adjunta una copia del documento de registro y el abstract de la Patente Americana:



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
 United States Patent and Trademark Office
 Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
 P.O. Box 1450
 Alexandria, Virginia 22313-1450
 www.uspto.gov

APPLICATION NUMBER	FILING or 371(c) DATE	GRP ART UNIT	FIL FEE REC'D	ATTY. DOCKET NO	TOT CLAIMS	IND CLAIMS
61/241,994	09/14/2009		110	065715.0213		

CONFIRMATION NO. 6935

23640
 BAKER BOTTS, LLP
 910 LOUISIANA
 HOUSTON, TX 77002-4995

FILING RECEIPT



Date Mailed: 09/28/2009

Receipt is acknowledged of this provisional patent application. It will not be examined for patentability and will become abandoned not later than twelve months after its filing date. Any correspondence concerning the application must include the following identification information: the U.S. APPLICATION NUMBER, FILING DATE, NAME OF APPLICANT, and TITLE OF INVENTION. Fees transmitted by check or draft are subject to collection. Please verify the accuracy of the data presented on this receipt. **If an error is noted on this Filing Receipt, please submit a written request for a Filing Receipt Correction. Please provide a copy of this Filing Receipt with the changes noted thereon. If you received a "Notice to File Missing Parts" for this application, please submit any corrections to this Filing Receipt with your reply to the Notice. When the USPTO processes the reply to the Notice, the USPTO will generate another Filing Receipt incorporating the requested corrections**

Applicant(s)

Nicholas A. Peppas, Austin, TX;
 Edgar Perez-Herrero, Salamanca, SPAIN;

Power of Attorney: None

If Required, Foreign Filing License Granted: 09/21/2009

The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is **US 61/241,994**

Projected Publication Date: None, application is not eligible for pre-grant publication

Non-Publication Request: No

Early Publication Request: No

**** SMALL ENTITY ****

Title

Protein Imprinting by Means of Alginate-Based Polymer Microcapsules

PROTECTING YOUR INVENTION OUTSIDE THE UNITED STATES

Since the rights granted by a U.S. patent extend only throughout the territory of the United States and have no effect in a foreign country, an inventor who wishes patent protection in another country must apply for a patent in a specific country or in regional patent offices. Applicants may wish to consider the filing of an international application under the Patent Cooperation Treaty (PCT). An international (PCT) application generally has the same effect as a regular national patent application in each PCT-member country. The PCT process **simplifies the filing** of patent applications on the same invention in member countries, but **does not result** in a grant of an international

page 1 of 3

RECEIVED *JL*

SEP 28 2009

BAKER BOTTS LLP

**PROTEIN IMPRINTING BY MEANS OF ALGINATE-BASED POLYMER
MICROCAPSULES**

BACKGROUND

[0001] The present invention relates to molecular imprinting polymers, and, at least in some embodiments, to novel calcium alginate polymer microcapsules, and their associated methods of use.

[0002] A molecular imprinting polymer ("MIP") is generally a crosslinked polymeric network formed in the presence of a molecular mold or template. Sometimes called a plastic antibody, a MIP generally retains a complementary cavity once the mold or template molecule is extracted. The release of the template allows the MIP material to exhibit a selective "memory" with respect to the template. This simulates the typical molecular recognition of biological systems, such as antibodies or enzymes. MIPs tend to show a certain chemical affinity for the original molecule and, consequently, can be used to fabricate sensors, as catalysis, or for separation methods.

[0003] Molecular imprinting has been successfully used to recognize small molecules, such as herbicides, metal ions, and amino acids. Thus, MIPs can be used as sensors, chromatography beds, resins for separation processes, and analytical tools in enzyme-linked immunosorbent assays ("ELISA assays").

[0004] Heretofore, bio-macromolecules, such as antibodies and enzymes, have been employed for protein recognition purposes. However, such bio-macromolecules are sometimes difficult to find and/or produce. There is a need for receptor-like synthetic materials such as protein-imprinted polymers as substitutes for natural receptors.

[0005] However, the development of MIPs capable of recognizing macromolecules, such as peptides and proteins, has met with many difficulties, and the literature on this new field is not extensive. The current approach to macromolecular imprinting generally involves the inclusion of a template within a polymer formed from functional monomers and crosslinking agents. However, macromolecular imprinting technologies heretofore have been generally incompatible with the diagnosis and recognition in many life sciences applications, such as medical applications, food additives, or drug delivery, which require biocompatible or alimentary products.

**CAPÍTULO 9: APLICACIÓN III: DESARROLLO DE FILMS
BIFÁSICOS PARA UN POSIBLE TRATAMIENTO DE LA
FÍSTULA BRONCOPLURAL POSTNEUMONECTOMÍA**

9. APLICACIÓN III: DESARROLLO DE FILMS BIFÁSICOS PARA UN POSIBLE TRATAMIENTO DE LA FÍSTULA BRONCOPLURAL POST-NEUMONECTOMÍA

La neumonectomía (resección de todo un pulmón) es una técnica quirúrgica utilizada sobretodo en el tratamiento del carcinoma pulmonar y, más raramente, en el de otras patologías no tumorales, como la tuberculosis o las broquiectasias. A pesar de una cuidadosa selección preoperatoria, los pacientes neumonectomizados en nuestro país siguen presentando tasas altas de mortalidad precoz (9,1%) y morbilidad (36,3%), siendo la fístula bronco-pleural postneumonectomía (FBPN) una de las complicaciones postoperatorias más graves y difíciles de resolver (Jiménez et al., 2006). La FBPN se define como una comunicación entre el espacio pleural y la vía aérea a través del muñón bronquial. En estas circunstancias, en las que el muñón bronquial está en riesgo por desarrollo de fístula (isquemia, infección,...), una adecuada cicatrización y revascularización de la sutura bronquial es esencial para evitar la morbilidad y mortandad posoperatoria, sin mencionar los altos gastos hospitalarios que se generan por tratamientos prolongados y repetitivos.

Uno de los enfoques que ha obtenido un mayor éxito en el tratamiento de esta complicación quirúrgica es la reparación de tejidos mediante sistemas que contienen diferentes líneas celulares (Novoa et al., 2008). Así, según los trabajos realizados hasta ahora es posible postular que la cobertura del muñón bronquial con un injerto tisular de fibroblastos (Goto et al., 1999; Yancopoulos et al., 2000), y diferentes factores terapéuticos, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Nillesen et al., 2007) y el factor de crecimiento fibroblástico (bFGF) (Nillesen et al., 2007), reducen el riesgo de muerte pos-operativa por fístula bronco-pleural tardía postneumonectomía.

Un monocito es un leucocito, parte del sistema inmune del cuerpo humano, que protege contra los patógenos transportados por la sangre y que se mueve con rapidez hacia los sitios de infección en los tejidos. Los

monocitos son producidos por la médula ósea a partir de los precursores hematopoyéticos, y generan factores de crecimiento tales como el factor endotelial vascular, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), el factor fibroblástico básico, bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor), y el factor de necrosis tumoral alfa (tumor necrosis factor- α) con unos pesos moleculares de 42, 16, y 27 KDa, respectivamente (Gerber et al., 1999; Montrucchio, 1994; Shaulian, 1997). El método ideal para obtener monocitos es el aislamiento por adherencia a partir de células mononucleadas procedentes de la sangre periférica (Bennett y Breit, 1994). Por ello, en este trabajo, también fueron utilizadas células mononucleadas para poder trabajar con un mayor número de células.

Existen pruebas de que la acción coordinada y secuencial de ciertos factores de crecimiento, tales como el VEGF, el FGF, o el PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), aceleran los procesos normales de angiogénesis y maduración vascular (Yancopoulos et al., 2000), permitiendo el desarrollo de redes capilares totalmente funcionales dentro de injertos inicialmente avasculares (Chen et al., 2007; Nillesen et al., 2007; Perets et al., 2003; Richardson et al., 2001).

El fibroblasto es la célula más común y menos especializada del tejido conectivo. Se encarga de la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular y presenta gran capacidad para diferenciarse dando lugar a otros tipos celulares más especializados del tejido conjuntivo. El fibroblasto está involucrado, además, en los procesos de cicatrización, ya que cuando ocurre daño tisular, se induce mitosis de fibroblastos y se estimula la producción de sobre todo colágeno, que aísla el tejido y favorece su reparación.

Los fibroblastos son estimulados por varias citoquinas, destacando el factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta: transforming growth factor beta), y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF: fibroblast growth factor). El TGF-beta estimula la producción de colágeno y fibronectina, principalmente en proceso de cicatrización. El FGF estimula la proliferación de fibroblastos y la síntesis de matriz extracelular.

Diversos trabajos enfatizan el papel de los fibroblastos en la regeneración del epitelio traqueal *in vitro*, favoreciendo su proliferación y diferenciación (Goto et al., 1999; Kobayashi et al., 2007).

Uno de los factores más importantes que pueden complicar el desarrollo de las terapias celulares es la protección de las células implantadas del sistema inmunitario. Una solución no deseada al inmuno-rechazo es la administración de un cóctel de inmuno-supresores que puede producir serios efectos secundarios.

Sin embargo, en este trabajo se propone como solución al inmuno-rechazo la encapsulación de las células en membranas biocompatibles y selectivamente semipermeables, que aseguran la protección mecánica y bloquean la entrada de los mediadores inmunes, pero que permiten la difusión hacia el exterior de las moléculas activas (factores tróficos) producidas por las células y que permitirán el tratamiento de las enfermedades. Además, este tipo de membranas permiten la entrada de nutrientes y oxígeno, y la salida de los desechos (Angelova y Hunkeler, 1999; Benoit et al., 1996; De Vos et al., 2002; Orive et al., 2003, 2004) (Figura 9.1.).

Las células encapsuladas ofrecen la ventaja de ser capaces de sintetizar y segregar de forma continua las proteínas específicas, así como de responder a las señales fisiológicas que regulan la secreción. La membrana de las cápsulas actúa como una barrera permeable para las moléculas más grandes, como los anticuerpos y componentes complementarios, responsables del rechazo celular, de tal forma que el trasplante en un huésped inmunológicamente incompatible se hace posible. Con la apropiada permeabilidad a moléculas de bajo peso molecular tales como, nutrientes, metabolitos, y factores de crecimiento, las células encapsuladas se espera que mantengan su funcionalidad dentro de su barrera permeable y segregue el repertorio normal de proteínas (Figura 9.1.).

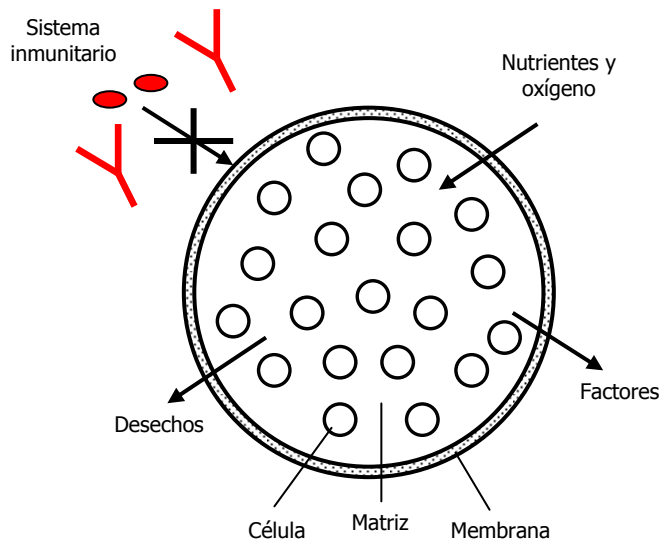


Figura 9.1. Esquema de una microcápsula

Durante los últimos años, se ha dedicado un gran esfuerzo en el desarrollo de soportes esféricos (microcápsulas) para la inmovilización de material biológico para su utilización en la terapia celular. Sin embargo recientemente, están ganando importancia otro tipo de soportes poliméricos de inmovilización, los films poliméricos (Jain et al., 1995). Este tipo de soportes presentan una serie de ventajas en comparación con los soportes esféricos, como por ejemplo su fácil recuperación en caso de complicaciones (Kizilel et al., 2005), su utilidad en la reparación de tejidos (Alperin et al., 2005) y para el tratamiento de heridas y quemaduras. Además, este tipo de soportes por su forma, estructura y resistencia mecánica son adecuados para su fijación mediante sutura quirúrgica. La resistencia mecánica de estos soportes, que debe resistir la tensión creada por el corazón, por ejemplo para la reparación de infartos de miocardio, fue analizada mediante su módulo elástico en trabajos anteriores del presente grupo de investigación.

A pesar de ser conocidas las propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad de los alginatos y los geles de fibrina, y de estar documentada su utilidad en ingeniería tisular, no se conoce una técnica que reporte un sopor-

te biocompatible de células y factores terapéuticos, con la suficiente resistencia mecánica para ser suturada y fijada al muñón bronquial, y que permita su revascularización en el tratamiento de la fístula broncopleurales postneumotomía.

En este trabajo se ha desarrollado una nueva técnica biocompatible efectiva de liberación dual y controlada mediante la utilización de films de dos fases (fibrina y alginato) de diferente estructura (Figura 9.2.):

- Una **capa de fibrina** con fibroblastos que proporciona *adherencia* al órgano, el muñón bronquial.
- Una **capa de alginato bórico** que proporciona la *resistencia mecánica* y permite su sutura al órgano. La capa de alginato, además, incorpora, tanto fibroblastos y factores terapéuticos (VEGF) libres, como microcápsulas con factores inmovilizados (bFGF).

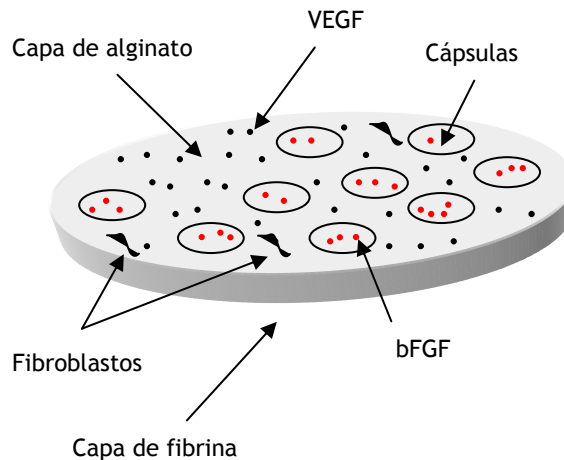


Figura 9.2. Esquema de la estructura de un film bifásico

La fibrina, proteína que participa en la reparación de heridas y la coagulación de sangre, fue desarrollada originalmente como sellador y adhesivo quirúrgico. Los geles de fibrina se pueden preparar a partir de la sangre de los propios pacientes mediante polimerización enzimática de fibrinógeno en la presencia de trombina a temperatura ambiente.

La Figura 9.3. muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido de la microanatomía de la matriz de fibrina, destacando la estructura en malla con unión de los monómeros de fibrina entre sí, dejando un tamaño de poro adecuado para la adhesión celular y visualizándose los fibroblastos adheridos a la misma. Estas imágenes demuestran la propiedad de adhesión que proporciona la capa de fibrina a la matriz bifásica.

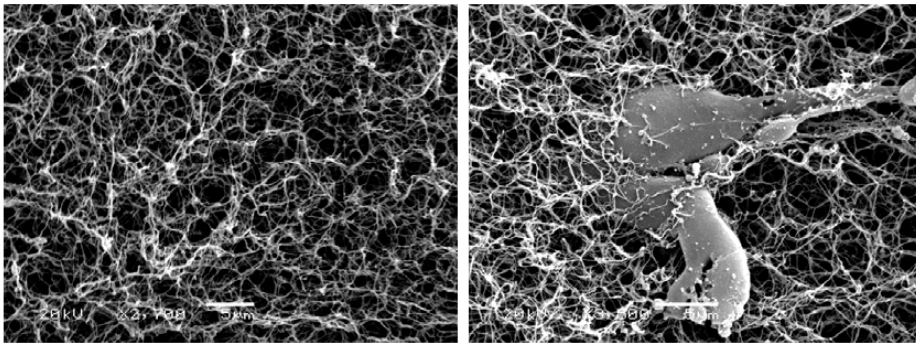


Figura 9.3. Microscopía electrónica de barrido donde se aprecia una matriz de fibrina sin componente celular (izquierda) y una matriz de fibrina con un fibroblasto integrado plenamente en la misma tras 21 días de cultivo (derecha)

La capa de alginato está diseñada para una dispensación dual y controlada de los factores VEGF y FGF, ya que además de tener suspendido el factor VEGF, incorpora microcápsulas con el factor FGF inmovilizado, permitiendo así una cinética de liberación secuencial de los mismos, lo que resulta fundamental para la formación y maduración capilar adecuada. Así, el VEGF comienza a liberarse de forma instantánea, mientras que el FGF comienza su liberación de forma más tardía y secuencial (Figura 9.4.). Esto permitirá

simular de forma bastante aproximada la secuencia de actuación normal de ambos factores “in vivo” necesaria para una correcta angiogénesis (Figura 9.5.).

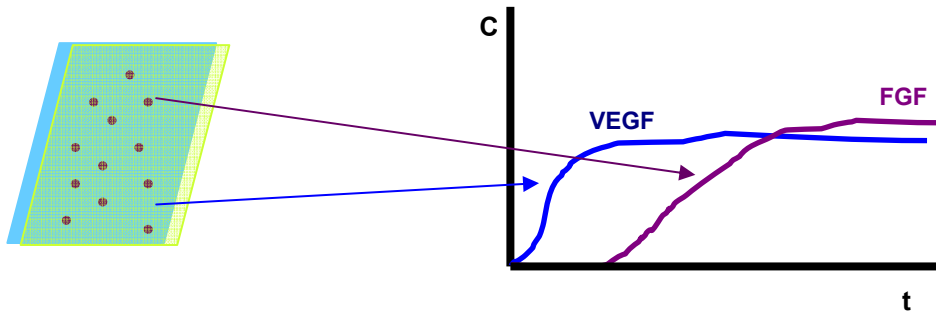


Figura 9.4. Perfiles de liberación de VEGF y de FGF desde el injerto

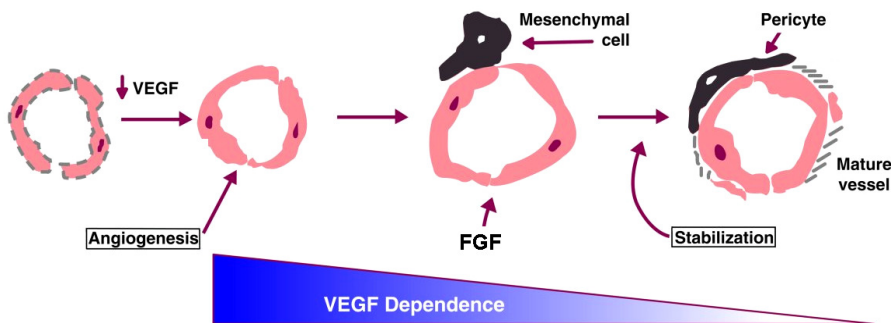


Figura 9.5. Proceso de formación y maduración vascular

En un principio, la formación de vasos es altamente dependiente de la acción del VEGF. Conforme se inicia la maduración vascular, la importancia del VEGF disminuye progresivamente a la par que comienzan su acción otros factores como el FGF (adaptado de Darland y D’Amore, Journal of Clinical Investigation, 1999).

Esta matriz bifásica desarrollada no sólo permite una liberación secuencial de dos factores terapéuticos diferentes (VEGF y bFGF), sino que también permite el crecimiento de los fibroblastos incorporados. Con todo

esto, la matriz desarrollada permite la vascularización y regeneración del epitelio bronquial para un posible tratamiento de la fístula broncopleurales postneumectomía.

9.1. GENERACIÓN DE LOS FILMS BIFÁSICOS

9.1.1. MÉTODO DE PREPARACIÓN DE LA CAPA DE FIBRINA (2 mL)

Para la coagulación de un gel de fibrina de 2 mL se siguió el procedimiento que se describe a continuación:

- Partir de una solución de 0,8 de plasma sanguíneo.
- Añadir, al plasma, 920 µL de medio de cultivo completo, completado con un 10 % de suero fetal bovino, y un 1% de penicilina/estreptomocina, para el cultivo de los fibroblastos.
- Suspender 40 000 fibroblastos en 120 µL de medio de cultivo y añadir a la mezcla anterior.
- Suplementar la mezcla con 80 µg de agente estabilizante del coágulo de fibrina (ácido tranexámico).
- Añadir 80 µg de cloruro cálcico (concentración final 4 mg/mL).
- Homogeneizar la muestra por pipeteo y dispensar en el recipiente de cultivo en el que se pretende coagular la mezcla.
- Introducir al incubador a 37 °C y 5% of CO₂ (Forma Direct Heat CO₂ Incubator, Thermo Electron Corporation, Hucoa-Erlöss, Model 311).
- Añadir suficiente medio de cultivo a los films de fibrina para evitar su desecación.

Todas las disoluciones utilizadas fueron completamente estériles. El proceso entero fue desarrollado en una campana de flujo laminar de tipo II (Nuair, Model NO-UN-425-40DE), bajo condiciones completamente estériles.

9.1.2. TÉCNICA DE PREPARACIÓN DE LA CAPA DE ALGINATO BÁRICO

En la literatura, habitualmente se utiliza la técnica de evaporación del solvente para la preparación de films poliméricos. Este proceso consiste en extender una fina capa de alginato sobre una placa de vidrio o una placa

Petry, para después producir su entrecruzamiento con cloruro cálcico. Una vez producidos los films, estos son desecados, bien con corrientes de aire, o mediante un horno a 40 °C (Chan, et al., 2006; Hermes y Narayani, 2002). Esta técnica no es apropiada porque la desecación puede dañar las células inmovilizadas. Además, es difícil controlar el espesor y la uniformidad de los films producidos, pudiéndose generar fibrosis y rechazo después del trasplante.

Con el objetivo de poder inmovilizar material biológico, se desarrolló una nueva técnica de generación de films basada en la reacción de gelificación iónica entre el alginato sódico y el cloruro de bario. Este método consiste en extender una fina capa de una solución de alginato sódico al 2 % en peso sobre una placa Petry con un papel de filtro poroso empapado con una solución de cloruro de bario al 3 % en peso. Después de esto, se añade gota a gota una solución de cloruro de bario al 3 % en peso sobre la superficie superior. Con este método es difícil controlar el espesor y la uniformidad.

Por tanto, se modificó este método, de tal forma, que se pudieran controlar estos parámetros, y así evitarse la fibrosis y el rechazo a la hora de implantar el film. Se desarrolló un segundo método de generación de films, que permitía controlar y reducir el espesor del mismo (hasta 300 micras), manteniendo la resistencia mecánica. El dispositivo utilizado para generar los films, que se muestra en la Figura 9.6., está compuesto por dos placas porosas filtrantes fijadas en un soporte metálico en contacto con una pinza de sujeción. En cada placa porosa fueron colocados filtros de Nylon de 0,45 micras empapados con una solución de cloruro bórico al 3 % en peso. En la placa porosa colocada sobre el soporte se vertió una fina capa de una solución de alginato sódico al 2 % en peso en el centro del filtro de Nylon. La otra placa filtrante fue colocada verticalmente sobre la primera, y el dispositivo fue fijado con una pinza de sujeción. A través de la entrada de la placa porosa superior se añadieron 4 mL de cloruro bórico al 3 % en peso, de tal

forma que atravesará la placa porosa, y contactará con la capa de alginato sódico formada, posibilitando la formación de la membrana del film.

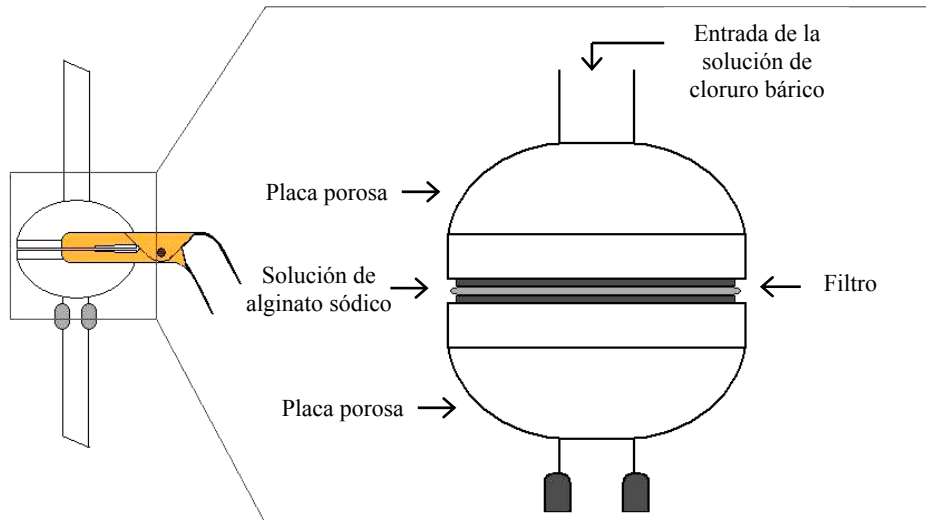


Figura 9.6. Dispositivo utilizado para preparar los films

Todas las disoluciones utilizadas fueron esterilizadas a 121 °C durante 30 minutos, utilizando un autoclave de vapor (P-Selecta, Autester-E). El alginato sódico fue esterilizado por exposición a radiación ultravioleta durante al menos 48 horas. Todo el equipamiento fue esterilizado, incluyendo el material de vidrio, mediante autoclave a 121 °C durante 30 minutos. El proceso entero fue desarrollado en una campana de flujo laminar de tipo II (Nuair, Model NO-UN-425-40DE), bajo condiciones completamente estériles.

9.1.3. TÉCNICA PARA LA GENERACIÓN DE MICROCÁPSULAS

Para la generación de las microcapsulas, se utilizó la técnica de estabilización de gelificación iónica. Esta técnica consiste en añadir una solución de alginato sódico del 2 % en peso gota a gota sobre una solución de clo-

ruro de bario al 3 % en peso. Las cápsulas se mantuvieron en la solución gelificante durante 5 minutos, para después ser filtradas con filtros de Nylon de 0,45 micras de poro.

Las gotas de alginato sódico fueron generadas mediante una unidad de encapsulación por vibración generada por un sistema piezo-eléctrico (Nisco Encapsulation Unit, Var D, LIN-0085). Este sistema dispone de una boquilla simple vibratoria, donde la frecuencia y la amplitud se pueden ajustar de forma digital. Una bomba jeringa produce un caudal libre de pulsaciones a través de la boquilla (Figura 9.7.).



Figura 9.7. Dispositivo utilizado para preparar las cápsulas

9.1.4. TÉCNICA PARA LA GENERACIÓN DE LOS FILMS BIFÁSICOS

Como se describió anteriormente, se ha desarrollado una técnica de generación de films bifásicos biocompatibles de fibrina y alginato (protegido mediante Patente Europea, EP10153306.5). Los films constan de dos capas de diferente estructura, una con fibrina que proporciona la adherencia al órgano,

y otra de alginato que proporciona la resistencia mecánica necesaria para su sutura al órgano. La capa de fibrina incorpora fibroblastos. La capa de alginato incorpora factores de crecimiento VEGF, cápsulas de alginato bórico con factores bFGF en su interior.

Primeramente, se preparó una solución de factor VEGF en Tris Buffer a pH de 8.0 con una concentración final de 1 µg/mL.

Además, se generaron microcápsulas de alginato bórico con bFGF incorporado. Para ello, se preparó una solución de factor bFGF, suspendiendo éste en una solución de Tris Buffer (pH = 8.0) hasta una concentración final de 1 µg/mL. Con esta solución del factor se preparó una solución de alginato sódico al 2 % en peso. La solución alginato-bFGF en Tris Buffer se añadió gota a gota sobre una solución de cloruro de bario al 3 % en peso, para generar las cápsulas.

Después, las cápsulas generadas fueron añadidas a la solución factor VEGF, y con esta suspensión se preparó una solución de alginato sódico al 2 % en peso, donde además se incluyeron 40 000 fibroblastos.

La matriz fue generada por dos diferentes procedimientos (protegidos por Patente Europea, EP10153306.5):

a) Generación de la matriz bifásica mediante placas Petry:

Este método consiste en extender una fina capa de 4 mL de la solución de alginato sódico al 2 % en peso con VEGF, cápsulas y fibroblastos, preparada previamente, sobre un papel de filtro poroso, empapado en una solución de cloruro de bario al 3 % en peso, colocado sobre una placa Petry. Las condiciones de gelificación se mantuvieron durante 5 minutos, dejando libre la superficie superior, sin solución gelificante, de tal forma que se pueda adherir la capa de fibrina sobre esta superficie superior del film. Después de esto, se

preparó la capa de fibrina (4 mL) sobre la superficie superior del film, como se describió previamente. Finalmente, el film bifásico se almacenó en medio de cultivo completo, complementado con un 10 % de suero fetal bovino, y un 1% de penicilina/estreptomicina, en un incubador a 37 °C y 5 % de CO₂ para su cultivo. Después de dos días de cultivo, la capa de fibrina se adherió a la capa de alginato, debido a la red de la fibrina, y entonces, la matriz se recubrió con una membrana de cloruro bórico para proteger la matriz, mediante la inmersión de la matriz en un baño con una solución de cloruro bórico al 3 % en peso.

b) Generación de la matriz bifásica mediante placas filtrantes porosas:

Este método genera films mediante un dispositivo que consta de dos placas filtrantes porosas fijadas a un soporte metálico en contacto con una pinza de sujeción. En cada placa porosa se colocaron filtros de Nylon, de 0,45 micras de tamaño de poro, empapados con una solución de cloruro de bario del 3 %. En el caso de la placa filtrante superior, la solución fue del 1 % en peso, para evitar que se produjera la reacción de gelificación al completo en la superficie superior del film, y permitiera la adherencia de la capa de fibrina sobre esta superficie. Sobre el centro del filtro colocado en la placa inferior fue vertida la solución de alginato sódico al 2 % en peso con VEGF, cápsulas y fibroblastos, preparada previamente. Después de esto, se colocó encima la otra placa filtrante, y el dispositivo se fijó mediante una pinza de sujeción. En este caso se evitó añadir la solución de cloruro de bario al 3 % por la entrada de la placa porosa superior, de tal forma que no se generara la reacción de gelificación al completo en la superficie superior del film. De esta forma, se generó una membrana con la suficiente resistencia mecánica para suturarla al órgano, pero que permitiera la adherencia de la capa de fibrina sobre esta superficie superior del film.

Después de esto, se preparó la capa de fibrina (4 mL) sobre la superficie superior del film, como se describió previamente. Finalmente, el

film bifásico se almacenó en medio de cultivo completo, complementado con un 10 % de suero fetal bovino, y un 1% de penicilina/estreptomicina, en un incubador a 37 °C y 5 % de CO₂ para su cultivo. Después de dos días de cultivo, la capa de fibrina se adherió a la capa de alginato, debido a la red de la fibrina, y entonces, la matriz se recubrió con una membrana de cloruro bórico para proteger la matriz, mediante la inmersión de la matriz en un baño con una solución de cloruro bórico al 3 % en peso.

9.2. ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR

Ya que la viabilidad celular dentro de las cápsulas, fue comprobada en el Capítulo 7, es necesario ahora comprobar, también, la supervivencia de las células y factores dentro de los films poliméricos. De esta forma se realizaron estudios de viabilidad celular con tres líneas celulares diferentes (monocitos, células monoclonales y fibroblastos) en los films generados mediante el método de las placas filtrantes porosas.

9.2.1. PROCEDIMIENTO DE INMOVILIZACIÓN DE LAS CÉLULAS

Los monocitos suministrados (15×10^6) por el servicio de hematología del Hospital Universitario de Salamanca fueron tratados con tripsina y centrifugados (Internacional Equipment Co., IEC Centra MP4R) a 1000 rpm durante 10 minutos a 20 °C. El medio de cultivo fue decantado y las células fueron resuspendidas en 2 mL de medio fresco de cultivo, para después mezclar esta suspensión celular con 13 mL de una solución de alginato sódico con medio de cultivo al 2 % en peso, para tener al final una suspensión alginato-células de concentración final de 1×10^6 células / mL.

Las células mononucleadas suministradas (136×10^6) por el servicio de hematología del Hospital Universitario de Salamanca fueron tratadas con tripsina y centrifugadas (Internacional Equipment Co., IEC Centra MP4R) a 1000 rpm durante 10 minutos a 20 °C. El medio de cultivo fue decantado y las células fueron resuspendidas en 2 mL de medio fresco de cultivo, para después mezclar esta suspensión celular con 5 mL de una solución de alginato sódico con medio de cultivo al 4 % en peso, para tener al final una suspensión alginato-células de concentración final de $19,5 \times 10^6$ células / mL.

Los fibroblastos suministrados (1×10^5) por el banco de tejidos de la Clínica San Francisco de León fueron tratadas con tripsina y centrifugadas (Internacional Equipment Co., IEC Centra MP4R) a 1000 rpm durante 10

minutos a 20 °C. El medio de cultivo fue decantado y las células fueron resuspendidas en 2 mL de medio fresco de cultivo, para después mezclar esta suspensión celular con 8 mL de una solución de alginato sódico con medio de cultivo al 4 % en peso, para tener al final una suspensión alginato-células de concentración final de 1×10^4 células / mL.

La generación de los films se produjo según el procedimiento de las placas filtrantes porosas, descrito previamente. En cada placa porosa se colocaron filtros de Nylon, de 0,45 micras de tamaño de poro, empapados con una solución de cloruro de bario del 3 %. Sobre el centro del filtro colocado en la placa inferior fueron vertidos 0,7 mL de la solución de alginato sódico con células al 2 ó 4 % en peso, según la línea celular, preparada previamente. Después de esto, se colocó encima la otra placa filtrante, y el dispositivo se fijó mediante una pinza de sujeción. A través de la entrada de la placa porosa superior se añadieron 4 mL de cloruro bórico al 3 % en peso. Después de esto, los films producidos fueron llevados a un baño de 15 mL de cloruro de bario al 3 % en peso. El tiempo de permanencia en el dispositivo y en el baño de cloruro de bario varió en función de la línea celular. Los films con monocitos y células monoclonales, estuvieron 10 minutos en el dispositivo, y otros 10 en el baño. Los films con fibroblastos permanecieron en el dispositivo durante 2 minutos y otros 5 en el baño.

De esta forma, se prepararon 4 films por línea celular, que se mantuvieron en placas Petry con 20 mL de medio completo de cultivo DMEM complementado con un 10% de suero fetal bovino, y un 1% de penicilina/estreptomicina, para cultivo a 37 °C y 5% de CO₂ en un incubador (Forma direct heat CO₂ incubator, Thermo Electron Corp., Hucoa-Erloss, Model 311). El medio se cambió cada 3 días.

La disolución de cloruro de bario fue autoclavada utilizando un autoclave de vapor (P-Selecta, Autester-E) a 121 °C durante 30 minutos. Todo el equipamiento utilizado, incluido todo el material de vidrio, fue autoclavado a 121 °C durante 30 minutos. El reactivo de alginato sódico fue

esterilizado por exposición a radiación ultravioleta durante al menos 24 horas.

El proceso entero fue desarrollado en una campana de flujo laminar de tipo II (Nuair, Model NO-UN-425-40DE), bajo condiciones completamente estériles.

9.2.2. VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS ENCAPSULADAS

El objetivo principal de esta parte es conseguir la supervivencia de las células inmovilizadas en los films generados.

Después de realizar la inmovilización de las diferentes líneas celulares en los films, se comprobó su supervivencia cada día mediante el método de la sal de tetrazolio o ensayo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-bromuro 2,5-difeniltetrazolio], descrito dentro del Apéndice I, “Materiales y Métodos”, en el apartado D). Todos los ensayos se realizaron durante 15 días.

Se realizó un calibrado absorbancia-número de células, con el objetivo de conocer el número exacto de células que había en cada momento.

Calibración absorbancia-número de células para la realización del test de viabilidad celular:

El ensayo MTT, descrito en el apéndice I, “Materiales y Métodos”, proporciona diferentes valores de absorbancia en función de la viabilidad celular. Esta absorbancia debe ser asociada a una cantidad fija de células. Por ello, se realizó una calibración previa con el objeto de transformar los valores obtenidos de absorbancia en número de células vivas. Se partió de un número conocido de células y se analizaron diferentes volúmenes, con una concentración de células conocida, mediante el método MTT, a través de un lector de placas ELISA (Expert Plus, ASYS).

a) **Monocitos:**

A partir de una suspensión inicial de células de $1,180 \times 10^6$ en 1235 μL de medio completo de cultivo, se tomaron diferentes volúmenes con número conocido de células, y se diluyeron hasta 200 μL rellenando el volumen restante con medio fresco de cultivo. A partir de aquí se realizó el ensayo MTT en un lector de placas ELISA para obtener las medidas de la absorbancia para las diferentes muestras. En la tabla 9.1. se pueden ver los volúmenes tomados a partir de la suspensión inicial, el número de células que contienen, así como su absorbancia. Para cada volumen se tomaron 4 medidas.

Tabla 9.1: Datos experimentales para la elaboración de la curva de calibrado

V [μL]	Nº células $\cdot 10^3$	Absorbancia _{media}
200	191	0,2423
160	153	0,2168
140	134	0,2024
120	115	0,1938
100	96	0,1735
80	76	0,1608
60	57	0,1248
40	38	0,0805
20	19	0,0460
10	9,5	0,0185
5	4,8	0,0018

La curva de calibrado obtenida muestra claramente dos zonas bien diferenciadas (Figura 9.8.). Por lo tanto, con el objetivo de minimizar los errores a la hora de calcular el número de células a partir de medidas de

absorbancia, se optó por separar la curva de calibrado en dos rectas, para concentraciones inferiores y superiores a 80000 células (Figura 9.8.).

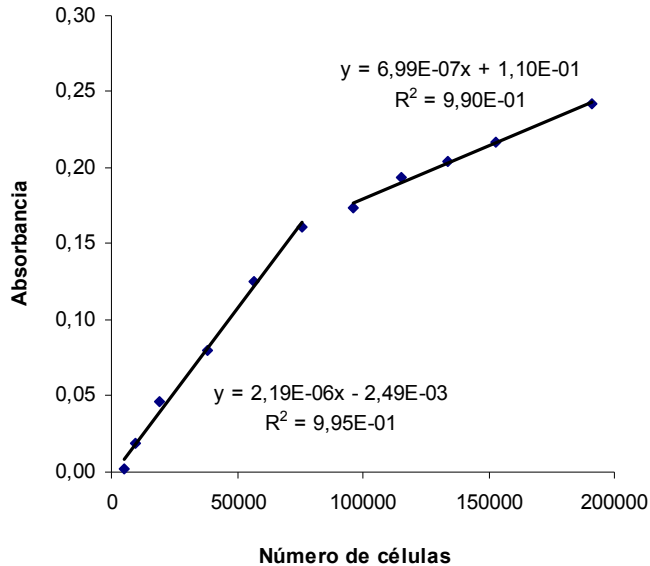


Figura 9.8. Recta de calibrado

b) Células mononucleadas:

A partir de una suspensión inicial de células de $6,5 \times 10^6$ / mL de medio completo de cultivo, se tomaron diferentes volúmenes con número conocido de células, y se diluyeron hasta 150 μ L rellenando el volumen restante con medio fresco de cultivo. A partir de aquí se realizó el ensayo MTT en un lector de placas ELISA para obtener las medidas de la absorbancia para las diferentes muestras. En la tabla 9.2. se pueden ver los volúmenes tomados a partir de la suspensión inicial, el número de células que contienen, así como su absorbancia. Para cada volumen se tomaron 4 medidas. La curva de calibrado obtenida se muestra en la Figura 9.9.

Tabla 9.2: Datos experimentales para la elaboración de la curva de calibrado

V [μL]	[N° células/mL] *10 ⁶	Absorbancia _{media}
150	6,5	1,2650
130	5,6	1,1090
120	5,2	0,9255
100	4,3	0,8355
90	3,9	0,8100
80	3,5	0,7640
70	3,0	0,6685
60	2,6	0,5045
50	2,2	0,4540
40	1,7	0,3930
30	1,3	0,3010
20	0,9	0,2410
10	0,4	0,1560
5	0,2	0,1150

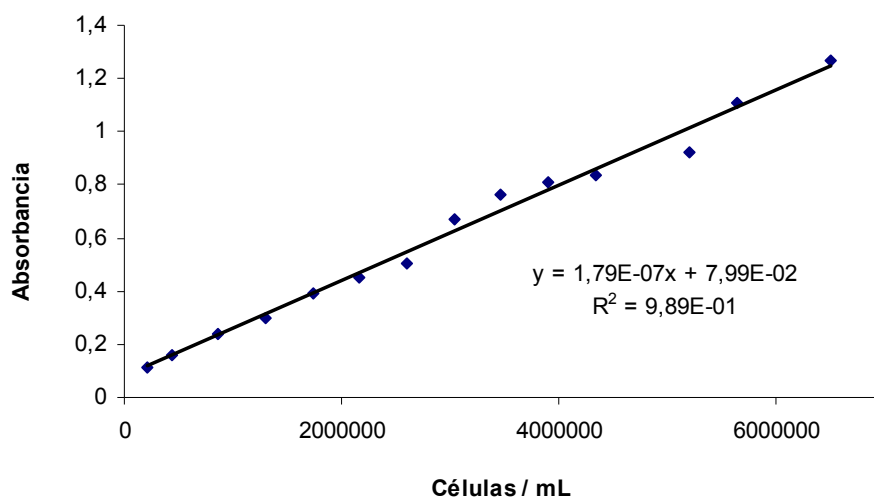


Figura 9.9. Recta de calibrado de las células mononucleadas

c) Fibroblastos:

A partir de una suspensión inicial de células de $1,0 \times 10^6$ / mL de medio completo de cultivo, se tomaron diferentes volúmenes con número conocido de células, y se diluyeron hasta 150 μ L rellenando el volumen restante con medio fresco de cultivo. A partir de aquí se realizó el ensayo MTT en un lector de placas ELISA para obtener las medidas de la absorbancia para las diferentes muestras. En la tabla 9.3. se pueden ver los volúmenes tomados a partir de la suspensión inicial, el número de células que contienen, así como su absorbancia. Para cada volumen se tomaron 4 medidas.

Tabla 9.3: Datos experimentales obtenidos para la elaboración de la curva de calibrado

V [μ L]	Nº células * 10^5	Absorbancia _{media}
150	1,5	2,0730
140	1,4	1,4870
130	1,3	1,8570
100	1,0	1,3010
80	0,8	0,9800
60	0,6	0,7440
20	0,2	0,2720
10	0,1	0,1160
5	0,05	0,0640

La curva de calibrado obtenida muestra claramente dos zonas claramente diferenciadas, optando por lo tanto a separar la curva en dos rectas para minimizar los errores a la hora de calcular en número de células a partir de una medida de absorbancia (Figura 9.10.).

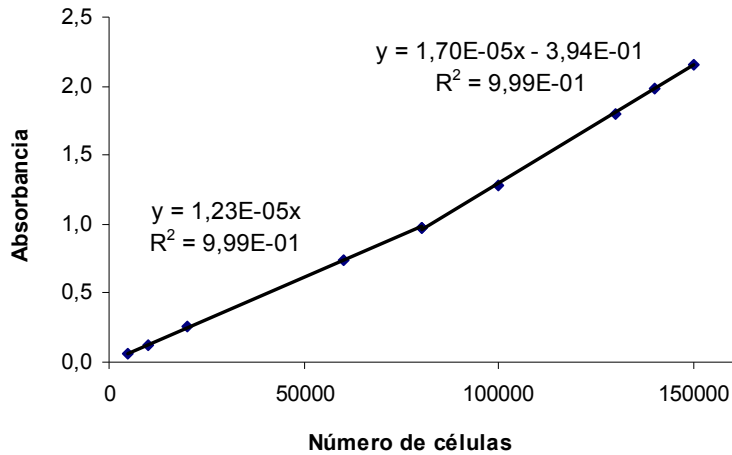


Figura 9.10. Recta de calibrado para los fibroblastos

Viabilidad de las células encapsuladas:

La figura 9.11. muestra la viabilidad celular de los monocitos inmovilizados en los films.

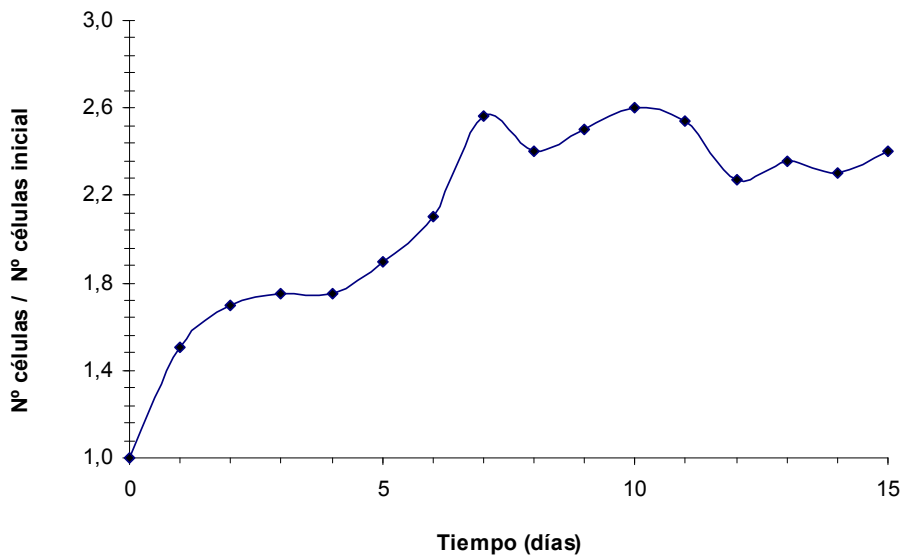


Figura 9.11. Viabilidad celular (monocitos)

De acuerdo con la Figura 9.11., la población celular se incrementa desde el primer día después del proceso de inmovilización, siendo el incremento en este primer día del 50 % con respecto al número inicial de células. A partir de aquí, existe una tendencia general de proliferación celular, alcanzando reiteradamente máximos locales.

En el caso de la línea celular de las células mononucleadas, en la Figura 9.12. se observa que existe viabilidad celular, pero que sin embargo, no se produce proliferación celular. No existe una tendencia de crecimiento celular, pero sin embargo, el número de células viables se mantiene por encima del valor inicial.

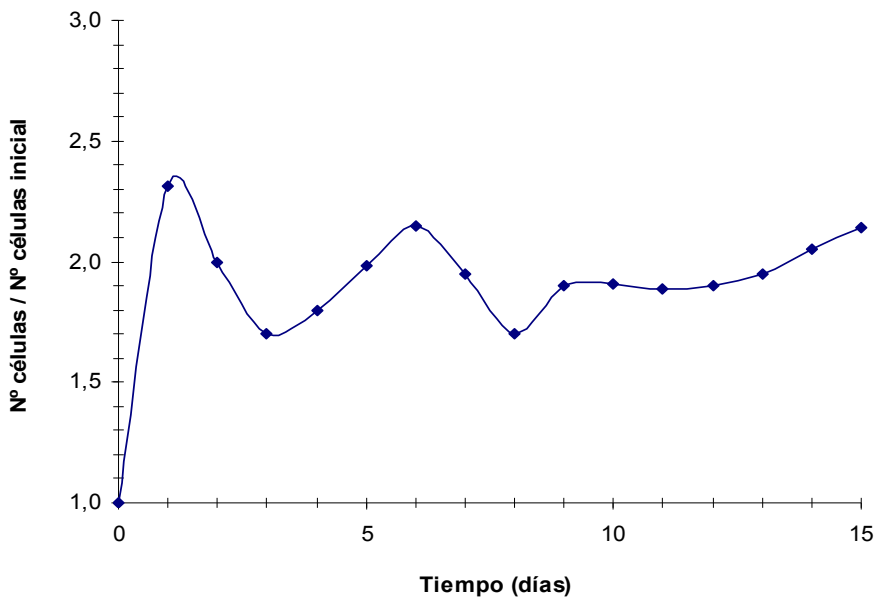


Figura 9.12. Viabilidad celular (células monoclonales)

La figura 9.13. muestra la tendencia de la línea celular de los fibroblastos. En esta gráfica se observa una clara proliferación celular, llegando a

incrementarse el número de células hasta diez veces el número de células inicial justo después del proceso de inmovilización.

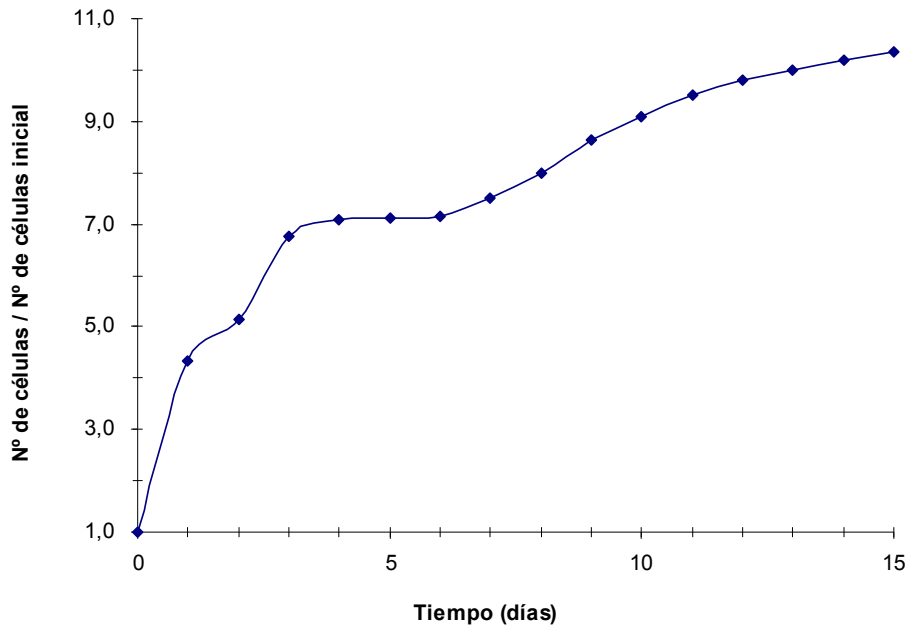


Figura 9.13. Viabilidad celular (fibroblastos)

La variación de los datos se puede justificar por el hecho de que no todos los films contienen el mismo número de células, ya que es muy difícil uniformizar las células en toda la superficie del film. Además, las medidas del test ELISA dependen de la muestra de film tomada.

9.3. ESTUDIOS DE LA EFICIENCIA DE LA MATRIZ BIFÁSICA EN EL TRATAMIENTO DE LA FÍSTULA BROCOPEURAL POSTNEUMONECTOMÍA

La Fístula Brocopleural Postneumonectomía (BPF) es una seria complicación después de una cirugía en el pulmón, tanto por su alta mortalidad (33 %) (Novoa et al., 2009), como por el deterioro de la calidad de vida que puede ocasionar, especialmente en los casos de fístula tardía, cuyo tratamiento definitivo pasa por la toracostomía (“ventana” torácica permanente, creada mediante resección costal e invaginación de los colgajos miocutáneos adyacentes, que permite la cura diaria - durante meses, incluso años- de la cavidad de neumonectomía), con posterior cierre quirúrgico de la misma mediante plastía muscular de dorsal ancho o sero mayor (Novoa et al., 2009). En resumen, estos pacientes deben someterse a una cirugía agresiva y mutilante, precisando de atención diaria durante un largo período de tiempo antes de poder ser candidatos a una nueva intervención que requerirá como mínimo la movilización de varios grupos musculares, con las lógicas repercusiones estéticas y funcionales que todo el proceso conlleva, sin mencionar el evidente incremento del gasto sanitario que esto supone.

Entre los factores que favorecen la aparición de la BPF, destacan aquellos que interfieren negativamente con el proceso normal de cicatrización, como la infección respiratoria postoperatoria o la revascularización del muñón bronquial. Como el tejido peribronquial juega un papel importante en el proceso de cicatrización de la vía aérea, su resección facilitaría la isquemia, ulceración, posterior necrosis parcial alrededor de la sutura bronquial, y BPF. Por lo tanto, en un esfuerzo por prevenir la aparición de BPF, se espera que la matriz bifásica aquí desarrollada sea capaz de cicatrizar y revascularizar el muñón bronquial.

Los resultados aquí presentados deben ser considerados como pilotos, basados únicamente en técnicas histológicas descriptivas y de observación (tinción hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica con anticuerpos CD-31 para la identificación de vaso sanguíneos). Estos resultados fueron realizados por el Servicio de Cirujía Torácica y el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca, y la Facultad de Veterinaria de León.

Se utilizaron 35 cerdos de dos a tres meses de vida y de peso entre 15 y 25 kg, incluyendo 30 animales en el grupo experimental, y los 5 restantes en un grupo control. Tras la anestesia general y monitorización, se practicó una toracotomía izquierda estándar, a través de la cual se realizó una neumonectomía izquierda, disecando el bronquio principal izquierdo hasta 2,5 centímetros de la carina traqueal y extirpando exhaustivamente todo el tejido peribronquial, a fin de que el muñón bronquial quede largo y completamente isquémico. Seguidamente se procede a su cierre mediante sutura quirúrgica, para después suturar en la zona de corte del bronquio un injerto tisular formado por la matriz bifásica con fibroblastos, VEGF, y FGF (en los animales del grupo control, dicho injerto fue sustituido únicamente por una matriz simple). Durante el período postoperatorio, los cerdos recibieron el oportuno tratamiento para el dolor. Aunque en el protocolo inicial se especificó que no se realizaría profilaxis antibiótica sobre los animales del estudio, la frecuente colonización multibacteriana de los mismos, unida a su situación de estabulación (que favorece los contagios) y a la inmunosupresión secundaria a la agresión quirúrgica, hicieron que el equipo de la Facultad de Veterinaria de León valorase como imprescindible la profilaxis y tratamiento antibiótico perioperatorios, lo que obligará a ser cautos a la hora de interpretar los hallazgos microbiológicos que se realicen.

La cicatrización del muñón bronquial se controló mediante bronoscopias repetidas con biopsia (análisis histológico) y cepillado bronquial (cultivo microbiológico y citología), realizadas en los días postoperatorios 3, 7, 14, 21, y 30. Todos los animales se sacrificaron por sobredosis de barbitúricos el día 30 del postoperatorio, o antes cuando presentaron fístula bronquial con

sintomas de infección o necrosis extensa del muñón bronquial. Tras el sacrificio, se extrajo el muñón bronquial con su injerto o matriz suturados para estudio histológico y microbiológico.

Se llevó a cabo un estudio morfológico del muñón bronquial con su matriz suturada, previa fijación en formol tamponado al 4 %. Tras incluirlo en parafina, se realizaron cortes histológicos y tinción con hematoxilina-eosina, para estudio morfológico de la estructura (presencia de fístula, granulación, epitelización) y reacción inflamatoria del muñón bronquial (grado de necrosis/rechazo). Para terminar, se verificó la presencia de vasos sanguíneos capilares empleando el marcador endotelial CD31, analizando su grado de maduración con el marcador alfa para actina de músculo liso.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos del análisis del Servicio de Anatomía Patológica y comentados por el Servicio de Cirujía Torácica, en los diferentes grupos de cerdos considerados:

- a) **Grupo de control, C (Figura 9.14):** se realizó una neumonectomía con cierre del muñón bronquial mediante sutura quirúrgica a 5 animales.

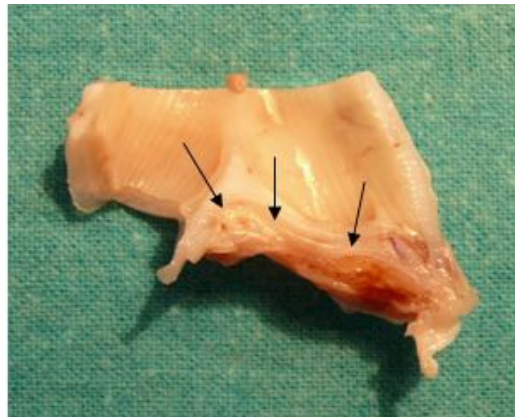


Figura 9.14. Sección histológica macroscópica de un muñón bronquial correspondiente a un cerdo del grupo control. Existe un escaso ensanchamiento sobre la línea de sutura (ver flechas), correspondiente a una “fibrosis reparativa”

Se obtuvieron los siguientes resultados:

- El sistema responde escasamente a la inflamación.
- La proliferación fibroblástica es escasa y corresponde al proceso natural de cicatrización (“fibrosis reparativa”).
- No existe evidencia de revascularización.

b) Grupo I, MS (matriz simple): se realizó una neumonectomía a 10 animales con cierre del muñón bronquial mediante sutura quirúrgica, pero además se cubrió el muñón bronquial con una matriz bifásica, consistente, exclusivamente en alginato y fibrina. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- El sistema responde de forma moderada a la inflamación.
- La proliferación fibroblástica es moderada y corresponde al proceso natural de cicatrización (“fibrosis reparativa”). La pared del muñón bronquial presenta un abundante material de aspecto gelatinoso y edematoso, correspondiente al alginato en proceso de degradación e incorporación.
- La revascularización es escasa.

c) Grupo II, ITC (Injerto tisular completo) (Figura 9.15): se realizó una neumonectomía a 20 animales con cierre del muñón bronquial mediante sutura quirúrgica, además, se cubrió el muñón bronquial con una matriz bifásica de alginato y fibrina, pero incorporando fibroblastos, VEGF y FGF. La principal característica de este grupo fue la cicatrización bronquial exuberante, con una pared bronquial muy gruesa (Figura 9.15.). Se obtuvieron los siguientes resultados:

- El sistema responde a la inflamación de una forma mucho más intensa que los otros dos grupos.

- La proliferación fibroblástica se dispara a partir del día 7 post-operatorio, entonces se estabiliza y gradualmente decrece hasta el día 30. Las células fibroblásticas son completamente viables y demuestran actividad biológica (proliferación positiva, migración,...), que significa que los factores VEGF y FGF están activos.
- A partir del día 7, se demuestra la formación de vasos sanguíneos con la evidencia del comienzo del crecimiento de capilares sanguíneos, continuando hasta completar estructuras vasculares a partir del día 14.

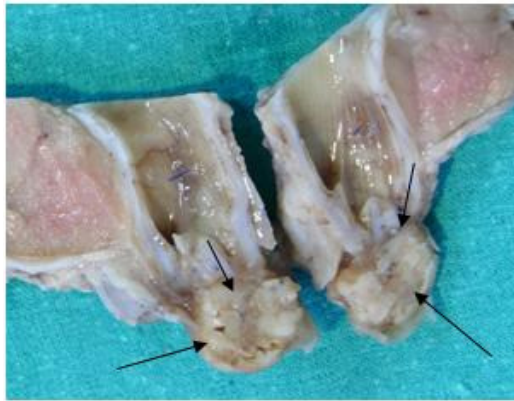


Figura 9.15. Sección histológica macroscópica de un muñón bronquial correspondiente a un cerdo del grupo experimental II. Existe un significativo ensanchamiento sobre la línea de sutura (ver flechas), correspondiente a un intenso proceso reparativo mediante la revascularización del tejido fibroso

Estas secciones histológicas macroscópicas fueron analizadas microscópicamente por el servicio de Anatomía Patológica para los tres grupos experimentales. Los análisis se realizaron a los 7, 14, 21 y 28 días de permanencia del injerto en los animales con el fin de observar la evolución de la revascularización, y los resultados se muestran en las Figuras 9.16.-9.19.

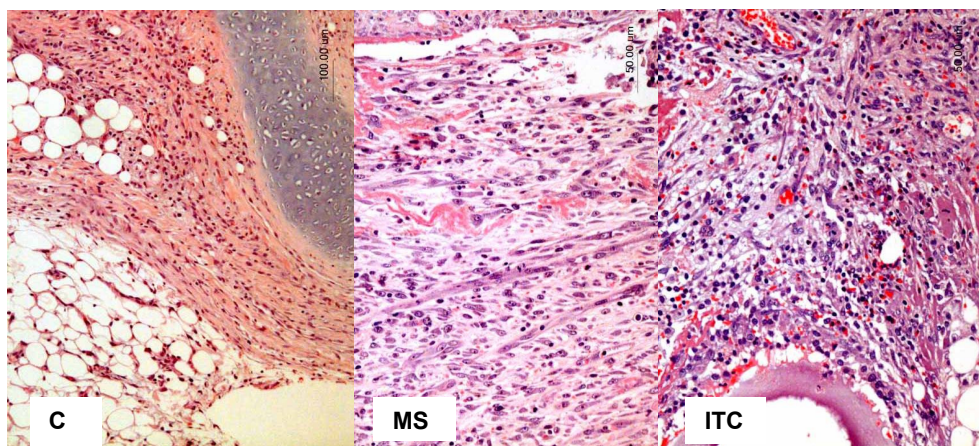


Figura 9.16. Análisis microscópico de las secciones histológicas macroscópicas para los 3 grupos experimentales a los 7 días del implante del injerto en los animales

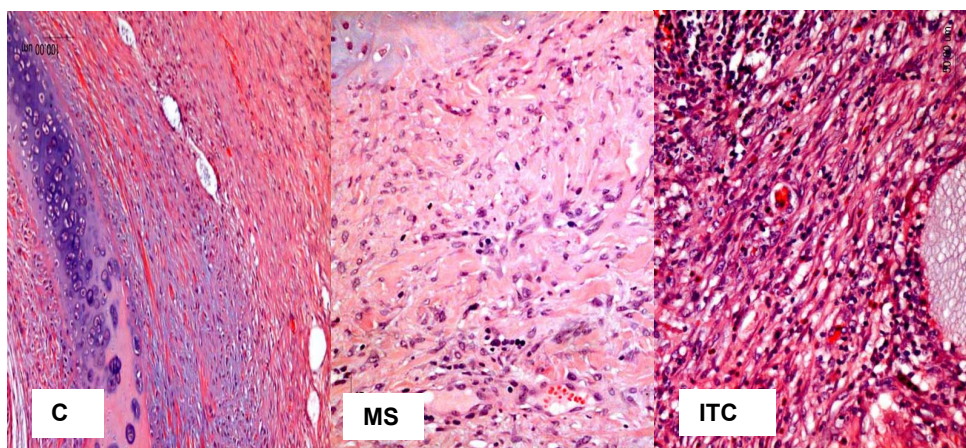


Figura 9.17. Análisis microscópico de las secciones histológicas macroscópicas para los 3 grupos experimentales a los 14 días del implante del injerto en los animales

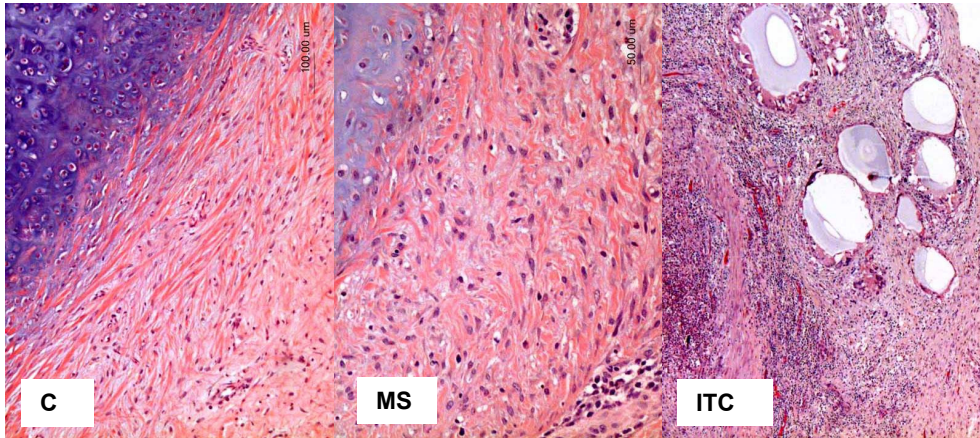


Figura 9.18. Análisis microscópico de las secciones histológicas macroscópicas para los 3 grupos experimentales a los 21 días del implante del injerto en los animales

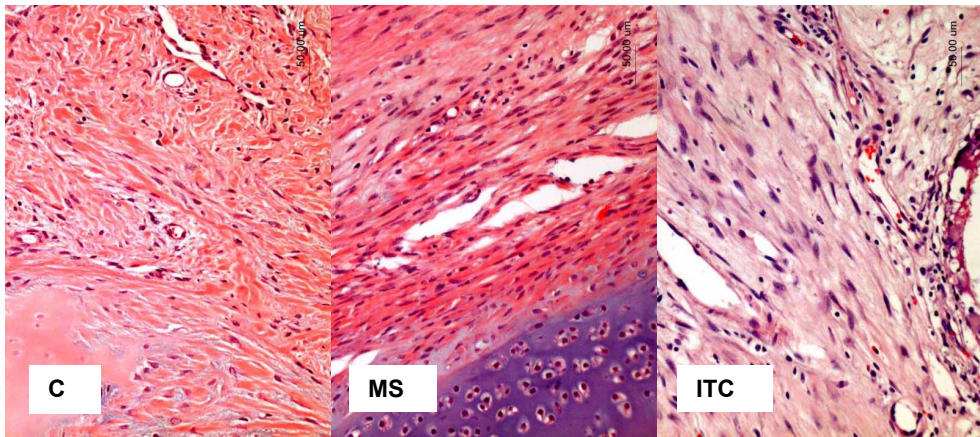


Figura 9.19. Análisis microscópico de las secciones histológicas macroscópicas para los 3 grupos experimentales a los 28 días del implante del injerto en los animales

En las Figuras 9.16.-9.19 se puede observar que en el grupo experimental con injertos completos (ITC), a partir del día 7, después del implante, se comienzan a evidenciar signos de revascularización, ya que comienzan a aparecer yemas (en violeta), es decir, que se empiezan a formar vasos sanguíneos. A partir del día 14 se empiezan a completar estructuras

vasculares. Se puede observar como en los grupos control se produce, exclusivamente, el proceso natural de cicatrización, no respondiendo el sistema a la inflamación, y no existiendo evidencias de revascularización. Los animales con una matriz simple, MS (alginato con fibrina), muestran una respuesta moderada a la revascularización. Sin lugar a dudas, la respuesta más intensa a la inflamación de todos los grupos experimentales se produce en el grupo con injerto tisular completo (ITC). En el día 21, después del implante, se puede observar en la foto del grupo experimental ITC (Figura 9.18.), que las cápsulas que inicialmente estaban en la capa de alginato, ahora forman parte del tejido, y están completamente desestabilizadas, formando exclusivamente una estructura de gel, y tendiendo a su desaparición. Esto demuestra la biocompatibilidad del sistema.

La angiogénesis es un proceso gobernado por un estrecho balance entre factores inhibidores y promotores en el que múltiples moléculas, células y factores tróficos interactúan de forma compleja. Se pensó que la respuesta angiogénica positiva detectada en los animales del grupo experimental de debe a la acción inmediata del VEGF, que apoyada por la liberación secuencial y sostenida del FGF permite no sólo la formación de nuevos vasos (mediante activación, proliferación, migración y adhesión en el foco lesional de células endoteliales) sino también su maduración (al estimular la proliferación de pericitos y la deposición de matriz extracelular). Los fibroblastos, cuya proliferación también se incrementa en respuesta a dichos factores, son capaces a su vez de producir diversas moléculas angiogénicas dando lugar a un mecanismo de retroalimentación que amplifica el proceso de revascularización.

Además, se incluye una foto de microscopio de una sección de tejido de un animal del grupo experimental ITC (Figura 9.20.), donde se puede observar la estructura de la matriz bifásica.

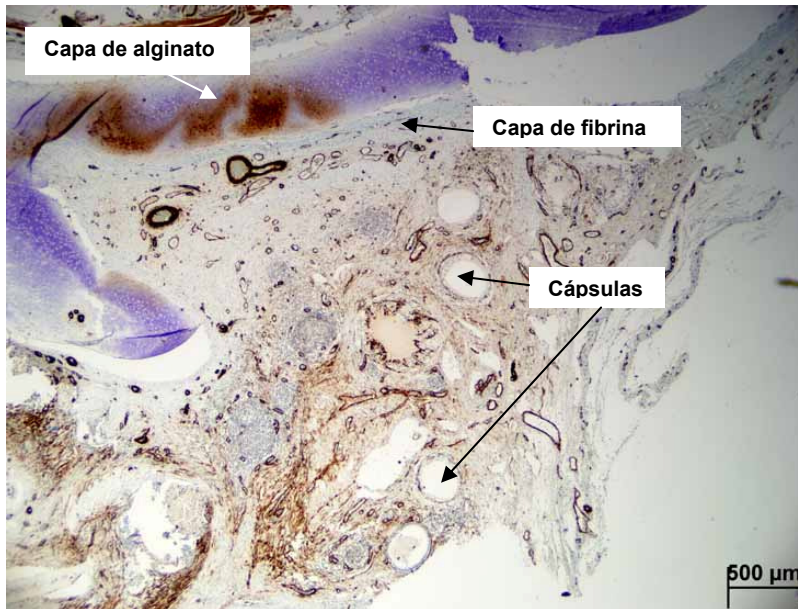


Figura 9.20. Imagen panorámica microscópica de una sección histológica de un muñón bronquial con tinción de actina (color marrón) en el grupo experimental ITC a los 7 días después del implante

En la Figura 9.20. se observa la estructura de la matriz bifásica, donde se pueden apreciar, tanto la capa de alginato (teñida), y la capa de fibrina junto al muñón bronquial. En esta foto se observa claramente, como las cápsulas, inicialmente en la capa de alginato, han migrado hasta el muñón bronquial, formando parte de él. Esto demuestra que la capa de alginato del film, se desestabiliza liberando factores, células, y cápsulas con factores. Además, en esta foto se puede observar como las cápsulas forman parte del muñón bronquial, lo que evidencia la desestabilización de las cápsulas, demostrando la biodegradabilidad de las mismas y la liberación completa de los factores inmovilizados en ellas.

En la Figura 9.21. se muestra una fotografía con el detalle de una cápsula que contiene el factor FGF, capturada dentro del injerto realizado en los animales. Además, en esta Figura se muestra una imagen de la distri-

bución espacial homogénea de las microcápsulas, lo que asegura una acción equilibrada del factor FGF en todos los puntos del injerto en el animal.

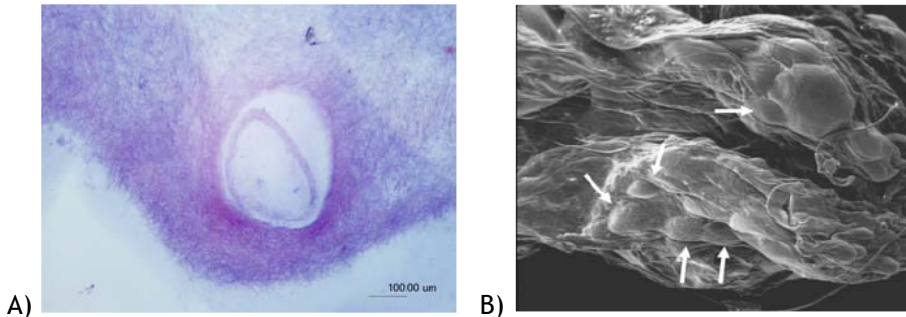


Figura 9.21. A.- Detalle de una cápsula conteniendo FGF en el injerto (microscopía óptica); B.- Microscopía electrónica del injerto que muestra abundantes microcápsulas homogéneamente distribuidas (ver flechas)

ACCIÓN BIOLÓGICA “IN VIVO” DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO LIBERADOS

En cuanto a la acción biológica de los factores de crecimiento “in vivo”, la cuantificación por densitometría de la expresión proteica tisular de los mismos resulta casi imposible, debido tanto al elevado “ruido de fondo” en las técnicas de inmunofluorescencia realizadas, como a que los receptores externos de ambas moléculas parecen bloquearse por el alginato, lo que impide que las determinaciones realizadas resulten fiables. Por ello, la determinación de la actividad biológica del VEGF y el FGF se llevó a cabo de forma indirecta mediante la constatación de su acción sobre los fibroblastos (elevada viabilidad y proliferación “in vivo”) y en la formación de neovasos (adecuada densidad y maduración de los mismos).

GRADO DE RECHAZO DEL IMPLANTE

El rechazo agudo en los injertos de la vía aérea se caracteriza histológicamente por la presencia de infiltrados celulares perivasculares y/o peri-

bronquiales, causantes en último término de isquemia y/o necrosis tisular. De forma general, debemos destacar la ausencia completa de estos signos en todos y cada uno de los grupos del presente estudio.

En los grupos sometidos a implante de matriz de alginato y/o microcápsulas, el grado de reacción inflamatoria de cuerpo extraño es leve e incluso menos intenso que el provocado por el material de sutura quirúrgica, de lo cual se puede deducir que la biocompatibilidad del material es excelente.

Resumiendo, la aplicación “in vivo” de las matrices bifásicas biocompatibles (con factores, células y cápsulas), desarrolladas en este trabajo, producen un efecto cicatrizante y vascularizante en el muñón bronquial, que parece ser efectivo en la prevención de la BPF.

9.4. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha desarrollado un soporte biocompatible de células y factores terapéuticos para un posible tratamiento efectivo de la fístula broncopleural postneumonectomía. Los soportes desarrollados son films bifásicos que constan de dos capas de diferente estructura, una con fibrina que proporciona la adherencia al muñón bronquial, y otra de alginato que proporciona la resistencia mecánica necesaria para su sutura al muñón bronquial. La capa de fibrina incorpora fibroblastos. La capa de alginato incorpora factores de crecimiento VEGF, cápsulas de alginato bórico con factores bFGF en su interior.

Se realizaron estudios de viabilidad celular con diferentes líneas celulares (monocitos, células monoclonales, y fibroblastos) para comprobar la supervivencia de las células inmobilizadas dentro de los films producidos, ya que la viabilidad celular dentro de las cápsulas ya se comprobó en el capítulo 7. Se observó viabilidad celular para las tres líneas celulares, y una tendencia general de crecimiento celular en el caso de los monocitos y los fibroblastos.

Además, se demostró que la aplicación “in vivo” de las matrices bifásicas biocompatibles desarrolladas en este trabajo, producen un efecto cicatrizante y vascularizante en el muñón bronquial, que parece ser efectivo en la prevención de la BPF.

Dada la relevancia de este trabajo, la matriz bifásica fue protegida mediante Patente Europea (EP10153306.5).

9.5. BIBLIOGRAFÍA

- Angelova, N., Hunkeler, D. (1999), “Rationalizing the design of polymeric biomaterials”, *Trends Biotechnol.*, **17**, 409-421.
- Alperin, C., Zandstra, P.W., Woodhouse, K.A. (2005), “Polyurethane Films seeded with embryonic stem cells-derived cardiomyocytes for use in cardiac tissue engineering applications”, *Biomaterials*, **26**, 7377-7386.
- Benoit et al. (1996), “Microencapsulation methods and industrial applications”, *Marcel Dekker, New York*.
- Chan, L., Huey, L., Heng, PWS, (2006), “Mechanisms of external and internal gelation and their impact as a coat and delivery system”, *Carbohydrate polymers*, **63**, 176-187.
- Chen, R.R., Silva, E.A., Yuen, W.W., Mooney, D.J. (2007), “Spatio-temporal VEGF and PDGF delivery patterns blood vessel formation and maturation”, *Pharm. Res.*, **24**, 258-264.
- Darland, D.C., D’Amore, P.A. (1999), “Blood vessel maturation: vascular development comes of age”, *J. Clin. Invest.*, **103(2)**, 157-158.
- De Vos, P, Hamel, A.F., Tatarkiewicz, K. (2002), “Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets”, *Diabetología*, **45**, 159-173.
- Del Valle, E.M.M., Galán, M.A., Herrero, E.P., Varela, G., Aranda, J.L. (2010), “Biocompatible vascularising and cicatrizing drug-delivery matrix”, Patente Europea, EP10153306.5.

- Goto, Y. et al. (1999), “In vitro reconstitution of the tracheal epithelium”, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **20**, 312-318.
- Hermes, R.S., Narayani, R. (2002), “Polymeric alginate Films and alginate beads for the controlled delivery of macromolecules”, *Trends Biomater. Artif. Organs*, **15**, 54-56.
- Jain, K, et al. (1995), “Retrievable, replaceable, macroencapsulated pancreatic islet xenografts. Long-term engraftment without immunosuppression”, *Transplantation*, **59**, 319-324.
- Jiménez, M.F., Varela, G., Novoa, N., Aranda, J.L. (2006), “La lobectomía broncoplástica frente a la neumonectomía en el tratamiento del carcinoma de pulmón no microcítico”, *Arch. Bronconeumol.*, **42**, 160-164.
- Kizilel, S., Garfinkel, M., Opara, E. (2005), “The bioartificial páncreas: progress and challenges”, *Diabetes technology & therapeutics*, **7(6)**, 968-985.
- Kobayashi, K. et al. (2007), “Potential of heterotopic fibroblasts as autologous transplanted cells for tracheal epithelial regeneration”, *Tissue Eng.*, **13**, 2175-2184.
- Nillesen, S.T., Geutjes, P.J., Wismans, R., Schalkwijk, J., Daamen, W.F., van Kuppevelt, T.H. (2007), “Increased angiogenesis and blood vessel maturation in acellular collagen-heparin scaffolds containing both FGF2 and VEGF”, *Biomaterials*, **28**, 1123-1131.

- [Novoa, N., Aranda, J.L., Jiménez, M.F., Varela, G. \(2008\)](#), “Utilidad de la transposición muscular en el cierre de la fístula pleural postneumectomía y de la toracostomía en un único tiempo quirúrgico”, *Cir. Cardiov.*, **15(2)**, 153-158.
- [Orive, G. et al. \(2003\)](#), “Cell encapsulation: promise and progress”, *Nat. Med.*, **9**, 104-107.
- [Orive, G. et al. \(2004\)](#), “History, challenges and promises of cell microencapsulation”, *Trends Biotechnol.*, **22**, 87-92.
- [Perets, A. et al. \(2003\)](#), “Enhancing the vascularisation of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres”, *J. Biomed. Mater. Res. A.*, **65**, 489-497.
- [Richardson, T.P., Peters, M.C., Ennett, A.B., Mooney, D.J. \(2001\)](#), “Polymeric system for dual growth factor delivery”, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 1029-1034.
- [Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J. \(2000\)](#), “Vascular-specific growth factors and blood vessel formation”, *Nature*, **407**, 242-248.

9.6. DIFUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados derivados del Capítulo 9 se difundieron a través de un congreso internacional, un artículo internacional, y una patente europea:

Autores: Eva M.M. Del Valle, Edgar P. Herrero, M.A. Galán
Título: *Immobilization of cells in biocompatible films to cell therapy.*
Congreso: *XVII International Conference on Bioencapsulation*
Ciudad: Groningen, Netherlands.
Fecha: 24-26 Septiembre 2009.
Participación: Póster (P41).

Autores: Eva M. Del Valle, Edgar P. Herrero, Dina A.O. Martins, M.A. Galán
Título: *Inmobilisation of cells in biocompatible films to cell therapy.*
Revista: *The open tissue engineering & regenerative medicine journal*,
 2 (2009) 14-19.

Autores: Eva M. Martín Del Valle, Miguel. A. Galán, Edgar Pérez Herre-
 ro, Gonzalo Varela Simó, Jose Luís Aranda Alcaide.
Título: Biocompatible vascularising and cicatrizing drug-delivery matrix.
Nº registro: Patente europea, *EP 10153306*.
Institución: Universidad de Salamanca.
Fecha: 11/02/2010 - España

A continuación, se adjunta una copia del artículo publicado en la revista internacional *The Open Tissue Engineering & Regenerative Medicine Journal*, así como una copia del documento de registro y el abstract de la Patente Europea:

Immobilisation of Cells in Biocompatible Films to Cell Therapy

Eva. M. Martín Del Valle*, Edgar P. Herrero, Dina A. O. Martins and Miguel. A. Galán

Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, P/Los Caidos S/N, 37008, Salamanca, Spain

Abstract: In this work a new system for immobilisation of cells was developed based on biocompatible alginate barium-films. Films are prepared to allow better control over film thickness and produce better film uniformity, avoiding roughness over film surface that can produce fibrosis and rejection after transplantation.

In this study monocyte, mononuclear and fibroblast cell lines were immobilised in micrometric (≈ 300 microns of thickness) barium alginate films. The system was able to maintain the cell viability of all the three types of cells for at least two weeks after immobilisation, but cell proliferation was only verified for the monocyte and fibroblast cell lines.

Key Words: Immobilisation, alginate barium membranes, cell therapy, cell viability.

INTRODUCTION

Cell therapy is one of the most exciting fields in translational medicine. It stands at the intersection of a variety of rapidly developing scientific disciplines: stem cell biology, immunology, tissue engineering, molecular biology, biomaterials, transplantation biology, regenerative medicine, and clinical research. Cell-based therapy may develop into a new therapeutic platform to treat a vast array of clinical disorders. The aim of cell therapy is to replace, repair or enhance the function of damaged tissues or organs.

The pneumonectomy (pulmonary resection) is a surgical procedure to remove a lung and it is used to excise tumorous tissue arising from lung cancer, and rarely for treatment of tuberculosis. Despite careful selection in the pre-operative period, high rates of early mortality (9.1 %) and morbidity remain after pneumonectomy in our country [1]. One of the most serious complications after the surgical procedure is the post pneumonectomy bronchopleural fistula (BPF). BPF is defined as a communication between the bronchial tree and the pleural space through the bronchial stump that usually results after pulmonary resection [2].

One successful approach to the treatment of this surgical complication is the tissue repairing by polymeric systems containing different cells lines, such as monocytes, mononuclear and fibroblasts [3].

Monocytes are produced by the bone marrow from haematopoietic stem cell precursors and produce growth factors, such as VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) and TNF- α (Tumour Necrosis Factor- α) with molecular weights of 42 KDa, 16 KDa, 27 KDa, respectively, that are very important to the angiogenesis [4-6]. The ideal method to obtain monocytes is the isolation by adherence from peripheral blood mononuclear

cells [7]. Then, in this work mononuclear cells were also used to be able to work with a bigger number of cells.

A fibroblast is a type of cell that synthesises and maintains the extracellular matrix of many animal tissues. Fibroblasts provide a structural framework (stroma) for many tissues, and play a critical role in wound healing. They are the most common cells of connective tissue in animals.

Coverage of the bronchial stump with autologous tissue of fibroblast [8-9], vascular endothelial growth factor (VEGF) [10] and basic fibroblast growth factor (bFGF) [10] reduces the risk of postoperative death due to BPF after pneumonectomy.

Several factors complicate the development of cellular therapies. Of primary importance is protection of the implanted cells from the host's immune system to prevent the freshly grafted cells from attack by native killer cells. A highly undesirable solution to immuno-rejection is the regular administration of a cocktail of immunosuppressants that can result in serious side effects.

In this work, we demonstrate a method for non-autologous cellular transplantation that mitigates immune rejection without immunosuppressants. To do that, cells were immobilised in support with semi-permeable and biocompatible membranes that provide mechanical protection to block entry of immune mediators, allowing outward diffusion of the growth factors produced by the cells to allow treatment of the disease. In addition, this membrane permits the entry of nutrients and oxygen, and the exit of waste [11-15].

During the last years, the major efforts have been dedicated to develop spherical microcapsules to cell therapy [16], but recently other type of cell immobilisation polymeric devices is taking importance, the immobilisation within polymeric films [17]. Cell immobilisation within films presents some advantages in comparison with microcapsules in some kinds of treatments; they are easy to retrieval in case of

*Address correspondence to this author at the Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, P/Los Caidos S/N, 37008, Salamanca, Spain; E-mail: emvalle@usal.es

complications [18] and are useful in tissue repairing [19] and wounds treatment.

In addition, their mechanical strength must be adequate to the applications required. Films will be fixed using sutures by surgery, and in cases as myocardial repair will be exposed to considerable tautness that barium alginate compounds should resist. Mechanical resistance tests have been made to ensure that barium alginate films present an appropriate elastic modulus.

Several studies on the pore size of the microcapsules has been completed. Changes in pore size determine the molecular weight cut-off of factors that can be released. A. Del Pozo *et al.* [20] considered an innovating technique that consists of the microencapsulation of a coloured substance that is available in several molecular weights (10-70 KDa), Rhodamine B isothiocyanate-Dextran. This allows the monitoring of its release by spectrophotometer measure, and as it is available in diverse molecular weights it allows simulate different kinds of molecules, that are of interest. Like microcapsules films must be controlled so factors can be released from cells.

There are two habitual techniques proposed to produce films using alginates: first process consists in dehydrate an alginate layer before crosslinking [21], this technique is not adequate because desiccation process will damage cells; second process consists in extend a thin alginate layer over a Petri dish and then crosslinking [22], this process could be applied to our case, but currently it is difficult to control film thickness and uniformity.

In this paper a relevant and new cellular immobilisation system based on biocompatible alginate barium-films is described. This new way to prepare films allows a better control over film thickness and makes better film uniformity, avoiding roughness over film surface that can produce fibrosis and rejection after transplantation.

Based on this new technology of producing biocompatible films with a high mechanical stability and a specific thickness, the main aim of this work is to achieve the cell immobilisation of different cell lines within the immobilisation system. Cell viability was investigated using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Sodium alginate from macrocystis pyrifera (medium viscosity) was purchased from Sigma Chemicals, barium chloride dihydrate, reagent grade was purchased from Scharlau, cell growth determination kit [3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT solution), and 0.1 N HCl in anhydrous isopropanol (MTT solvent)] was purchased from Sigma Chemicals, complete growth medium consisting of Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) was purchased from GIBCO and supplemented with 10 % foetal calf serum from CAMBREX, 1 % penicillin/streptomycin from GIBCO, and sterilized by filtration through 0.45- μ m membranes obtained from Millipore.

Cell Lines

Different cell lines were used in this study, monocytes and mononuclear cells from peripheral blood were obtained from the Haematology Service of the University Hospital of Salamanca, and fibroblast from the ocular surface of pork obtained from the Tissue Service of the San Francisco Clinic (León).

Production of the Films

1.5×10^6 of monocytes were supplied in 2 mL of medium of culture and diluted with a solution of alginate-medium until 15 mL of 2 % wt. alginate-cell suspension of 1×10^6 cells / mL.

1.36×10^6 of mononuclear cells were supplied in 2 mL of medium of culture and diluted with a solution of alginate-medium until 7 mL of 4 % wt. alginate-cell suspension of 1.95×10^6 cells / mL.

1×10^5 of fibroblast were supplied in 2 mL of medium of culture and diluted with a solution of alginate-medium until 10 mL of 4 % wt. alginate-cell suspension of 1×10^4 cells / mL.

The production of the films was optimised, to control and reduce the thickness (300 microns) maintaining the mechanical strength. The device to generate the biocompatible films (Fig. 1) was composed of two porous plates, fixated in a metallic support, in contact with a gripper. In each part of the device was placed a filter drenched with a 3 % wt. barium chloride. On the plate that was set in the support, was spilled 0.7 mL of a 4 % wt. alginate solution with cells, in the centre of the filter. The other plate was then vertically placed over the first one, and the device was fixed with the gripper. Through the entrance on the top of the device was introduced 4 mL of barium chloride solution so that it could cross the porous plate and contacting with the alginate thus enabling the formation of the gel, which constitutes the membrane.

The immobilisation of monocytes/mononuclear cells and fibroblasts differ in terms of permanence in the device and in a Petri dish with a 15 mL barium chloride solution. Films with monocytes/mononuclear cells were left for ten minutes in the device and another ten minutes in barium chloride solution in the Petri dish. Fibroblast films were left for two minutes in the device and another five minutes in the Petri dish.

There were prepared four films per cell line, which were maintained in Petri dish with 20 mL of complete growth medium DMEM supplemented with 10 % foetal calf serum, 1 % penicillin/streptomycin. The Petri dishes were stored for culturing at 37°C with 5% supply of CO₂ (Forma Direct Heat CO₂ Incubator, Thermo Electron Corporation, Hucoa-Erlöss, and Model 311). The medium was changed each 3 days.

All barium chloride, sodium citrate solutions, were autoclaved using a steam steriliser (P-Selecta, Autester-E) at 121°C for 30 min. The alginate powder was sterilised by exposure to UV radiation during 24 hours.

All the equipment used, including all the glassware were autoclaved at 121°C for 30 min. The whole process was per-

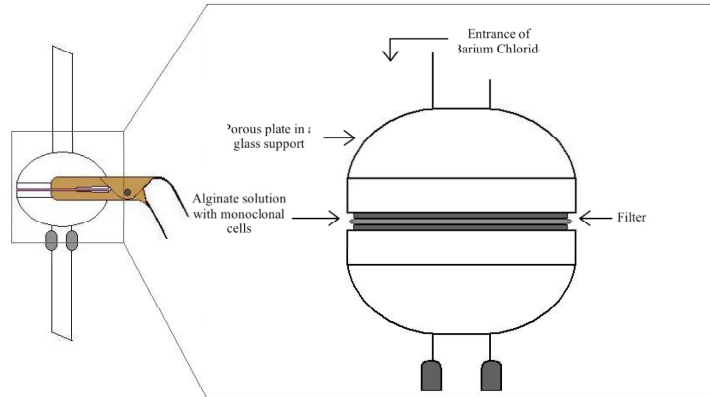


Fig. (1). Device used to prepared films with cells.

formed under sterile conditions in a class II laminar flow hood (Nuaire, Model NO-NU-425-40DE).

Method of Testing Viability of Encapsulated Cells

Encapsulated cell viability was assessed using the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay, first described by Mosmann in 1983 [23]. Previously established procedures, as described by Uludag, were used with some modifications [24]. The reduction of tetrazolium salts is widely accepted as a reliable way to examine the cell viability in microcapsules. This viability test is based on the ability of a mitochondrial dehydrogenase enzyme from viable cells to cleave the tetrazolium rings of the pale yellow MTT and form dark blue formazan crystals, which are largely impermeable to cell membranes, thus, resulting in its accumulation within healthy cells. Solubilisation of the cells by the addition of a detergent results in the liberation of the crystals, which are solubilised. The number of surviving cells is directly proportional to the level of the formazan product created. The colour can then be quantified using a simple colorimetric assay. The results can be quantified by spectrophotometric means.

The viability tests were carried out using 100 μ l of culture medium with testing films per well of a 96-well microplate. Aseptically 20 μ l of MTT solution (Sigma-Aldrich, USA, 5 mg/ml in RPMI-1640) were added to each well and incubated at 37 $^{\circ}$ C for 3.5 h. After the incubation period, cultures were removed from incubator and the resulting MTT formazan crystals were dissolved adding the MTT solvent (0.1 N HCl in anhydrous isopropanol) directly to the culture in an amount equal to the original culture volume (100 μ l). Wells were read within 1 hour after adding MTT solvent. Pipetting up and down (trituration) is required to completely dissolve the MTT formazan crystals. Absorbance of each well was then measured in a spectrophotometer using a wavelength of 570 nm, with reference wavelength set at 690 nm. Blanks consisting of complete culture medium without cells were also analysed.

RESULTS AND DISCUSSION

Preliminary Characterization

The polymeric films were characterized previously and the best properties were chosen having good mechanical strength and the optimal pore size [20]. The size of the pores of the slab should be in range between 16-42 KDa to allow the release of the growth factors that the cells secrete. When the concentration of sodium alginate increases, the rhodamine release also increases, because the pore size is bigger [20]. In addition, a high mechanical resistance is required to allow the suture of the film in tissues, and it is achieved with high concentration of alginate and barium chloride; alginate concentration (2 and 4 % wt.), and a barium concentration of 3.0 % wt.

Cell Calibration

MTT assay gives absorbance values, but these values have to be associated to a quantity of living cells. A calibration was made to relate absorbance values and living cells number. Known numbers of cells were disposed in a multiwell plate and MTT assay was performed. A calibration curve was obtained; this curve represents number of known living cells vs. absorbance.

a) Monocytes

Initial cell suspension of monocytes had a cell concentration of 1.18×10^6 cells in 1235 μ L. Different volumes (Table 1) were taken from the initial suspension of cells in culture medium, to obtain different known cell number, and were disposed in a multiwell plate and all the volumes were filled with fresh medium of culture until to 200 μ L to perform the MTT assay. Fig. (2) show the calibration curves to the monocytes cell line.

b) Mononuclear Cells

Initial cell suspension of mononuclear cells had a cell concentration of 6.5×10^6 cells/ μ L. Different volumes (Table 2) were taken from the initial suspension of cells in culture

Table 1. Quantity of Monocyte for Calibration

V, μ L	200	160	140	120	100	80	60	40	20	10	5
Cells / 10^3	191	153	134	115	96	76	57	38	19	9,5	4,8

Table 2. Quantity of Mononuclear Cells for Calibration

V, μ L	150	130	120	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	5
Cells / 10^6	6,5	5,6	5,2	4,3	3,9	3,5	3,0	2,6	2,2	1,7	1,3	0,9	0,4	0,2

medium, to obtain different known cell number, and were disposed in a multiwell plate and all the volumes were filled with fresh medium of culture until to 150 μ L to perform the MTT assay. Fig. (3) show the calibration curves to the mononuclear cell line.

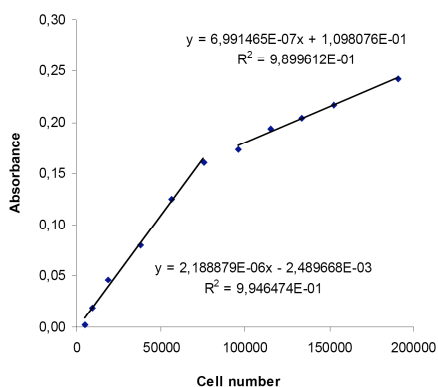


Fig. (2). Cell calibration to the monocytes cell line.

b) Fibroblasts

Initial cell suspension of fibroblast had a cell concentration of 1.0×10^6 cells / μ L. Different volumes (Table 3) were taken from the initial suspension of cells in culture medium, to obtain different known cell number, and were disposed in a multiwell plate and all the volumes were filled with fresh medium of culture until to 150 μ L to perform the MTT assay. Fig. (4) show the calibration curves to the fibroblast cell line.

Viability of Encapsulated Cells

The main aim in the present work is to achieve the viability of cells immobilised in the alternative supports of films

Table 3. Quantity of Fibroblast for Calibration.

V, μ L	150	140	130	100	80	60	20	10	5
Cells / 10^5	1.5	1.4	1.3	1.0	0.8	0.6	0.2	0.1	0.05

produced by gelation processes. For the review of literature immobilisation of these cell lines was not achieved before.

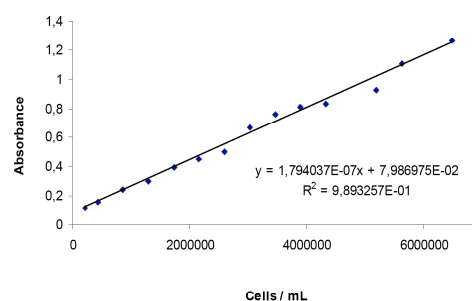


Fig. (3). Cell calibration to the mononuclear cell line.

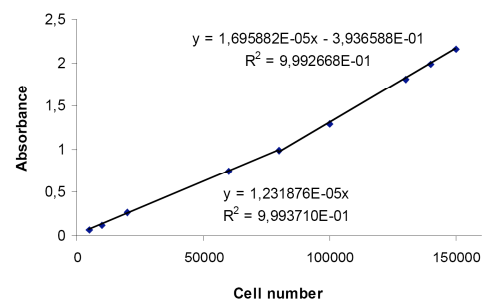


Fig. (4). Cell calibration to the fibroblast cell line.

To test whether the cells could survive within the micro-metric alginate-barium films, the cell viability was monitored using an MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay.

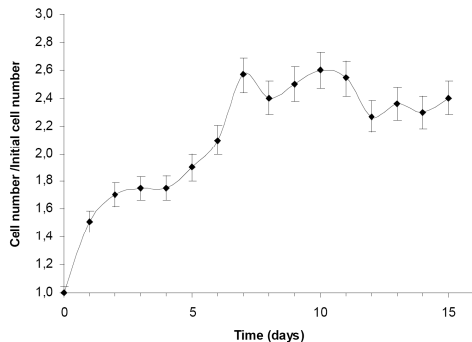


Fig. (5). Cell viability for monocytes.

According to Fig. (5), in the first day after immobilisation of monocytes cell line, cell population increases 50% with respect to the initial cells quantity. Cells continue proliferating and reach repeatedly local maximums. Generally analysing the variation of cell viability in the barium alginate membranes produced, related to the initial number, it's possible to see a general trend of cell proliferation.

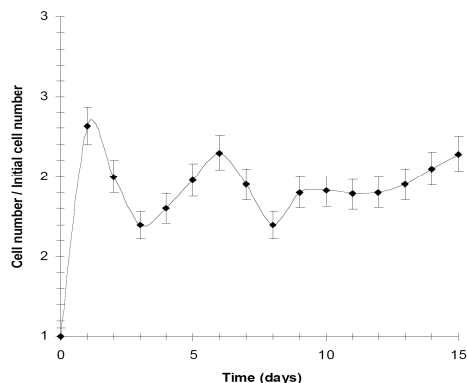


Fig. (6). Cell viability for mononuclear cells.

In the case of the mononuclear cell line (Fig. 6), analysing the data in the fifteen days of the analysis it can be referred that the used system Ba-ALG allows cell viability but doesn't permit cell proliferation. There isn't any trend of cell growth, but the number of viable cells has remained at or above the initial value.

With fibroblast cell line (Fig. 7), generally analysing the variation of cell viability in the barium alginate membranes produced, related to the initial number, it's possible to see that cell proliferation occurs since it is detected a quantity of cells always higher than the initial amount. On the other hand, there are two reading points discordant of the trend of cell proliferation that can be explained by not significant sample, which contained a smaller quantity of cells then expected.

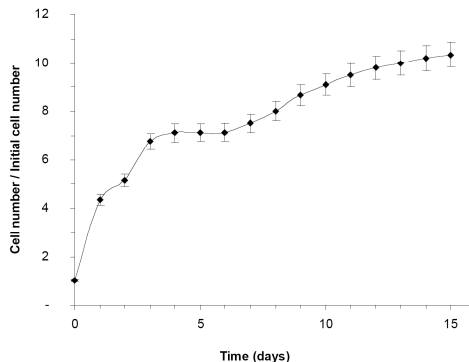


Fig. (7). Cell viability for fibroblast.

The data variation could be justified by the fact that not all films contain the same number of cells, and ELISA measure depends on the sample chosen; however, cell viability in Ba-ALG membranes is assure in all cases for at least fifteen days; all measures are over the initial cell quantity. A certain cell proliferation inside the film is proved in two cell lines.

CONCLUSIONS

In this study, was successfully achieved, the immobilisation of monocyte, mononuclear and fibroblast cell lines, in micrometric (≈ 300 microns of thickness) barium alginate membranes with supplemented growth medium, based on gelification processes.

The system used proved to be a good alternative to encapsulate the types cells mentioned, revealing itself an suitable system to maintain cell viability of all the three types of cells and enable cell proliferation of monocyte and fibroblast cell lines for at least fifteen days.

ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge Haematology Service of the University Hospital of Salamanca and Tissue Service of the San Francisco Clinic (León, Spain) for the cells provided. This research was supported by funds from the Ministry of Science and Education (MEC) and Savings Bank Federation of Castilla y León. The authors gratefully acknowledge the financial support.

REFERENCES

- [1] Jimenez MF, Varela G, Novoa N, *et al.* La lobectomía broncoplastica frente a la neumonectomía en el tratamiento del carcinoma de pulmón no microcítico. *Arch Bronconeumol* 2006; 42: 160-64.
- [2] Cerfolio RJ. The incidence, etiology, and prevention of postresectional bronchopleural fistula. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 13: 3-7.
- [3] Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, *et al.* Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A* 2003; 65: 489-97.
- [4] Gerber HP, Vu TH, Ryan, AM, *et al.* VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999; 5: 623-28.

- [5] Shaulian E. Induction of Mdm2 and enhancement of cell survival by bFGF. *Oncogene* 1997; 15(22): 2717-25.
- [6] Montrucchio G. Tumor necrosis Factor α -induced angiogenesis depends on *in situ* platelet-activating factor biosynthesis. *J Exp Med* 1994; 180: 377-82.
- [7] Bennett S, Breit SN. Variables in the isolation and culture of human monocytes that are of particular relevance to studies of HIV. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 236-40.
- [8] Kobayashi K, Suzuki T, Nomoto Y, *et al.* Potential of heterotopic fibroblasts as autologous transplanted cells for tracheal epithelial regeneration. *Tissue Eng* 2007; 13: 2175-84.
- [9] Goto Y, Noguchi Y, Nomura A, *et al.* *In vitro* reconstitution of the tracheal epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20: 312-18.
- [10] Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, *et al.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-48.
- [11] Benita S. Microencapsulation methods and industrial applications. Marcel Dekker: New York, 1996.
- [12] Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, *et al.* Cell encapsulation: promise and progress. *Nat Med* 2003; 9: 104-7.
- [13] Angelova N, Hunkeler D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends Biotechnol* 1999; 17: 409-21.
- [14] Orive G, Hernandez RM, Gascon AR, *et al.* History, challenges and promises of cell microencapsulation. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 87-92.
- [15] De Vos P, Hamel AF, Tatarkiewicz K. Considerations for successful transplantation of encapsulated pancreatic islets. *Diabetologia* 2002; 45: 159-73.
- [16] Herrero EP, Del Valle EMM, Galan MA. Immobilisation of Mesenchymal stem cells and monocytes in biocompatible microcapsules to cell therapy. *Biotechnol Prog* 2007; 23: 940-45.
- [17] Jain K, Yang H, Cai B-R, *et al.* Retrievable, replaceable, macroencapsulated pancreatic islet xenografts. Long-term engraftment without immunosuppression. *Transplantation* 1995; 59: 319-24.
- [18] Kizilel S, Garfinkel M, Opara E. The bioartificial pancreas: progress and challenges. *Diabetes technology & therapeutics* 2005; 7(6): 968-85.
- [19] Alperin C, Zandstra PW, Woodhouse KA. Polyurethane films seeded with embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for use in cardiac tissue engineering applications. *Biomaterials* 2005; 26: 7377-86.
- [20] Del Pozo A, Del Valle EMM, Galan MA. Kinetic diffusion studies of alginate-calcium and alginate barium microcapsules and determination of influence of factors implied in their production using doe. Submitted to be published to *Journal of Membrane Science* (2007).
- [21] Hermes RS, Narayani R. Polymeric alginate films and alginate beads for the controlled delivery of macromolecules. *Trends Biomater Artif Organs* 2002; 15: 54-6.
- [22] Wan Chan L, Huey Ying L, Heng PWS. Mechanisms of external and internal gelation and their impact as a coat and delivery system. *Carbohydrate polymers* 2006; 63: 176-87.
- [23] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- [24] Uludag H, Sefton MV. Microencapsulated human hepatoma (Hepg2) cells-*in vitro* growth and protein release. *J Biomed Mater Res* 1993; 27: 1213-24.

Received: October 8, 2008

Revised: January 15, 2009

Accepted: February 11, 2009

© Del Valle *et al.*; Licensee Bentham Open.This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.



Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	753677	
Application number	EP10153306.5	
File No. to be used for priority declarations	EP10153306	
Date of receipt	11 February 2010	
Your reference	EP1367.36	
Applicant	UNIVERSIDAD DE SALAMANCA	
Country	ES	
Title	Bicompatible vascularising and cicatrizing drug-delivery matrix	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml DESC.pdfDESCRIP.pdf (19 p.) ABST.pdfABSTRACT.pdf (1 p.) f1002-1.pdf (1 p.) f1002-3.pdf (1 p.) f1002-5.pdf (1 p.)	ep-request.xml ep-request.pdf (4 p.) CLMS.pdfCLAIMS.pdf (3 p.) DRAW.pdfDRAWINGS.pdf (2 p.) f1002-2.pdf (1 p.) f1002-4.pdf (1 p.)
Submitted by	CN=A. Pons Arino 7414,O=Pons Patentes y Marcas Internacional, S.L.,C=ES	
Method of submission	Online	
Date and time	11 February 2010, 14:05 (CET)	

Acknowledgement of receipt - application number EP10153306.5

Page 1 of 2

**BIOCOMPATIBLE VASCULARISING AND CICATRIZING DRUG-
DELIVERY MATRIX**

5

OBJECT OF THE INVENTION

The main object of the present invention relates to a biocompatible drug-delivery matrix that allows the vascularization, cicatrization and the
10 regeneration of tissues, a method to develop it, and the use to vascularize and cicatrize tissues.

Matrixes obtained by the method comprise at least the release of one bioactive-molecule.

15

BACKGROUND OF THE INVENTION

Tissue engineering has been an active field of research for several decades now. However, its clinical application is still limited due to some unsolved
20 problems, such as the poor blood supply for the allografts in the initial phase after implantation. Insufficient vascularisation can lead to improper cell integration or cell death in tissue-engineered constructs.

Sometimes it is necessary to remove an organ or part of it (e.g., the lung), due to cancer or other illnesses. After whole lung removal (what we call a
25 pneumonectomy), one of the most feared complications is post pneumonectomy bronchopleural fistula (BPF), communication between the bronchial tree and the pleural space through the bronchial stump responsible for patient deterioration, infection and finally death "*Cerfolio RJ. The incidence, etiology, and prevention of postresectional bronchopleural fistula. Semin Thorac Cardiovasc Surg 2001; 13: 3-7.*" "*Jiménez MF, Varela*
30

CAPÍTULO 10: CONCLUSIONES FINALES

10. CONCLUSIONES FINALES.

En esta tesis doctoral se ha desarrollado y caracterizado una nueva técnica de generación de cápsulas, basada en la generación de gotas por procesos de atomización neumática y su posterior estabilización mediante la reacción de gelificación iónica, que produce cápsulas con un reducido tamaño comprendido entre 20 y 50 micras, con distribuciones de tamaño de partícula estrechas, y con un control total del tamaño de partícula mediante la variación del caudal del líquido y del aire, así como la viscosidad del líquido.

Con este trabajo se solucionan los problemas existentes en cuanto a biocompatibilidad y tamaño para su aplicación en nuevas vías terapéuticas y de diagnóstico, mediante inyección Hamilton y aerosoles, ya que se consiguen cápsulas con tamaños en el rango requerido, y sin la utilización de disolventes orgánicos ni condiciones drásticas de producción, sin la utilización de productos químicos añadidos más que el alginato sódico y el cloruro bórico.

Esta técnica fue mejorada con la inclusión de un tanque presurizado, que permitía la pulverización de líquidos de cualquier viscosidad a cualquier caudal, y con la automatización de todas las variables involucradas en el proceso. Dada la relevancia de este trabajo, la nueva técnica de generación de cápsulas ha dado lugar a una Patente Europea (EP10153319.8).

Se desarrolló un modelo, tomando como base la teoría de ondas, para un mejor entendimiento del mecanismo de generación de las cápsulas.

Se propuso un modelo semi-empírico para predecir el tamaño de las cápsulas obtenidas con la técnica desarrollada, sin necesidad de experimentación, lo que será de gran utilidad a la hora de elegir los parámetros para generar cápsulas de un determinado tamaño.

Además, se desarrolló un modelo teórico de inestabilidad, mediante un análisis de estabilidad temporal, que explica el proceso de ruptura de la hoja líquida por la acción del aire y predice el tamaño final de las cápsulas, teniendo en cuenta los mecanismos de atomización primaria y secundaria.

Comparando la predicción realizada con el modelo semi-empírico y la predicción del modelo teórico, se puede observar que el modelo real del proceso (modelo de inestabilidad), se ajusta con mayor precisión a los datos experimentales que el modelo semi-empírico, que se puede utilizar como una primera aproximación para describir tanto la tendencia como el tamaño final de las microcápsulas.

Con el objetivo de conocer el comportamiento real de las microcápsulas en el cuerpo humano, para su utilización en cualquiera de sus múltiples aplicaciones en el campo de la biomedicina, fueron realizados estudios “in vitro” de transferencia de materia, tanto en discontinuo como en continuo, para simular la liberación de proteínas hacia medios fisiológicos o a través de tejidos u órganos, respectivamente.

En estos estudios se puso de manifiesto la importancia de las interacciones electrostáticas entre el alginato y las proteínas en el proceso de liberación de proteínas, de tal forma que se abren nuevas perspectivas para la técnica desarrollada, pudiéndose aplicar en procesos de reconocimiento de proteínas.

En base al trabajo realizado en esta tesis, la técnica desarrollada fue aplicada en un posible tratamiento de la esclerosis múltiple, mediante la inmovilización de células madre mesenquimales y monocitos, en el reconocimiento de proteínas aplicándose al diagnóstico de la esclerosis múltiple, y en la prevención de la fístula broncopleural postneumonectomía, a través del desarrollo de matrices bifásicas biocompatibles que parecen ser efectivas en la prevención de esta complicación en la cirugía del pulmón.

La importancia de las aplicaciones que tiene la técnica de generación de cápsulas desarrollada en este trabajo se refleja en la generación de una Patente Europea EP10153306.5., y una Patente Americana US 61/241,994.

FINAL CONCLUSIONS

It has been developed and characterized a new technique for the generation of capsules, based on the generation of drops by pneumatic atomization processes and the subsequent stabilization of the drops through the ionic gelation reaction, which produces capsules with a small size, between 20 and 50 microns, with a narrow particle size distributions and with full control of particle size by varying the liquid and air flow rates and the fluid viscosity. This technique solves the current problems in terms of biocompatibility and size for the application in new diagnostic and therapeutic treatments by injection Hamilton and aerosols.

This technique was improved with the inclusion of a pressurized tank, allowing the spraying of liquids of any viscosity at any flow, and the automation of all the variables involved in the process. Given the relevance of this work, the new technique of generation of capsules has led to a European Patent (EP10153319.8).

The technique developed here was modeled, based on wave theory, to a better understanding of the mechanism of generation of the capsules. It was proposed a semi-empirical model to predict the size of the capsules without experimentation. Also, it was developed a theoretical model (instability model) through a temporal stability analysis, which explains the process of breaking the liquid sheet by the action of air, and predicts the final size of the capsules, taking into account the mechanisms of primary and secondary atomization. Comparing both, the prediction with semi-empirical model, and the prediction of the theoretical model, it is possible to observe that the real model of the process (model instability), fits, more accurately, the experimental data that the semi-empirical model, which can be used as a first approximation to describe both the trend as the final size of the microcapsules.

In order to understand the real behavior of the microcapsules in the human body for its use in any of its multiple applications in the field of biomedicine, steady and unsteady mass transfer studies were performed in

vitro to simulate the release of proteins to physiological media or through tissues or organs, respectively. These studies highlighted the importance of electrostatic interactions between the alginate and proteins in the process of release of proteins, so that open new perspectives for the technique developed here that could be applied in protein recognition processes.

The technique has been applied in a possible treatment for multiple sclerosis, by immobilization of mesenchymal stem cells and monocytes, in recognition of protein, applied to the diagnosis of multiple sclerosis, and the prevention of bronchopleural fistula postneumonectomía, through the development of biphasic biocompatible matrices that seems to be effective in the prevention of this complication in the surgery of the lung. The importance of the applications that have the technique developed in this work is reflected in the generation of a European Patent EP10153306.5, and an American Patent (US 61/241,994).

APÉNDICES

APÉNDICE I: MATERIALES Y MÉTODOS

1. PRODUCTOS QUÍMICOS Y BIOLÓGICOS

- Aire sintético ALPHAGAZ AIRE. Air Liquide España.
- Alginato sódico (Macrocystis Pyrifera) de viscosidad media. Sigma.
- Cloruro de bario deshidratado. Calidad de reactivo. Scharlau.
- Rodamina B Isotiocianato dextrano (10-40-70 kDa). Sigma.
- Kit de determinación del crecimiento celular basado en MTT. Solución MTT [3 - (4,5 - dimetiltiazol - 2 - il) - bromuro 2,5 - difeniltetrazolio] y disolvente MTT (0,1 N HCl en isopropanol). Sigma.
- Medio completo de cultivo DMEM. Gibco. Invitrogen Corporation.
- Penicilina - Estreptomicina. Gibco. Invitrogen Corporation.
- Suero Fetal Bovino estéril para cultivo celular de origen sudamericano. Cambrex.
- Células madre mesenquimales procedentes de medula ósea de pacientes sanos. Suministradas por el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca.
- Monocitos y células monoclonales procedentes de sangre periférica de donantes sanos. Suministradas por el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca.

2. MATERIAL UTILIZADO

- Analizador del tamaño de partícula por difracción de láser. Microtac. Leeds and Northrup.
- Analizador del tamaño de partícula por difracción de láser. Mastersizer 2000. Malvern.
- Microscopio óptico (DM1000) con cámara científica incorporada (DFC280). Leica.
- Balanza analítica 2442 Satorius-Werke, Explorer Ohaus.
- Balanza granataria JADEVER, AW-5500.
- Agitador magnético P-SELECTA, con controlador de agitación.
- Agitador magnético VELP Scientifica, Are2, con controlador de agitación.
- Agitador JANKE and JUNKEL GMBH & CO, IKA Labortechnik.
- Agitador orbital Polymax 1040. Heidolph.
- Agitador orbital. OVAN.
- Baño de ultrasonidos. KERRY.
- Viscosímetro rotacional VISCO ELITE. Fungilab S. A.
- Baño termostatzado. SBS.
- Baño termostatzado con recirculación. P-SELECTA FRIGITERM.
- Espectrofotómetro UVIKON 922. KONTROL INSTRUMENTS.
- 2 Bombas peristálticas 101F/R. Watson Marlow.
- Centrífuga IEC Centra MP4R. Internacional Equipment Co.
- Incubador de CO₂ modelo 311. Forma direct heat CO₂ incubator, Thermo Electron Corp., Hucoa-Erloss.
- Autoclave de vapor Autester-E. P-Selecta.
- Campana de flujo laminar de tipo II modelo NO-UN-425-40DE. Nuaire.
- Lector de placas Expert Plus. ASYS.
- Rotámetro con válvula incorporada 1/4'' 20 P-3/37. ABB.

- Válvula de apertura HE-3/8-D-MINI. Festo.
- Medidor de presión MAP-40-1-1/8-EN. Festo.
- Filtro LF-3/8, serie D. Festo.
- Interruptor de presión Ceraphant T. Endress + Hauser.
- Regulador manual de presión LR-1/4-D-7-MINI. Festo.
- Regulador proporcional de presión MPPE-3-1/8-1-420-B. Festo.
- Regulador proporcional de presión MPPE-3-1/8-6-420-B. Festo.
- Caudalímetro másico por principio térmico t-mass S AT70. Endress + Hauser.
- Válvula de bola de tres vías BVT34. InterApplA.
- Suministrador de potencia 5-240 Watts, DNR Series. XP.
- Boquilla atomizadora 1/8 JJAU.
- Boquilla atomizadora PulsaJet 1/8 10000JJAU.
- Micropipetas semiautomáticas Pipetman. Gilson.
- Puntas de micropipetas Diamond. Gilson.
- Filtros de membrana de nylon de 0,45 µm. Scharlau.
- Placas Petry. J. D. Catalán S. L.
- Tubos de centrífuga 30 mL. Sarstedt.
- Frascos de cultivo de tejidos. IWAKI.
- Cubeta de continuo. Hellma.
- Cubetas de discontinuo. Kartell.
- Material de vidrio. Scharlau.

3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

A) MEDICIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

Se ha obtenido la distribución del tamaño de partícula de las microcápsulas producidas por difracción láser. Para ello, se han utilizado los analizadores de tamaño de partícula, Microtac (Leeds and Northrup), y Mastersizer2000 (Malvern).

Estos dispositivos utilizan el fenómeno de la dispersión de la luz de un haz de láser proyectado a través de la corriente de partículas. La cantidad y la dirección de la luz dispersada por las partículas son medidas por una matriz de detectores ópticos y después es analizada por un microcomputador que calcula la distribución de tamaños de las partículas en la corriente muestra. Un esquema del fenómeno se muestra en la Figura A1.1. La difracción láser ofrece múltiples ventajas, como tiempos de medición cortos, buena reproducibilidad y precisión, calibración sencilla, amplio intervalo de medición y elevada versatilidad.

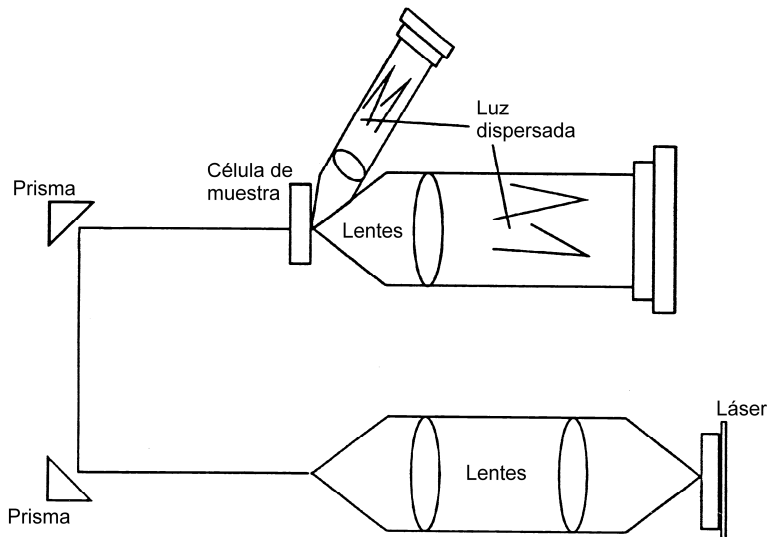


Figura A1.1. Sistema óptico de medida de las partículas

El analizador del tamaño de partícula consta de un recirculador de muestra, un módulo de medida y un módulo de control por ordenador (ver Figura A1.2.). En el recirculador de muestra, el sistema de manipulación del fluido bombea agua de un depósito a través de tuberías hasta el fondo de la célula de muestra, localizada en el módulo de medida. El fluido sale por la parte superior de la célula de muestra y vuelve al depósito. El sistema de manipulación del fluido es directamente manejado por el operador. La muestra es añadida manualmente al depósito y mezclada con el fluido recirculado de tal forma que una corriente de partículas bien dispersadas pase continuamente a través de la célula de muestra para el análisis.

Es necesaria la dispersión de la muestra para conseguir una muestra no aglomerada. Por ello se utiliza un baño de ultrasonidos para dispersar la muestra antes de añadirla al depósito.

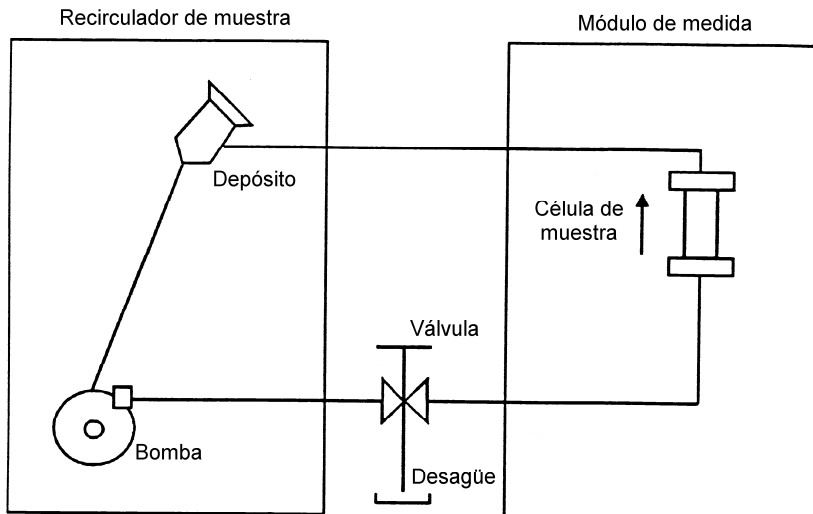


Figura A1.2. Diagrama de flujo del sistema de muestreo

El módulo de medida y el módulo de control por ordenador funcionan de la siguiente manera: un haz de láser es proyectado a través de una célula

de muestra transparente que contiene una corriente de partículas en movimiento suspendidas en un fluido. Los rayos de luz que golpean las partículas son dispersados en ángulos inversamente proporcionales al tamaño de partícula. La matriz de fotodetectores mide la cantidad de luz a determinados ángulos. Las señales eléctricas, proporcionales a los valores de flujos de luz medidos, son entonces procesadas por un microordenador para formar un histograma multicanal de la distribución del tamaño de partícula como se muestra en la Figura A1.3.

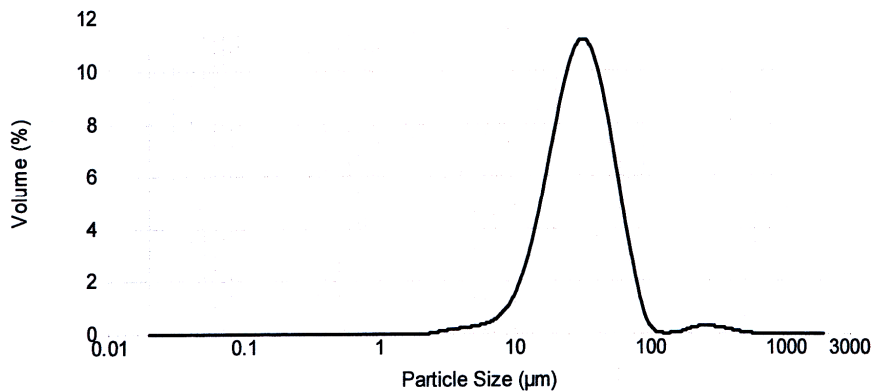


Figura A1.3. Ejemplo de una distribución del tamaño de partícula

B) ANÁLISIS DE LA IMAGEN

Las fotografías de las microcápsulas fueron tomadas a través de una cámara científica (LEICA DFC280) conectada a un microscopio óptico (LEICA DM1000) (Figura A1.4.). Las imágenes son enviadas a un ordenador, donde son tratadas con un software de tratamiento de imágenes (LEICA IM1000), que permite insertar la escala y realizar mediciones en las fotografías.



Figura A1.4. Microscopio Leica DM1000

El Microscopio:

El microscopio compuesto es un instrumento óptico que se emplea para aumentar o ampliar las imágenes de objetos y organismos no visibles a simple vista. El microscopio óptico común está conformado por tres sistemas: el sistema mecánico, el sistema óptico, y el sistema de iluminación.

El sistema mecánico está constituido por una serie de piezas en las que van instaladas las lentes que permiten el movimiento para el enfoque. El sistema óptico comprende un conjunto de lentes dispuestas de tal manera que produce el aumento de las imágenes que se observan a través de ellas. El

sistema de iluminación comprende las partes del microscopio que reflejan, transmiten y regulan la cantidad de luz necesaria para efectuar la observación a través del microscopio.

La parte mecánica del Microscopio:

La parte mecánica del microscopio comprende: el pie, el tubo, el revólver, el asa, la platina, el carro, el tornillo macrométrico y el tornillo micrométrico. Estos elementos sostienen la parte óptica y de iluminación, además permite los desplazamientos necesarios para el enfoque del objeto.



Figura A1.5. Platina del microscopio

- **El pie.** Constituye la base sobre la que se apoya el microscopio y tiene por lo general forma de Y o bien es rectangular
- **El tubo.** Tiene forma cilíndrica y está ennegrecido internamente para evitar las molestias que ocasionan los reflejos de la luz. En su extremidad superior se colocan los oculares.
- **El revólver.** Es una pieza giratoria provista de orificios en los cuales se enroscan los objetivos. Al girar el revólver, los objetivos pasan por el eje del tubo y se colocan en posición de trabajo, la cual se nota por el ruido de un piñón que lo fija.

- **La columna**, llamada también asa o brazo, es una pieza colocada en la parte posterior del aparato. Sostiene el tubo en su porción superior y por el extremo inferior se adapta al pie.
- **La platina (Figura A1.5.)**. Es una pieza metálica plana en la que se coloca la preparación u objeto que se va a observar. Presenta un orificio en el eje óptico del tubo que permite el paso de los rayos luminosos a la preparación. La platina puede ser fija, en cuyo caso permanece inmóvil; en otros casos puede ser giratoria, es decir, mediante tornillos laterales puede centrarse o producir movimientos circulares.
- **Carro**. Es un dispositivo colocado sobre la platina que permite deslizar la preparación con movimiento ortogonal de adelante hacia atrás y de derecha a izquierda.
- **El tornillo macrométrico**. Girando este tornillo, asciende o desciende el tubo del microscopio, deslizándose en sentido vertical gracias a una cremallera. Estos movimientos largos permiten el enfoque rápido de la preparación.
- **El tornillo micrométrico**. Mediante el movimiento casi imperceptible que produce al deslizar el tubo o la platina, se logra el enfoque exacto y nítido de la preparación. Lleva acoplado un tambor graduado en divisiones de 0,001 mm que se utiliza para precisar sus movimientos y puede medir el espesor de los objetos.

El sistema Óptico:

El sistema óptico es el encargado de reproducir y aumentar las imágenes mediante el conjunto de lentes que lo componen. Está formado por los oculares y los objetivos.

Los oculares. Los oculares están constituidos generalmente por dos lentes, dispuestas sobre un tubo corto. Los oculares generalmente más utilizados son

los de: 8X, 10X, 12.5X, 15X. La X se utiliza para expresar en forma abreviada los aumentos.

Los objetivos (Figura A1.6.). Los objetivos producen aumento de las imágenes de los objetos y organismos y, por tanto, se hallan cerca de la preparación que se examina. Los objetivos utilizados corrientemente son de dos tipos: objetivos secos y objetivos de inmersión. Los objetivos secos se utilizan sin necesidad de colocar sustancia alguna entre ellos y la preparación. En la cara externa llevan una serie de índices que indican el aumento que producen, la abertura numérica y otros datos. El número de objetivos varía con el tipo de microscopio y el uso a que se destina. Los aumentos de los objetivos secos más frecuentemente utilizados son: 6X, 10X, 20X, 40X y 50X. El objetivo de inmersión está compuesto por un complicado sistema de lentes. Para observar a través de este objetivo es necesario colocar una gota de aceite de cedro entre el objetivo y la preparación, de manera que la lente frontal entre en contacto con el aceite de cedro. Generalmente, estos objetivos son de 100X y se distingue por uno o dos círculos o anillos de color negro que rodea su extremo inferior. Los objetivos se disponen en una pieza giratoria denominada revólver.



Figura A1.6. Objetivos del microscopio óptico

El sistema de Iluminación:

Este sistema tiene como finalidad dirigir la luz natural o artificial de tal manera que ilumine la preparación u objeto que se va a observar en el microscopio. Comprende los siguientes elementos:

- **El espejo.** Tiene dos caras: una cóncava y otra plana. Goza de movimientos en todas las direcciones. La cara cóncava se emplea de preferencia con iluminación artificial, y la plana, para iluminación natural (luz solar). Modernamente se prescinde del espejo en la fabricación de microscopios, ya que éstos traen incorporada una lámpara colocada en el eje del microscopio.
- **Condensador.** El condensador está formado por un sistema de lentes, cuya finalidad es concentrar los rayos luminosos sobre el plano de la preparación. El condensador se halla debajo de la platina. El condensador puede deslizarse sobre un sistema de cremallera mediante un tornillo que determina su movimiento ascendente o descendente.
- **Diafragma.** Generalmente, el condensador está provisto de un diafragma-iris, que regula su abertura y controla la calidad de luz que debe pasar a través del condensador.

La trayectoria del rayo de luz a través del microscopio es la siguiente. El haz luminoso procedente de la lámpara pasa directamente a través del diafragma al condensador. Gracias al sistema de lentes que posee el condensador, la luz es concentrada sobre la preparación a observar. El haz de luz penetra en el objetivo y sigue por el tubo hasta llegar el ocular, donde es captado por el ojo del observador.

Propiedades del Microscopio:

Poder separador. También llamado a veces poder de resolución, es una cualidad del microscopio, y se define como la distancia mínima entre dos puntos próximos que pueden verse separados. El ojo normal no puede ver separados dos puntos cuando su distancia es menor a una décima de milímetro. En el microscopio óptico, el poder separador máximo conseguido es de 0,2 décimas de micra.

Poder de definición. Se refiere a la nitidez de las imágenes obtenidas, sobre todo respecto a sus contornos. Esta propiedad depende de la calidad y de la corrección de las aberraciones de las lentes utilizadas.

Aumento del microscopio. En términos generales se define como la relación entre el diámetro aparente de la imagen y el diámetro o longitud del objeto. Esto quiere decir que si el microscopio aumenta 100 diámetros un objeto, la imagen que estamos viendo es 100 veces mayor que el tamaño real del objeto. Para calcular el aumento de un microscopio, basta multiplicar el aumento del ocular por el aumento del objetivo.

Campo del microscopio. Es el círculo visible que se observa a través del microscopio. También podemos definirlo como la porción del plano visible observado a través del microscopio. Si el aumento es mayor, el campo disminuye, lo cual quiere decir que el campo es inversamente proporcional al aumento del microscopio.

C) MEDIDA DE LA VISCOSIDAD.

Se ha utilizado un viscosímetro rotacional (Visco Elite, Fungilab S.A.) para medir la viscosidad del líquido (Figura A1.7.). El principio de medida se basa en aplicar una velocidad de giro constante y medir la resistencia (par de torsión) que ofrece la muestra al giro del rotor, es decir, este tipo de equipos se basan en la resistencia a la torsión que ofrece un líquido al giro de un husillo de características conocidas, sumergido en el líquido.



Figura A1.7. Viscosímetro rotacional

Básicamente, el cilindro o disco móvil (husillo) está acoplado con un muelle al árbol motor que gira a una determinada velocidad constante, impulsando el husillo. El ángulo de desviación del eje se mide electrónicamente dando la medida de la torsión. Cuanto más viscoso sea el líquido de la muestra, el motor requerirá de más energía para alcanzar su velocidad de giro prefijada. Esto es debido a que el motor requiere aplicar un par de torsión suficiente para vencer la resistencia que le ofrece el líquido viscoso a estudio (Figura A1.8.).

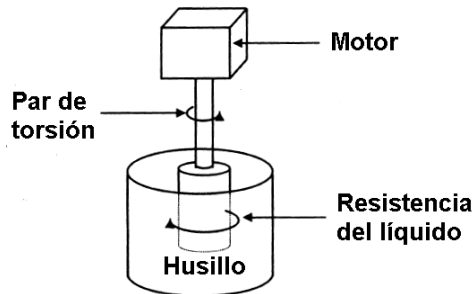


Figura A1.8. Esquema de funcionamiento de un viscosímetro rotacional

Para realizar la medición de la viscosidad, debe mantenerse constante la temperatura de líquido muestra, y debe alcanzarse un estado estacionario, esto es, que el motor alcance su velocidad nominal de giro. Entonces, se lee la deflexión causada por el par de torsión sobre el elemento mecánico calibrado, el cual es directamente proporcional al par de torsión, y éste a la viscosidad, si se trata de un líquido newtoniano.

Este tipo de viscosímetros diponen de una amplia gama de husillos y de una extensa gama de velocidades, proporcionando así una gran capacidad de medida de la viscosidad. Para cualquier líquido de viscosidad determinada, la resistencia al avance aumenta proporcionalmente a la velocidad de rotación del husillo o al tamaño del mismo, permitiendo efectuar la medición de la viscosidad teniendo en cuenta la velocidad seleccionada y el tipo de husillo escogido.

D) MÉTODO PARA DETERMINAR LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS INMOVILIZADAS

La viabilidad de las células encapsuladas fue llevada a cabo mediante el método de la sal de tetrazolio (ensayo MTT), descrito primeramente por Mosmann en 1983 (Mossmann, 1983). Se utilizó el procedimiento descrito por Uludag y Sefton con algunas modificaciones (Uludag y Sefton, 1993).

El ensayo MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] ó [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-bromuro 2,5-difeniltetrazolio], es un método colorimétrico que nos permite conocer el número de células viables en un cultivo. Este compuesto es una sal de tetrazolio soluble, de color amarillo, que se transforma (es reducido) en un cristal de formazán de color azul, impermeable a las membranas celulares, por acción de la actividad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de las células vivas (células metabólicamente activas), que se disuelve con isopropanol para medir su absorbancia en el espectrofotómetro. Se considera que la cantidad de formazan que se produce en un cultivo es directamente proporcional a la cantidad de células vivas. El color puede ser cuantificado utilizando un simple ensayo colorimétrico mediante un espectrofotómetro.

En el caso de las **cápsulas micrométricas**, la viabilidad celular se realizó a diario por triplicado sobre muestras de 100 µL de medio de cultivo con microcápsulas tomadas de las placas Petry donde están almacenadas en microplatos de 96 pocillos. De forma estéril se añadieron a cada pocillo 20 µL de la solución MTT (Sigma-Aldrich, 5 mg/mL en RPMI-1640) y se incubó a 37 °C durante 3 horas y media. Después del periodo de incubación, los cultivos fueron eliminados del incubador, y los cristales de formazán fueron disueltos añadiendo el disolvente MTT (0,1 N HCl en alcohol isopropílico anhidro) directamente al cultivo en una cantidad igual a la muestra original (100 µL). Los pocillos fueron leídos mediante un lector de placas dentro de la primera hora después de la adición del disolvente. Para disolver los cristales de formazán por completo es necesario pipetear arriba y abajo. La absorbancia

de cada pocillo se midió en un lector de placas utilizando una longitud de onda de 570 nm, con una longitud de onda de referencia de 690 nm. También, se analizaron blancos consistentes en medio de cultivo completo sin células.

En el caso de las **cápsulas milimétricas**, la viabilidad celular se realizó a diario por triplicado, sobre una cápsula tomada de las placas Petry donde están almacenadas, con 100 μL de medio de cultivo, en microplatos de 96 pocillos. A partir de aquí se siguió el mismo procedimiento descrito antes.

En el caso de los **films**, la viabilidad celular se realizó a diario, por triplicado, sobre un trozo de film de 2cm^2 , tomada de las placas Petry donde están almacenadas, con 100 μL de medio de cultivo, en microplatos de 96 pocillos. A partir de aquí se siguió el mismo procedimiento descrito antes.

E) BIBLIOGRAFÍA

- Mossmann, T. (1983), “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays”, *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63.

- Uludag, H., Setfton, M.V. (1993), “Microencapsulated human hepatoma (Hepg2) cells in vitro growth and protein release”, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 1213-1224.

APÉNDICE II: EXPRESIONES UTILIZADAS EN EL CAPÍTULO 4

A) RELACIONES DE RECURRENCIA

Las siguientes relaciones de recurrencia fueron utilizadas en la sección 4.5.4.:

$$I_{n-1}(z) - I_{n+1}(z) = \frac{2n}{z} I_n(z) \quad (\text{A.1})$$

$$K_{n-1}(z) - K_{n+1}(z) = \frac{2n}{z} K_n(z) \quad (\text{A.2})$$

$$I'_n(z) = \left[I_{n-1}(z) - \frac{n}{z} I_n(z) \right] \frac{dz}{dz} \quad (\text{A.3})$$

$$K'_n(z) = \left[-K_{n-1}(z) - \frac{n}{z} K_n(z) \right] \frac{dz}{dz} \quad (\text{A.4})$$

$$I'_n(z) = \left[I_{n+1}(z) + \frac{n}{z} I_n(z) \right] \frac{dz}{dz} \quad (\text{A.5})$$

$$K'_n(z) = \left[-K_{n+1}(z) + \frac{n}{z} K_n(z) \right] \frac{dz}{dz} \quad (\text{A.6})$$

Para un modo axi-simétrico, $n = 0$

B) COEFICIENTES I

Expresiones de los coeficientes utilizados en las constantes de las ecuaciones (78)-(83) en la sección 4.5.4.:

$$l_1 = 2\bar{k}^2 i I_1(\bar{k}) K_1(\bar{kh}) - 2\bar{k}^2 i K_1(\bar{k}) I_1(\bar{kh}) \quad (\text{B.1})$$

$$l_2 = 2\bar{k}^2 I_1(\bar{k}) I_1(\bar{sh}) - (\bar{s}^2 + \bar{k}^2) I_1(\bar{s}) I_1(\bar{kh}) \quad (\text{B.2})$$

$$l_3 = 2\bar{k}^2 I_1(\bar{k}) K_1(\bar{sh}) - (\bar{s}^2 + \bar{k}^2) K_1(\bar{s}) I_1(\bar{kh}) \quad (\text{B.3})$$

$$l_4 = (\bar{k}^2 - \bar{s}^2) I_1(\bar{s}) \quad (\text{B.4})$$

$$l_5 = (\bar{k}^2 - \bar{s}^2) K_1(\bar{s}) \quad (\text{B.5})$$

$$l_6 = 2\bar{k}^2 K_1(\bar{k}) I_1(\bar{kh}) - 2\bar{k}^2 i K_1(\bar{kh}) I_1(\bar{k}) \quad (\text{B.6})$$

$$l_7 = (\bar{s}^2 + \bar{k}^2) I_1(\bar{s}) I_1(\bar{kh}) - (\bar{s}^2 + \bar{k}^2) I_1(\bar{sh}) I_1(\bar{k}) \quad (\text{B.7})$$

$$l_8 = (\bar{s}^2 + \bar{k}^2) K_1(\bar{s}) I_1(\bar{kh}) - (\bar{s}^2 + \bar{k}^2) K_1(\bar{sh}) I_1(\bar{k}) \quad (\text{B.8})$$

$$l_9 = l_2 l_6 - l_1 l_7 \quad (\text{B.9})$$

$$l_{10} = l_3 l_6 - l_1 l_8 \quad (\text{B.10})$$

$$l_{11} = l_5 l_9 - l_{10} l_4 \quad (\text{B.11})$$

$$l_{12} = l_6 l_{11} - l_6 l_4 l_{10} \quad (\text{B.12})$$

$$l_{13} = l_6 l_9 l_{11} \quad (\text{B.13})$$

$$l_{14} = l_8 l_9 l_6 l_4 - l_7 l_{12} \quad (\text{B.14})$$

$$l_{15} = l_8 l_9 l_9 - l_7 l_9 l_{10} \quad (\text{B.15})$$

$$l_{16} = l_{13} l_9 l_{11} - 2\bar{k}^2 i K_1(\bar{k}h) I_1(\bar{k}) l_9 l_{11} l_{14} - \\ - 2\bar{k}^2 I_1(\bar{k}) I_1(\bar{sh}) l_{12} l_{13} + 2\bar{k}^2 I_1(\bar{k}) K_1(\bar{sh}) l_9 l_{13} l_6 l_4 \quad (\text{B.16})$$

$$l_{17} = 2\bar{k}^2 K_1(\bar{sh}) l_{13} l_9 l_9 - 2\bar{k}^2 i K_1(\bar{k}h) l_9 l_{11} l_{15} - \\ - 2\bar{k}^2 I_1(\bar{sh}) l_9 l_{13} l_{10} \quad (\text{B.17})$$

$$l_{18} = l_{13} l_9 l_{11} \quad (\text{B.18})$$

C) COEFICIENTES II

Expresiones de los coeficientes utilizados en las ecuaciones (100)-(102):

$$E_1 = -\frac{(-i\bar{\omega} + i\bar{k})^2}{kl_{18}I_1(\bar{k}h)} I_o(\bar{k}h)l_{16} + \frac{2i\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})^2}{l_{13}\bar{k}} K_o(\bar{k}h)I_1(\bar{k})l_{14} -$$

$$\frac{\left(-\bar{\omega} + \bar{k}\sqrt{\frac{We_i}{We_l}}\frac{1}{g_i}\right)^2}{\bar{k}I_o'(\bar{k}h)} g_i I_o(\bar{k}h) - \frac{2Z(-i\bar{\omega} + i\bar{k})I_1'(\bar{k}h)(\bar{k})l_{16}}{l_{18}I_1(\bar{k}h)} \quad (C.1)$$

$$E_2 = -\frac{4Zi(\bar{k})^3(-i\bar{\omega} + i\bar{k})K_1'(\bar{k}h)}{l_{13}} I_1(\bar{k})l_{14} - \frac{4Z\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})\bar{s}I_1'(\bar{s}h)I_1(\bar{k})l_{12}}{l_9l_{11}} +$$

$$+ \frac{4Z\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})\bar{s}K_1'(\bar{s}h)}{l_{11}} l_6l_4I_1(\bar{k}) \quad (C.2)$$

$$E_3 = -\frac{1}{h^2We_l} \left(1 - h^2\bar{k}^2\right) - h\frac{We_{si}}{We_l} + \frac{We_s}{We_l}\frac{1}{h^3} \quad (C.3)$$

$$E_4 = \frac{(-i\bar{\omega} + i\bar{k})^2}{\bar{k}l_{18}I_1(\bar{k}h)} I_o(\bar{k}h)l_{17} - \frac{2i\bar{k}^2(-i\bar{\omega} + i\bar{k})^2}{\bar{k}l_{13}} K_o(\bar{k}h)l_{15} +$$

$$+ \frac{2Z(-i\bar{\omega} + i\bar{k})\bar{k}I_1'(\bar{k}h)}{l_{18}I_1(\bar{k}h)} l_{17} + \frac{4Z\bar{k}^3i(-i\bar{\omega} + i\bar{k})K_1'(\bar{k}h)}{l_{13}} l_{15} \quad (C.4)$$

$$E_5 = -\frac{4Z\bar{k}^2(-i\bar{\omega}+i\bar{k})\bar{s}I_1'(\bar{s}h)l_{10}l_9}{l_9l_{11}} - \frac{4Z\bar{k}^2(-i\bar{\omega}+i\bar{k})\bar{s}K_1'(\bar{s}h)}{l_{11}}l_9 \quad (\text{C.5})$$

$$F_1 = -\frac{(-i\bar{\omega}+i\bar{k})^2}{kl_{18}I_1(\bar{k}h)}I_o(\bar{k})l_{16} + \frac{2i\bar{k}^2(-i\bar{\omega}+i\bar{k})^2}{kl_{13}}K_o(\bar{k})I_1(\bar{k})l_{14} -$$

$$-\frac{2Z(-i\bar{\omega}+i\bar{k})I_1'(\bar{k})\bar{k}l_{16}}{l_{18}I_1(\bar{k}h)} - \frac{4Z\bar{k}^3(-i\bar{\omega}+i\bar{k})K_1'(\bar{k})}{l_{13}}I_1(\bar{k})l_{14} \quad (\text{C.6})$$

$$F_2 = -\frac{4Z\bar{k}^2(-i\bar{\omega}+i\bar{k})\bar{s}I_1'(\bar{s})I_1(\bar{k})l_{12}}{l_9l_{11}} + \frac{4Z\bar{k}^2(-i\bar{\omega}+i\bar{k})\bar{s}K_1'(\bar{s})}{l_{11}}l_6l_4l_1(\bar{k}) \quad (\text{C.7})$$

$$F_3 = -\frac{(-i\bar{\omega}+i\bar{k})^2}{kl_{18}I_1(\bar{k}h)}I_o(\bar{k})l_{17} - \frac{2i\bar{k}^2(-i\bar{\omega}+i\bar{k})^2}{l_{13}\bar{k}}K_o(\bar{k})l_5 -$$

$$-\frac{\left(-\bar{\omega}+\bar{k}\sqrt{\frac{We_o}{We_i}\frac{1}{g_o}}\right)^2 g_r K_o(\bar{k})}{\bar{k}K_o'(\bar{k}h)} + \frac{2Z(-i\bar{\omega}+i\bar{k})\bar{k}I_1'(\bar{k})}{l_{18}I_1(\bar{k}h)}l_{17} \quad (\text{C.8})$$

$$F_4 = \frac{4Z\bar{k}^3 i(-i\bar{\omega}+i\bar{k})K_1'(\bar{k})}{l_{13}}l_{15} - \frac{4Z\bar{k}^2(-i\bar{\omega}+i\bar{k})\bar{s}I_1'(\bar{s})l_{10}l_9}{l_9l_{11}} -$$

$$-\frac{4Z\bar{k}^3(-i\bar{\omega}+i\bar{k})\bar{s}K_1'(\bar{s})}{l_{11}}l_9 \quad (\text{C.9})$$

$$F_5 = \frac{1}{We_l} \left(1 - k^{-2} \right) - \frac{We_{so}}{We_l} + \frac{We_s}{We_l} \quad (\text{C.10})$$

$$\frac{G}{H} = - \frac{(E_4 + E_5)}{E_1 + E_2 + E_3} \quad (\text{C.11})$$

$$\frac{G_1}{H_1} = - \frac{(F_3 + F_4 + F_5)}{F_1 + F_2} \quad (\text{C.12})$$

APÉNDICE III: REOLOGÍA

(Bird, R.B., Stewart, W.E., Lighfoot, E.N. (2002), "Transport phenomena", John Wiley & Sons, Inc, New York)

La reología es la ciencia del flujo y la deformación, que estudia las propiedades mecánicas de los gases, líquidos, plásticos, substancias asfálticas y materiales cristalinos.

Considérese un fluido contenido entre dos grandes placas paralelas, separadas entre si por una pequeña distancia.

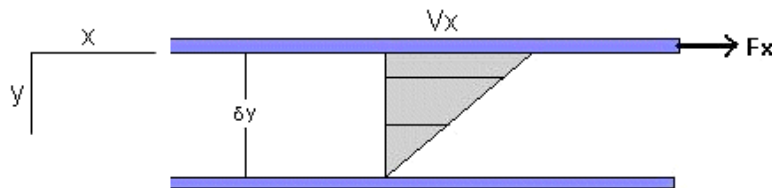


Figura A3.1. Formación del perfil de velocidad en estado estacionario para un fluido contenido entre dos láminas

Supongamos que el sistema está inicialmente en reposo. En el tiempo $t = 0$ la placa superior se pone en movimiento con velocidad constante v_x aplicando una fuerza F_x en la dirección x mientras la placa inferior se deja estacionaria ($v_x = 0$). Al moverse la placa superior arrastra consigo la capa de fluido inmediatamente adyacente, la que se mueve a la misma velocidad de la superficie. Como la placa inferior está estacionaria, la velocidad del fluido allí es cero. Pero la capa de fluido vecina a la placa superior se mueve con respecto a la capa de fluido inmediatamente inferior que inicialmente se encontraba en reposo y a su vez le imprime movimiento. De esta manera el movimiento de la placa superior hace aparecer un campo de velocidades en el líquido, con la velocidad decreciendo continuamente desde v_x en la placa superior hasta cero en la placa inferior (Figura A3.1.).

Por tanto, el movimiento de la placa superior provoca un aumento en la velocidad del fluido en la dirección x , desde cero hasta algún valor positivo. Como la cantidad de movimiento es proporcional a la velocidad, habrá un correspondiente aumento en la cantidad de movimiento en x . En otras palabras, la cantidad de movimiento en “ x ” se transporta en la dirección “ y ” desde la placa hasta el fluido y allí desde una capa de fluido a la siguiente (Figura A3.1.).

A medida que transcurre el tiempo, el perfil de velocidades se va modificando al ir ganando cantidad de movimiento el fluido, hasta que finalmente se alcanza el estado estacionario estableciéndose un perfil lineal de velocidades. Una vez alcanzado dicho estado estacionario, es preciso aplicar una fuerza constante F_x , para mantener el movimiento de la lámina superior, ya que de otra forma la lámina se pararía. Esto indica la presencia de un rozamiento, motivado por una propiedad intrínseca del fluido denominada viscosidad (Figura A3.1.).

Una vez desarrollado el flujo, es decir, alcanzado el régimen estacionario, la relación de la fuerza aplicada por unidad de área es proporcional al gradiente de velocidad que se produce en dirección normal al de la aplicación de dicha fuerza, de acuerdo con la ecuación (A3.1):

$$\left(\frac{F}{A}\right)_x = \tau_{yx} = -\mu \frac{dv_x}{dy} \quad (\text{A3.1})$$

Esta expresión es la llamada ley de Newton de la viscosidad. La constante de proporcionalidad de esta expresión es lo que se denomina viscosidad de un fluido. Los fluidos que cumplen dicha ecuación se denominan fluidos newtonianos. Todos los gases y la mayor parte de los líquidos sencillos, se comportan según la ecuación (A3.1). Los fluidos no newtonianos suelen ser las pastas, suspensiones y polímeros de elevado peso molecular.

De acuerdo con la ecuación (A3.1), se deduce que la densidad de flujo viscoso de cantidad de movimiento sigue la dirección del gradiente negativo

de velocidad; es decir, que sigue la dirección de velocidad decreciente. En otras palabras, la cantidad de movimiento va “cuesta abajo”, en el sentido de que desciende de una región de velocidad alta a otra de baja velocidad, de la misma forma que un trineo se desliza de un lugar elevado hasta otro más bajo, y el calor fluye de una zona caliente hacia otra más fría.

La fuerza F está aplicada en sentido longitudinal, es decir, arrastra a la superficie. Las fuerzas que actúan de esta manera, se denominan fuerzas de cizalla, y a la relación entre la fuerza de cizalla y el área sobre la que actúan se denomina esfuerzo cortante, que se designa como τ_{yx} , los subíndices indican que la aplicación de una fuerza de cizalla en dirección del eje x , produce un gradiente de velocidad en dirección del eje y . Es decir, que el movimiento de una capa de fluido en dirección del eje x , transmite una fuerza de rozamiento en dirección del eje y , que expresada por unidad de área es el esfuerzo cortante, el cual se transmite de las capas de fluido con mayor velocidad a las de menor velocidad.

Un fluido newtoniano se describe como uno en el cual el esfuerzo cortante es directamente proporcional a la velocidad de deformación, o sea la viscosidad es constante e independiente de la velocidad de deformación.

De acuerdo con la ley de la viscosidad de Newton (ecuación A3.1), para un fluido newtoniano, al representar gráficamente τ_{yx} (esfuerzo cortante) frente a $-\partial v_x/\partial y$ a presión y temperatura constantes (Figura A3.2.), dará una línea recta, que pasa por el origen de coordenadas, y cuya pendiente es la viscosidad del fluido. Sin embargo, existen algunos materiales industrialmente importantes que no se comportan de acuerdo con la ecuación (A3.1), y que se desvían de la línea recta (Figura A3.2.), estas sustancias con conocidas como fluidos no newtonianos.

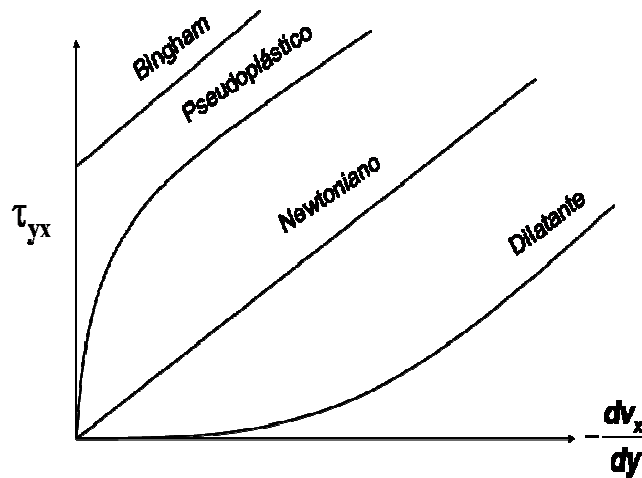


Figura A3.2. Esfuerzo cortante contra $-\partial v_x/\partial y$ a presión y temperatura constantes

Es decir, el comportamiento más sencillo reflejado en la Figura A3.2. es el correspondiente a la curva de los fluidos newtonianos, que es una recta que pasa por el origen de coordenadas. Las demás curvas representan el comportamiento reológico de líquidos llamados no Newtonianos.

Algunos líquidos, no fluyen hasta que se alcanza un esfuerzo cortante mínimo, que se representa por τ_0 , y después fluyen linealmente para esfuerzos cortantes superiores. Los líquidos que se comportan de esta forma reciben el nombre de Plásticos de Bingham.

La curva que representa un fluido pseudoplástico, pasa por el origen, es cóncava hacia abajo para bajos esfuerzos cortantes, haciéndose recta para esfuerzos cortantes elevados. En este tipo de fluidos la viscosidad disminuye a medida que aumenta el esfuerzo de corte sobre el fluido.

En los fluidos dilatantes la viscosidad aumenta a medida que aumenta el esfuerzo de corte al cual es sometido el fluido. La curva que representa este tipo de fluidos es cóncava hacia arriba para bajos esfuerzos cortantes, y se hace lineal para esfuerzos cortantes elevados.

APÉNDICE IV: PROGRAMAS MATHEMATICA®

A continuación se adjuntan los programas de Mathematica® utilizados en este trabajo:

PROGRAMA PARA LA RESOLUCIÓN DE LA ECUACIÓN DE DISPERSIÓN (CAPÍTULO 4).

```
<<Graphics`MultipleListPlot`
<<Graphics`Legend`
gi=0.0258;
go=0.0258;
h=0.9;
s=  $\sqrt{(k^2) + oh * (-I * w + I * k)}$  ;
a=(k*h);
b=k;
c=(s*h);
dia1=  $\partial_z$  BesselI[1, z] /.z->a;
dib1=  $\partial_z$  BesselI[1, z] /.z->b;
kia1=  $\partial_z$  BesselK[1, z] /.z->a;
kib1=  $\partial_z$  BesselK[1, z] /.z->b;
dia0=  $\partial_z$  BesselI[0, z] /.z->a;
dib0=  $\partial_z$  BesselI[0, z] /.z->b;
kia0=  $\partial_z$  BesselK[0, z] /.z->a;
kib0=  $\partial_z$  BesselK[0, z] /.z->b;
dsia1=  $\partial_z$  BesselI[1, z] /.z->c;
dsib1=  $\partial_z$  BesselI[1, z] /.z->d;
ksia1=  $\partial_z$  BesselK[1, z] /.z->c;
ksib1=  $\partial_z$  BesselK[1, z] /.z->d;
l1=2*k^2*BesselI[1,b]*BesselK[1,a]-k^2*I*BesselK[1,b]*BesselI[1,a];
l2=2*k^2*BesselI[1,b]*BesselI[1,c]-(s^2+k^2)*BesselI[1,d]*BesselI[1,a];
l3=2*k^2*BesselI[1,b]*BesselK[1,c]-(s+k^2)*BesselK[1,d]*BesselI[1,a];
l4=(k^2-s^2)*BesselI[1,d];
```

$$l5=(k^2-s^2)*\text{BesselK}[1,d];$$

$$l6=2*k*\text{BesselK}[1,b]*\text{Bessel}[1,a]-2*k^2*\text{BesselK}[1,a]*\text{Bessel}[1,b];$$

$$l7=(s^2+k^2)*\text{Bessel}[1,d]*\text{Bessel}[a]-(s^2+k^2)*\text{Bessel}[1,c]*\text{Bessel}[1,b];$$

$$l8=(s^2+k^2)*\text{BesselK}[1,d]*\text{Bessel}[1,a]-(s^2+k^2)*\text{BesselK}[1,c]*\text{Bessel}[1,b];$$

$$l9=l2*l6-l1*l7;$$

$$l10=l3*l6-l1*l8;$$

$$l11=l5*l9-l10*l4;$$

$$l12=6*l11-l6*l4*l10;$$

$$l13=l6*l9*l11;$$

$$l14=l8*l9*l6*l4-l7*l12;$$

$$l15=l8*l9*l9-l7*l9*l10;$$

$$l16=l13*l9*l11-2*k^2*\text{BesselK}[1,a]*\text{Bessel}[1,b]*l9*l11*l14-$$

$$2*k^2*\text{Bessel}[1,b]*\text{Bessel}[1,c]*l12*l13+2*k^2*\text{Bessel}[1,b]*\text{BesselK}[1,c]*l9*l13*l6*l4;$$

$$l17=2*k^2*\text{BesselK}[1,c]*l13*l9*l9-2*k^2*\text{BesselK}[1,a]*l9*l11*l15-$$

$$2*k^2*\text{Bessel}[1,c]*l9*l13*l10;$$

$$l18=l13*l9*l11;$$

$$E1=-(-l*w+l*k)^2/(k*l18*\text{Bessel}[1,a]*\text{Bessel}[0,a]*l16+(2*l*k^2*(-l*w+l*k)^2)/(k*l13)*\text{BesselK}[0,a]*\text{Bessel}[1,b]*l14-((-w+k)^2*gi*\text{Bessel}[0,a])/(k*dia0)-(2*(-l*w+l*k)*dia1*k*l16*oh)/(l18*\text{Bessel}[1,a]);$$

$$E2=-((4*l*k^3*(-l*w+l*k)*kia1*oh)/l13*\text{Bessel}[1,b]*l14-(4*k^2*(-l*w+l*k)*s*dsia1*\text{Bessel}[1,b]*l12*oh)/(l9*l11)+(4*k^2*(-l*w+l*k)*s*ksia1*oh)/l11*l6*l4*\text{Bessel}[1,b]);$$

$$E3=-1/(h^2*Wel)*(1-h^2*k^2)-h*Wesi/Wel+Wes/Wel*1/h^3;$$

$$E4=((-l*w+l*k)^2*\text{Bessel}[0,a])/(k*l18*\text{Bessel}[1,a])*l17-(2*l*k^2*(-l*w+l*k)^2)/(k*l13)*\text{BesselK}[0,a]*l15+(2*(-l*w+l*k)*k*dia1*oh)/(l18*\text{Bessel}[1,a])*l17+(4*k^3*l*(-l*w+l*k)*kia1*oh)/l13*l15;$$

$$E5 = - (4*k^{2*(-l*w+l*k)}*s*dsia1*l10*l9*oh)/(l9*l11) - (4*k^{2*(-l*w+l*k)}*s*ksia1*oh)/l11*l9;$$

$$F1 = -(-l*w+l*k)^2/(k*l18*BesselI[1,a]*BesselI[0,b]*l16+(2*l*k^{2*(-l*w+l*k)}^2)/(k*l13)*BesselK[0,b]*BesselI[1,b]*l14-(2*(-l*w+l*k)*dib1*k*l16*oh)/(l8*BesselI[1,a])-(4*l*k^{3*(-l*w+l*k)}*ksib1*oh)/l13*BesselI[1,b]*l14;$$

$$F2 = -(4*k^{2*(-l*w+l*k)}*s*dsib1*BesselI[1,b]*l12*oh)/(l9*l11)+(4*k^{2*(-l*w+l*k)}*s*ksib1*oh)/l11*l6*l4*BesselI[1,b];$$

$$F3 = ((-l*w+l*k)^2*BesselI[0,b])/(k*l18*BesselI[1,a])*l17-(2*l*k^{2*(-l*w+l*k)}^2)/(k*l13)*BesselK[0,b]*l15-((-w+k)^2*go*BesselK[0,b])/(k*ksia0)+(2*(-l*w+l*k)*dib1*k*oh)/(l18*BesselI[1,a])*l17;$$

$$F4 = (4*l*k^{3*(-l*w+l*k)}*kib1*oh)/l13*l15 - (4*k^{2*(-l*w+l*k)}*s*dsib1*l10*l9*oh)/(l9*l11) - (4*k^{2*(-l*w+l*k)}*s*ksib1*oh)/l11*l9;$$

$$F5 = 1/Wel*(1 - k^2) - Weso/Wel + Wes/Wel;$$

$$GH = -(E4+E5)/(E1+E2+E3);$$

$$G1H1 = -(F3+F4+F5)/(F1+F2);$$

$$FN = GH - G1H1;$$

ejemplofuncionkwFN0=FN/.{Wel->2,Wes->2,Wei->35128,Weo->35128,Wesi->35128,Weso->35128,oh->0.2};

tabla0=Table[{vk,Im[w/FindRoot[(ejemplofuncionkwFN0/.k->vk)==0,{w,{(1+10*I),(2+8*I)}},MaxIterations->200]}],{vk,0.01,2.71,0.01}];

tabla0

ejemplofuncionkwFN1=FN/{Wel->0.01,Wes->0.01,Wei->35128,Weo->35128,Wesi->35128,Weso->35128,oh->0.2};

tabla1=Table[{vk,Im[w/FindRoot[(ejemplofuncionkwFN1/.k->vk)==0,{w,{(1+10*I),(2+8*I)}},MaxIterations->200]}],{vk,0.01,2.81,0.01}];

tabla1

```
ejemplofuncionkwFN2=FN/.{Wel->0.11,Wes->0.11,Wei->35128,Weo->35128,Wesi->35128,Weso->35128,oh->0.2};
```

```
tabla2=Table[{vk,Im[w/FindRoot[(ejemplofuncionkwFN2/.k->vk)==0,{w,{(1+10*I),(2+8*I)}}},MaxIterations->200]}],{vk,0.03,3.01,0.01}};
```

tabla2

```
ejemplofuncionkwFN3=FN/{Wel->0.11,Wes->0.11,Wei->14808,Weo->14808,Wesi->14808,Weso->14808,oh->0.2};
```

```
tabla3=Table[{vk,Im[w/.FindRoot[(ejemplofuncionkwFN3/.k->vk)==0,{w,{(1+10*I),(2+8*I)}}},MaxIterations->200]}],{vk,0.01,3.01,0.01}};
```

tabla3

```
ejemplofuncionkwFN4=FN/{Wel->0.11,Wes->0.11,Wei->14808,Weo->14808,Wesi->14808,Weso->14808,oh->0.2};
```

```
tabla4=Table[{vk,Im[w/FindRoot[(ejemplofuncionkwFN4/.k->vk)==0,{w,{(1+10*I),(2+8*I)}}},MaxIterations->200]}],{vk,0.03,3.01,0.01}};
```

tabla4

```
ejemplofuncionkwFN5=FN/{Wel->0.11,Wes->0.11,Wei->14808,Weo->14808,Wesi->14808,Weso->14808,oh->0.6};
```

```
tabla5=Table[{vk,Im[w/FindRoot[(ejemplofuncionkwFN5/.k->vk)==0,{w,{(1+10*I),(2+8*I)}}},MaxIterations->200]}],{vk,0.01,3.01,0.01}};
```

tabla5

EJEMPLO DE UN PROGRAMA PARA LA CORRELACIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS EN UN PROCESO DE TRANSFERENCIA DE MATERIA EN DISCONTINUO (CAPÍTULO 6)

```
d=2*10^-01;
num=103;
vc=num*(4/3)*Pi*((d/2)^3);
vo=4;
area=num*4*Pi*((d/2)^2);
cqco=0.51;
model[h_,t_]:= cqco+(1-cqco)*(Exp[-((1/vo)+(vc/(vo^2)))*(h*area*t)])
data=Import["Rh40000_12_discontinuo.xls"][[1]]
sol=Table[h/.FindRoot[model[h,data[[i,1]]]==data[[i,2]],{h,0.0000001}],{i,1,Lengt
h[data]]]
ListPlot[sol]
FindFit[data,model[h,t],{{h,0.0001}},t]
tabla0=Table[{to,{model[h,t]/.{t->to}[[1]]},{to,0,22800,600}]
Export["40000_12_discontinuo_LEWINSKA.xls", tabla0]
data=Import["Rh40000_12_discontinuo.xls"][[1]]
```

PROGRAMA PARA LA CORRELACIÓN DE LOS DATOS OBTENIDOS EN UN PROCESO DE TRANSFERENCIA DE MATERIA EN CONTINUO (CAPÍTULO 6)

```

tita=Pi;
z=Cos[tita];
r=1;
a=1*10^-01;
g=9.8*100;
rpm=110;
omega=(rpm*2*Pi)/60;
zo=0.68;
u1=(((a^2)*omega*zo)+((4*(a^4)*(omega^3))/g))/(Pi*(2.5)^2);
u2=(1.53)/(Pi*(2.5)^2)*(1/60);
u=u1+u2;

model[d_,t_]:=Module[{Pe,tt}, Pe=(u*a/d); tt=((t*d)/(a^2));
  (1/(r/a)*Erfc[((r/a)-1)/(2*(tt)^(1/2))]+(Pe)*((((-1/2)+(3/(4*((r/a)^2)))-
  (1/(4*((r/a)^3))))*Erfc[((r/a)-1)/(2*(tt)^(1/2))]+(3/4)*(((1/(r/a))-
  (1/((r/a)^2)))^(r/a)-1+(tt))*Erfc[((r/a)-
  1+((tt)^(1/2))/(2*(tt)^(1/2)))]*LegendreP[1,z])]]

data=Import["Rh70000_12.xls"][[1]]

sol=Table[d/.FindRoot[model[d,data[[i,1]]]==data[[i,2]},{d,0.0001}],{i,1,Length
[data]}]

ListPlot[sol]

FindFit[data,model[d,t],{{d,0.0001}},t]

tabla2=Table[{to,{model[d,t]/.{t->to}[[1]]},{to,60,4140,60}]

Export["70000_12_short_corregido.xls", tabla2]

```

```

a=1*10^-01;
t=4140;
g=9.8*100;
rpm=110;
omega=(rpm*2*Pi)/60;
zo=0.68;
u1=(((a^2)*omega*zo)+((4*(a^4)*(omega^3))/g))/(Pi*((2.5)^2));
u2=(1.53)/(Pi*((2.5)^2)*(1/60));
u=u1+u2;
model[r,tita,t]:=Modul[{Pe,tt}, Pe=(u*a/d); tt=((t*d)/(a^2));
  (1/r)*Erfc[(r-1)/(2*(tt)^(1/2))]+(Pe)*(((1/2)+(3/(4*(r^2)))-(1/(4*(r^3))))*Erfc[(r-
  1)/(2*(tt)^(2)])+(3/4)*(((1/r)-(1/r))^(r-1+(tt)))*Erfc[(r-
  1+((tt)^(1/2)))/(2*(tt)^(1/2))])*Cos[tita]]

ContourPlot[model[Sqrt[x^2+y^2],ArcTan[y/x],{x,0,3},{y,-3,3},AspectRatio->
Automatic,ContourLabels->10,Contours->
{0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,0.9,1.0}]

ContourPlot[model[Sqrt[x^2+y^2],ArcTan[y/x],{x,0,3},{y,-3,3},AspectRatio->
Automatic,ContourLabels->10,Contours->
{0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,0.9,1.0}]

ContourPlot[model[Sqrt[x^2+y^2],ArcTan[y/x],1320],{x,0,3},{y,-3,3},AspectRatio
->Automatic,ContourLabels10,Contours->
{0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,0.9,1.0}]

ContourPlot[model[Sqrt[x^2+y^2],ArcTan[y/x],4140],{x,0,3},{y,-3,3},
AspectRatioAutomatic,ContourLabels->10,Contours->
{0,0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6,0.7,0.8,0.9,1.0}]

```

PROGRAMA PARA LA OBTENCIÓN DEL COEFICIENTE DE DIFUSION EFECTIVA A PARTIR DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE MATERIA (CAPÍTULO 6)

```
dp=2*10^-03;
a=1*10^-03;
g=9.8;
visc=1*10^-3;
dens=1000;
rpm=110;
omega=(rpm*2*Pi)/60;
zo=6.8*10^-3;
u=omega*(10*10^-03)
Reynolds=(dp*dens*u)/visc
Sc=visc/(dens*dm);
FindRoot[((h*dp)/dm)-2-1.1*(Reynolds^(0.6))*(Sc^(1/3)), {dm,1*10^-12}]
de=dm*(0.82^2)
```