



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS QUÍMICAS

**PRODUCCIÓN Y ESTUDIO DE NANOPARTÍCULAS
DE ETILCIANOACRILATO. SU TRANSPORTE A
TRAVÉS DE LA PIEL.**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB ROBERTO DÍAZ TORRES



TUTOR: DRA SUEMI RODRÍGUEZ ROMO

AÑO: 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

GRACIAS A LA UNAM POR DARMER LA OPORTUNIDAD DE ESTUDIAR ESTE POSGRADO.

A MI TUTORA LA DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO POR SU APOYO Y AMISTAD, AL DR. VICTOR MANUEL CASTAÑO MENESES POR SUS ATINADAS ASESORÍAS.

A LA COORDINACIÓN DEL PROGRAMA Y A LA SECRETARÍA TÉCNICA DEL POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS DE LA FES-CUAUTITLÁN POR TODO EL SOPORTE Y AYUDA ACADEMICO-ADMINISTRATIVA.

AGRADEZCO EL APOYO ECONÓMICO POR LAS BECAS OTORGADAS AL CONACYT Y A LA D.G.E.P.

GRACIAS TAMBIÉN AL DR. SERGIO JIMÉNEZ DEL CINVESTAV JURQUILLA, A RODOLFO ROBLES, AL DR. JAVIER REVILLA Y A LA MAESTRA BRIGIDA DEL CARMEN CAMACHO ENRÍQUEZ DE LA FES-CUAUTITLÁN, POR SU AYUDA TÉCNICA EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

DEDICATORIAS

A MIS HIJOS (JOSÉ ROBERTO, PAULINA Y XIMENA), A MI ESPOSA (PATRICIA) Y A MIS PADRES (ROBERTO Y MARÍA LUISA), A TODOS AQUELLOS QUE CREYERON EN MÍ.

DEDICÓ ESTA TESIS DOCTORAL Y TODAS LAS NOCHES DE DESVELO Y SUFRIMIENTO QUE AHORA SE CONVIERTEN EN ÉXITO Y BIENESTAR.

PRODUCTOS DE ESTE TRABAJO DOCTORAL

ESTE TRABAJO DE INVESTIGACION DERIVÓ EN LA CONCLUSION DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL MISMA QUE SE PRESENTÓ EN DIFERENTES CONGRESOS Y FOROS ACADÉMICOS QUE A CONTINUACIÓN SE MENCIONAN:

PONENCIA EN EL XXXV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FARMACEUTICAS CELEBRADO DEL 3 AL 7 DE NOVIEMBRE DE 2002 EN LOS CABOS BAJA CALIFORNIA CON EL TRABAJO: "FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ETILCIANOACRILATO PARA USO FARMACÉUTICO".

PONENCIA "THE FIRST INTERNATIONAL CONFERENCE ON NONLINEAR, FRACTIONAL AND STOCHASTIC DYNAMICS AND THE FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP ON COMPLEX SYSTEMS, APPLIED CATEGORY THEORY, FRACTALS, FRACTIONAL CALCULUS AND CHAOS" CON LA PLÁTICA "FORMATION DYNAMICS OF ETHYLCYANOACRYLATE NANOPARTICLES" EN LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DEL 24 AL 28 DE ENERO DEL 2005.

PARTICIPACIÓN EN "THE THIRD WORLD CONFERENCE ON DRUG ABSORPTION, TRANSPORT AND DELIVERY" CON EL CARTEL "ETHYLCYANOACRYLATE NANOPARTICLES USED AS SKIN DRUG CARRIERS. STUDY OF FORMATION MECHANISM". CELEBRADO EN BARCELONA, ESPAÑA DEL 18 AL 20 DE ABRIL DEL 2005.

PARTICIPACIÓN COMO PONENTE EN LAS "IV JORNADAS DE FARMACIA" CON LA PLÁTICA "NANOPARTÍCULAS EN FARMACIA" QUE SE LLEVÓ A CABO EL DÍA 23 DE AGOSTO DEL 2005 EN LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

SE PUBLICÓ UN ARTÍCULO *IN EXTENSO*, EL CUAL SE ANEXA A ESTA TESIS:

OSCILLATIONS IN THE KINETICS OF ETHYLCYANOACRYLATE NANOPARTICLES INTENDED AS SKIN DRUG CARRIERS (2005) **R DIAZ-TORRES**, V M CASTANO, A GANEM-QUINTANAR, DQUINTANAR-GUERRERO AND S RODRIGUEZ-ROMO NANOTECHNOLOGY 16 2612–2618 DOI:10.1088/0957-4484/16/11/024

Índice General

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	9
RESUMEN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1 GENERALIDADES	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1.1 NANOTECNOLOGÍA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1.2 NANOTECNOLOGÍA EN FARMACIA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1.3 TECNOLOGÍA DE PUNTA EN FARMACIA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1.4 POLÍMEROS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1.4.1 <i>Concepto y clasificación de los polímeros</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.4.2 <i>Fuerzas de Atracción intermoleculares</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.4.2.1 <i>Fuerzas de Van der Waals</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.4.2.2 <i>Fuerzas de atracción</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.4.2.3 <i>Enlaces de hidrógeno</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.4.2.4 <i>Atracciones iónicas</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.4.3 <i>Polímeros isómeros</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.4.4 <i>Concepto de tacticidad</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.4.5 <i>Homopolímeros y copolímeros</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.4.6 <i>Procesos de polimerización</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.4.6.1 <i>Polimerización por adición</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.4.6.2 <i>Polimerización por condensación</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.4.6.3 <i>Polimerización en suspensión, emulsión y masa</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.4.7 <i>Transiciones de los polímeros dependientes de la temperatura...</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.5 OSCILADORES QUÍMICOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
1.5.1 <i>El modelo de Lotka-Volterra</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.5.2 <i>La reacción de Bray</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.5.3 <i>La reacción de Belousov-Zhabotinsky (BZ)</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.5.4 <i>El Brusselator</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
1.5.5 <i>Origen del Oregonador</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
2 PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.1 DEFINICIÓN DE NANOPARTÍCULAS EN FARMACIA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.2 FABRICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
2.2.1 <i>Polimerización en emulsión</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
2.2.2 <i>Polimerización en una fase acuosa continua</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
2.2.3 <i>Polimerización en emulsión en una fase orgánica continua</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
2.2.4 <i>Polimerización Interfacial</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
2.2.4.1 <i>Emulsificación electrocapilar</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
2.2.4.2 <i>Nanopartículas de polialquilmecianoacrilato</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
2.2.5 <i>Deposición del disolvente</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
2.2.6 <i>Evaporación del disolvente</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
2.2.7 <i>Otros aspectos importantes de la fabricación de nanopartículas</i> ..	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
3 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
3.1 MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
4 EL MODELO Y SU COMPARACIÓN CON DATOS EXPERIMENTALES	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

4.1 COMPARACIÓN DEL MODELO TEÓRICO CONTRA LOS DATOS EXPERIMENTALES DE LA CINÉTICA DE FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5 PIEL	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5.1 INTRODUCCIÓN.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5.2 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LA PIEL.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
5.2.1 <i>La epidermis</i>	¡Error! Marcador no definido.
5.2.2 <i>La dermis</i>	¡Error! Marcador no definido.
5.2.3 <i>Tejido subcutáneo</i>	¡Error! Marcador no definido.
5.2.4 <i>Accesorios de la piel</i>	¡Error! Marcador no definido.
5.3 EFECTO DE LA HIDRATACIÓN DEL ESTRATO CORNEO.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
6 TRANSPORTE EN PIEL	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
6.1 TÉCNICA DE EXFOLIACIÓN MEDIANTE TIRAS ADHESIVAS (TAPE STRIPPING)¡	ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
6.1.1 <i>Aplicación de la Técnica de “Tape Stripping”</i>	¡Error! Marcador no definido.
6.1.2 <i>Algunas preguntas sin respuesta respecto a la técnica de “Tape Stripping”</i>	¡Error! Marcador no definido.
7 MICROFOTOLUMINISCENCIA	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
OBJETIVOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
HIPÓTESIS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Índice de Figuras

- FIGURA 1: FINANCIAMIENTO PARA NANOTECNOLOGÍA EN EUA¹ ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 2: TIPOS DE COPOLÍMEROS..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 3: OSCILACIONES EN POBLACIONES DE CONEJOS (H) Y LINGES (P) EN EL MODELO DE LOTKA-VOLTERRA⁵ ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 4: TIPOS DE NANOPARTÍCULAS¹³ ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 5: ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA PIEL⁵⁵ ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 6: COMPONENTES PRINCIPALES DE LA PIEL⁵⁶ ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 7: MICROGRAFÍA DE LA PIEL⁵⁶ ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 8: DIAGRAMA DE LOS PROCESOS DE LIBERACIÓN, DIFUSIÓN, DISTRIBUCIÓN, METABOLISMO, ACCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE FÁRMACOS QUE PENETRAN A TRAVÉS DE PIEL. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 9: MODELO UTILIZADO PARA REALIZAR CÁLCULOS TEÓRICOS DE TRANSPORTE A TRAVÉS ESTRATO CORNEO (SC). ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 10: ESTRUCTURA DE LA EPIDERMIS⁵⁷ ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 11: IRRIGACIÓN SANGUÍNEA DE LA PIEL⁵⁸ ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 12: ADIPOSITOS PRESENTES EN EL TEJIDO SUBCUTÁNEO⁵⁹ ... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 13: SISTEMA GLANDULAR EN LA PIEL⁶⁰ ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 14: ESQUEMA DE LA HIDRATACIÓN DEL ESTRATO CORNEO⁶⁸... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 15: INTERACCIÓN DE LA VARIABLE PH Y LA VARIABLE CONCENTRACIÓN DE TENSOACTIVO SOBRE EL TAMAÑO PROMEDIO DE TAMAÑO DE PARTÍCULA, EN EL NIVEL ALTO Y EN EL NIVEL BAJO... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 16: INTERACCIÓN DE LA VARIABLE CONCENTRACIÓN DE MONÓMERO Y LA VARIABLE CONCENTRACIÓN DE TENSOACTIVO SOBRE EL TAMAÑO PROMEDIO DE TAMAÑO DE PARTÍCULA, EN EL NIVEL ALTO Y EN EL NIVEL BAJO. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 17: INTERACCIÓN DE LA VARIABLE PH Y LA VARIABLE CONCENTRACIÓN DE MONÓMERO SOBRE EL TAMAÑO PROMEDIO DE TAMAÑO DE PARTÍCULA, EN EL NIVEL ALTO Y EN EL NIVEL BAJO. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 18: INTERACCIÓN DE LA VARIABLE PH Y LA VARIABLE VELOCIDAD DE AGITACIÓN SOBRE EL TAMAÑO PROMEDIO DE TAMAÑO DE PARTÍCULA, EN EL NIVEL ALTO Y EN EL NIVEL BAJO. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 19: INTERACCIÓN DE LA VARIABLE CONCENTRACIÓN DE MONÓMERO Y LA VARIABLE VELOCIDAD DE AGITACIÓN SOBRE EL TAMAÑO PROMEDIO DE PARTÍCULA, EN EL NIVEL ALTO Y EN EL NIVEL BAJO. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 20: INTERACCIÓN DE LA VARIABLE CONCENTRACIÓN DE TENSOACTIVO Y LA VARIABLE VELOCIDAD DE AGITACIÓN SOBRE EL TAMAÑO PROMEDIO DE PARTÍCULA, EN EL NIVEL ALTO Y EN EL NIVEL BAJO. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 21: CORRELACIÓN GRÁFICA DE LAS VARIABLES ESTUDIADAS. VAR1: PH, VAR2: AGITACIÓN (RPM), VAR3: CONCENTRACIÓN DE MONÓMERO (L/10ML), VAR4: CONCENTRACIÓN DE TENSOACTIVO (%), VAR5: TAMAÑO PROMEDIO DE PARTÍCULA (NM). ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 22: SUPERFICIE DE RESPUESTA DE LOS DATOS RESULTANTES DEL DISEÑO DE EXPERIMENTOS DE LA SEGUNDA ETAPA. PH Y CONCENTRACIÓN DE TENSOACTIVO VS TAMAÑO PROMEDIO DE PARTÍCULA. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 23: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL TENSOACTIVO ANTES Y DESPUÉS DE LA CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC). ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 24: ESTRUCTURA QUÍMICA DE PLURONICS CUANDO ES PLURONICS F68 TIENE DE X 152.73 Y DE Y 28.97 EN PROMEDIO Y CUANDO ES PLURONICS F127 TIENE DE X 200.45 Y DE Y 65.17 EN PROMEDIO. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 25: ESTRUCTURA QUÍMICA DE POLIVINILALCOHOL (PVA). ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
- FIGURA 26: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA POLIVINILPIRROLIDONA (PVP)..... ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 27: EFECTO DEL TIPO DE TENSOACTIVO Y DEL PH SOBRE EL TAMAÑO PROMEDIO DE PARTÍCULA. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 28: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE PESO MOLECULAR DE POLIETILCIANOACRILATO A PH 1.27 POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE PERMEACIÓN EN GEL. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 29: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE PESO MOLECULAR DE POLIETILCIANOACRILATO A PH 2.4 POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE PERMEACIÓN EN GEL. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 30: MICROGRAFÍAS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO FORMADAS A PH 1.27 Y 2.40. EL ANCHO DE LA MICROGRAFÍA ES EQUIVALENTE A 1 μ M. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 31: RESULTADOS DE RMN H DE LAS NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO A PH 1.27. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 32: RESULTADOS DE RMN C DE LAS NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO A PH 1.27. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 33: RESULTADOS DE RMN H DE LAS NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO A PH 2.40. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 34: RESULTADOS DE RMN C DE LAS NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO A PH 2.40. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 35: GRÁFICA DE RESULTADOS DE CINÉTICA DE FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 36: DATOS RESULTANTES DEL MODELO TEÓRICO VS DATOS EXPERIMENTALES. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 37: COMPARACIÓN DE LOS DATOS TEÓRICOS VS EXPERIMENTALES DE LA DERIVADA DE LA ABSORBANCIA CON RESPECTO AL TIEMPO PH 1.27. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 38: COMPARACIÓN DE LOS DATOS TEÓRICOS VS EXPERIMENTALES DE LA DERIVADA DE LA ABSORBANCIA CON RESPECTO AL TIEMPO PH 2.40. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 39: EFECTO DE LA CINTA ADHESIVA, DE LA CINTA ADHESIVA CON PIEL Y DE LA CINTA ADHESIVA CON PIEL Y NANOPARTÍCULAS SOBRE LA RESPUESTA DE MICROFOTOLUMINISCENCIA. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 40: DISTRIBUCIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS EN EL ESTRATO CORNEO A DIFERENTES TIEMPOS. GRÁFICA DE CINTAS RETIRADAS DE LA ZONA DE APLICACIÓN VERSUS RESPUESTA DE MICROFOTOLUMINISCENCIA (INTENSIDAD) A DIFERENTES TIEMPOS. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

FIGURA 41: GRÁFICA DE LA CONCENTRACIÓN VERSUS RESPUESTA DE MICROFOTOLUMINISCENCIA (INTENSIDAD) PARA EVALUAR LINEALIDAD DE LA INTENSIDAD VERSUS CONCENTRACIÓN. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Índice de Tablas

TABLA 1: MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS ³⁸⁻⁵⁴	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 2: DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO (PRIMERA ETAPA)	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 3: DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO (SEGUNDA ETAPA).	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 4: RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO (PRIMERA ETAPA)	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 5: CORRELACIÓN ENTRE LAS VARIABLES EMPLEADAS EN LA PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO (PRIMERA PARTE).	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 6: RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO (SEGUNDA ETAPA).	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 7: ETAPAS PROPUESTAS PARA LA FORMACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO.	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
TABLA 8: RESULTADOS DEL SEGUIMIENTO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO A TRAVÉS DEL ESTRATO CORNEO A DIFERENTES TIEMPOS DE APLICACIÓN. RESPUESTA DE MICROFOTOLUMINISCENCIA (INTENSIDAD) VERSUS CINTAS RETIRADAS A DIFERENTES TIEMPOS DE APLICACIÓN.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

Resumen

Desde la antigüedad el ser humano ha tratado de aliviar las enfermedades causadas por cuestiones hereditarias, agentes patógenos, desórdenes alimenticios o factores físicos como lesiones, el medio ambiente, entre otros. La búsqueda de mejores formas para tratar dichas enfermedades dio origen al surgimiento de disciplinas especializadas como la medicina. La aplicación de sustancias de origen animal, vegetal o mineral (fármaco o principio activo) fue y ha sido el arma principal de la medicina hasta nuestros días. El surgimiento de la Farmacia obedece a la necesidad de hacer llegar a los principios activos a un sitio de acción en las mejores condiciones posibles y tratando de que este conserve durante más tiempo sus propiedades hasta poder ser administrado. Las estrategias para conjuntar a la medicina con la farmacia han ido de la mano desde tiempos remotos y es ahora que la dosificación de fármacos mediante acarreadores de nueva generación ha cobrado gran importancia debido a que muchos de los fármacos existentes cumplen una función muy importante en las terapias medicamentosas, pero tienen propiedades fisicoquímicas que hacen prácticamente imposible que dicha sustancia llegue al sitio de acción; es en este tipo de problemas que el profesional farmacéutico desarrolla acarreadores para lograr una dosificación adecuada y una pronta recuperación del paciente. Como parte de esta nueva oleada de acarreadores de fármacos se encuentran las nanopartículas, de las cuales se hablará con más detenimiento en el desarrollo de este trabajo.

Esta tesis presenta el estudio de la fabricación de nanopartículas de polietilcianoacrilato y su transporte a través de la piel. En el desarrollo de este trabajo de investigación se realizó un diseño de experimentos para poder ajustar las variables de proceso a los niveles adecuados para poder fabricar nanopartículas de polietilcianoacrilato de tamaño menor a 100nm, el cual es el tamaño adecuado para poder ser utilizadas como transportadores de fármacos a través de la piel humana. Una vez realizados los experimentos planteados, los esfuerzos fueron enfocados a conocer el mecanismo mediante el cual se forman las nanopartículas de polietilcianoacrilato, para lo cual se exploraron algunas variables adicionales al proceso de manufactura y se realizó una cinética del fenómeno de formación de dichas nanoestructuras. La manera que se encontró para poder explicar dicho fenómeno fue mediante un modelo utilizado en reacciones oscilantes: "El Brusselator". Mediante dicho modelo se lograron explicar todos los fenómenos asociados con el mecanismo.

Una vez propuesto el modelo de formación de las nanopartículas se buscó la forma de seguir el transporte de las nanopartículas a través de la piel para lo cual se utilizó una técnica llamada "Tape Stripping" (exfoliación mediante tiras adhesivas) para la obtención de las muestras a diferentes profundidades del estrato córneo y como técnica analítica para la cuantificación se utilizó microfotoluminiscencia.

Resumiendo, los aportes de esta tesis doctoral son los siguientes:

- 1.- La utilización del diseño de experimentos para lograr un tamaño de partícula promedio de las nanopartículas de polietilcianoacrilato inferior a los 100nm.

- 2.- Se propuso un modelo formal basado en reacciones oscilantes para la formación de las nanopartículas de polietilcianoacrilato.
- 3.- Se dio seguimiento a las nanopartículas de polietilcianoacrilato a través del estrato corneo mediante la técnica de "Tape Stripping" (exfoliación mediante tiras adhesivas) y la cuantificación mediante microfotoluminiscencia, la cual nunca se había utilizado para este tipo de trabajos y mucho menos en nanopartículas poliméricas de uso farmacéutico.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1 GENERALIDADES

1.1 Nanotecnología

En 1986, cinco años después de que los investigadores Gerd Binnig y Einrich Rohrer de la IBM ganaran el premio Nobel por su invención del microscopio basado en el efecto túnel, el libro “Los motores de la creación” escrito por K. Eric Drexler, creó una sensación de control sobre la materia. El libro describe nano-máquinas auto-replicables que podrían producir virtualmente cualquier material, mientras que revertía el calentamiento global, curaban enfermedades y dramáticamente podían extender la esperanza de vida. Los científicos reconocidos de la época ridiculizaron esta visión debido a que era algo improbable y catalogaron tales ideas como una proyección absurda del futuro. Debido a esta atmósfera que ha rodeado a la nanotecnología, desde entonces se pueden vislumbrar algunas ventajas imprevistas. Para muchos científicos estudiosos de las nano-estructuras, las proyecciones de Drexler sobre la nanotecnología marcaron la frontera entre la ciencia y la ficción de una manera definitiva. Ahora se habla de las máquinas que pueden llegar a reparar células, las cuales eliminarían el envejecimiento y de las máquinas elaboradoras de alimento que con materia prima podrían producir los nutrientes necesarios sin matar animales o cortar plantas. Todo esto ha servido para crear una fascinación en los científicos tradicionales que actualmente se enfocan en proyectos todavía no tan elaborados pero eminentemente más tangibles. La nanotecnología se ha convertido pues en una oferta de investigación bastante atractiva, inclusive para la farmacia.

El libro de Drexler ha inspirado una vena rica de la literatura de la ciencia-ficción; por ejemplo: “hechiceros de lo pequeño,” por Graham P. Collins. Los libros referentes a la nanotecnología han hecho que los jóvenes se interesen en el estudio de esta área.

El peligro viene cuando los libros acerca de nanotecnología son tomados al pie de la letra y se cree que los nanorobots se reproducirán de manera incontrolable. Una masa incontrolablemente creciente de nanorobots podría poner en peligro las sociedades actuales, a tal peligro Drexler lo llamo “Grey-goo”. Esta visión de los peligros que pudiera traer la nanotecnología aparta la atención del verdadero “goo”; las armas químicas y biológicas.

Entre químicos e investigadores en materiales que se han convertido en nanotecnólogos las predicciones de Drexler se han asumido con cierta incredulidad; la ciencia está lejos de poder producir las máquinas nanoscópicas que pueden ayudar a restablecer cerebros congelados de animación suspendida. Zyvex, una compañía iniciada por un magnate del software tentado por la nanotecnología Drexleriana, ha reconocido cuan difícil será crear robots en la escala del nanómetro; esta compañía ha empezado a hacer ciertos

elementos micro mecánicos para contrarrestar el crecimiento nanotecnológico, lo cual Drexler ha criticado en sus libros.

A pesar de toda esta polémica sobre nanotecnología, parece ser que los gobiernos del mundo están convencidos de que este será un campo estratégico que no hay que descuidar. Así como en su momento la arcilla y la piedra fueron determinantes para el desarrollo de los pueblos primitivos, los metales en otro momento de la historia, más recientemente el desarrollo de circuitos y la era tecnológica donde surgieron las computadoras, la nanotecnología vendrá a ser parte clave en este crecimiento y desarrollo de las civilizaciones.

En los Estados Unidos de Norte América la inversión en investigación en nanotecnología creció de 117 millones de dólares en 1997 a cerca de 500 millones de dólares en el 2002ⁱ. Lo que lleva a pensar que la nanotecnología será un aspecto muy importante en el desarrollo de la tecnología del futuro.

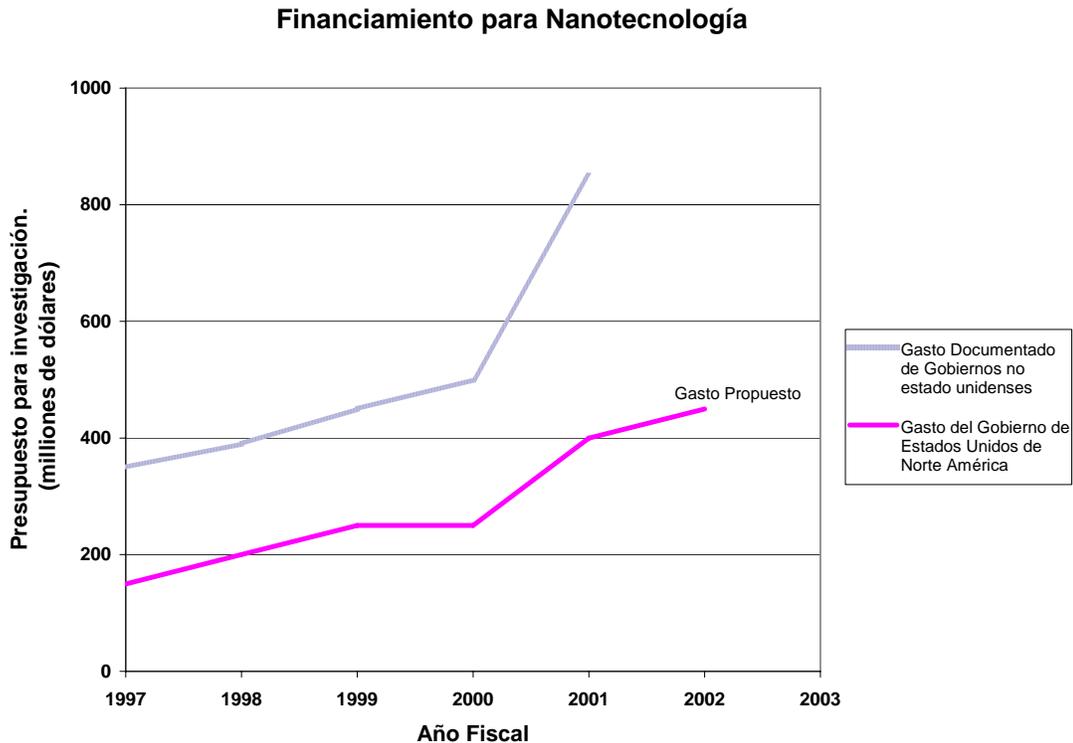


Figura 1: *Financiamiento para Nanotecnología en EUA¹.*

Para no ir muy lejos, en el año 2001, científicos del Instituto Weizmann en Israel, desarrollaron una computadora del tamaño de una gota de agua, la cual fue hecha a base de DNA y enzimas. Bautizaron dicha computadora como “Automaton”. Otros ejemplos del uso de la nanotecnología en diversos campos, es la alteración de genes de bacterias para producir proteínas que se pueden usar en circuitos nanoelectrónicos, también se han usado virus para liberar medicamentos de manera específica.

Las nuevas herramientas capaces de proyectar imágenes y la manipulación de moléculas o átomos nos han llevado a la nueva era de la nanotecnología. Los iconos de esta revolución son el microscopio basado en el efecto túnel y el microscopio de fuerza atómica entre otros, capaces de crear figuras de átomos individuales o de moverlos desde un lugar a otro. El laboratorio de investigación de la IBM en Zurich, incluso ha montado en la punta más pequeña usada en microscopios de fuerza atómica, cerca de 1000 cantilevers microscópicos en un microchip. Las puntas en el dispositivo pueden escribir bits digitales en una hoja de polímero. La técnica podría conducir a un dispositivo de almacenaje de datos de 20 veces o más la densidad de los mejores discos de hoy.

Varias maneras de fabricar estructuras nanométricas han surgido en el mundo. Como escultores, los fabricantes de arriba hacia abajo cincelan o agregan el material a granel a una superficie. Los microchips, que ahora tienen líneas de circuito de poco más de 100 nanómetros, están a punto de convertirse en el ejemplo más notable. En contraste, los fabricantes de abajo hacia arriba utilizan procesos de auto-ensamblado para poner juntas estructuras de átomos o moléculas que se ordenen espontáneamente, dadas las condiciones apropiadas. Los cilindros de nanotubos de grafito con características eléctricas muy particulares son un buen ejemplo de nanoestructuras que se auto-ensamblan.

La nanotecnología se ha convertido en algo tan importante que en Estados Unidos en 1999 había cerca de 10 centros de investigación en nanotecnología dentro de las Universidades y para el año 2001 eran ya cerca de 30.

Por más que quisiéramos apartar nuestra atención de la nanotecnología, es un tema que día a día nos va alcanzando y va formando parte de nuestra vida cotidiana. Podemos verlo en el cine, en series de televisión, en programas futuristas, y otros más, así como en productos desarrollados por científicos mexicanos como la pintura anti-graffiti, recubrimientos anticorrosivos, esmaltes para evitar que se manchen los dientes, etc., todos estos desarrollos realizados en el CFATA (Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada) de la UNAM. La nanotecnología ha alcanzado también a la industria cosmética con el uso de nanosomas y nanoesferas. Actualmente en la industria farmacéutica se trabaja con nanoesferas y nanocápsulas, para administrar fármacos disminuyendo efectos adversos y mejorando la efectividad.

1.2 Nanotecnología en Farmacia

La revolución acaecida en los últimos años de tratar de dosificar medicamentos de manera más efectiva, con menos efectos adversos y más específicos, ha sido uno de los principales objetivos de las ciencias farmacéuticas. Los científicos en la actualidad han volteado la vista a tratar de mejorar los sistemas de liberación de fármacos. Muchos de los medicamentos actuales son bastante efectivos pero tienen que ser dosificados de manera más eficiente. La época en que se administraban fármacos en grandes dosis para mantener un efecto terapéutico por un corto tiempo está cada vez más cerca de terminar.

Los fármacos por su naturaleza química se enfrentan a grandes desafíos en su paso por el organismo: degradación por el ácido del estómago, el paso hepático, ataques inmunológicos, incompatibilidad con alimentos, entre otros.

Lo anterior ha hecho que se desarrollen estrategias como lo son los dendrímeros, la formación de complejos, las ciclodextrinas, los recubrimientos de gránulos, recubrimientos de tabletas, los liposomas, la búsqueda de polimorfos más solubles, los profármacos, etc., con el fin de hacer llegar los fármacos a sus sitios de acción de forma más eficaz y sin los efectos adversos que estos conllevan.

La farmacia como otras disciplinas, ha entrado a la era moderna y ha echado mano de la tecnología de punta para tratar de solucionar los problemas de falta de especificidad y los efectos adversos, para lo cual ha desarrollado sistemas basados en estas nuevas herramientas que nos ofrece la ciencia y tecnología.

1.3 Tecnología de punta en Farmacia

El desarrollo de metodologías y el uso de equipo de vanguardia utilizado en otros campos es poco frecuente en el área farmacéutica. La caracterización de materiales farmacéuticos es parte importante de la estrategia para desarrollar nuevos productos, pero debido al atraso tecnológico que ha sufrido el sector, el farmacéutico sigue utilizando metodologías y equipos que en muchas áreas ya son obsoletos.

El empleo de tecnología de punta como los rayos X, la microscopía de fuerza atómica, la microscopía basada en el efecto túnel, el análisis calorimétrico, la microscopía electrónica de barrido, el análisis de tamaño de partícula mediante dispersión de luz dinámica, técnicas espectroscópicas de emisión, etc., que en otras áreas han ayudado a encontrar resultados muy originales, en farmacia muy pocos investigadores hacen uso de ellas. La investigación en este campo sigue siendo a escalas macroscópicas, por ello cada día surgen problemas no solucionables, principalmente en la industria. El conocimiento microscópico de las características de los materiales farmacéuticos es de vital importancia para poder explicar su comportamiento macroscópico. Sin ir muy lejos, la solubilidad de un principio activo se ve modificada por un cambio en la celda unitaria del cristal, dicho fenómeno llamado polimorfismo, puede ser debido a stress ejercido por variaciones en las condiciones del proceso de obtención de la materia prima; el cual suele ser distinto según el proveedor, dicho cambio pocas veces es considerado por los químicos en desarrollo de las empresas farmacéuticas. La forma de estudiar dichos fenómenos y encontrar las posibles causas es mediante el análisis del material mediante metodologías de punta como lo son la difracción de rayos X, el análisis calorimétrico y la espectroscopia IR, solo por mencionar algunas.

Durante la ejecución de algún proceso, los cambios a nivel microscópico pueden ser de suma importancia y eso puede traer problemas serios en estabilidad, solubilidad, compatibilidad con excipientes, etc., lo cual se puede remediar, combinando metodologías de análisis avanzadas y condiciones de proceso controladas y optimizadas.

Se puede escribir mucho sobre los problemas que se presentan en el ámbito farmacéutico y como se pudieran resolver utilizando tecnología de punta y lo mismo se puede decir de los vicios en el desarrollo de nuevos productos a nivel industrial y como pudiera ayudar un buen análisis mediante metodologías modernas utilizadas en otras áreas, pero no es el objetivo de este trabajo, sólo baste decir que el uso de tecnología sofisticada en el ámbito farmacéutico debe de ser más expedito debido al avance que están teniendo otras áreas del conocimiento humano.

Por lo anterior, la incorporación del conocimiento, el empleo de equipo y metodologías utilizadas en otras áreas, harán entrar a las ciencias farmacéuticas actuales al avance tecnológico global y crecerán de manera vertiginosa para estar listas para las exigencias del futuro, donde se visualizan medicamentos basados en nanotecnología y ciencias genómicas.

1.4 Polímeros

La materia en general está formada por moléculas que pueden ser de un tamaño considerado normal o moléculas muy grandes llamadas polímeros.

Los polímeros se producen por la unión de muchas moléculas pequeñas denominadas monómeros que forman grandes cadenas de diversas formas. Algunas son lineales, otras tienen ramificaciones. Algunas más se asemejan a las escaleras de mano y otras son como redes tridimensionales.

Existen polímeros naturales de gran importancia comercial como el algodón, formado por fibras de celulosas. La celulosa se encuentra en la madera y en los tallos de muchas plantas, y se emplean para hacer telas y papel. La seda es otro polímero natural muy apreciado y es una poliamida semejante al nylon. La lana, proteína del pelo de las ovejas, es otro ejemplo. La mayor parte de los polímeros que usamos en nuestra vida diaria son materiales sintéticos con propiedades y aplicaciones variadas.

Lo que distingue a los polímeros de los materiales constituidos por moléculas de tamaño normal son sus propiedades mecánicas. En general, los polímeros tienen una excelente resistencia mecánica debido a que las grandes cadenas poliméricas se atraen. Las fuerzas de atracción intermoleculares dependen de la composición química del polímero y pueden ser de varias clases.

1.4.1 Concepto y clasificación de los polímeros.

Un polímero (del griego *poly*, muchos; *meros*, parte, segmento) es una sustancia cuyas moléculas son, por lo menos aproximadamente, múltiplos de unidades de peso molecular bajo. La unidad de bajo peso molecular es el monómero. Si el polímero es rigurosamente uniforme en peso molecular y estructura molecular,

su grado de polimerización es indicado por un numeral griego, según el número de unidades de monómero que contiene; así, hablamos de dímeros, trímeros, tetrámero, pentámero y sucesivos. De tal forma, el término polímero designa una combinación de un número no especificado de unidades. De este modo, el trioximetileno, es el trímero del formaldehído.

Los polímeros son designados de acuerdo a las reglas del comité de nomenclatura de la IUPAC.ⁱⁱ Si el número de unidades es muy grande, se usa también la expresión gran polímero. Un polímero no tiene la necesidad de constar de moléculas individuales todas del mismo peso molecular, y no es necesario que todas tengan las mismas composiciones químicas y la misma estructura molecular. Hay polímeros naturales como ciertas proteínas globulares y poli-carbohidratos, cuyas moléculas individuales tienen los mismos pesos moleculares y la misma estructura molecular; pero la gran mayoría de los polímeros sintéticos y naturales importantes son mezclas de componentes poliméricos homólogos. La pequeña variabilidad en la composición química y en la estructura molecular es el resultado de la presencia de grupos finales, ramas ocasionales, variaciones en la orientación de unidades monoméricas y la irregularidad en el orden en el que se suceden los diferentes tipos de esas unidades en los copolímeros. Estas variedades en general no suelen afectar a las propiedades del producto final, sin embargo, se ha descubierto que en ciertos casos hubo variaciones en copolímeros y ciertos polímeros cristalinos.

1.4.2 Fuerzas de Atracción intermoleculares.

1.4.2.1 Fuerzas de Van der Waals.

También llamadas fuerzas de dispersión, están presentes en las moléculas de muy baja polaridad, generalmente hidrocarburos. Estas fuerzas provienen de dipolos transitorios: como resultado de los movimientos de electrones, en cierto instante una porción de la molécula se vuelve ligeramente negativa, mientras que en otra región aparece una carga positiva equivalente. Así se forman dipolos no-permanentes. Estos dipolos producen atracciones electroestáticas muy débiles en las moléculas de tamaño normal, pero en los polímeros, formados por miles de estas pequeñas moléculas, las fuerzas de atracción se multiplican y llegan a ser enormes, como en el caso del polietileno.

1.4.2.2 Fuerzas de atracción.

Debidas a dipolos permanentes, como en el caso de los poliésteres. Estas atracciones son mucho más potentes y a ellas se debe la gran resistencia tensil de las fibras de los poliésteres.

1.4.2.3 Enlaces de hidrógeno.

Este tipo de interacción molecular, que ocurre por la presencia de grupos funcionales fuertemente electronegativos unidos a átomos de hidrógeno, como en las poliamidas (nylon), las cuales son tan fuertes, que una fibra obtenida con estas poliamidas tiene resistencia tensil mayor que la de una fibra de acero de igual masa.

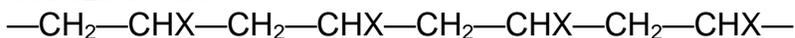
1.4.2.4 Atracciones iónicas.

Las atracciones de tipo iónico, son las más intensas: un ejemplo característico es el copolímero etileno-ácido acrílico, que al ser neutralizado con la base $M(OH)_2$, producirá la estructura deseada. Estos materiales se llaman ionómeros y se usan, por ejemplo, para hacer películas transparentes de alta resistencia. La fuerza total de atracción entre las moléculas del polímero, dependería del número de las interacciones.

1.4.3 Polímeros isómeros.

Los polímeros isómeros son polímeros que tienen esencialmente la misma composición de porcentaje, pero difieren en la colocación de los átomos o grupos de átomos en las moléculas. Los polímeros isómeros del tipo vinilo pueden diferenciarse en las orientaciones relativas (cabeza a cola, cabeza a cabeza, cola a cola, o mezclas al azar de las dos) de los segmentos consecutivos (unidades monoméricas):

Cabeza a cola



Cabeza a cabeza y cola a cola



O bien en la orientación de sustituyentes o cadenas laterales con respecto al plano de la cadena axial hipotéticamente extendida.

La isomería *cis-trans* puede ocurrir, y probablemente ocurre, para cualquier polímero que tenga ligaduras dobles, distintas a las que existen en los grupos vinilo pendientes (los unidos a la cadena principal).

1.4.4 Concepto de tacticidad.

El termino tacticidad se refiere al ordenamiento espacial de las unidades estructurales. El mejor ejemplo es el polipropileno, que antes de 1955 no tenía ninguna utilidad. En ese año, Giulio Natta en Milán, utilizó para hacer polipropileno, los catalizadores que Karl Ziegler había desarrollado para el polietileno. Esos catalizadores, hechos a base de cloruro de titanio y tri-alkil-aluminio, acomodan a los monómeros de tal manera que todos los grupos metilos quedan colocados del mismo lado en la cadena.

En esta forma, Natta creó el polipropileno *isotáctico*, que tiene excelentes propiedades mecánicas. Hasta ese momento, con los procedimientos convencionales, sólo se había podido hacer polímeros *atácticos*, sin regularidad estructural.

El polipropileno atáctico es un material ceroso, con pésimas propiedades mecánicas.

Otros catalizadores permiten colocar los grupos alternadamente, formando polímeros que se llaman sindiotácticos, los cuales, como los isotácticos, tienen muy buenas propiedades.

1.4.5 Homopolímeros y copolímeros.

Los materiales como el polietileno, el PVC, el polipropileno, y otros que contienen una sola unidad estructural, se llaman homopolímeros. Los homopolímeros, además, contienen cantidades menores de irregularidades en los extremos de la cadena o en ramificaciones.

Por otro lado los copolímeros contienen varias unidades estructurales, como es el caso de algunos muy importantes en los que participa el estireno.

Estas combinaciones de monómeros se realizan para modificar las propiedades de los polímeros y lograr nuevas aplicaciones. Lo que se busca es que cada monómero imparta una de sus propiedades al material final; así, por ejemplo, en el ABS, el acrilonitrilo aporta su resistencia química, el butadieno su flexibilidad y el estireno imparte al material la rigidez que requiera la aplicación particular.

Evidentemente, al variar las proporciones de los monómeros, las propiedades de los copolímeros van variando también, de manera que el proceso de copolimerización permite hasta cierto punto fabricar polímeros a la medida.

No solo cambian las propiedades al variar las proporciones de los monómeros, sino también al variar su posición dentro de las cadenas. Así, existen los siguientes tipos de copolímeros:

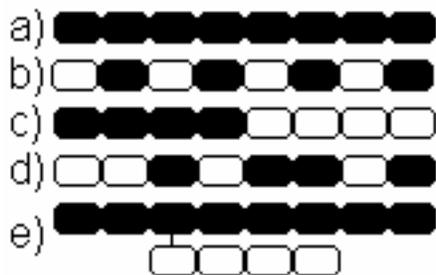


Figura 2: Tipos de copolímeros a) Homopolímero, b) Copolímero alternado, c) Copolímero en bloque, d) Copolímero al azar, e) Copolímero injertado.

Las mezclas físicas de polímeros, que no tienen uniones permanentes entre ellos, también forman parte de la enorme versatilidad de los materiales poliméricos. Son el equivalente a las *aleaciones metálicas*.

En ocasiones se mezclan para mejorar alguna propiedad, aunque generalmente a expensas de otra. Por ejemplo, el óxido de polifenilo tiene excelente resistencia térmica pero es muy difícil procesarlo. El poliestireno tiene justamente las propiedades contrarias, de manera que al mezclarlos se gana en facilidad de procedimiento, aunque resulte un material que no resistirá temperaturas muy altas. Sin embargo, en este caso hay un efecto sinérgico, en el sentido en que la resistencia mecánica es mejor en algunos aspectos que a la de cualquiera de los dos polímeros. Esto no es frecuente, porque puede ocurrir únicamente cuando existe perfecta compatibilidad entre los dos polímeros y por regla general no la hay, así que en la mayoría de los casos debe agregarse un tercer ingrediente para compatibilizar la mezcla. Lo que se emplea casi siempre es un copolímero injertado, o uno de bloque que contenga unidades estructurales de los dos polímeros.

Otras veces se mezcla simplemente para reducir el costo de material. En otros casos, pequeñas cantidades de un polímero de alta calidad puede mejorar la del otro, al grado de permitir una nueva aplicación.

1.4.6 Procesos de polimerización.

Existen diversos procesos para unir moléculas pequeñas con otras para formar moléculas grandes. Su clasificación se basa en el mecanismo por el cual se unen estructuras monoméricas o en las condiciones experimentales de reacción, así la polimerización puede efectuarse por distintos métodos a saber:

1.4.6.1 Polimerización por adición.

- Adición de moléculas pequeñas de un mismo tipo unas a otras por apertura del doble enlace sin eliminación de ninguna parte de la molécula (polimerización de tipo vinilo).

- Adición de pequeñas moléculas de un mismo tipo unas a otras por apertura de un anillo sin eliminación de ninguna parte de la molécula (polimerización tipo epóxido.).
- Adición de pequeñas moléculas de un mismo tipo unas a otras por apertura de un doble enlace con eliminación de una parte de la molécula (polimerización alifática del tipo diazo.).
- Adición de pequeñas moléculas unas a otras por ruptura del anillo con eliminación de una parte de la molécula (polimerización del tipo α - aminocarboxianhidro.).
- Adición de birradicales formados por deshidrogenación (polimerización tipo *p*-xileno.).

1.4.6.2 Polimerización por condensación.

- Formación de poliésteres, poliamidas, poliéteres, polianhidros, etc., por eliminación de agua o alcoholes, con moléculas bifuncionales, como ácidos o glicoles, diaminas, diésteres entre otros (polimerización del tipo poliésteres y poliamidas).
- Formación de poli-hidrocarburos, por eliminación de halógenos o haluros de hidrógeno, con ayuda de catalizadores metálicos o de haluros metálicos (policondensación del tipo de Friedel-Crafts y Ullmann.).
- Formación de polisulfuros o poli-polisulfuros, por eliminación de cloruro de sodio, con haluros bifuncionales de alquilo o arilo y sulfuros alcalinos o polisulfuros alcalinos o por oxidación de dimercaptanos (policondensación del tipo Thiokol).

1.4.6.3 Polimerización en suspensión, emulsión y masa.

- Polimerización en suspensión. En este caso el peróxido es soluble en el monómero. La polimerización se realiza en agua, y como el monómero y polímero que se obtiene de él son insolubles en agua, se obtiene una suspensión. Para evitar que el polímero se aglomere en el reactor, se disuelve en el agua una pequeña cantidad de alcohol polivinílico, el cual cubre la superficie de las gotas del polímero y evita que se peguen.
- Polimerización en emulsión. La reacción se realiza también en agua, con peróxidos solubles en agua pero en lugar de agregarle un agente de suspensión como el alcohol polivinílico, se añade un emulsificante, que puede ser un detergente o un jabón.

En esas condiciones el monómero se emulsifica, es decir, forma una dispersión de gotas pequeñas en el medio de polimerización. Estas micro gotas quedan estabilizadas por el tensoactivo durante todo el proceso de la polimerización, y acaban formando un látex de aspecto lechoso, del cual se hace precipitar el polímero rompiendo la emulsión. Posteriormente se lava, quedando siempre restos de tensoactivo, lo que le imprime características especiales de adsorción de aditivos.

- Polimerización en masa. En este tipo de reacción, los únicos ingredientes son el monómero y el peróxido.

El polímero que se obtiene es muy semejante al de suspensión, pero es más puro que éste y tiene algunas ventajas en la adsorción de aditivos porque no está contaminado con alcohol polivinílico.

1.4.7 Transiciones de los polímeros dependientes de la temperatura.

A temperaturas altas, los polímeros se vuelven líquidos muy viscosos en los que las cadenas están constantemente en movimiento, cambiando su forma y deslizándose unas sobre las otras. A temperaturas muy bajas, el mismo polímero sería un sólido duro, rígido y frágil.

El polímero puede solidificarse formando un sólido amorfo o uno cristalino. Como se sabe, los polímeros con fuertes irregularidades en su estructura tienden a formar sólidos amorfos y los polímeros con cadenas muy simétricas tienden a cristalizar, por lo menos parcialmente.

A temperaturas altas el polímero está en forma de un líquido viscoso, y al enfriarlo, se vuelve cada vez más elástico hasta que llega a la *temperatura de transición vítrea*, T_g , en que se convierte en un sólido duro, rígido y frágil. Lo que sucede es que, conforme disminuye la temperatura, el polímero se contrae debido a que las cadenas se mueven menos y se atraen más. Dado que va disminuyendo el volumen libre, es decir, los espacios entre las moléculas, los segmentos de las cadenas tienen cada vez menos lugar para girar, hasta que al llegar a T_g , dejan de hacerlo, el material se pone rígido y en esas condiciones se vuelve *vítreo*, es decir frágil, porque sus cadenas aunque todavía vibran ya no pueden girar para cambiar su posición, y no tienen manera de amortiguar los impactos. A esta restricción del movimiento molecular también contribuye por supuesto, la falta de suficiente energía debida a las bajas temperaturas.

Evidentemente, el estado vítreo lo alcanzan diferentes polímeros a diferentes temperaturas. Los que sean más flexibles, con menos grupos voluminosos o con hetero-átomos en sus cadenas, podrán girar o permanecer flexibles a temperaturas menores que los otros. Por ejemplo, los silicones, el polietileno y el hule natural tienen temperaturas de transición vítrea de -123, -120 y -73 °C respectivamente. En cambio, polímeros con grupos grandes o grupos muy polares o polarizables, tienen de por sí tan baja movilidad que son vítreos a temperatura ambiente y para reblandecerlos se requiere de altas temperaturas.

En los polímeros semicristalinos existen dos transiciones: una, cuando cristaliza el polímero al enfriarlo y la otra cuando el material elástico resultante se vuelve vítreo (T_g).

Entre T_m (temperatura de fusión) y T_g , los cristalitos están embebidos en una matriz más o menos elástica y el material es correoso, pero a T_g los cristales están dispersos en una matriz frágil.

Las propiedades mecánicas de los polímeros también cambian con la temperatura y en un gráfico que relaciona el módulo de elasticidad con la temperatura, se pueden apreciar las mismas transiciones.

A T_g , el material es un sólido vítreo de gran rigidez. La única deformación posible se debe al estiramiento y doblamiento de los enlaces covalentes que unen a los átomos en la cadena, y al estiramiento de los enlaces intermoleculares. Esta deformación no es permanente ni puede ser muy pronunciada.ⁱⁱⁱ

A temperaturas superiores a T_g , la deformación es más extensa y más dependiente del tiempo, las moléculas ya tienen mayor libertad y cambian continuamente su forma y hasta cierto punto su posición. La aplicación del esfuerzo tiende a orientar a las moléculas. Por ejemplo, un esfuerzo de tensión extiende a las moléculas y las orienta en la dirección del esfuerzo aplicado, ya que así se produce una elongación de la muestra.

Si la temperatura es mayor, pero muy cercana a T_g , la deformación es prácticamente reversible y se debe al reordenamiento de segmentos cortos de las cadenas.

Entre T_g y T_m , el material es huloso porque las cadenas están enmarañadas y eso dificulta su movimiento.

A temperaturas cercanas a T_m y mayores, las cadenas poliméricas ya se deslizan y separan causando flujo viscoso irreversible. El material se comporta como un líquido muy viscoso.

Un polímero parcialmente cristalino, generalmente tiene mayor resistencia mecánica que el mismo material con estructura amorfa. La mayor resistencia o mayor módulo se debe al gran número y la regularidad de los espacios intermoleculares en las estructuras cristalinas. En los polímeros amorfos, el número de estas interacciones es menor y su espaciado es errático, así que al aplicarles esfuerzo, muchas secciones del polímero se extienden o deforman libremente.

Existen otros efectos de la temperatura sobre los polímeros que son dignos de tomar en cuenta, por ejemplo:

El azufre polimérico es un elastómero inorgánico interesante. Bajo condiciones de equilibrio a temperatura ambiente, el azufre rómbico consiste principalmente de anillos de 8 miembros. Cuando se calienta, este funde a 113°C a una viscosidad relativamente baja, obteniéndose un líquido rojizo-amarillento. A temperaturas más altas aproximadamente 160°C , la viscosidad aumenta repentinamente ya que los anillos de 8 miembros se abren y se extienden, formándose cadenas lineales de cerca de 1×10^5 grados de polimerización. Con posterior calentamiento, la viscosidad decrece, ya que el polímero de-polimeriza. La polimerización súbita cuando se calienta es llamada "Temperatura piso", debajo de la cual la energía libre de polimerización es positiva, y por arriba de esta la energía libre de polimerización es negativa. (Esto es lo opuesto de muchos polímeros orgánicos, los cuales exhiben "Temperaturas techo", arriba de la cual los polímeros de-polimerizan hasta monómeros).^{iv}

Más adelante se verá como los procesos de polimerización, de-polimerización, re-polimerización y dinámica de clusters están íntimamente relacionados. Este

trabajo trata de dar una explicación a este tipo de fenómenos, difíciles de entender por su complicado mecanismo.

En este trabajo se observará que la “Temperatura techo” es importante, pero cuando un polímero está en solución y bajo los efectos de otros factores como el pH, el iniciador y la temperatura (aunque no necesariamente cerca de la “Temperatura techo”), entre otros, pueden dar origen a procesos de depolimerización equivalentes a aquellos ocurridos en estado sólido por arriba de su “Temperatura techo”.

1.5 Osciladores Químicos

Después de haber revisado de manera general el tema de los polímeros, a partir de este punto se hará énfasis en el fenómeno cinético y dinámico observado durante la formación de las nanopartículas de polietilcianoacrilato. El fenómeno encontrado es parte de los llamados osciladores químicos.

Cada sistema vivo contiene cientos de osciladores químicos. El estudio sistemático de las reacciones químicas oscilantes se ha combinado con el amplio campo de la dinámica química no lineal de origen más reciente.

En 1828, Fechner describió una celda electromagnética que producía una corriente oscilante, éste fue el primer reporte publicado de oscilaciones en un sistema químico. Ostwald observó en 1899 que la tasa de disolución del cromo en ácido se incrementaba y disminuía periódicamente. Debido a que ambos sistemas eran inhomogéneos, la reacción oscilante se creyó imposible. Degn escribió en 1972: “Es difícil pensar en cualquier otra pregunta que ocupara a los químicos del siglo diecinueve y que todavía no haya recibido una respuesta satisfactoria”. Actualmente, las reacciones oscilantes siguen en estudio, como se verá en este trabajo.

Los comportamientos oscilantes se pueden ver en muchos sistemas químicos, pero se puede enfocar primeramente en sistemas homogéneos, reacciones isotérmicas en solución acuosa.

Si bien las reacciones oscilantes no fueron bien entendidas hasta mediados de los años 70, la discusión teórica inició desde 1910. En esta tesis se toma como referencia los trabajos teóricos y experimentales que fueron liderados por las ideas de Prigogine sobre termodinámica fuera de equilibrio y el trabajo experimental y teórico de Belousov, Zhabotinskii, Field, Körös y Noyes, los cuales persuadieron a los químicos sobre las oscilaciones químicas, las fronteras móviles y otros fenómenos que ahora comprenden el repertorio de la dinámica química no lineal merecían un estudio serio.

1.5.1 El modelo de Lotka-Volterra

Alfred Lotka fue uno de los personajes más interesantes en la historia de la ciencia. Él escribió varios artículos teóricos sobre oscilaciones químicas en las primeras décadas del siglo veinte y fue autor de una monografía sobre biología

teórica (1925) la cual contiene material que es vigente hasta la fecha. Lotka dejó la ciencia e invirtió la mayor parte de su vida laboral en un empleo en una compañía de seguros. En 1910, Lotka mostró que un conjunto de reacciones consecutivas pueden oscilar en su camino al equilibrio. Continuó su investigación por los comportamientos oscilantes surgidos de la ley de acción de masas y publicó su segundo artículo una década después (1920). Este último modelo, no es aplicable para ningún sistema químico real, pero ha inspirado considerablemente a los ecologistas. Vito Volterra usó ideas similares a las de Lotka para investigar un amplio rango de problemas ecológicos, incluyendo los efectos de la migración de muchas especies que interactuaban simultáneamente. El modelo más conocido de este tipo hoy en día es el denominado modelo de Lotka-Volterra y es usado frecuentemente para caracterizar interacciones depredador-presa^v.

El modelo consiste de tres etapas irreversibles. X es la población de conejos, la cual se reproduce de manera auto catalítica. A es la cantidad de pasto, la cual se asume que es constante, o al menos en gran exceso comparada con el consumo que de él pueden hacer los conejos. Y es la población de linces, y P representa los linces muertos.



Como ya se dijo cada etapa es irreversible: Los conejos nunca regresarán a ser pasto, ni los linces revivirán. Se puede entonces escribir un sistema de ecuaciones diferenciales para describir el comportamiento del depredador y la presa:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= k_x ax - k_y xy \\ \frac{dy}{dt} &= k_y xy - k_d y \end{aligned} \tag{2}$$

donde k_x es la constante de velocidad que refleja que tan rápido se reproducen los conejos; k_y especifica que tan rápido se reproducen los linces dado un número, x , de conejos para comer; y k_d indica la tasa de mortalidad de los linces. Para cualquier conjunto de constantes, el número de conejos y de linces oscilará con un periodo que depende de k_x , k_y , k_d y a . La “reacción neta”, la cual procede monótonamente, es la conversión de pasto (se asume que crece tan rápido como es consumido), a linces muertos. A continuación se muestran las oscilaciones en las poblaciones de conejos (H) y linces (P).

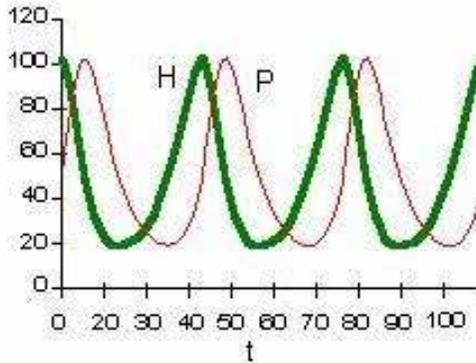


Figura 3: Oscilaciones en poblaciones de conejos (H) y linces (P) en el modelo de Lotka-Volterra⁵.

Una característica clave del sistema y de muchos sistemas químicos que presentan oscilaciones, es la auto catálisis, lo cual significa que la velocidad de crecimiento de las especies, sea animal o química, se incrementa con la población o concentración de esa especie. Aún los sistemas auto catalíticos pueden alcanzar un estado estacionario en el cual la velocidad neta de incremento de las especies relevantes es cero; por ejemplo, la tasa de reproducción de conejos está exactamente balanceada con el consumo de estos por los linces, y la velocidad de muerte de linces es exactamente la misma que los nacimientos de linces bebés. Matemáticamente, encontramos tal estado ajustando todas las derivadas igual a cero y resolviendo las ecuaciones algebraicas resultantes para las poblaciones.

Las oscilaciones en las dos poblaciones resultan de las diferencias entre la reproducción de los conejos y la reproducción de linces. Los conejos se reproducen debido a que el pasto, A , está en constante suministro. La población de linces también se incrementará, pero solo después de que la población de conejos haya crecido. Una vez que la población de linces sea demasiado grande y el suministro de pasto sea limitado, los conejos serán comidos más rápidamente en comparación a los nuevos conejos que nacen; entonces la población de conejos comenzará a disminuir, lo cual, como consecuencia, llevará a una disminución en la población de linces. La población de conejos comenzará a aumentar otra vez. De esa manera, habrá un tiempo de latencia entre los cambios en ambas poblaciones.

1.5.2 La reacción de Bray.

El primer oscilador isotérmico homogéneo en ser descrito fue la reacción de yodato, yodo y peróxido de hidrógeno estudiado por William C. Bray de la Universidad de California en Berkeley y más tarde por su estudiante Herman Liebafsky. El peróxido de hidrógeno se descompone a oxígeno y agua, se

encontró que las tasas de evolución de las concentraciones de oxígeno y yodo (I_2) variaban cercana y periódicamente. Sin embargo, por los próximos cincuenta años, los químicos escribirían que la reacción no era realmente homogénea y que las oscilaciones fueron debidas al polvo o a burbujas. Bray explícitamente contestó esta objeción en 1921 usando soluciones mezcladas y filtradas a temperatura ambiente cuidadosamente. La velocidad de reacción fue tan lenta que el oxígeno difundió antes de que las burbujas pudieran formarse.

Noyes y colaboradores revivieron el trabajo de Bray y Liebhafsky en los años 70 y condujeron cuidadosamente experimentos y modelamiento matemático, utilizando bases teóricas de termodinámica fuera de equilibrio. Mediante estos experimentos tuvieron éxito en convencer a la comunidad científica de esa época que la reacción de Bray representa un genuino oscilador químico.

1.5.3 La reacción de Belousov-Zhabotinsky (BZ).

El inicio de la dinámica no lineal moderna puede ser atribuido a Pavlovich Belousov (1893-1970), quien estaba buscando un análogo inorgánico del ciclo de Krebs, un proceso metabólico clave en el cual el ácido cítrico es un intermediario. El empezó sus estudios en 1950 mientras era la cabeza del Laboratorio de Biofísica en el primer ministerio de salud de la ex Unión Soviética (Antes de la revolución de 1917, Belousov había estudiado química en Zurich). El investigó una solución de bromato, ácido cítrico y iones céricos (Ce^{4+}), esperaba ver la conversión monótona del Ce^{4+} amarillo al Ce^{3+} incoloro. En lugar de eso, la solución repetidamente se aclaraba y se tornaba amarilla otra vez. Belousov estudió el sistema cuidadosamente, incluyendo los efectos de la temperatura y la concentración inicial. También notó que, sin agitación en una probeta, la solución exhibía ondas móviles amarillas. Mandó un manuscrito para ser sometido a publicación en 1951, pero fue rechazado. El editor de la revista le informó que su "supuesto descubrimiento" era imposible. El artículo podría ser publicado solamente si el daba evidencia adicional; una simple receta y fotografías de las diferentes fases de las oscilaciones no eran suficientes. El trabajó seis años más y sometió una nueva versión del manuscrito a otra revista, pero el editor volvió a rechazarlo. Belousov decidió no volver a tratar de publicar su trabajo, pero conservó su manuscrito, el cual circuló entre sus colegas en Moscú. Su única publicación sobre esta reacción apareció en unas memorias sin refereo de una conferencia sobre biología y radiación en 1958. Un manuscrito que Belousov escribió en 1951 describiendo su trabajo fue publicado póstumamente en ruso en 1981 y después en una traducción al inglés en 1985. En 1961, Anatol Zhabotinsky, un estudiante del doctorado en biofísica en la Universidad estatal de Moscú, trató de utilizar el mismo sistema que Belousov por sugerencia de su profesor, S. E. Schnoll. Sin embargo Zhabotinsky no tenía el artículo de Belousov, no tenía por consiguiente la receta original: 0.2 g de $KBrO_3$, 0.16 g de $Ce(SO_4)_2$, 2 g de ácido cítrico, 2 mL de H_2SO_4 (1:3), y suficiente agua para hacer 10mL de solución. Reemplazó el ácido cítrico con ácido malónico y obtuvo una mejor formulación, la cual no producía precipitados.

Zhabotinsky escribió un manuscrito que envió a Belousov para sus comentarios en 1962. Belousov respondió por correo, pero evitó un encuentro directo y nunca se vieron cara a cara. Al menos diez artículos sobre la reacción de Belousov-Zhabotinsky fueron publicados en ruso antes del primero en inglés. Se llevó a cabo una conferencia en Praga en el año de 1968 sobre "Osciladores Bioquímicos y Biológicos" y Zhabotinsky presentó algunos de sus resultados. Esta reunión motivó a muchos del bloque Este a estudiar la reacción BZ y la publicación de las memorias en inglés atrajo la atención de muchos químicos del Oeste también.

En muchos de sus experimentos, Belousov usó el indicador redox ferroina para incrementar el cambio de color durante las oscilaciones. La ferroina es roja en soluciones reducidas y azul en su forma oxidada, dando una variación de color más fácilmente visible que el cambio de pálido color amarillo a incoloro del sistema cérico-ceroso. Zaikin y Zhabotinsky encontraron que la ferroina sola podía catalizar la reacción BZ sin cerio. Este avance les permitió estudiar soluciones sin agitación en capa fina, en donde descubrieron ondas químicas propagantes. De esto mostraron como un sistema homogéneo exhibe no solo auto-organización temporal si no también espacial.

En 1980, el premio Lenin fue otorgado a Belousov, Zhabotinsky, V. I. Krinsky, G. R. Ivanitsky y A. Zaikin por su trabajo en la reacción BZ. Belousov había muerto en 1970.

Antes, y aún durante el desarrollo de la reacción BZ, se escribieron muchos artículos en occidente referentes a las causas por las cuales las reacciones oscilantes en sistemas homogéneos eran imposibles. Algunos dijeron que la reacción de Bray no era una reacción homogénea, en lugar de eso, decían que era el resultado de la presencia de pequeñas partículas. Muchos otros pensaron que la reacción era un artificio de un fenómeno heterogéneo como formación de burbujas. Hubo además quienes argumentaron que tal auto organización temporal espontánea violaba la segunda ley de la termodinámica.

1.5.4 El Brusselator.

Debido al hecho de que se generan comportamientos oscilantes de simples "reacciones químicas" con cierta cinética de acción de masas, el modelo de Lotka-Volterra no es una descripción apropiada de ningún sistema químico. Su gran problema es que es demasiado exitoso para generar comportamientos oscilantes. Es posible demostrar que el modelo tiene una solución oscilante para cada valor de constantes de velocidad y "suministro de comida" A o valores iniciales de X o Y , y que la amplitud y el periodo de las oscilaciones obtenidas depende de las cantidades antes mencionadas (constantes y suministro); hay un arreglo infinito de soluciones oscilantes. Si el sistema es perturbado, adicionando un poco más de A o X o Y , este continúa oscilando, pero ahora con un nuevo periodo y amplitud, hasta que es perturbado nuevamente. En presencia de cualquier cantidad significativa de ruido, sería muy difícil reconocer el comportamiento oscilante periódico, ya que este estaría constantemente

saltando de un comportamiento oscilante a otro. Los sistemas químicos reales no se comportan de esta manera. Estos oscilan solo dentro de un rango finito de parámetros, y tienen un modo único (amplitud y frecuencia) de oscilaciones, al cual ellos regresan si el sistema es perturbado. ¿Es posible construir un modelo razonable que tenga estas características?

El primer modelo que tuvo un respeto por la comunidad científica fue propuesto por Prigogine y Lefever en 1968 y fue comprobado por Tyson en 1973, a este modelo le llamaron “El Brusselator”.



Por medios analíticos y simulación numérica, Prigogine y Lefever demostraron que su modelo mostraba oscilaciones homogéneas y ondas propagantes como las que se vieron en el sistema BZ. El Brusselator fue extremadamente importante porque mostró que un mecanismo químicamente viable podría exhibir auto-organización.

En 1977, Nicolis y Prigogine resumieron el trabajo de la escuela de Bruselas en un libro titulado *Auto-organización de sistemas en no-equilibrio*. Por su contribución al estudio de sistemas fuera de equilibrio, Ilya Prigogine fue acreedor al premio Nóbel en química en el año de 1977.

1.5.5 Origen del Oregonador

El trabajo que llevó a legitimar el estudio de las reacciones oscilantes es una historia fascinante de casualidades y trabajo duro. En 1969, Richard Field, un alumno recién doctorado de la Universidad de Rhode Island, empezó una estancia posdoctoral con el experto en cinética química Richard Noyes en la Universidad de Oregon en Eugene. Por otro lado, Robert Mazo, un teórico del mismo departamento acababa de regresar de una estancia sabática en Bruselas con el grupo de Prigogine. Estando en Bruselas, Mazo había visto una demostración de la reacción BZ y de la formación de bandas que ocurre cuando esta reacción está corriendo en una probeta sin agitación. Mazo presentó un seminario en el departamento de química de la Universidad de Oregon y demostró el bandeo. Después de esta plática, Noyes se preguntó si el bandeo reaparecería si la solución fuera agitada. Cuando Mazo y sus colaboradores trataron de agitar el sistema de reacción, en el laboratorio descubrieron el comportamiento oscilante.

Fields y Noyes estaban fascinados por las oscilaciones y empezaron a trabajar para determinar el mecanismo de este importante comportamiento. El investigador Endre Körös había llegado recientemente a Eugene para una visita sabática de la Universidad de Eötvös en Budapest. Endre había ido a estudiar

las reacciones de intercambio de yodo, una especialidad de Noyes, pero cuando vio la reacción BZ, decidió trabajar en ella, también. Endre sugirió usar un electrodo selectivo de bromo para seguir la reacción, el cual demostró la importancia del bromo en la reacción. Durante este tiempo, Kasperek y Bruice llevaron a cabo un estudio sobre la reacción BZ que incluyó algunas observaciones interesantes pero sin explicar el mecanismo. Esta publicación alentó al grupo de Eugene, pero Bruice discontinuó el trabajo debido a que pensó que las oscilaciones surgieron de un sistema puramente homogéneo.

El hecho importante fue que Fields, Körös y Noyes fueron capaces de explicar el comportamiento cualitativo de la reacción BZ usando los mismos principios de la cinética química y la termodinámica que gobiernan las reacciones químicas ordinarias. Ellos publicaron en 1972 su mecanismo que se conoce como FKN en un artículo que ahora es un clásico. Una simulación numérica del comportamiento oscilante basado en el mecanismo FKN fue publicado algunos años más tarde.

Arthur Winfree, un biólogo con un interés en patrones espacio temporales, había asistido a la conferencia de Praga y decidió intentar el estudio de formación de patrones en la reacción BZ. En 1972, la cubierta de la revista Science mostraba el patrón de ondas espirales en la reacción BZ de Winfree. Fields y Noyes vieron inmediatamente como entender el desarrollo de tales patrones con la ayuda del mecanismo FKN y publicaron una explicación el mismo año.

Una etapa final solidificó el hecho de que la reacción BZ y las oscilaciones químicas tuvieran permanencia en la mente de los químicos de los años 1970's. Field y Noyes trabajaron para simplificar el mecanismo FKN, el cual, con sus 20 pasos elementales y especies químicas, era demasiado largo y complicado para tratarlo numéricamente con las más avanzadas computadoras y programas de la época, solo se podía hacer algo de trabajo analítico. Con profundo conocimiento químico, obtuvieron un modelo que tenía solo tres variables en concentraciones y mantenía las características esenciales de la reacción BZ completa. El modelo obtenido fue llamado "OREGONADOR".



2 PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS

2.1 Definición de nanopartículas en Farmacia

Las nanopartículas son sistemas sólidos coloidales formados de materiales macromoleculares (biodegradables o no), los cuales, debido a su talla submicrónica, son generalmente estables en el medio dispersante. La escala a la cual se encuentran las nanopartículas farmacéuticas es de $1\mu\text{m}$ (1000nm) a 1nm .

Existen básicamente dos tipos de nanopartículas farmacéuticas cuya diferencia estriba en el hecho de su fabricación y uso. Aquellas nanopartículas cuya estructura es sólida totalmente, son denominadas nanoesferas. Existen otras nanopartículas cuyo centro es hueco y le permiten contener fármaco líquido en su interior, en otros casos el centro o núcleo puede ser un sólido que posteriormente es recubierto por una película; a diferencia de las nanoesferas, a este tipo de nanopartículas se les denomina nanocápsulas.

En la siguiente figura se ilustran las diferencias antes mencionadas entre las nanoesferas y las nanocápsulas.

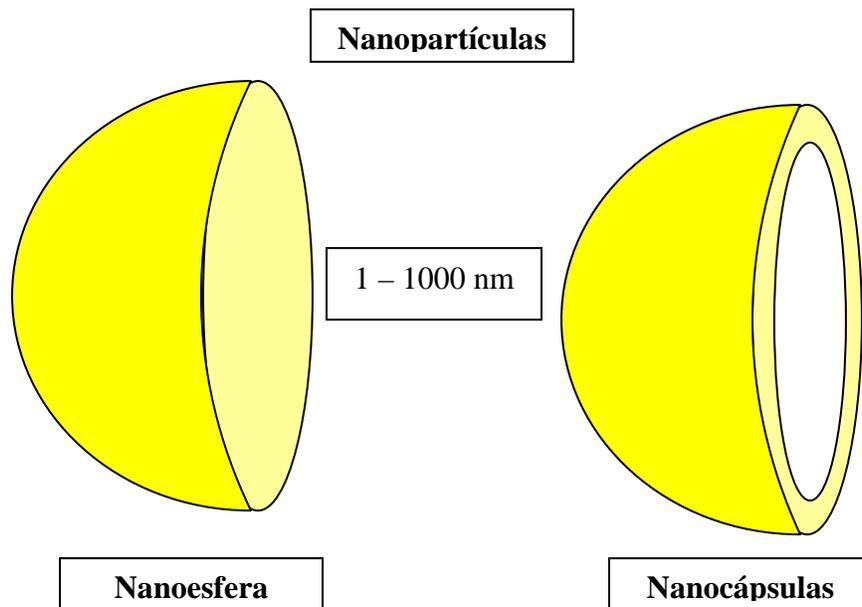


Figura 4: Tipos de nanopartículas¹³.

2.2 Fabricación de nanopartículas

Tecnológicamente los métodos de fabricación de nanopartículas son variados y contemplan un abanico de recursos tecnológicos para producir tanto nanocápsulas como nanoesferas. El método dependerá del material a utilizar, de sus propiedades fisicoquímicas, así como de las características del fármaco.

A continuación se describen los métodos más usados para la fabricación de nanopartículas farmacéuticas.

2.2.1 Polimerización en emulsión

En esta técnica se emplea un emulsificante que mantiene al monómero en gotas hasta que por la acción de un iniciador, el monómero empieza a polimerizar para formar las nanopartículas. Esta técnica fue propuesta por Harkins en 1948. Hoy día, a pesar de que es una técnica ampliamente utilizada para producir nanopartículas, tiene vacíos desde el punto de vista del conocimiento de su mecanismo.

En primer lugar se ha visto que las gotas de monómero que inicialmente se forman, son más grandes que las partículas producidas. Fitch y colaboradores^{vi, vii, viii, ix}, encontraron que la concentración de emulsificante no afecta la tasa de polimerización y que la formación de partículas es independiente de la tasa de polimerización. Se encontró además que la polimerización ocurre siempre a una determinada concentración inicial dependiente del tipo de polímero. El número de micelas es independiente del número de partículas formadas^{x, xi}. A concentraciones relativamente bajas de monómero, la polimerización se lleva a cabo aún sin presencia de emulsificante. Todo lo anterior condujo a Fitch a concluir que la iniciación de la polimerización se lleva cabo en el disolvente. La iniciación se lleva a cabo en esta fase cuando las moléculas de monómero son golpeadas por moléculas del iniciador o por radiaciones de alta energía. La polimerización y el crecimiento de las cadenas se mantienen por las moléculas de monómero que difunden hasta el polímero en crecimiento. La difusión de estas moléculas de monómero al polímero en crecimiento es mucho más rápida que el proceso de polimerización, proveyendo de monómero a las vecindades de donde la polimerización se esta llevando a cabo^{xii}. Las gotas de monómero y las micelas de emulsificante, actúan como depósitos para el monómero que será utilizado posteriormente y en etapas posteriores, las micelas sirven como depósitos para las moléculas de emulsificante que estabilizan las partículas de polímero después de la separación de fases y previenen la coagulación. Como se mencionó anteriormente, algunos sistemas pueden ser polimerizados sin la presencia de emulsificante^{xiii, xiv}.

Inicialmente, durante la polimerización en emulsión las moléculas de polímero en crecimiento permanecen disueltas en la fase continua de los alrededores. Después de que cierto peso molecular es alcanzado, las moléculas formadas se vuelven insolubles, así que la separación de fases y la formación de partículas ocurren indicadas por el efecto Tyndall. Después de la separación de fases, monómero adicional y moléculas de polímero, incluyendo micro y macro radicales, difunden dentro de las partículas poliméricas en crecimiento, manteniendo el crecimiento posterior de las partículas. La terminación de la polimerización se lleva a cabo por la reacción de dos radicales antes o después de la formación de la partícula^{xv}. Consecuentemente una partícula sencilla de polímero está constituida por un número grande de macromoléculas. El peso molecular de los polímeros que constituyen las nanopartículas está en el rango de 1000 Da en el caso de nanopartículas de polialquilmecanoacrilatos^{xvi} hasta 4 00000 Da en el caso de las nanopartículas de polimetilmetacrilato^{xvii}. Asumiendo por ejemplo un tamaño de partícula de 100nm y una densidad de 1 g/cm³, una nanopartícula estaría compuesta por 1000 a 5X10⁵ macromoléculas, dependiendo del peso molecular final de las cadenas del polímero.

2.2.2 Polimerización en una fase acuosa continua.

Este método de fabricación de nanopartículas se ejemplifica con un alquilmecanoacrilato como el que se usó en este trabajo.

Los monómeros de cianoacrilato son adicionados al medio de polimerización acuoso en concentraciones de entre 0.05% y 7 %^{xviii}. Debido a que la solubilidad de los monómeros de cianoacrilato está excedida en la mayoría de estas concentraciones, se forman gotas de monómero y el sistema tiene que ser agitado permanentemente.

El mecanismo de polimerización es de tipo aniónico, iniciado por las bases presentes en el medio de polimerización. Los cianoacrilatos son principalmente iniciados por los iones OH⁻ resultantes de la disociación del agua, pero algunos fármacos básicos pueden actuar como iniciadores. Esta polimerización inducida por iones OH⁻ es muy rápida. Por esta razón el pH tiene que ser mantenido por debajo de 3.5, con algunos fármacos aún menores a 1.0, para permitir la formación de nanopartículas. La influencia de la temperatura, pH, monómero, tipo y concentración de electrolitos, agente acidificante, y emulsificante sobre el proceso de polimerización es muy complejo. La razón es que el medio de polimerización genera simultáneamente iones OH⁻ para iniciar la reacción así como iones H⁺ que la terminan. Como resultado de esta terminación de la polimerización debida a los iones H⁺, el peso molecular después de la polimerización es muy bajo y disminuye cuando se disminuye el pH^{xix}. La influencia del pH en el tamaño de partícula es algo diferente: un tamaño de partícula mínimo existe alrededor de un pH de 2, mientras que la polidispersidad cae cuando el pH se incrementa hasta alcanzar un estado estacionario cerca de un pH de 2.5 y mayores^{xx}.

Como resultado de los bajos pesos moleculares, las partículas en crecimiento tienen una consistencia muy suave y son propensas a la aglomeración. Por esta razón, los estabilizantes tienen una influencia significativa en el tamaño de partícula y el peso molecular^{xxi}. Esta influencia del estabilizante es también bastante compleja. Concentraciones altas de estabilizante generalmente produce partículas de menor tamaño. Concentraciones por arriba del 2% del estabilizante Poloxamer 188 reduce el tamaño de partícula del poliisobutilcianoacrilato de 200nm que es el tamaño sin estabilizante a 31 a 56nm cuando este está presente^{xxii}.

Las nanopartículas producidas sin estabilizante o por el uso de polisorbatos como tensoactivos, tienen una distribución unimodal de peso molecular del orden de entre 1000 y 4000Da, mientras algunos estabilizantes como los dextrans o los poloxameros llevan el sistema hacia una distribución bimodal de pesos moleculares con máximos a 1000 a 4000Da y de 20000 a 40000Da. Esta distribución bimodal es indicativa de dos procesos de polimerización separados. Un proceso probablemente ocurra en la fase acuosa donde la terminación de la polimerización debida a los iones H⁺ es rápida, dando lugar a pesos moleculares bajos. Después de la formación de las partículas primarias, otra ruta de polimerización parece ser posible, la captura de moléculas de polímero sin terminar de polimerizar dentro de estas partículas. Debido a que la concentración de H⁺ es menor dentro de las partículas formadas, la frecuencia de la terminación de las cadenas se ve reducida. Como consecuencia el peso molecular de las cadenas es mucho más grande. Sin embargo, también puede ser posible que las cadenas de dextrán o poloxamer se este incluyendo a la estructura final de la cadena polimérica.

2.2.3 Polimerización en emulsión en una fase orgánica continua.

La polimerización en emulsión en fase orgánica continua fue uno de los primeros procesos para la producción de nanopartículas^{xxiii}, ^{xxiv}, ^{xxv}, ^{xxvi}, ^{xxvii}. En este proceso, las fases son reversas y se emplean monómeros muy solubles en agua. Inicialmente la acrilamida y la N,N'-bisacrilamida fueron usados como monómeros. Los monómeros son solubilizados por tensoactivos.

El proceso de polimerización de poli(acrilamida) es altamente tóxico debido a los monómeros pero también por el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos y grandes cantidades de tensoactivo, por ello es poco importante hoy en día.

Los monómeros de cianoacrilato son mucho menos tóxicos que la acrilamida y sus polímeros son rápidamente biodegradables. Por esta razón se ha adaptado el método de obtención de nanopartículas empleando polimerización en emulsión en fase orgánica continua a la producción de nanopartículas de polialquilo(ciano)acrilato. Sin embargo, debido a la alta solubilidad de los monómeros de alquilo(ciano)acrilato en solventes orgánicos se formaron nanopartículas huecas (nanocápsulas) y nanopartículas sólidas monolíticas (nanoesferas)^{xxviii}. Las partículas sólidas (nanoesferas) fueron observadas más

frecuentemente que las nanocápsulas. Posiblemente la razón por la cual se producen las nanocápsulas es la siguiente: El fármaco disuelto en una pequeña cantidad de agua es solubilizado por los tensoactivos dentro de la fase orgánica. Como resultado, se forma una microemulsión con micelas acuosas hinchadas que contienen fármaco. Los monómeros de alquilcianoacrilato adicionados al sistema difunden a esas micelas y los iones OH^- y/o el fármaco básico inician la polimerización. Esta polimerización es tan rápida que se forma una pared impermeable en la interfase solvente orgánico-agua que impide que más moléculas de monómero difundan al interior de las nanocápsulas. Sin embargo, dentro de la nanocápsula puede haber monómero que puede polimerizar formando partículas monolíticas como se mencionó anteriormente.

2.2.4 Polimerización Interfacial.

La polimerización de alquilcianoacrilatos en un disolvente orgánico que contiene micelas hinchadas de agua, puede llevar a la formación de una pared polimérica en la interfase, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, la mayoría de las partículas formadas por este proceso son monolíticas. Por ello se requieren métodos más adecuados para la formación de nanocápsulas. A continuación se describen dos métodos para tal efecto:

2.2.4.1 Emulsificación electrocapilar.

En este proceso se aplica un potencial eléctrico entre una fase oleosa y una acuosa. Cuando este potencial excede un cierto valor, la tensión interfacial se reduce a casi cero y ocurre la emulsificación espontánea. Entonces se forman emulsiones monodispersas estables de aproximadamente $100\text{nm}^{\text{xxix}}$.

2.2.4.2 Nanopartículas de polialquilcianoacrilato.

Se pueden formar nanopartículas de polialquilcianoacrilato por polimerización interfacial en los límites de una fase acuosa. Este proceso fue introducido por Al Khouri Fallouh y colaboradores^{xxx}. En este proceso el monómero de alquilcianoacrilato así como el fármaco lipofílico son disueltos en una mezcla de aceite y etanol. La proporción de aceite a etanol es de entre 1:10 a 1:200. Los aceites empleados pueden ser Miglyol®, ácido bencílico u otro aceite. La solución orgánica que contiene el fármaco y el monómero se adiciona lentamente (5mL/min) a través de un tubo o una aguja en agua o solución buffer (pH 3-9) que contenga un tensoactivo como puede ser poloxamer 188 o 407^{xxxi} o fosfolípidos.

Las nanocápsulas están formadas por una gota interna oleosa y una pared polimérica en su contorno^{xxxii}, estas son formadas espontáneamente por polimerización aniónica del cianoacrilato en el aceite después del contacto con el iniciador que en este caso son los iones OH⁻ del agua. El diámetro de estas cápsulas es controlado principalmente por la concentración de Miglyol® en el etanol, dando lugar a nanocápsulas de cerca de 180 nm a concentraciones muy bajas de Miglyol® (0.5%) y de cerca de 450 nm a concentraciones altas (8%). El pH de la fase acuosa así como la saturación de monómero con dióxido de azufre, un desacelerador de polimerización, no tiene efecto significativo en el tamaño de la partícula. Incrementando las concentraciones de monómero se incrementa la densidad pero no el tamaño de las cápsulas resultantes, lo cual indica que se formaron nanocápsulas con pared más gruesa.

2.2.5 Deposición del disolvente.

Por este método se pueden producir nanocápsulas. En este proceso se disuelven en acetona un polímero así como fosfolípidos^{xxxiii}. Se adiciona una solución de fármaco en benzoato de bencilo a la fase orgánica y esta mezcla es adicionada después a una solución acuosa de poloxamer 188 en constante agitación. Se forman nanocápsulas con pared polimérica con centro oleoso^{xxxiv}. Esta suspensión se tiene que concentrar por evaporación de la acetona y se tiene que realizar una remoción del agua a presión reducida.

2.2.6 Evaporación del disolvente.

La evaporación de disolvente es un método bien montado para la preparación de microcápsulas de tamaños mayores a 1 μm^{xxxv}. Sin embargo, con este proceso se pueden producir partículas menores a 1000 nm. El polímero preformado se disuelve junto con el fármaco y un solvente orgánico, la mezcla anterior se emulsifica en agua y después se evapora el disolvente con calor o con presión reducida. Es esta la razón por la que el tamaño de partícula depende de las gotas de emulsión formadas antes de la evaporación del disolvente. El tamaño puede ser controlado por varios factores como los son velocidad de agitación, tipo y cantidad de agente dispersante, viscosidad de las fases acuosa y orgánica, el diseño del recipiente y del agitador, la cantidad de las fases orgánica y acuosa y la temperatura.

Las primeras nanopartículas de ácido poliláctico con fármaco, fueron producidas por evaporación de solvente^{xxxvi}. Se usó poloxamer 188 como agente emulsificante.

El método de evaporación de disolvente ha sido usado también para la preparación de nanopartículas de poliacrilatos y etilcelulosa usando indometacina como fármaco modelo^{xxxvii}. Algunos de los polímeros incluyendo Eudragit® RS, Eudragit® RL y etilcelulosa, no requieren ningún tensoactivo o estabilizante polimérico. En otros casos, se usa polisorbato 80, poloxamer 188, lauril sulfato de sodio, Brij® 35, Brij® 78, Myrj® 52 o poli vinil acetato. El tamaño

de partícula disminuye con el incremento de presión de homogenización y el número de ciclos, alcanzando un estado estacionario después de 5 ciclos y cuando se incrementa la concentración de tensoactivo.

2.2.7 Otros aspectos importantes de la fabricación de nanopartículas.

Las anteriores son técnicas destinadas a la producción de nanopartículas por diferentes medios y toman en cuenta las características de los materiales utilizados, algunas de ellas no son muy usadas dado que el disolvente remanente puede ser un problema para uso farmacéutico, por la toxicidad que estos conllevan. Existen otros métodos de fabricación de nanopartículas que aquí no se mencionan como el método de desolvatación de soluciones poliméricas, producción de nanopartículas de albúmina y gelatina en una emulsión aceitosa, el método de desolvatación de macromoléculas y el método de fabricación de nanopartículas de carbohidratos. Los métodos que se describieron a detalle son los más importantes al modo de ver del que escribe.

La técnica que aquí se empleó es la llamada polimerización en fase acuosa continua. Se ha hablado bastante de este tipo de fabricación de nanopartículas a base de monómeros polimerizados *in situ*, la tendencia actual es utilizar los llamados polímeros preformados, polímeros que por diversas técnicas son utilizados para formar las nanoesferas o la pared de las nanocápsulas. Como quiera que fuere, la polimerización *in situ* ayuda a formar nanopartículas de diversos tamaños y manipulando de manera adecuada las condiciones de proceso, se obtendrá casi el tamaño que se quiera. Se han reportado nanopartículas de polialquilcianoacrilatos de una gama muy amplia de tamaños.

3 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

3.1 Métodos Físicoquímicos de caracterización de nanopartículas.

Existen muchos y variados métodos para la caracterización de nanopartículas que se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 1: Métodos para la caracterización de nanopartículas³⁸⁻⁵⁴.

Parámetro	Método
Tamaño de nanopartícula	Espectroscopia de correlación de fotón. (PCS por sus siglas en inglés)
	Microscopía electrónica de transmisión. (TEM por sus siglas en inglés)
	Microscopía electrónica de barrido. (SEM por sus siglas en inglés)
	SEM combinado con energía dispersiva.
	Espectrometría de rayos X
Peso Molecular	Cromatografía de permeación en gel.
Densidad	Picnometría de compresión de Helio.
Cristalinidad	Difracción de Rayos X.
	Calorimetría de Barrido diferencial.
Carga superficial.	Electroforesis
Hidrofobicidad	Cromatografía de interacción hidrofóbica.
	Medición del ángulo de contacto
Propiedades superficiales	Espectrometría de masas de ión secundario estático. (SSIMS)
Análisis de elemento superficie	ESCA (Espectroscopia foto electrónica de rayos X por análisis químico).

El tamaño es la característica de las nanopartículas que se evalúa más comúnmente. Sin embargo, también se determinan otras propiedades como la densidad, peso molecular y cristalinidad, que son elementos relacionados con las propiedades de liberación y degradación, mientras que las características de superficie e hidrofobicidad influyen significativamente la interacción con el medio ambiente biológico después de la administración a humanos y animales y por lo tanto influyen la distribución en el organismo.

Medir el tamaño de partícula en el rango de nanómetros es todavía un problema. El método más rápido y rutinario es la espectroscopia de correlación de fotones o dispersión de luz dinámica^{xxxviii}. La espectroscopia de correlación de fotones determina el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas vía movimiento

Browniano. Por esta razón, la medición del tamaño está influenciada por la interacción de las partículas con el medio líquido de los alrededores, consecuentemente se debe conocer la viscosidad exacta del medio. Hace algunos años, solo se podía obtener la media y la dispersión de una población de nanopartículas, actualmente los equipos modernos tienen computadoras con programas especializados y es relativamente fácil la determinación de distribuciones de tamaño de partícula de poblaciones multimodales. El problema con la determinación de tamaño de nanopartículas sigue siendo la presencia de partículas extrañas como polvo o alguna otra fuente de contaminación.

Por lo anterior, es necesario verificar los resultados obtenidos con la espectroscopia de correlación de fotones con otra técnica como la microscopía electrónica. Hay dos métodos de microscopía electrónica usados para este fin, ellos son la microscopía de electrónica de barrido y la microscopía electrónica de transmisión.

La microscopía de barrido requiere que la muestra seca se recubra con un material conductivo, usualmente oro. El espesor de la capa de oro es difícil de determinar y normalmente puede variar entre 25 y 60 nm. Debido a que la capa de oro cubre toda la nanopartícula y que el diámetro se determina de manera superficial, la incertidumbre en el tamaño de partícula con este método aumenta más o menos el tamaño real en 70 nm, este aumento no es aceptable ya que los tamaños de nanopartícula que se están obteniendo actualmente son inferiores a 50 nm. Métodos más recientes (microscopía electrónica de barrido de bajo voltaje con recubrimiento de platino), se están desarrollando para tener un recubrimiento más delgado y es un tipo de microscopía de barrido más precisa para la determinación de tamaño de partícula^{xxix}. Aun con esta técnica, se pueden pegar a la nanopartícula materiales como por ejemplo los tensoactivos, que con el secado que se obtiene para preparar la muestra para microscopía de barrido puede dar lugar a errores en la determinación del tamaño^{xi}.

La microscopía electrónica de transmisión con o sin tinción es un método relativamente sencillo para la determinación del tamaño de partícula. Sin embargo algunos materiales no son suficientemente densos electrónicamente y no pueden ser teñidos, pueden ser fundidos o quemados debido a la radiación debida al haz de electrones y esta técnica no puede ser usada para dichos materiales.

Las nanopartículas también pueden ser vistas con microscopía electrónica de transmisión después de congelamiento-fractura o congelamiento-distribución. Este método es óptimo para nanopartículas ya que después de fracturarlos se puede observar el interior. Por esta razón, es el método de caracterización más versátil para evaluar tamaño y morfología. Desafortunadamente, es el método más laborioso y tardado para usarse y por ende no es útil para mediciones de rutina.

Recientemente, se han desarrollado nuevos tipos de microscopios de alta resolución, por ejemplo microscopios sonda de barrido, microscopios de fuerza atómica, microscopio de fuerza láser y el microscopio de efecto tunel-barrido^{xii},^{xiii},^{xliii}. Estos microscopios también pueden ser útiles en la investigación de la superficie de las nanopartículas.

El peso molecular de las nanopartículas se determina mediante su disolución en un disolvente adecuado y posteriormente se inyecta la muestra en un cromatógrafo de permeación en gel. Sin embargo, la validación de los datos obtenidos puede ser un problema. Hasta ahora se cuentan con estándares de poliestireno y polimetilmetacrilato y son válidos para determinar el peso molecular de otros polímeros mediante su uso. Se obtiene datos bastante exactos siempre y cuando el polímero de prueba tenga estructura y propiedades similares a los estándares utilizados. Con la técnica de permeación en gel es necesario que el polímero esté totalmente disuelto, por ello no es posible determinar el peso molecular de polímeros entrecruzados ni de nanopartículas de macromoléculas naturales.

Las mediciones de densidad pueden ser hechas por medio de picnometría de compresión de helio y por centrifugación por gradiente de densidad. Si se comparan ambos métodos se puede obtener información de la estructura interna de las nanopartículas. Desafortunadamente las posibilidades de estos métodos no han sido suficientemente explotadas.

Se puede obtener información acerca de la estructura interna de las nanopartículas por difracción de rayos X y por métodos termoanalíticos como la Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC), Análisis Térmico Diferencial (DTA), Análisis Gravimétrico Térmico (TGA), Análisis Mecánico Térmico (TMA) y el Análisis Óptico Térmico (TOA)^{xliv}, ^{xlv}. En muchos casos, moléculas pequeñas de fármaco quedan atrapadas en la red polimérica formando una solución sólida amorfa^{xlvi}, ^{xlvii}. En otros casos, dentro de la red polimérica se haya cristalitas pequeños de fármaco^{xlviii}. A manera de ejemplo, es muy interesante el caso de la pilocarpina cristalizada dentro de nanopartículas de polibutilcianoacrilato, que dan como consecuencia un estado polimórfico diferente que no se observó fuera de la red polimérica^{xlix}.

La carga superficial de las nanopartículas es determinada principalmente por movilidad electroforética. Un gran número de métodos son utilizados para la determinación de este parámetro, entre los que se incluyen examen ultramicroscópico del movimiento de patrones de difracción de nanopartículas con rayo láser y anemometría Doppler laser.

La carga superficial parece tener una influencia importante en la ingesta fagocítica de nanopartículas en células *in vitro*. La influencia de la carga en células *in vivo* parece tener una influencia menos pronunciada^l. Por otra parte, la hidrofobicidad de la superficie de las nanopartículas parece tener una mayor influencia en su distribución en el organismo después de una administración intravenosa que la carga superficial. Los dos métodos más importantes para la determinación de la hidrofobicidad son: medición de ángulo de contacto^{li} y la cromatografía de interacción hidrofóbica^{lii}. Sin embargo, las mediciones de ángulo de contacto solo pueden ser hechas en superficies planas, no directamente en nanopartículas hidratadas en su medio de dispersión. Por las razones anteriores, la cromatografía de interacción hidrofóbica parece ser la mejor opción aunque sea un método más laborioso. Con este método se puede obtener una diferenciación entre nanopartículas con diferentes propiedades

superficiales utilizando para ello una columna con alquil-sefariosa y eluyéndolas con un gradiente de Triton® X-100^{liii, liv}.

4 EL MODELO Y SU COMPARACIÓN CON DATOS EXPERIMENTALES

El entendimiento humano en algunos casos llega a ser limitado. Esto debido a que nuestra capacidad de imaginación ha venido a la baja y nos es difícil creer que las cosas no son como las vemos de manera macroscópica. Cuando vemos un aeroplano, nos causa dificultad pensar que siendo tan pesado pueda volar y transportar cargas tan grandes, jamás pensamos en todos los principios y tecnología aplicada para dicha función.

En la ciencia en general sucede algo similar. Podemos describir un fenómeno a manera de relato pero podemos estar en un error, pues nuestra imaginación puede no haber considerado aspectos importantes del fenómeno. Es muy diferente cuando por medio de números, símbolos, diagramas, etcétera, representamos el fenómeno y otros investigadores pueden hacer aportaciones ulteriores.

Si vamos más allá, el uso de ecuaciones para describir fenómenos queda por encima de algunas otras maneras de modelamiento, ya que estas se pueden probar, comprobar y refutar. Se basan en principios físicos, químicos y matemáticos, entre otros, que han sido comprobados y aceptados, en tanto que los modelos no basados en ecuaciones matemáticas pueden no ser comprobables por su ambigüedad.

Mediante el uso de ecuaciones para describir un fenómeno, podemos plantear situaciones hipotéticas y así simular que pudiera suceder. Si se tiene una o varias ecuaciones que describan algún fenómeno es hasta cierto modo sencillo poder explorar que pasa bajo condiciones de prueba diferentes. Este tipo de simulaciones han llevado a los investigadores a conclusiones que hasta después de varios años pueden ser comprobables mediante experimentación.

Actualmente el empleo de computadoras hace que la simulación tome un nuevo sentido. Anteriormente los científicos podían tardar mucho tiempo haciendo cálculos para encontrar la solución a alguna ecuación complicada. Hoy, cálculos bastante difíciles pueden ser realizados en poco tiempo y sin errores. La tecnología ha avanzado tanto que problemas irresolubles históricamente se han podido resolver mediante el uso de una computadora.

Hoy día nos es difícil pensar en la resolución de un problema sin el empleo de una computadora. La cantidad de datos que se pueden manejar al mismo tiempo y la manera en que podemos procesarlos va más allá de los que pudieran haber pensado las mentes brillantes de tiempos pasados.

Se pueden encontrar programas casi de cualquier tipo, para procesamiento y análisis de datos, pero si algún problema no encaja en el software escogido tenemos la opción de crear nuestros propios programas, la cual es una tendencia cada vez más generalizada. De ahí surge la necesidad de que los

investigadores modernos tengan que aprender a programar o en el peor de los casos que trabajen en equipos multidisciplinarios donde haya un programador experto y así avanzar más rápidamente en los proyectos.

Las redes sociales son pues en la ciencia moderna, primordiales para el éxito de los proyectos, mientras una persona en México hace experimentos, otra persona en Japón por ejemplo, esta recibiendo los datos de los experimentos en tiempo real y los está procesando para hacer un modelo que explique dicho fenómeno.

Estas redes sociales hacen que puedan existir laboratorios o centros de investigación casi sin equipo para hacer determinaciones pues se tienen los contactos para poder enviar muestras o datos a otros centros y completar ahí los pasos que faltan.

4.1 Comparación del Modelo Teórico contra los datos experimentales de la cinética de formación de nanopartículas de polietilcianoacrilato.

En décadas pasadas, se ha dedicado un esfuerzo considerable a desarrollar nanopartículas biodegradables como sistemas de liberación de fármacos. Se han utilizado una gran variedad de polímeros para llevar de manera eficaz el fármaco a su sitio de acción y así reducir al mínimo efectos secundarios. Entre otras ventajas importantes, las nanopartículas incrementan la estabilidad, mejoran la biodisponibilidad^{lv} y disminuyen efectos secundarios. Se han utilizado para dispensar fármacos^{lvi}, en sistemas de liberación controlada, en las vacunas, terapia génica, y un sin número de aplicaciones.

Los cianoacrilatos fueron sintetizados primeramente en 1949 y su uso clínico fue divulgado hasta finales de los años 50^{lvii}. En forma de polímero se considera poco tóxico. Sin embargo es bien sabido que el monómero se degrada a cianoacetato y a formaldehído^{lviii}. La tasa de degradación se relaciona con la longitud de la cadena; los derivados homólogos alquilados pequeños degradan rápidamente y presentan una toxicidad más alta que los derivados alquilados grandes. Claramente hay una consecuencia en los tejidos vista como inflamación, necrosis del tejido y riesgos de infección producida por los subproductos histotóxicos (especialmente en las zonas bien vascularizadas como son los tejidos finos suaves, tales como la piel), por ello se deben reducir al mínimo para que los fármacos sean llevados a su sitio de acción.

Es interesante como la forma física del cianoacrilato afecta de manera importante la tasa de degradación; se sabe que los polímeros en polvo se degradan mucho más rápidamente que las películas^{lix}. La histotoxicidad es más alta si los monómeros (u oligómeros de peso molecular muy bajo) son atrapados por las nanopartículas, ya sea dentro de su matriz polimérica o sobre la superficie.

Hay una dificultad inherente para producir nanopartículas poliméricas biodegradables con tamaño de partícula debajo de 100 nm, el cual es el tamaño apropiado para que las nanopartículas penetren la piel humana. Como se ha

analizado anteriormente, se han optimizado las condiciones de proceso para producir nanopartículas de etilcianoacrilato de tamaños menores a 100 nm. Por otro lado, el modelo más aceptado para explicar el fenómeno de formación de este tipo de nanopartículas es el modelo de emulsión-polimerización propuesto por Harkins^{lx} en 1947, pero este modelo ha probado ser inexacto para explicar los resultados experimentales, en esta tesis se propone un nuevo modelo que explica el comportamiento oscilatorio experimental de la absorbancia en la cinética de formación de las nanopartículas de etilcianoacrilato, usando un modelo fenomenológico novedoso que hecha mano de multi-escalas, este modelo esta basado en el Brusselator^{lxi, lxii}, el cual incluye simultáneamente procesos de polimerización, de-polimerización, re-polimerización, cinética de agregación y formación de gromerados. Con este modelo es posible realizar una estimación del monómero remanente que puede traer consecuencias importantes a la piel por considerarse altamente tóxico.

Como este proceso es rápido y fuera de equilibrio, la cinética de formación de las nanopartículas no es fácil de caracterizar debido a la escala de tiempo en que se lleva a cabo la reacción. En particular, las etapas iniciales de nucleación de la nanopartícula son aspectos clave aún no totalmente entendidos. Para pH bajos y cuando han transcurrido algunos minutos, el modelo explica totalmente los resultados experimentales para la síntesis de nanopartículas de etilcianoacrilato. Para reforzar este trabajo podemos decir que se han presentado esquemas oscilantes en la dinámica de polimerización en otros sistemas, como por ejemplo la tensión superficial en la polimerización de metilmetacrilato^{lxiii}.

5 PIEL

5.1 Introducción.

El objetivo principal de producir nanopartículas de etilcianoacrilato inferiores a 100 nm es que puedan ser administradas a través de piel ya que es este el tamaño crítico para que las nanopartículas puedan difundir en la piel.

La piel tiene como principal ventaja para la administración de medicamentos, el hecho de ser un órgano bastante grande donde se pueden aprovechar diferentes zonas para la administración de medicamentos.

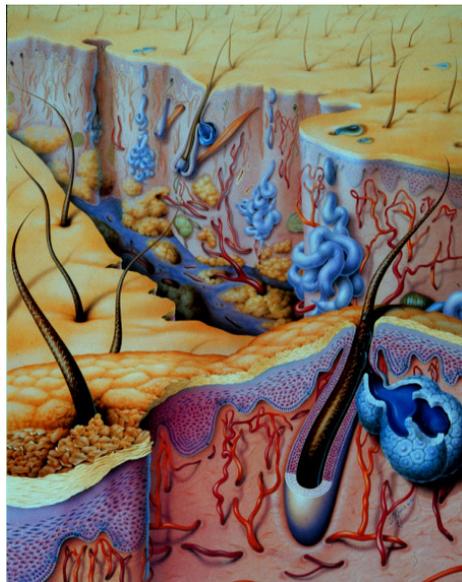


Figura 5: Estructura tridimensional de la piel⁵⁵.

No obstante lo anterior, la piel por su función biológica intrínseca, tiene desventajas para la administración de fármacos por esta vía lo cual es un reto para los formuladores de formas farmacéuticas, como ejemplo, el estrato córneo, que es la barrera más exterior, tiene entre una de sus funciones principales, el no dejar pasar agentes externos al cuerpo humano, incluyendo los medicamentos. Los medicamentos que se pueden administrar a través de esta vía tienen que cumplir con ciertos requisitos como por ejemplo: ser liposolubles y tener un tamaño molecular relativamente pequeño.

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano^{lxiv}, contando con aproximadamente el 10% de la masa total corporal, y es el órgano encargado de interactuar íntimamente con el medio ambiente. En esencia, la piel consiste de 4 capas: el estrato córneo (epidermis no viable), la epidermis viable, la dermis y el tejido subcutáneo. Hay también otro tipo de estructuras que forman parte de la

piel como los folículos pilosos, conductos de sudor, glándulas y uñas. Muchas de las funciones de la piel pueden ser clasificadas como esenciales para la supervivencia del cuerpo de los mamíferos en un ambiente relativamente hostil. En un contexto general, estas funciones pueden ser clasificadas como de protección, mantenimiento de la homeostasis y funciones de sensibilidad. La importancia del papel de protección y homeostático de la piel se ilustra por sus propiedades de barrera en la supervivencia de los humanos en ambientes de temperatura variable y contenido de humedad, así como en presencia de peligros ambientales tales como los agentes químicos, bacterias, alérgenos, hongos, objetos diversos y radiación, como por ejemplo de los rayos solares. En un segundo contexto, la piel es el principal órgano para mantener la homeostasis del cuerpo, especialmente en términos de su composición, regulación del calor, control de la presión arterial y tiene un papel excretor muy importante.

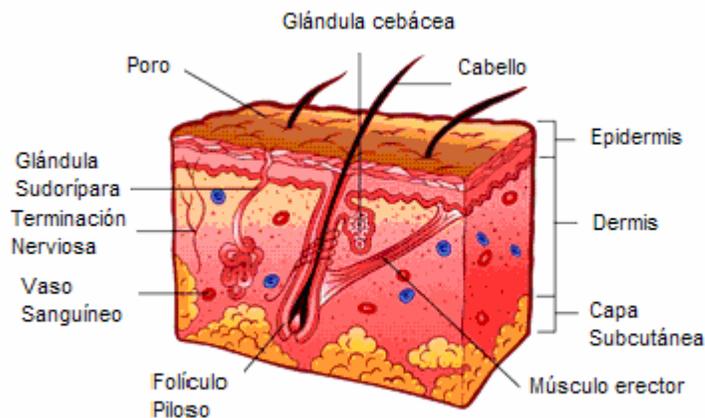


Figura 6: Componentes principales de la piel⁶⁶

Se ha argumentado que la tasa de metabolismo basal de los animales de diferente tamaño puede ser escalada al área superficial del cuerpo así como para mantener una temperatura constante a través del control termorregulador de la piel^{lxv}. En tercer lugar, la piel es el órgano sensorial más importante en términos de sensibilidad ante las influencias ambientales tales como el calor, la presión, el dolor y la entrada de alérgenos y microorganismos. Finalmente, la piel está en continua regeneración y reparación. Para dar cumplimiento a cada una de estas funciones, la piel tiene que ser dura, robusta y flexible con una comunicación efectiva entre cada uno de sus componentes intrínsecos.

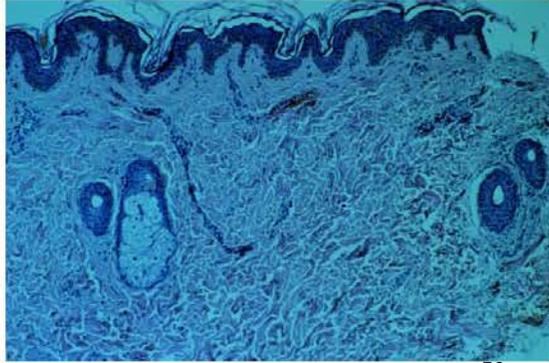


Figura 7: Micrografía de la piel⁵⁶.

Muchos agentes se aplican a la piel ya sea de forma deliberada o accidentalmente con propósitos ya sea benéficos o para deteriorarla. El uso de productos tópicos era evidente en tiempos pasados y hay reportes de beneficios sistémicos de agentes anti-infecciosos y hormonales en los años 40. La tecnología moderna de parches transdérmicos fue introducida a fines de los años 70s. La aplicación e importancia del estudio de la absorción dérmica quedan ampliamente justificadas ya que se puede estudiar el efecto local, como es el caso de los corticoesteroides, utilizados para la dermatitis, el efecto sistémico, utilizado en los parches de nicotina para combatir el tabaquismo, el efecto superficial, mediante el uso de filtros solares, cosméticos y agentes anti-infecciosos. La absorción dérmica es importante también para estudiar el transporte hacia tejidos más profundos, como en el caso de los agentes anti-inflamatorios musculares y también se estudia la absorción por esta vía en eventos involuntarios pero que pueden alterar el estado de salud de las personas en sus áreas de trabajo, como es el caso de los solventes, agroquímicos y otros alérgenos por mencionar algunos. La siguiente figura muestra los procesos antes mencionados y los sitios de efecto del compuesto aplicado a la piel.

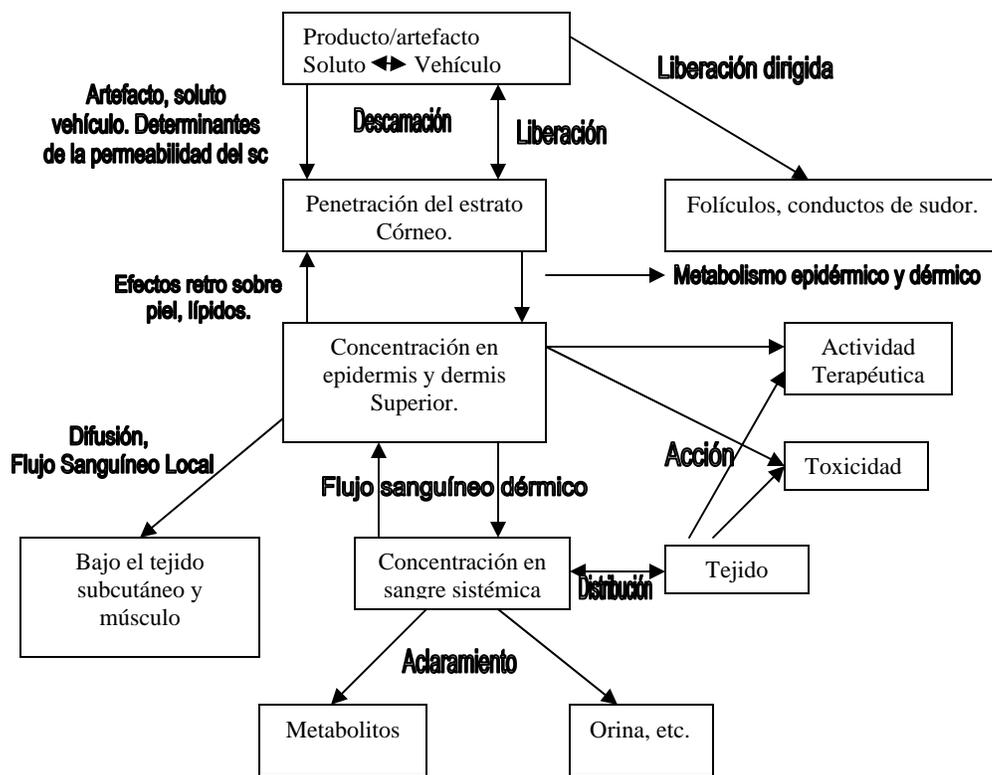
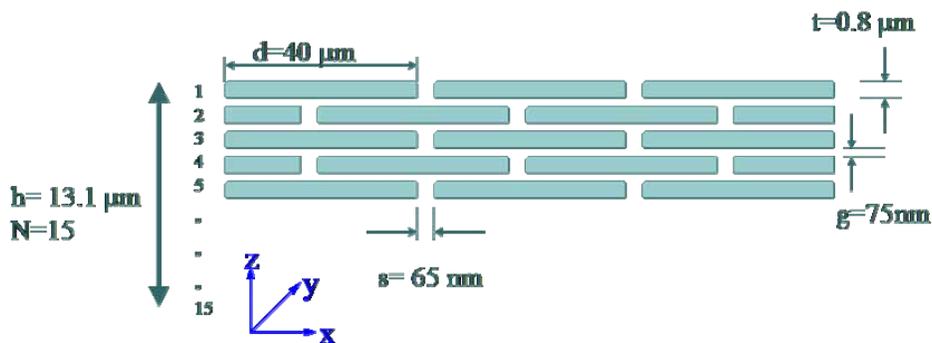


Figura 8: Diagrama de los procesos de liberación, difusión, distribución, metabolismo, acción y distribución de fármacos que penetran a través de piel.

La piel se empezó a tomar en cuenta como un potencial sitio de liberación de fármacos cuando se pensó que se evita el problema del vaciamiento estomacal, los efectos del pH y la desactivación enzimática asociada con el paso gastrointestinal; se elude también el metabolismo del primer paso hepático; y al terminar el tratamiento es relativamente fácil retirar el artefacto de liberación del fármaco. En la práctica, la liberación de solutos a través de la piel está asociada con un número de dificultades como la variabilidad en la absorción percutánea debida al sitio de aplicación, enfermedad, edad, y diferencias de especie; los efectos del metabolismo del primer paso en piel; capacidad de reservorio de la piel; irritación y otros efectos tóxicos causados por los productos tópicos; heterogeneidad e inducibilidad de la piel tanto en el metabolismo como en los mecanismos de regreso; definición inadecuada de los criterios de bioequivalencia; y un entendimiento incompleto de las tecnologías que pueden ser usadas para facilitar o retardar la absorción percutánea. Sin embargo, la liberación controlada de solutos a través de la piel continúa siendo de interés con el desarrollo de tecnologías tales como los promotores químicos de penetración, la sonoforesis, los transfersomas y la electroporación.

5.2 Estructura y función de la piel.

Es necesario enfatizar en que las funciones de protección, homeostáticas y de sensibilidad de la piel están todas traslapadas e integradas. Por ejemplo, las propiedades de barrera a entidades químicas involucra resistencia a su entrada (barrera provista por el estrato corneo), una proporción de esas entidades químicas entran al metabolismo librando el paso del estrato corneo (epidermis inviable), la sensibilidad y atención al daño causado por la entrada de entidades químicas (mediador de inflamación liberado en la epidermis con involucramiento de la dermis), y la remoción de tales entidades químicas del sitio por el suministro sanguíneo dérmico y la distribución dentro de los órganos especialmente responsables de la eliminación de las entidades químicas por medio del metabolismo (hígado) y excreción (riñón).



SC, se muestran las dimensiones representativas del diámetro de los queratinositos (d), espesor del queratinositos (t), número de capas de queratinositos (N), espesor del SC (h) -calculada de $h=N(t+g)$ -, espacio vertical entre queratinositos (g), espacio lateral entre queratinositos (s).

Figura 9: Modelo utilizado para realizar cálculos teóricos de transporte a través estrato corneo (SC).

La regulación del calor corporal es a través del tejido graso subcutáneo, la regulación fisiológica del flujo sanguíneo afecta, por ejemplo, la pérdida de calor por vaso dilatación, el enfriamiento por transpiración. Consideremos a continuación la estructura y función de los componentes de la piel.

5.2.1 La epidermis

La epidermis desempeña un gran número de funciones, uno de los más importantes es la generación del estrato corneo. El estrato corneo como ya se dijo en párrafos anteriores es la capa más externa de la epidermis y tiene un grosor aproximado de 10 a 20 micras. El estrato corneo es epidermis no viable y consiste de 15 a 25 filas de células apiladas, planas, hexagonales y

queratinizadas, embebidas en un cemento de lípido intercelular. Cada célula es de aproximadamente 40 micras de diámetro y 0.5 micras de grosor. El grosor del estrato corneo varía dependiendo de la zona del cuerpo, por ejemplo en la palma de las manos y en la planta de los pies es mucho más grueso. Las propiedades de barrera del estrato corneo pueden ser en parte atribuidas a su densidad tan grande (1.4 g/cm^3 en estado seco), a su baja hidratación del 15 al 20%, comparada con la hidratación normal del cuerpo de 70 % y a su baja área superficial para el transporte de solutos (ahora se sabe que la mayoría de los solutos entran al cuerpo a través de las regiones intercelulares con amplitudes menores a 0.1 micras presentes en el estrato corneo). Las células del estrato corneo están compuestas de queratinas unidas insolubles en un 70% aproximadamente y lípidos en un 20% aproximadamente, encerradas dentro de las células, y esta mezcla implica cerca del 5% del peso total del estrato córneo. La región intercelular consiste de lípidos y desmosomas para la cohesión de los corneocitos. La función de barrera esta facilitada por la continua descamación de esta dura capa la cual sufre un recambio de todo el estrato corneo una vez cada 2 a tres semanas. Entre otras, una función muy importante que tiene el estrato corneo es la de evitar que salgan componentes del cuerpo hacia el medio ambiente, como lo es el agua. Se ha estimado que la eficiencia de la barrera es tal que el agua se pierde mediante transpiración insensible a una tasa de $0.5 \text{ mL cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$, o 250 mL de agua por día para un adulto normal. Los desórdenes de epitelización, tales como soriasis, llevan a un recambio mucho más rápido de piel, a veces es de 2 a 4 días, lo que conlleva a una formación impropia de las funciones.

Las células del estrato corneo se originan en la epidermis viable y sufren muchos cambios morfológicos antes de la descamación. Así que la epidermis consiste de muchos estratos de células en niveles variables de diferenciación. Las células de la epidermis tienen origen en la lámina o membrana basal entre la dermis y la epidermis viable. En esta capa hay melanocitos, células de Langerhans, células de Merkel y dos tipos de las principales células queratínicas: Las primeras funcionan como células troncales y tiene la capacidad de dividirse y formar nuevas células; las segundas sirven para anclar la epidermis a la membrana base^{lxvi}. La membrana base tiene un grosor de entre 50 y 70 nm y consiste de dos capas; la lámina densa y la lámina lúcida, las cuales contienen principalmente proteínas, tales como colágeno tipo IV, laminina, nidógeno y fibronectina. El colágeno tipo IV es responsable de la estabilidad mecánica de la membrana base, mientras que la laminina y la fibronectina están involucradas con la unión entre la membrana base y los queratinocitos basales.

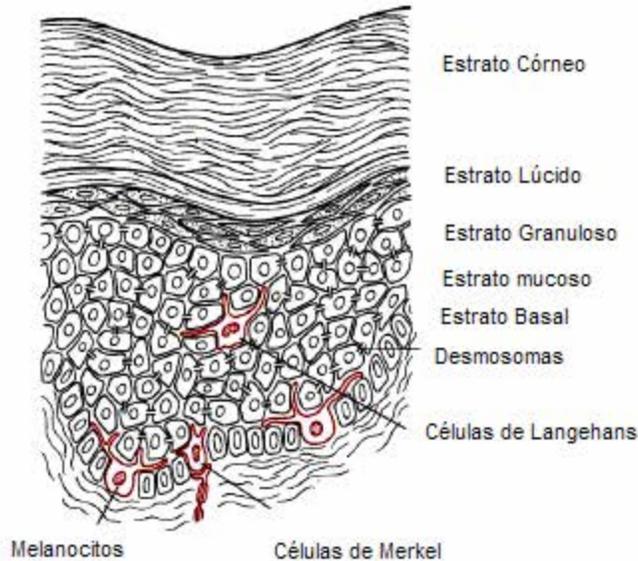


Figura 10: Estructura de la epidermis⁵⁷.

5.2.2 La dermis

La dermis, es un componente crítico del cuerpo, no solo provee el sistema de nutrición, inmune y soporte de la epidermis a través de la capa papilar adyacente a la epidermis si no que juega un papel, muy importante en la regulación de la temperatura, presión y dolor. El componente estructural principal de la dermis es una capa gruesa reticular. La dermis tiene un grosor de cerca de 0.1 a 0.5 cm y consiste de fibras de colágeno en un 70%, el cual provee un andamiaje de soporte y acojinamiento y tejido conectivo elástico, el cual da elasticidad en una matriz de un semigel de muco polisacáridos. En general, la dermis tiene una amplia población de células. Las principales células presentes son los fibroblastos, los cuales producen los componentes del tejido conectivo como son el colágeno, la laminina, la fibronectina y la vitronectina; las células cebadas, las cuales están involucradas en las respuestas inmune e inflamatoria; y los melanocitos que tienen la función de producir el pigmento melanina.

Dentro de la dermis se encuentra una red vascular extensa que provee nutrición a la piel, reparación y respuesta inmune y para el resto del cuerpo, intercambio de calor, respuesta inmune y regulación térmica. La tasa de flujo sanguíneo que llega a la piel es de cerca de $0.05 \text{ mL min}^{-1} \text{ cm}^{-3}$, provee un área de intercambio vascular equivalente al área de la superficie de la piel. Los vasos sanguíneos de la piel derivan de los vasos del tejido subcutáneo, con una red arterial que provee a la capa papilar, los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y apocrinas, el área subcutánea, así como la propia dermis. Estas arterias alimentan las arteriolas, capilares, vénulas y las venas.

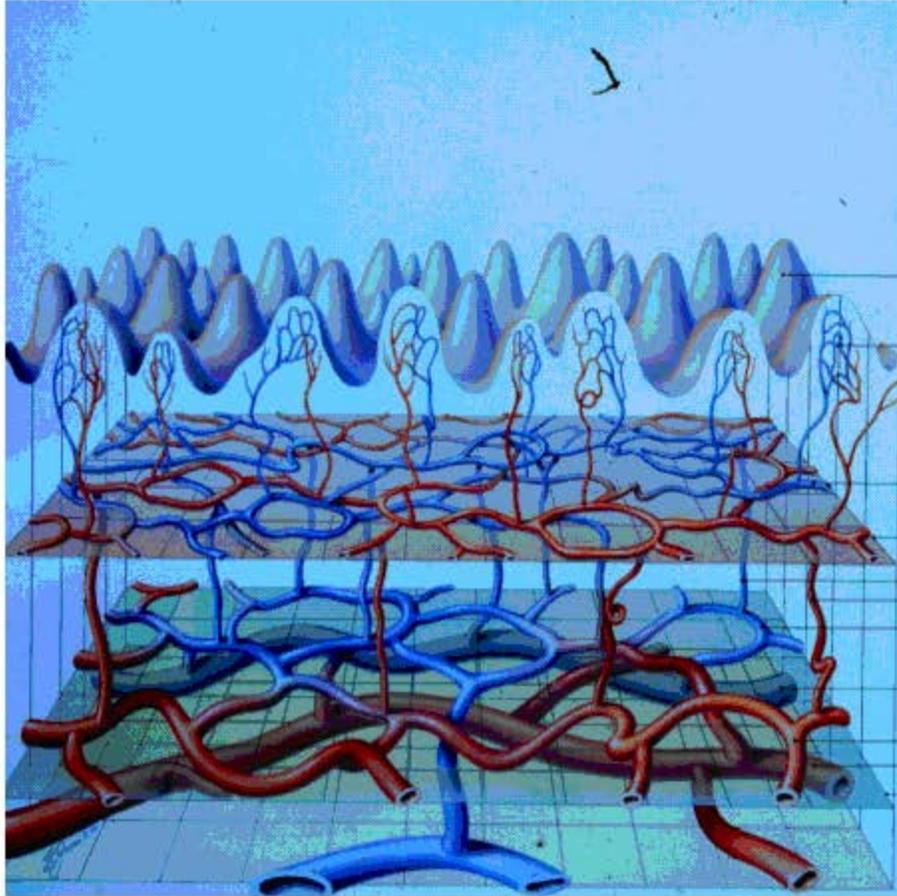


Figura 11: Irrigación sanguínea de la piel⁶⁸.

El sistema linfático es un componente importante de la piel en la regulación de la presión intersticial, en los mecanismos de movilización y defensa y en la remoción de desechos. Este sistema es una malla densa y plana en la capa papilar de la dermis y se extiende a las regiones más internas de la dermis. Se demostró que mientras el flujo sanguíneo determina el aclaramiento de solutos pequeños, tales como el agua y la lidocaína, el flujo linfático es determinante en la remoción dérmica de solutos grandes, tales como el interferón^{lxvii}. También están presentes en la dermis un gran número de diferentes tipos de fibras nerviosas que se distribuyen en la piel, incluyendo aquellas para presión, dolor y temperatura.

5.2.3 Tejido subcutáneo.

La capa más profunda de la piel es el tejido subcutáneo o hipodermis. La hipodermis actúa como un aislante térmico, un absorbente de choque y una región de almacenaje de energía. Esta capa es una red de células grasas arregladas en lóbulos y unidas a la dermis por interconexiones de colágeno y fibras de elastina. Así como las células grasas (posiblemente el 50 % de la grasa

corporal), las otras células importantes en la hipodermis son los fibroblastos y los macrófagos.

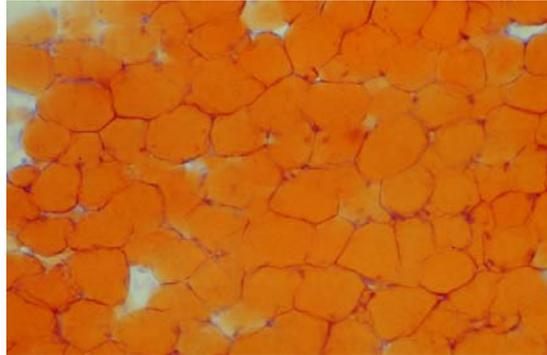


Figura 12: Adipositos presentes en el tejido subcutáneo⁵⁹.

Uno de los principales papeles de la hipodermis es llevar los sistemas vascular y neural por la piel. Este tejido ancla la piel en al músculo. Los fibroblastos y los adipositos pueden ser estimulados por la acumulación de fluidos intersticiales y linfáticos dentro de la piel y del tejido subcutáneo^{lxviii}.

5.2.4 Accesorios de la piel.

Hay cuatro accesorios de la piel: Los folículos pilosos con sus glándulas sebáceas asociadas, glándulas sudoríparas ecrinas, glándulas sudoríparas apocrinas y las uñas. Cada accesorio tiene una función diferente. Los folículos pilosos están distribuidos en toda la superficie de la piel con excepción de las palmas de las manos, las plantas de los pies y los labios. Un músculo suave, el pilorum erector, une el folículo al tejido dérmico y permite al cabello pararse en respuesta al miedo. Cada folículo está asociado con una glándula sebácea que varía en tamaño de 200 a 2000 micras de diámetro. El sebo secretado por esta glándula, contiene triglicéridos, ácidos grasos libres y ceras, este sebo protege y lubrica la piel así como mantiene un pH cercano a 5. El área fraccional de los folículos es un poco más de 1/1000 del total de la superficie de la piel. Las glándulas ecrinas o glándulas sudoríparas y las glándulas apocrinas constituyen dos tercios y un tercio del total de las glándulas respectivamente. Las glándulas ecrinas son estructuras epidermales simples, son tubos enmarañados que surgen de bolas enmarañadas de aproximadamente 100 μm de diámetro localizadas en la dermis más profunda. Estas glándulas secretan una solución de sal diluida con un pH cercano a 5, esta secreción es estimulada por determinantes controladores de temperatura tales como el ejercicio, las temperaturas ambientales altas, así como stress emocional a través del sistema nervioso autónomo. Las glándulas ecrinas ocupan un área superficial total de aproximadamente 1/10000 del total de la superficie de la piel. Por su parte las glándulas apocrinas están limitadas a regiones específicas del cuerpo humano y son también tubos enmarañados. Estas glándulas son diez veces el tamaño de

los ductos ecrinos, se extienden hasta el tejido subcutáneo y están juntas con los folículos pilosos.

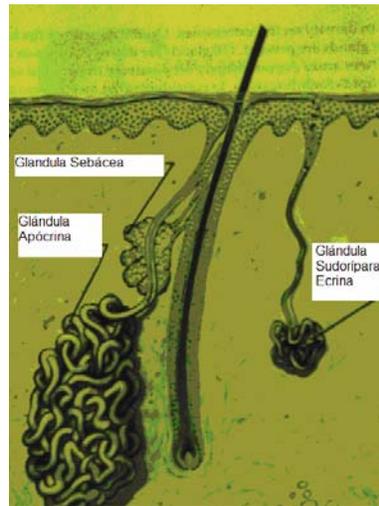


Figura 13: Sistema glandular en la piel⁶⁰.

Por otro lado, las uñas pueden ser consideradas como vestigios en los humanos. Sin embargo, se le atribuyen algunas funciones manipulativas y de protección.

En el proceso de queratinización las células sufren cambios de forma y algunos otros similares a los experimentados por las células epidermales que forman el estrato córneo. Esto no es de sorprender ya que la membrana basal de la matriz de la uña muestra muchas similitudes a la membrana basal epidermal^{lxxix}.

5.3 Efecto de la hidratación del estrato corneo.

Una vez que se han visto los diferentes componentes de la piel y que se conoce un poco más de su estructura y función, entramos al estudio de la hidratación del estrato corneo, el cual es la capa a la que nos enfocaremos en este trabajo, ya que la técnica para dar seguimiento a las nanopartículas de polietilenoacrilato a través de la piel se enfoca principalmente a tomar muestras del estrato corneo mediante el método de tape stripping (exfoliación mediante tiras adhesivas). Para comprender mejor el porqué las nanopartículas de polietilenoacrilato difunden a través de la piel queda mejor explicado si entendemos que sucede durante el proceso de hidratación de la piel.

La hidratación del estrato corneo puede cambiar profundamente las propiedades de esta barrera^{lxx}. Los mecanismos involucrados en la respuesta a la hidratación no están plenamente definidos; sin embargo, es probable que sean el resultado de la combinación del hinchamiento inducido por el agua de los corneocitos y alguna forma de expansión inducida por agua de la lamela lipídica intercelular. En el estado normal, el estrato corneo contiene entre un 15 y un 20 % de agua, la mayoría de la cual está asociada con la queratina intracelular^{lxxi}. El agua en el estrato corneo se puede incrementar hasta un 400% después de

un remojo excesivo. El hinchamiento de los corneocitos es posible debido al incremento de la entrada de agua, la cual interactúa con la queratina para expandir la orientación espacial de la proteína. Se ha observado que los corneocitos de las uñas y del cabello no se hinchan igual que los del estrato corneo después de una hidratación excesiva, esto es indicativo de que el grado de interacción entre el agua y la queratina es función de la posición y estabilidad de los enlaces disulfuro en los péptidos^{lxxii}. Entonces, donde los filamentos α-hélice de la queratina están holgadamente empaquetados y más flexibles, como en los queratinocitos del estrato corneo, existe una habilidad más grande para alterar su conformación y acomodar el agua.

El sitio de la interacción del agua con la lamela lipídica intercelular es menos claro. Mediante estudios con la técnica de difracción de rayos X de ángulo amplio, indicaron que no hay hinchamiento de la bicapa con la hidratación^{lxxiii}. Lo anterior sugiere que las moléculas de agua no se absorben entre la región lamelar. Como se esperaría para un estrato corneo totalmente hidratado, los corneocitos observados están hinchados, con zonas de agua aparentemente desplazando y separando los filamentos de queratina. Zonas distintas de agua se observaron en los espacios intercelulares del estrato corneo hidratado. También se observaron en los espacios intercelulares estructuras lipídicas tipo vesículas, lo cual sugiere que los lípidos son extraídos presumiblemente de la lamela.

Se ha sugerido que las estructuras observadas tipo vesículas^{lxxiv}, pueden representar una laguna resultado de la degradación desmosomal^{lxxv}. Las lagunas son microdominios localizados en el espacio extracelular en la mitad de las capas más exteriores del estrato corneo^{lxxvi}. Durante la hidratación las lagunas proveen un sitio obvio para zonas de agua y durante la exposición prolongada al agua, ocurre una expansión lateral de las lagunas a través de las regiones de las cabezas polares de los lípidos intercelulares. Por consecuencia, la expansión de las lagunas individuales pueden llevar a un sistema de lagunas continuas, este proceso no parece perturbar la lamela lipídica. Se ha propuesto que el sistema de lagunas continuas representa una vía no bien definida temporal a través del estrato corneo.

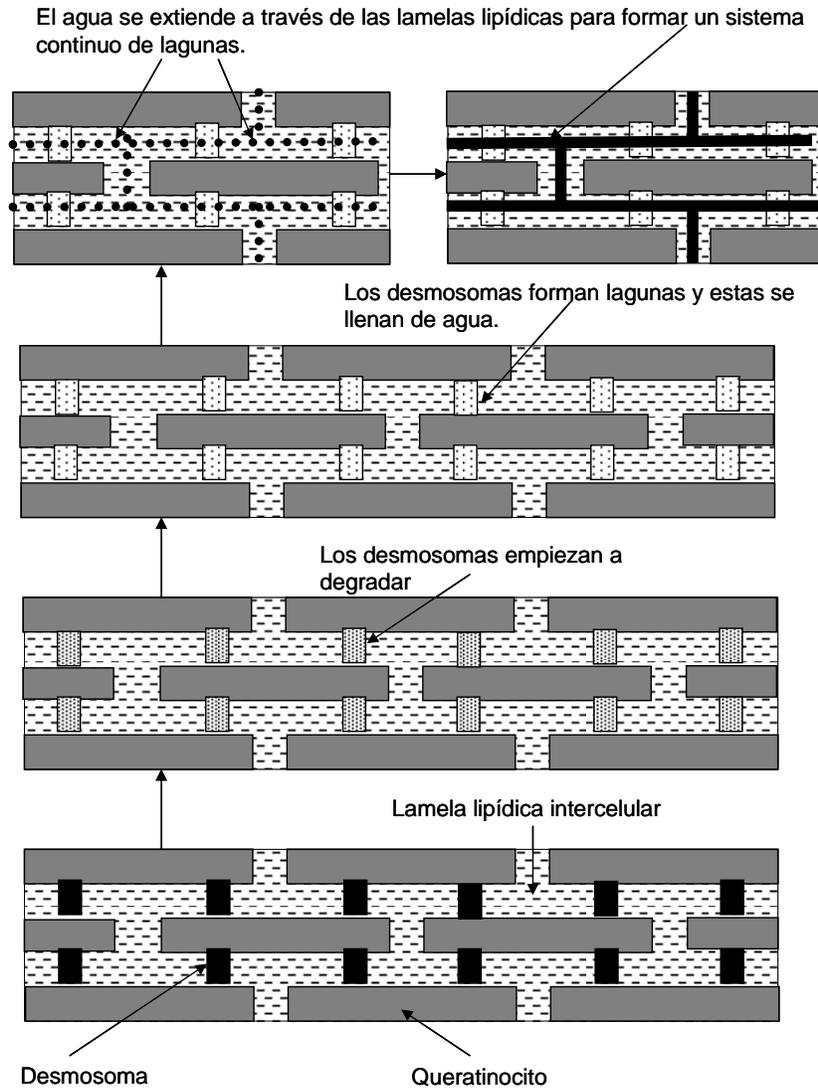


Figura 14: Esquema de la hidratación del estrato corneo⁶⁸.

En conclusión, las observaciones recientes sugieren que la hidratación del estrato corneo no lleva a un decremento total en el orden de los lípidos intercelulares y están presentes solo pequeñas cantidades de agua en las regiones de las de los grupos polares de las cabezas de los lípidos intercelulares^{lxxvii}. Por tanto, se puede suponer un posible mecanismo por el cual la hidratación promueve la absorción percutánea. En ese modelo, el hinchamiento de la queratina es parecido al hinchamiento de los tabiques en un modelo de tabiques-concreto del estrato corneo, en el cual los lípidos intercelulares representados por el concreto se pierden. El efecto total sería un incremento en la movilidad de las cadenas y en la permeabilidad, sin afectar el orden de los lípidos.

6 TRANSPORTE EN PIEL.

Como el objetivo principal de este trabajo se enfocó en la fabricación de nanopartículas de polietilenoacrilato para transportar fármacos a través de la piel, para poder realizar este estudio era necesario poder encontrar una manera de seguir las nanopartículas en su paso por la piel. La técnica que se maneja para estudios in vivo es la denominada "Tape Stripping" (exfoliación mediante tiras adhesivas) la cual se describe a continuación.

6.1 Técnica de exfoliación mediante tiras adhesivas (Tape Stripping)

Esta es una técnica que ha sido útil en estudios dermatofarmacológicos ya que permite remover de manera selectiva y a veces exhaustiva la capa más exterior de la piel, el estrato corneo. De manera general, una cinta adhesiva se aplica y se presiona sobre la zona de prueba de la piel y subsecuentemente se remueve abruptamente. El procedimiento de aplicación y remoción puede ser repetido numerosas veces. La piel que ha sido sometida a este proceso ha sido utilizada como daño estandarizado en la investigación de curación de heridas, se ha adaptado para estudios de cinética de crecimiento epidermal y también puede ser usada como una herramienta diagnóstica en dermatología ocupacional en la evaluación de la calidad de la capa cornea. Las observaciones acerca de que la piel podría ser depósito para ciertos compuestos químicos, fue reportado originalmente por Malkinson y Ferguson^{lxxviii}. La localización de este depósito dentro del estrato corneo fue demostrado más tarde por Vickers utilizando corticosteroides^{lxxix}.

El uso de la técnica de "Tape Stripping" para investigar las funciones de depósito y barrera de la piel se ha convertido en una herramienta con un aporte significativo en el estudio de la piel. Las diferencias en la permeabilidad de piel intacta y después de ser sometida a la técnica de "Tape Stripping" han aportado información importante a cerca de la resistencia difusiva de varios estratos de la piel. Se ha encontrado que la remoción de la capa córnea no es posible aún después de 30 a 40 veces que se aplicó la técnica, ya que se observó que algunas funciones de barrera se conservaban en el tejido así tratado.

6.1.1 Aplicación de la Técnica de “Tape Stripping”

La suposición de que algunos factores mejoran la absorción percutánea y esto se ve reflejado en un incremento en el depósito^{lxxx} en el estrato córneo, hizo que la técnica de “Tape Stripping” se convirtiera en una herramienta muy importante para seleccionar y comparar vehículos para fármacos tópicos. Los datos obtenidos en los experimentos donde se usó la metodología de “Tape Stripping” fueron relacionados a: penetración química dentro de la piel, permeación química a través de la piel, eliminación química de la piel, parámetros farmacodinámicos y parámetros clínicos.

En una serie de investigaciones in vitro e in vivo usando la técnica de “Tape Stripping”, se pudo ver que la penetración de fármacos dentro del estrato córneo era dependiente del vehículo utilizado, esto se realizó cuantificando en las cintas removidas el químico radio marcado. Se ha observado también que en las determinaciones in vitro la penetración de fármaco es mayor que in vivo. In vivo la penetración a través de piel se determina cuantificando el fármaco eliminado en orina y se ha encontrado que la cantidad excretada es dependiente del vehículo utilizado.

Dupuis, Lotte, Rougier y colaboradores^{lxxxi, lxxxii, lxxxiii, lxxxiv, lxxxv} estandarizaron la metodología de la técnica de “Tape Stripping”. Su método determina la concentración de sustancias químicas en el estrato córneo al final de una aplicación corta de 30 minutos. Los investigadores antes mencionados encontraron una relación lineal entre el contenido depositado en el estrato córneo y la absorción percutánea in vivo (cantidad total de fármaco permeado en 4 días) usando el método de excreción urinaria estándar. Establecieron que la principal ventaja de su protocolo validado de “Tape Stripping” son las determinaciones de excreción fecal y eliminación urinaria de fármaco absorbido en piel y la aplicación de fármacos no radio marcados en absorción percutánea. Debido al hecho de que los ensayos proveen predicciones confiables de absorción total de un grupo de compuestos seleccionados, es raro encontrar interpretaciones mecanísticas de esta técnica.

Comúnmente la administración de los fármacos es evaluada aplicando productos de prueba y de referencia simultáneamente en sitios múltiples de la piel en un estudio con un solo individuo y se obtienen muestras de estrato córneo a intervalos secuenciales de tiempo de aplicación. De manera similar, para evaluar la eliminación de fármacos, se aplica el producto de referencia y el producto de prueba por periodos específicos en sitios múltiples de la piel y se realizan remociones secuenciales de estrato córneo. Adicionalmente, los estudios de eliminación de fármacos se realizan cuando se ha alcanzado un estado estacionario en el estrato córneo.

6.1.2 Algunas preguntas sin respuesta respecto a la técnica de “Tape Stripping”.

A pesar de que la técnica de “Tape Stripping” se ha usado en investigaciones dermatofarmacológicas por muchas décadas, muchos detalles experimentales no han sido explicados aún y esta metodología requiere todavía una validación rigurosa. En evaluaciones clásicas de bioequivalencia los componentes del vehículo de un producto de prueba y de uno de referencia pueden ser diferentes y pueden influir también en las propiedades adhesivas de la cinta, así como en la cohesión de los corneocitos. De lo anterior se puede decir que la caracterización dermatofarmacocinética puede convertirse en algo extremadamente complejo y susceptible de error. También se sabe que la tasa de remoción de los corneocitos en diferentes sitios es muy disímil y la caracterización dermatofarmacocinética basada en perfiles de concentración dentro del estrato córneo no es posible. Otra observación importante de hacer es que el “Tape Stripping” que se realiza en estrato córneo de piel humana, arrastra capas de células de diferentes profundidades debido a las imperfecciones.

Por otro lado, en las secciones de material y métodos de las diferentes investigaciones hechas donde se ha utilizado la técnica de “Tape Stripping” no se menciona el uso de una plantilla para realizar las pruebas siempre en el mismo sitio, lo que da mayor variabilidad a la metodología. En talleres recientes realizados por la FDA, se recomienda el uso de una plantilla para realizar este tipo de pruebas dermatofarmacológicas.

Por último, la técnica de “Tape Stripping” originalmente se empezó a usar para pruebas in vivo, pero después se ha usado en pruebas in vitro. Dependiendo del origen de la piel (humano o animal), de la fuente que se obtuvo (cirugía o anfiteatro), de las condiciones de almacenaje y de la duración de los experimentos in vitro, la integridad de la piel puede variar e influir en la cantidad de estrato córneo removido en cada cinta.

7 MICROFOTOLUMINISCENCIA.

A manera de fundamento y para entender mejor la manera en que se realizan las determinaciones de microfotoluminiscencia en las cintas utilizadas para la técnica de piel exfoliada (Tape Stripping), se tiene que decir que existen tres tipos de métodos ópticos que se relacionan estrechamente: fluorescencia, fosforescencia y quimioluminiscencia de la cual no hablaremos en esta ocasión. En estos tres métodos, la molécula a estudiar se excita para dar un espectro de emisión que se utiliza para el análisis cualitativo y cuantitativo.

La fluorescencia y la fosforescencia se logran mediante la absorción de fotones, por lo que frecuentemente se le conoce a estos métodos con el término **fotoluminiscencia**.

Ambos fenómenos son parecidos pero en el caso de la fosforescencia, hay un cambio en el espín del electrón en tanto que en la fluorescencia no lo hay. Por lo que la fluorescencia presenta una luminiscencia mucho más corta que la

fosforescencia. Para ambos fenómenos en muchos de los casos la emisión fotoluminiscente es de mayor longitud de onda que la radiación utilizada para la excitación.

Una gran ventaja de estos métodos de detección es que son mucho más sensibles que la espectroscopia de absorción y permiten hacer determinaciones que por otros métodos serían muy difíciles de realizar. Son además métodos muy lineales, pero tienen la desventaja de que pueden sufrir interferencias fácilmente. En general se utilizan más los métodos espectroscópicos de absorción que los métodos fotoluminiscentes pues existen mucho más especies que absorben en el espectro UV/Visible que aquellas que presentan fotoluminiscencia tras la absorción de radiación^{lxxxvi}.

La fluorescencia puede ser vista en sistemas muy sencillos, así como muy complejos. Por ejemplo, los vapores atómicos diluidos que contienen sodio tienen electrones 3s que pueden ser excitados al estado 3p mediante la absorción de longitudes de onda de 5.896 y 5.890. Cuando han pasado entre 10^{-8} a 10^{-5} segundos, los electrones regresan al estado inicial, emitiendo radiación en la misma longitud de onda que se utilizó para su excitación. A este tipo de fenómeno se le conoce como fluorescencia de resonancia o radiación de resonancia.

Muchas de las moléculas presentan radiación de resonancia, pero es más común encontrar moléculas que presentan fluorescencia en longitudes de onda mayores que las líneas de resonancia, a este tipo de desplazamientos se les conoce como desplazamiento Stokes^{lxxxvii}.

Tratando de explicar un poco más la diferencia de fluorescencia y fosforescencia, tenemos que hablar de lo que es el espín del electrón y de cómo se relaciona éste con dicha diferencia.

Si hablamos de espín del electrón tenemos que hablar del principio de exclusión de Pauli que establece que en un átomo no puede haber dos electrones con los cuatro números cuánticos iguales; esto restringe la posibilidad de encontrar más de dos electrones en un orbital y además estos deben de tener los estados de espín opuestos. Cuando esto sucede se dice que los electrones están apareados. Cuando esto ocurre no hay un campo magnético neto y no pueden ser atraídas ni repelidas por campos magnéticos permanentes. A este tipo de moléculas se les conoce como **diamagnéticas**. Por el contrario los radicales libre, los cuales tienen electrones desapareados son atraídos o repelidos por campos magnéticos formales y se les da el nombre de **paramagnéticos**.

Cuando los espines de los electrones están apareados, se le conoce como estado **singulete** y cuando un estado de este tipo se expone a un campo magnético, no se produce un cambio en los niveles de energía. En el caso de los radicales libre, se presenta un estado **doblete**, pues el electrón impar puede tomar dos orientaciones en un campo magnético.

Cuando un electrón de una molécula es excitado a un nivel superior, sigue siendo un singulete, si el espín del electrón excitado continúa apareado con el electrón en el estado fundamental. De no seguir apareados se denomina **triplete**.

Es necesario mencionar que el estado triplete excitado es menos energético que el estado singulete excitado y que una transición singulete/triplete o viceversa, es menos probable que la correspondiente singulete/singulete. Por consiguiente el tiempo de vida media de un triplete excitado va desde 10^{-4} a varios segundos en tanto que el tiempo de vida media de un singulete excitado es de entre 10^{-8} a 10^{-5} segundos. La probabilidad de que una molécula presente una transición debida a radiación a un triplete excitado es baja. Sin embargo existe la posibilidad de que una molécula presente una transición electrónica de singulete excitado a triplete excitado, lo cual da como origen la **fosforescencia**.

En el caso de las nanopartículas y sus propiedades de auto ensamblaje y distribución electrónica debida a esta propiedad^{lxxxviii}. Esta técnica es bastante adecuada tanto porque las nanopartículas presentan fotoluminiscencia y por las cantidades tan pequeñas que se pueden detectar mediante esta técnica^{lxxxix}.

OBJETIVOS

- 1) Determinar los niveles óptimos de las variables de proceso (velocidad de agitación, cantidad de tensoactivo, concentración del monómero y pH) para la obtención de nanopartículas de polietilcianoacrilato con un tamaño inferior a 100nm.
- 2) Caracterizar las nanopartículas obtenidas en cuanto a tamaño, peso molecular de los oligómeros, composición química y morfología
- 3) Evaluar el efecto de otras variables que pudieran influir en el proceso de elaboración de nanopartículas de polietilcianoacrilato.
- 4) Elaborar un modelo matemático que explique la formación de las nanopartículas de polietilcianoacrilato a través del tiempo.
- 5) Dar seguimiento a las nanopartículas a través del estrato córneo mediante la técnica de "Tape Stripping" (exfoliación mediante tiras adhesivas) y microfotoluminiscencia.

HIPÓTESIS

Hipótesis 1: La obtención de partículas de tamaño inferior a 100nm depende fundamentalmente de la velocidad de agitación, cantidad de tensoactivo, concentración del monómero y pH.

Hipótesis 2: El establecimiento de un modelo matemático para explicar la formación de nanopartículas de etilcianoacrilato es un fenómeno oscilante que se puede abordar mediante ventanas de refinamiento, involucrando los fenómenos de polimerización, depolimerización y dinámica de aglomerados.

Hipótesis 3: Las nanopartículas de tamaño inferior a 100 nm penetran en piel, según se ha expuesto en la literatura. El seguimiento de la penetrabilidad de las nanopartículas de etilcianoacrilato mediante la técnica de **exfoliación con tiras adhesivas** (“tape stripping”) permitirá saber hasta que capa de estrato córneo esta afirmación es cierta y obtener un perfil de concentraciones.

REFERENCIAS

- i Stix, G. (2001). *Scientific American*, **285**: 35.
- ii Jenkins, A. D.(1998). *in Chemical Nomenclature*, (K. J. Thurlow, ed.) Kluwer Academic Publishers.
- iii Sperling, L.H. (1985). *J. Chem Ed.* **62**:1030.
- iv Mark, J.E., Allcock, H.R., West, R. (1992). *Inorganic Polymers*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- v Epstein, I.R., Pojman, J.A. (1998). *An Introduction to Non Linear Chemical Dynamics*. New York:Oxford University Press, p. 3-14.
- vi Fitch, R.M., Prenosil, M. B., Sprick, K. J. (1966). *Amer. Chem. Soc., Polym. Preprints* **7**:707
- vii Fitch, R.M., Prenosil, M. B., Sprick, K. J. (1969). *J. Polymer Sci. C* **27**:95
- viii Fitch, R.M., Tsai, C. (1970). *J. Polymer Sci., Polymer Lett.* **8**:703.
- ix Fitch, R.M. (1973). *Brit. Polymer J.* **5**:467.
- x Roe, C.P. (1968). *Ind. Eng. Chem.* **60**:20.
- xi Robb, I.D. (1969). *J. Polymer Sci., Part A-1* **7**:417.
- xii Gardon, J. L. (1977). *Interfacial Synthesis, Vol. 1* (F. Millich and C.E. Carraher, eds.) New York:Marcel Dekker, p. 205.
- xiii Kreuter, J. (1983). *Pharm. Acta Helv.* **58**:196
- xiv Berg, U. E., Kreuter, J., Speiser, P.P., Soliva, M. (1986). *Pharm. Ind.* **48**:75
- xv Kreuter, J. (1982). *J. Polym. Sci., Polym. Lett.* **20** :543
- xvi El-Egakey, M.A., Bentele, V., Kreuter J. (1983) *Int. J. Pharm.* **13**:349
- xvii Bentele, V., Berg, U.E., Kreuter, J. (1983) *Int. J. Pharm.* **13**:109
- xviii Douglas, S. J., Davis, S.S., Holding, S.R. (1985) *Brit. Polym. J.* **17**:339
- xix Vansnick, L., Couvreur, P., Cristianes-Leyh, D., Roland, M. (1985) *Pharm. Res.* **1** :36
- xx Douglas, S. J., Illum, L., Davis, S.S. (1985) *J. Colloid Interface Sci.* **103**:154
- xxi Douglas, S. J., Illum, L., Davis, S.S., Kreuter J. (1984) *J. Colloid Interface Sci.* **101**:149
- xxii Seijo, B., Fattal, E., Roblot-Treupel, L., Couvreur, P. (1990) *Int. J. Pharm.* **62**:1.
- xxiii Birrenbach, G., Speiser, P.P. (1976) *J. Pharm. Sci.* **65**:1763
- xxiv Ekman, B., Lofter, C., Sjöholm, I. (1976) *Biochem.* **15**:5115.
- xxv Ekman, B., Sjöholm, I. (1978) *J. Pharm. Sci.* **67**:693.
- xxvi Ljungstedt, I., Ekman, B., Sjöholm, I. (1978) *Biochem. J.* **170**:161.
- xxvii Edman, P., Ekman, B., Sjöholm, I. (1980) *J. Pharm. Sci.* **69**:838.
- xxviii Krause, H. J., Schwarz, A., Rohdewald, P. (1986) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **12**:527
- xxix Watanabe, A., Higashitsuji, K., Nishizawa, K. (1978) *J. Colloid Interface Sci.* **64**:278
- xxx Al Khouri Fallouh, N., Roblot-Treupel, L., Fessi, H., Devissaguet, J.P., Puisieux, F. (1986) *Int. J. Pharm.* **28**:125
- xxxi Chouinard, F., Kan, F. W. K., Leroux, J. C., Foucher, C., Lenaerts, V. (1991) *Int. J. Pharm.* **72** : 211.

-
- xxxii Rollot, J. M., Couvreur, P., Roblot-Treupel, L., Puisieux, F. (1986) *J. Pharm. Sci.* **75** : 361.
- xxxiii Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. Ph., Ammoury, N., Benita, S. (1989) *Int. J. Pharm.* **55** : R 1
- xxxiv Ammoury, N., Fessi, H., Devissaguet, J. P., Puisieux, F., Benita, S. (1990) *J. Pharm. Sci.* **79** :163
- xxxv Marchal-Heussler, L., Fessi, H., Devissaguet, J. P., Hoffman, M., Maincent, P. (1992) *S.T.P. Pharma Sci.* **2** :98
- xxxvi Gurny, R., Peppas, N. A., Harrington, D.D., Banker, G. S. (1981) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **7**:1
- xxxvii Bodmeier, R., Chen, H. (1990) *J. Controlled Rel.* **12**:223
- xxxviii Kreuter, J. (1983) *Int. J. Pharm.* **14**:43
- xxxix Zimmer, A., Kreuter, J., Robinson, J. R. (1991) *J. Microencapsul.* **8** : 497
- xl Kopf, H., Joshi, R. K., Soliva, M., Speiser, P. (1976) *Pharm. Ind.* **38** : 281
- xli Magenheim, B., Benita, S. (1991) *S.T.P. Pharm. Sci.* **1**: 221
- xlii Hansma, P. K., Tersoff, J. (1987) *Appl. Phys.* **61**: R1
- xliii Hansma, P. K., Elings, V. B., Marti, O., Bracker, C. E. (1988) *Science* **242**: 209
- xliv Gedde, U. W. (1990) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **16**: 2465
- xlvi Benoit, J. P., Benita, S., Puisieux, F. Thies, C. (1984) *Microspheres and Drug Therapy* (S. S. Davis, L. Illum, J. G. McVie, and E. Tomlinson, eds.). Amsterdam: Elsevier, p. 91
- xlvi Yalabik-Kas, H. S., Kreuter, J., Hincal, A. A., Speiser, P. P. (1986) *J. Microencapsul.* **3**: 213
- xlvi Kreuter, J. (1983) *Topics in Pharmaceutical Sciences* (D. D. Breimer and P. Speiser, eds). Amsterdam: Elsevier, p. 359
- xlvi Bissery, M. C., Puisieux, F., Thies, C. (1983) *Proc. 3rd Int. Confer. Pharm. Technol.*, Paris, **3** : 233
- xlix Harmia, T., Speiser, P., Kreuter, J. (1986) *J. Microencapsul.* **3** : 3
- l Wilkins, D. J., Myers, P. A. (1966) *Brit. J. Exp. Pathol.* **47**: 568
- li Tröster, S. D., Kreuter, J. (1988) *Int. J. Pharm.* **45**:91
- lii Carstensen, H., Müller, B. W., Müller, R. H. (1991) *Int. J. Pharm.* **67**: 29
- liii Müller, R. H., Wallis, K. H., Tröster, S. D., Kreuter, J. (1992) *J. Controlled Rel.* **20**:237
- liv Tröster, S. D., Wallis, K. H., Müller, R. H., Kreuter, J. (1992) *J. Controlled Rel.* **20**:247
- lv Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., Rudzinski, W. E. (2001) *J. Contr. Rel.* **70**:1
- lvi Müller, R.H., Lherm, C., Herbort, J., Blunk, T., Couvreur, P. (1992) *Int. J. Pharm* **84**:1
- lvii Coover, H. N., et al (1959) *J. Plast. Surg. Engl.* **15** :5
- lviii Matsumoto, T., et al (1968) *Aron Alpha a Sanyo Am. Surg.* **24**:263
- lix Park, D-H, Kim, B-S, Ahn, K-D, Kim, E-Y, Kim, Y-J, Han, D. K. (2003) *J. Appl. Polym. Sci.* **89**:3272
- lx Harkins, W. D. (1947) *J. Am. Chem. Soc.* **69**:1428

-
- Ixi Prigogine, I., Lefever, R. (1968) *J. Chem. Phys.* **48**: 1695
- Ixii Tyson, J. (1973) *J. Chem. Phys.* **58**: 3919
- Ixiii Schork, F. J., Ray, W. H. (1987) *J. Appl. Polym. Sci.* **34**: 1259
- Ixiv Pannatier, A., Jenner, P., Testa, B., Etter, J.C., (1978) *Drug Metab. Rev.* **8**:319
- Ixv Neville, A.M. (1994) *Am. Physiol. Soc.* 2870
- Ixvi Lavker, R.M., Sun, T., (1982) *Science* **215**: 1239
- Ixvii Cross, S.E., Roberts, M.S. (1993) *J. Pharm. Pharmacol.* **45**:606
- Ixviii Suba, A., Rockson, S.G. (1997) *Vasc. Med.* **2**:321
- Ixix Cameli, N., Picardo, M., Perrin, C. (1994) *Br. J. Dermatol.* **130**:583
- Ixx Roberts, M.S., Walter, M. (1993) *Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement*. New York: Marcel Dekker, pp 1-30
- Ixxi Vavosour, I., Kitson, N., Mackay, A. (1998) *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **3**:101
- Ixxii Gniadecka, M., Nielsen, O.F., Christensen, D.H., Wulf, H.C. (1998) *J. Invest. Dermatol.* **110**:393
- Ixxiii Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Salomons-de Vries, van der Spek, J.A., Bras, W. (1992) *Int. J. Pharm.* **84** : 205
- Ixxiv van Hal, D.A., Jeremiasse, E., Junginger, H.E., Spies, F., Bouwstra, J.A. (1996) *J. Invest. Dermatol.* **106**:89
- Ixxv Menon, G.K., Elias, P.M. (1997) *Skin Pharmacol.* **10**:235
- Ixxvi Hou S.Y.E., Mitra, A.K., White, S.H., Menon, G.K., Ghadially, R., Elias, P.M. (1991) *J. Invest. Dermatol.* **96**:215
- Ixxvii Suponen, T.M., Bouwstra, J.A., Urti, A. (1999) *J. Controlled Release* **59**:149
- Ixxviii Malkinson, F.D., Ferguson, E.H. (1955) *J. Invest. Dermatol.* **25**:281
- Ixxix Vickers, C.F.H. (1963) *Arch. Dermatol.* **88**:20
- Ixxx Munro, D.D. (1969) *Br. J. Dermatol.* **81(suplemento 4)**: 92
- Ixxxi Dupuis, D., Rougier, A., Roguet, R., Lotte, C., Kalopissis, G. (1984) *J. Invest. Dermatol.* **82** :353
- Ixxxii Dupuis, D., Rougier, A., Roguet, R., Lotte, C. (1986) *Br. J. Dermatol.* **115** :233
- Ixxxiii Rougier, A., Lotte, C., Dupuis, D. (1987) *J. Soc. Cosmet. Chem.* **38** :397
- Ixxxiv Rougier, A., Lotte, C., Maibach, H.I. (1987) *J. Invest. Dermatol.* **88** :577
- Ixxxv Rougier, A., Rallis, M., Krien, P., Lotte, C. (1990) *Arch. Dermatol. Res.* **282**:498
- Ixxxvi Lakowicz J.R., (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York: Plenum Press
- Ixxxvii Schulman S., *Molecular Luminescence Spectroscopy*, Ed. New York: Wiley, Part 1, (1985), Part 2, (1988), Part 3, (1993)
- Ixxxviii Pitsillides, C.M., Joe, E.K., Wei, X.B., Anderson, R.R., Lin, CP., (2003) *Biophysical Journal*, **84**: 4023
- Ixxxix Marsal, L., Besombes, L., Tinjod, F., Kheng, K., Wasiela, A., Gilles, B., Rouviere, J.L., Mariette, H., (2002) *Journal of Applied Physics*, **91**: 4936

CAPÍTULO II: **MATERIALES Y** **MÉTODOS**

1 PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO.

En este estudio uno de los principales objetivos es la fabricación de nanopartículas usando etilcianoacrilato como monómero para una polimerización en fase acuosa continua. El tamaño deseado de nanopartículas es del orden de 100nm o menores. Para lograr el objetivo deseado se busca determinar las variables más importantes y sus niveles más adecuados.

Cuando se trabaja con experimentos en los que intervienen varios parámetros, es difícil evaluar éstos de manera adecuada. Lo usual es mantener todos los parámetros constantes, excepto uno para poder evaluar el efecto de ese factor que no se mantuvo constante sobre una variable de respuesta determinada. A esta manera de trabajar se le conoce como ensayo y error.

Existe como contraparte otra metodología que fue la que se usó en este trabajo para poder evaluar el efecto de varios parámetros al mismo tiempo y sus posibles interacciones. Hablando de interacciones, éstas no se evalúan cuando se trabaja por ensayo y error; y muchas veces estas interacciones llegan a ser más importantes que los parámetros principales evaluados de manera individual. Por lo tanto, la metodología que permite evaluar el efecto de varios parámetros al mismo tiempo es llamada de manera general “diseño de experimentos”. Esta forma de trabajo, permite mediante técnicas estadísticas, conocer el efecto de parámetros individuales, interacciones entre los diferentes parámetros y efectos cuadráticos, cúbicos, y de órdenes superiores, dependiendo del diseño de experimentos empleado.

El diseño de experimentos de manera general, establece un orden de realización de los experimentos de manera aleatoria, cada experimento se realiza en los niveles previamente establecidos. Lo normal es escoger niveles de los parámetros de manera equidistante de un punto de referencia para hacer los cálculos lo más sencillos y manejables posible.

Una vez que se llevaron a cabo los experimentos, se someten los datos a un análisis de regresión para obtener un polinomio de respuesta, válido únicamente para la zona comprendida entre los niveles y las variables escogidas. Se realizan a su vez pruebas estadísticas para evaluar la validez del modelo de ajuste, con lo cual se define cuáles son las principales variables que afectan la respuesta escogida.

Para esta parte del proyecto se probaron las siguientes variables, que de acuerdo a la literatura son las de mayor efecto sobre el tamaño de partícula: pH, velocidad de agitación, concentración de monómero, concentración de tensoactivo. A cada variable se le han asignado 2 niveles de acuerdo a los hallazgos publicados en literatura.

En esta primera parte del trabajo experimental se buscó obtener las mejores condiciones de proceso para la obtención de nanopartículas de tamaño inferior a 100 nm.

1.1 Producción de nanopartículas de polietilcianoacrilato (Primera etapa).

Para producir las nanopartículas del etilcianoacrilato, se usaron etilcianoacrilato de la marca SIGMA ALDRICH, Pluronic® F68 de la marca SIGMA ALDRICH y ácido clorhídrico (J.T. Baker). Las distribuciones de tamaño de partícula fueron determinadas usando un submicron Sizer N4 plus, marca COULTER.

Se disolvió HCl en 10mL del agua desionizada para obtener soluciones acuosas con pH=0.54 y 2.7. El tensoactivo fue agregado lentamente a estas soluciones hasta obtener concentraciones de 1% y 3% (p/v). La mezcla de reacción se agitó a 500 y 1000 RPM hasta que fue alcanzada completa disolución. Finalmente, el monómero fue inyectado lentamente a 20 y 100 $\mu\text{L}/10\text{ mL}$ y la mezcla fue agitada por 20 minutos. Se realizaron las combinaciones de las variables a los niveles indicados en un esquema de diseño factorial 2^K , en este caso fué un diseño 2^4 completo.

Tabla 2: Diseño experimental para la producción de nanopartículas de polietilcianoacrilato (primera etapa)

Corrida Número	pH	Velocidad de agitación (rpm)	Concentración de monómero ($\mu\text{L}/10\text{mL}$)	Concentración de tensoactivo (% w/v)
1	0.54	500	20	1
2	0.54	500	20	3
3	0.54	500	100	1
4	0.54	500	100	3
5	0.54	1000	20	1
6	0.54	1000	20	3
7	0.54	1000	100	1
8	0.54	1000	100	3
9	2.7	500	20	1
10	2.7	500	20	3
11	2.7	500	100	1
12	2.7	500	100	3
13	2.7	1000	20	1
14	2.7	1000	20	3
15	2.7	1000	100	1
16	2.7	1000	100	3

De 3 a 5 gotas de la mezcla fueron colocadas en una celda plástica y se completó con agua desionizada, se cubrió la celda para evitar la contaminación con polvo y se colocó dentro del compartimiento del submicron Sizer. Se determinó la distribución de tamaño de las nanopartículas para cada experimento. Usando análisis de varianza, se obtuvo el mejor ajuste para el tamaño promedio de las nanopartículas que fue de tipo polinomial.

1.2 Producción de nanopartículas de polietilcianoacrilato (Segunda parte).

Una vez que se determinaron las variables que tenían más influencia sobre el tamaño de partícula (pH y concentración de tensoactivo), se procedió a realizar una serie de experimentos encaminados a encontrar la mejor combinación de ambas variables para lograr obtener nanopartículas de tamaños inferiores a 100 nm.

Se escogieron los siguientes pH de acuerdo a la experiencia obtenida en la sección anterior: 1.61, 1.93, 2.78, 3.06 y la concentración del tensoactivo de 5 y 7 % (p/v). Los experimentos se realizaron con una concentración de monómero de 100 ($\mu\text{L}/10\text{ mL}$) y la velocidad de agitación fue de 1000 rpm.

Tabla 3: Diseño experimental de la producción de nanopartículas de polietilcianoacrilato (segunda etapa).

Corrida Número	pH	Velocidad de agitación (rpm)	Concentración de Monómero ($\mu\text{L}/10\text{ mL}$)	Concentración de tensoactivo (% w/v)
1	1.61	1000	100	5
2	1.61	1000	100	7
3	1.93	1000	100	5
4	1.93	1000	100	7
5	2.78	1000	100	5
6	2.78	1000	100	7
7	3.06	1000	100	5
8	3.06	1000	100	7

1.3 Efecto de la concentración micelar crítica y el tipo de tensoactivo.

Para estudiar el efecto de la concentración micelar crítica (CMC) sobre el tamaño de las nanopartículas de etilcianoacrilato, se colocaron 10 mL del agua desionizada a pH fijo (0.54, 1.61, 1.93 y 2.70) y se utilizó una agitación de 1000 rpm por 10 minutos, con las diferentes concentraciones del tensoactivo y se agregó lentamente 100 μL de monómero. Una vez que se termina la adición, el sistema se agitó por 20 minutos.

2 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO.

2.1 Peso Molecular de las unidades poliméricas.

El peso molecular del etilcianoacrilato de las nanopartículas fue determinado usando un cromatógrafo 410 GPC Waters con detector de índice de refracción. Se prepararon tres columnas de Styragel HR 0.4% y se usó THF como disolvente. Se utilizó poliestireno para la calibración.

2.2 Microscopía de Barrido Electrónico (morfología).

La preparación de las muestras para obtener las imágenes de microscopía electrónica de barrido fue depositando una gota diluida al 30% sobre un portaobjetos y posteriormente se les dio un baño de oro para introducir la muestra en el microscopio electrónico JEOL JSM-25SII.

2.3 Resonancia Magnética Nuclear.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono y de protones (NMR) de las nanopartículas de etilcianoacrilato fueron obtenidos usando un espectrómetro Varian Mercury SO12002-NMR (frecuencia 200MHz; se utilizaron concentraciones estándares de 1% p/v, 1% de TMS como referencia química y como disolvente cloroformo deuterado).

3 CINÉTICA DE FORMACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO.

Se estudió la cinética de formación de las nanopartículas de etilcianoacrilato. En estos experimentos, el pH se fijó constante e igual a 1.27 y 2.40 para retardar el proceso (reacción química y formación de la partícula). Bajo estas condiciones la naturaleza del tensoactivo usado para la síntesis es casi irrelevante; esto simplificó el modelo propuesto. El tensoactivo fue agregado a la solución a una concentración de 5% (w/v), se adicionaron 100 μ L del monómero en 10 mL de la mezcla, se agitó la mezcla de reacción a 1000 rpm y la solución fue leída en un espectrofotómetro UV-Visible a 210 cm^{-1} de longitud de onda. Nótese que el pH 2.4 es un valor óptimo para sintetizar nanopartículas de etilcianoacrilato con un tamaño por debajo de 100nm.

4 METODOLOGÍA UTILIZADA PARA CUANTIFICAR EL ACTIVO EN LA MUESTRA DE PIEL EXFOLIADA (TAPE STRIPPING).

4.1 Estudios preliminares.

Este trabajo pretende cuantificar la cantidad de nanopartículas de polietilcianoacrilato en el estrato córneo (SC). La técnica para poder obtener muestras de nanopartículas a diferentes profundidades del estrato córneo fue la de "tape stripping" cuyo sustento y posibles errores se mencionaron anteriormente.

Una vez que se obtuvieron las cintas adhesivas con las muestras de las nanopartículas a diferentes profundidades del SC, se realizó la determinación espectrofotométrica (se verá con más detalle el procedimiento experimental en el siguiente inciso). Un primer intento por cuantificar las nanopartículas se realizó por medio de espectroscopía IR, no obteniéndose los resultados esperados. La señal característica del grupo ciano está entre 2220 cm^{-1} y 2260 cm^{-1} pero cuando se colocaron las cintas en la celda del IR y se hizo la determinación de la cantidad de nanopartículas, no hubo respuesta. Se probó también con espectroscopia RAMAN y nuevamente, como en el caso de la espectroscopia IR, no hubo respuesta en el rango de longitudes de onda antes mencionadas. Debido a la falta de resultados por las técnicas analíticas ya señaladas, se decidió, probar con una técnica usada para evaluar de forma cuantitativa nanopartículas metálicas llamada microfotoluminiscencia. Esta forma de evaluar nanopartículas a diferentes profundidades del estrato córneo, hasta donde se sabe no ha sido utilizada para estos fines y no hay reportes de su uso en sistemas similares.

El estudio de esta clase de fenómenos es realmente nuevo, los primeros intentos por estudiar los sistemas mesoscópicos empezaron a fines de los años setenta en el siglo veinte. Los intentos microscópicos y macroscópicos no habían sido útiles para estudiar esta escala. Los nanoaglomerados y los nanotubos están en esta escala. El estudio de esta escala es realmente interesante ya que los sistemas aquí involucrados obedecen a reglas diferentes a la escala macro y a la escala micro ya que las propiedades de volumen son despreciables frente a las propiedades de superficie.

Debido a la alta energía superficial, las estructuras mesoscópicas tienden a auto-ensamblarse y estas pueden tener y de hecho tienen propiedades muy interesantes. El estudio de los coloides, las nanoestructuras, etc. han alcanzado un papel preponderante en los últimos años.

Si hablamos de sistemas mesoscópicos, tenemos que mencionar a los aglomerados. Estos son aglomerados de moléculas o átomos de igual o diferente naturaleza química. El sistema de nanopartículas de que trata este trabajo también incluye la formación de clusters. En general los clusters tienen propiedades electrónicas muy interesantes y es por esto que podemos usar fotoluminiscencia para caracterizarlos.

Es posible excitar con luz aglomerados neutros o cargados y estudiar la radiación que estos emiten. La pérdida de energía por emisión o radiación ocurre en estos sistemas y tienen anchos de banda grandesⁱ.

Muchos trabajos se han publicado usando microfotoluminiscencia por ejemplo para caracterizar puntos cuánticos^{ii, iii, iv}, nanocristales^v, columnas fabricadas por medio de litografía de emisión de electrones^{vi}, nanopartículas inorgánicas^{vii}, nanoestructuras^{viii}, interfaces^{ix}, alambres cuánticos^x. El como se comporte el material depende de la temperatura^{xi}, en semiconductores^{xii}, etc. La técnica de microfotoluminiscencia se utiliza principalmente para caracterizar materiales metálicos.

En el campo de los semiconductores la microfotoluminiscencia ha ayudado a entender mejor el efecto de usar diferentes aleaciones y se puede determinar cual es la mejor proporción de materiales^{xiii}. También se puede evaluar el efecto de la porosidad^{xiv}.

La idea de emplear la microfotoluminiscencia para seguir las nanopartículas de polietilcianoacrilato a través del estrato corneo es original ya que no hay referencias hasta ahora de este tipo de uso. La forma común que se utiliza para este tipo de estudios es mediante espectroscopia IR y se ha utilizado solamente para evaluar cintas adhesivas con fármaco libre y no en una nanopartícula o disolviendo el pegamento de la cinta junto con el fármaco en un solvente adecuado. La microfotoluminiscencia aplicada al estudio de la difusión de nanopartículas a través de membranas biológicas o en sistemas biológicos puede ser de gran ayuda en estudios farmacéuticos.

4.2 Condiciones experimentales de la evaluación de las nanopartículas de polietilcianoacrilato a través de piel.

Como primera fase se prepara una suspensión de nanopartículas de entre 70 y 110nm para realizar la prueba. Una celda de vidrio es colocada en el brazo del voluntario y se adicionan 3mL de la suspensión de nanopartículas dentro de la celda. Después la celda es fijada al brazo por medio de una película plástica. Se deja el la celda con las nanopartículas por 30 minutos en contacto con el brazo del voluntario, se retira la celda y la suspensión de nanopartículas y después se limpia y seca la zona con un paño seco.

Inmediatamente después de limpiar la zona del brazo, se coloca una cinta adhesiva (Cinta 845 de 3M) de 5X3 cm y se aplica presión para que la cinta pegue bien en la zona donde se aplicaron las nanopartículas. Se retira la cinta tomándola de una esquina y se coloca dentro de una caja petri previamente identificada. Se realiza la misma operación 14 veces más. Cada vez que se realiza la operación anterior es importante ir retirando la cinta de forma alternada para obtener mejor reproducibilidad en las muestras, una vez se retira de izquierda a derecha y otra vez de derecha a izquierda.

El mismo procedimiento se realiza para los tiempos de 1hr, 2hr y 3hr.

Cada cinta contiene células muertas, lípidos, nanopartículas, etc. Entre más cintas apliquemos a la zona de aplicación de las nanopartículas, alcanzaremos mayor profundidad en el estrato corneo (SC).

Como se mencionó en el inciso anterior la técnica para cuantificar las nanopartículas en las cintas obtenidas en el procedimiento experimental, fue microfotoluminiscencia.

4.3 Microfotoluminiscencia.

Las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente en un sistema micro RAMAN (marca Dior) modelo Labram, el cual tiene un láser He-Ne que emite a 632.8 nm. El haz de luz fue enfocado a la superficie de la muestra con un objetivo de 50X que permitió reducir el diámetro del láser a 2 micrómetros. El equipo tiene un sistema óptico que permite observar en una pantalla la región de la muestra que se desea analizar. Con este aditamento se tuvo el cuidado de estudiar regiones similares en cada profundidad de la piel. Esto significa, que se estudiaron regiones con apariencia óptica similar en tamaño y grosor. La señal obtenida se separó en sus componentes espectrales por medio de una malla de difracción de 1200 líneas/mm y se analizó con la ayuda de un detector CCD termoelectricamente enfriado. El tiempo de integración fluctuó entre 30 y 60 segundos. En algunos casos la luminiscencia fue tan intensa que fue necesario usar filtros de densidad neutral para evitar la saturación del detector.

REFERENCIAS

- ⁱ Haberland, H., (1994) *Clusters of atoms and Molecules I*, Ed. Springer-Verlag, 1^a ed, pag 1-12
- ⁱⁱ Qi, J.F., Mao, C.B., White, J.M., Belcher, A.M. (2003) *Physical Review B* **68** (12): art. no.-125319
- ⁱⁱⁱ Tachibana, K., Someya, T., Ishida, S., Arakawa, Y. (2000) *Applied Physics Letters* **76**:3212
- ^{iv} Samuelson, L., Carlsson, N., Castrillo, P., Gustafsson, A., Hessman, D., Lindahl, J., Montelius, L., Petersson, A., Pistol, M.E., Seifert, W. (1995) *Japanese Journal of Applied Physics part 1-Regular Papers short notes and Review Papers* **34**:4392
- ^v Valenta, J., Linnros, J., Juhasz, R., Rehspringer, J.L., Huber, F., Hirlimann, C., Cheylan, S., Elliman, R.G. (2003) *Journal of Applied Physycs* **93**:4471
- ^{vi} Demangeot, F., Gleize, J., Frandon, J., Renucci, M.A., Kuball, M., Peyrade, D., Manin-Ferlazzo, L., Chen, Y., Grandjean, N. (2002) *Journal of Applied Physics* **91**: 6520
- ^{vii} Liu, Y.X., Liu, Y.C., Shen, D.Z., Zhong, G.Z., Fan, X.W., Kong, X.G., Mu, R., Henderson, D.O. (2002) *Solid State communications* **121**: 531
- ^{viii} Marsal, L., Besombes, L., Tinjod, F., Kheng, K., Wasiela, A., Gilles, B., Rouviere, J.L., Mariette, H. (2002) *Journal of Applied Physics* **91**:4936
- ^{ix} Jahn, U., Notzel, R., Hey, R., Grahn, H.T., Ploog, K.H. (2000) *Japanese Journal of Applied Physics part 1-Regular Papers short notes and Review Papers* **39**:4512
- ^x Voliotis, V., Bellessa, J., Grousson, R., Wang, X.L., Ogura, M., Matsuhata, H. (1998) *Solid-State Electronics* **42**:1217
- ^{xi} Zhao, H., Moehl, S., Wachter, S., Kalt, H. (2002) *Applied Physics Letters* **80**:1391
- ^{xii} Gustafsson, A., Pistol, ME., Montelius, L., Samuelson, L. (1998) *Journal of Applied Physics* **84**:1715
- ^{xiii} Heiras, J., Pichardo, E., Mahmood, A., Lopez, T., Perez-Salas, R., Siqueiros, J.M., Blanco, O., Castellanos, M. (2002) *Journal of Physics and Chemistry of solids* **63**:591
- ^{xiv} Buzaneva, E., Gorchinsky, A., Popova, G., Veblaya, T., Zankovych, S., Boiko, Y., Zolotareno, P., Pogorelov, V., Bukalo, V., Benilov, A., Lazarouk, S., Beyliss, S., Starovoitov, A., Senkevich, A. (2000) *Materials Science in Semiconductor processing* **3**:529

CAPÍTULO III:
RESULTADOS Y
ANÁLISIS DE
RESULTADOS

1 PRODUCCION DE NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOCARILATO.

1.1 Resultados del diseño experimental empleado para la producción de nanopartículas de polietilcianoacrilato (primera etapa).

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos en la primera fase de la optimización de variables del proceso de producción de nanopartículas de polietilcianoacrilato:

Tabla 4: Resultados del diseño experimental para la producción de nanopartículas de polietilcianoacrilato (primera etapa)

Corrida Número	pH	Velocidad de agitación (rpm)	Concentración de monómero ($\mu\text{L}/10\text{mL}$)	Concentración de tensoactivo (% w/v)	Tamaño promedio de nanopartícula. (nm)
1	0.54	500	20	1	240.07
2	0.54	500	20	3	182.20
3	0.54	500	100	1	493.40
4	0.54	500	100	3	380.87
5	0.54	1000	20	1	271.67
6	0.54	1000	20	3	1836.00
7	0.54	1000	100	1	209.00
8	0.54	1000	100	3	291.50
9	2.7	500	20	1	90.23
10	2.7	500	20	3	90.63
11	2.7	500	100	1	209.00
12	2.7	500	100	3	91.33
13	2.7	1000	20	1	101.57
14	2.7	1000	20	3	67.17
15	2.7	1000	100	1	45.90
16	2.7	1000	100	3	40.27

De los datos mostrados en la tabla anterior se realiza un análisis de regresión para conocer el modelo polinomial que mejor se ajusta a los datos experimentales, a continuación se presenta el modelo obtenido:

$$\begin{aligned} \text{Tamaño promedio de partícula} = & 833.62 - 604.44\text{TA} + 0.36\text{M} - 1.12\text{A} - 279.54\text{pH} \\ & + 2.35\text{TA}*\text{M} + 1.14\text{TA}*\text{A} + 226.57\text{TA}*\text{pH} + 0.0032\text{M}*\text{A} - 0.14\text{M}*\text{pH} + 0.43\text{A}*\text{pH} - \\ & 0.0051\text{TA}*\text{M}*\text{A} - 0.86\text{TA}*\text{M}*\text{pH} - 0.43\text{TA}*\text{A}*\text{pH} - 0.0013\text{M}*\text{A}*\text{pH} + \\ & 0.0019\text{TA}*\text{M}*\text{A}*\text{pH} \end{aligned}$$

El análisis estadístico muestra que el polinomio es válido para los niveles de las variables escogidas.

TA : Concentración de tensoactivo (% w/v)	ANOVA
A : Velocidad de agitación (rpm)	Prob>F 0.0001
pH : pH	R2 = 0.9950
M : Concentración de monómero (μL/100mL)	C.V. = 13.19

Del experimento anterior se evaluaron las interacciones entre las variables escogidas para saber como interactuaban entre ellas y el efecto de parejas de variables en sus niveles alto y bajo. A continuación se muestran las gráficas obtenidas para evaluar las interacciones de las variables evaluadas.

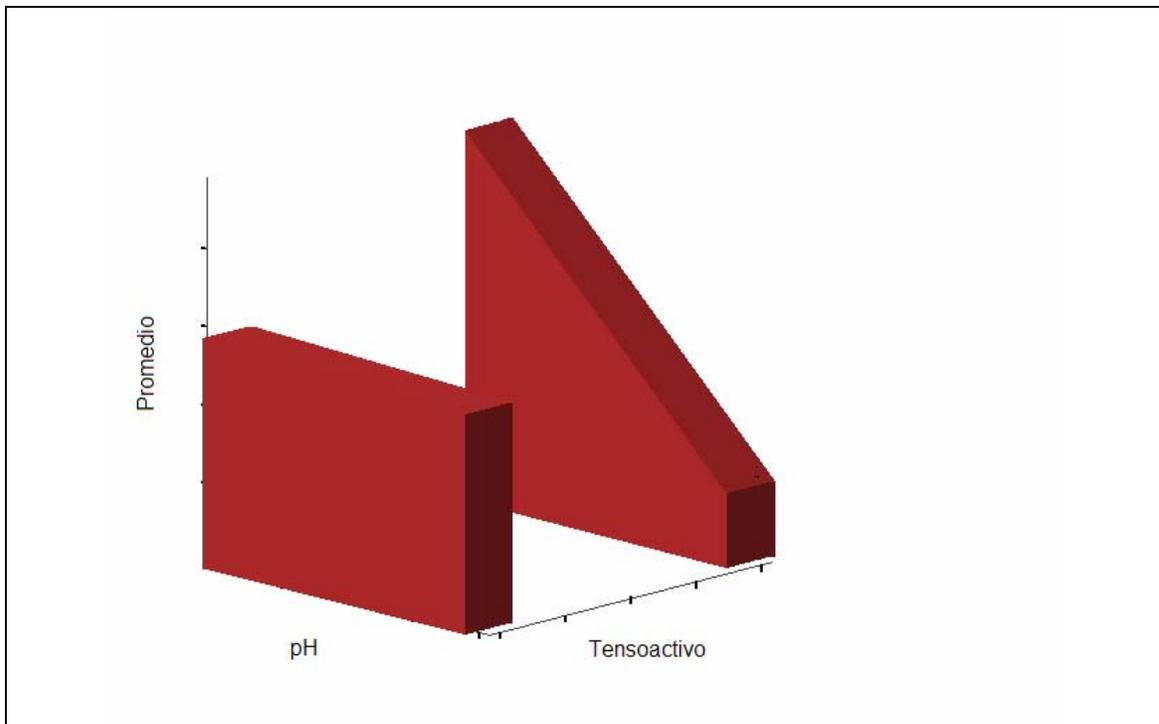


Figura 15: Interacción de la variable pH y la variable concentración de Tensoactivo sobre el tamaño promedio de tamaño de partícula, en el nivel alto y en el nivel bajo.

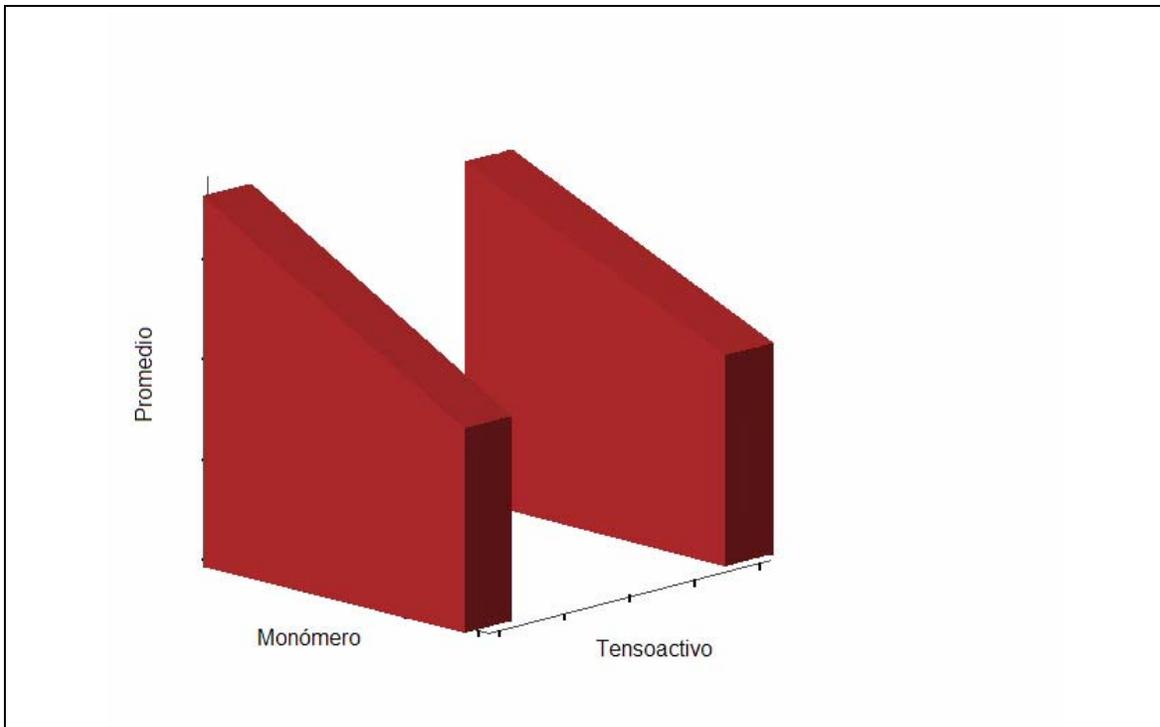


Figura 16: Interacción de la variable concentración de monómero y la variable concentración de tensioactivo sobre el tamaño promedio de tamaño de partícula, en el nivel alto y en el nivel bajo.

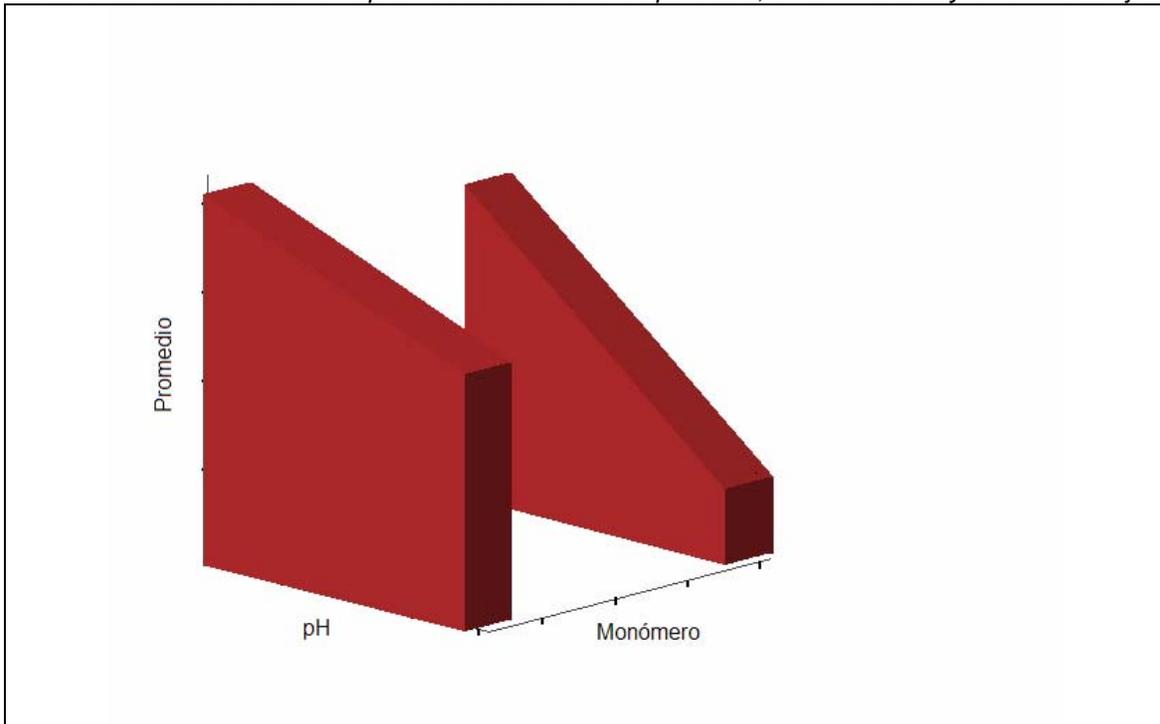


Figura 17: Interacción de la variable pH y la variable concentración de monómero sobre el tamaño promedio de tamaño de partícula, en el nivel alto y en el nivel bajo.

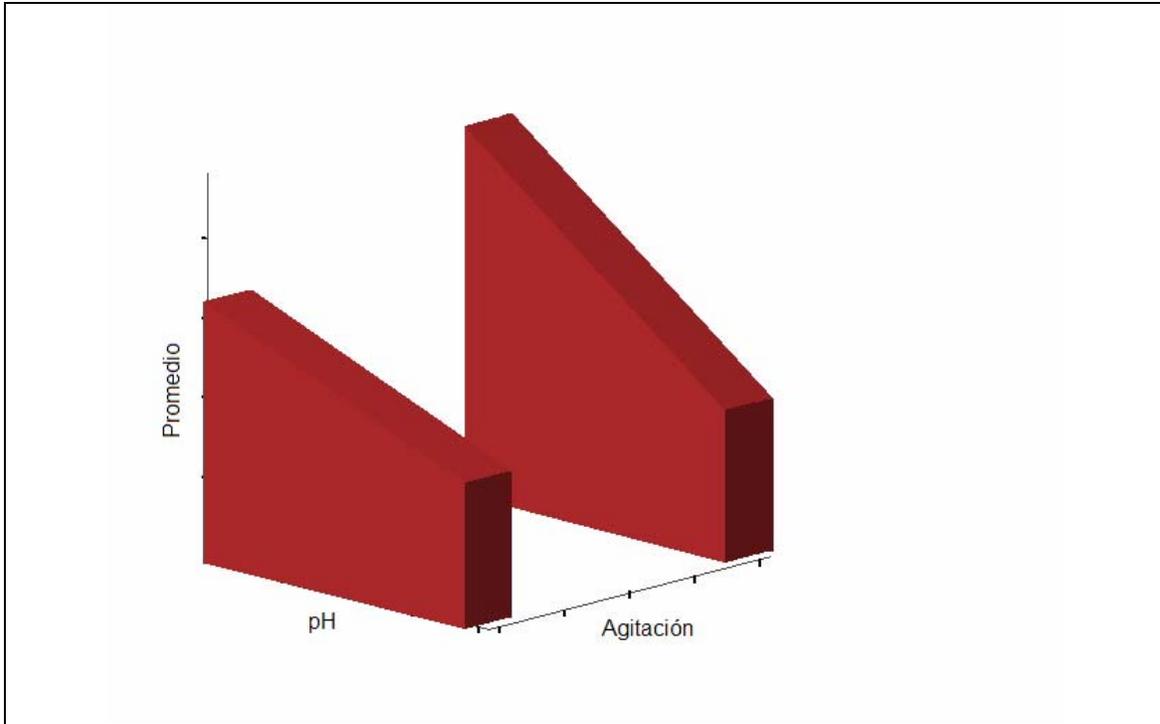


Figura 18: Interacción de la variable pH y la variable velocidad de agitación sobre el tamaño promedio de tamaño de partícula, en el nivel alto y en el nivel bajo.

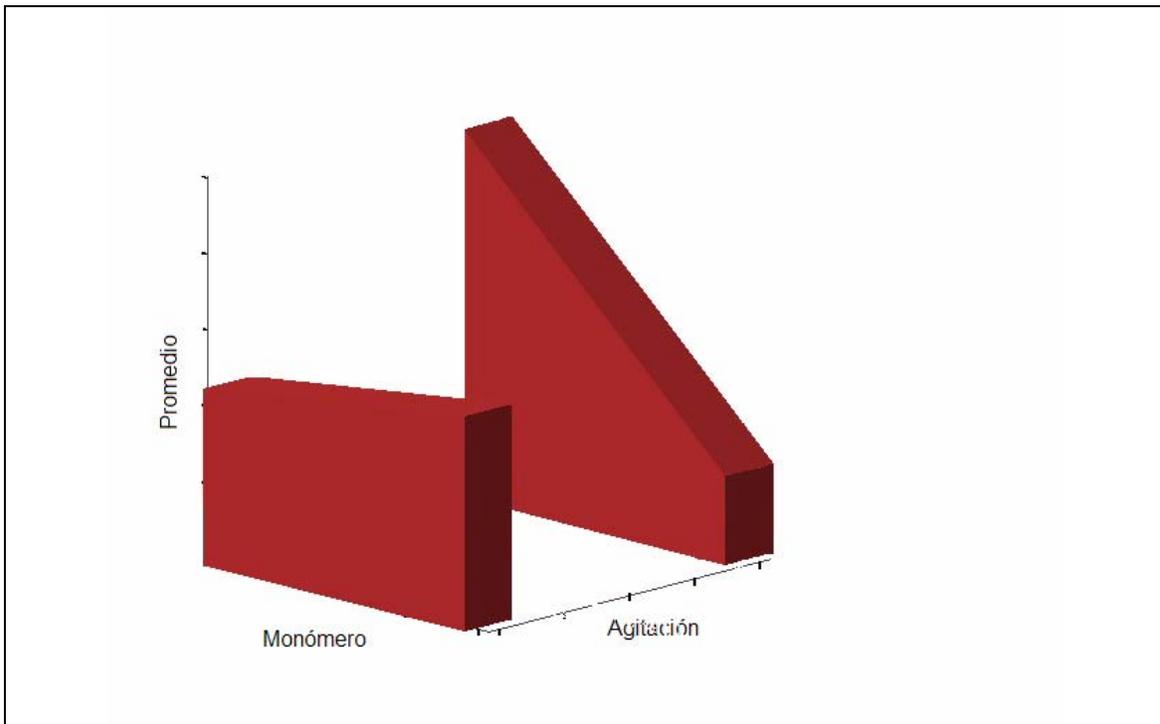


Figura 19: Interacción de la variable concentración de monómero y la variable velocidad de agitación sobre el tamaño promedio de partícula, en el nivel alto y en el nivel bajo.

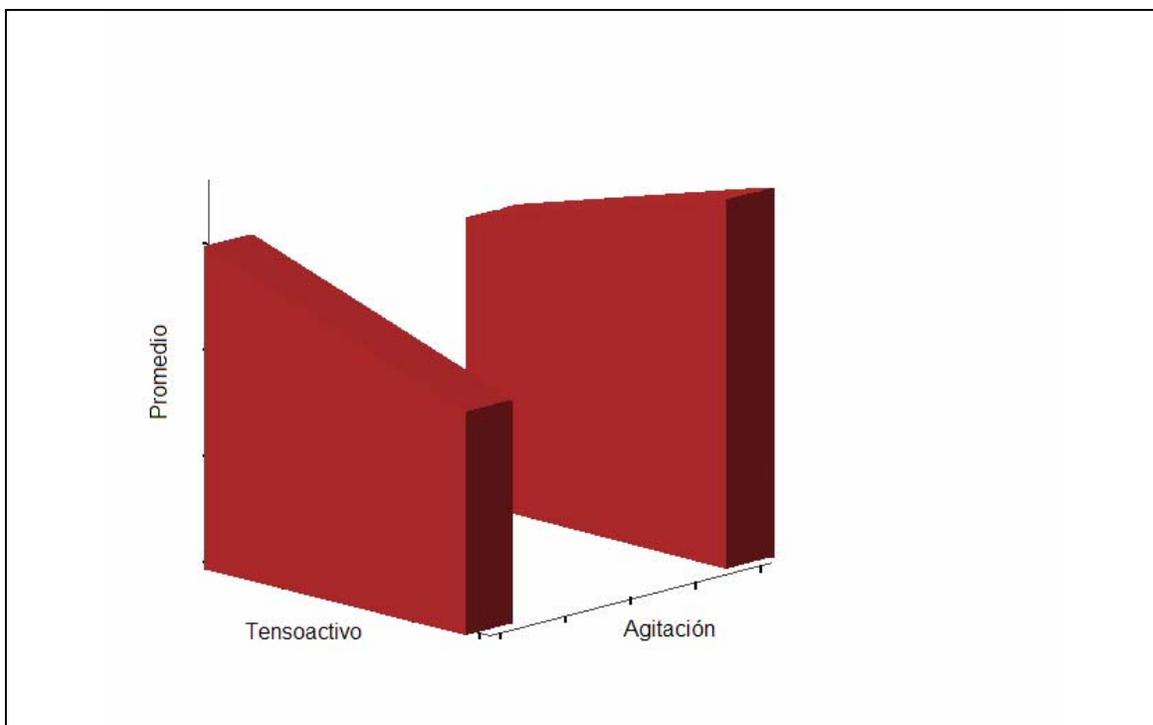


Figura 20: Interacción de la variable concentración de tensoactivo y la variable velocidad de agitación sobre el tamaño promedio de partícula, en el nivel alto y en el nivel bajo.

Otro aspecto importante a considerar es la correlación entre variables, ya que si hay correlaciones altas entre las variables, podríamos haber descartado variables por explicar respuestas proporcionalmente similares, en la siguiente tabla se muestra el análisis de correlación realizado:

Tabla 5: Correlación entre las variables empleadas en la producción de nanopartículas de polietilenoacrilato (primera parte).

Correlación entre variables					
	pH	Agitación (rpm)	Concentración de monómero ($\mu\text{L}/10\text{mL}$)	Concentración de tensoactivo (%)	Tamaño Promedio (nm)
pH	1	7.49E-17	9.14E-18	-1.71E-17	-
Agitación (rpm)	7.49E-17	1	1.77E-17	-1.23E-17	0.15735496
Concentración de monómero ($\mu\text{L}/10\text{mL}$)	9.14E-18	1.77E-17	1	-9.25E-19	-
Concentración de tensoactivo (%)	-1.71E-17	-1.23E-17	-9.25E-19	1	0.19876325
Tamaño Promedio (nm)	0.54642291	0.15735496	-0.16416382	0.19876325	1

A continuación se muestran los resultados de la tabla de manera esquemática

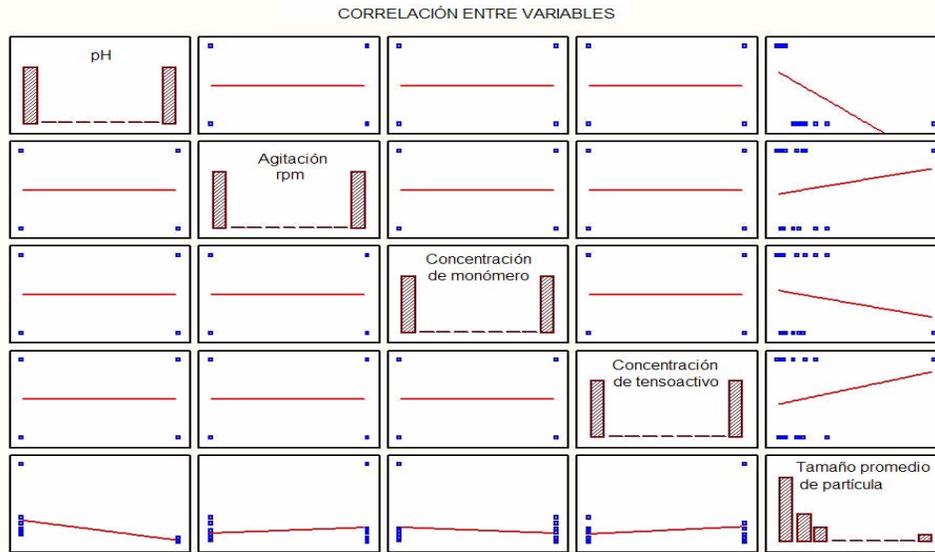


Figura 21: Correlación gráfica de las variables estudiadas. VAR1: pH, VAR2: agitación (rpm), VAR3: Concentración de monómero ($\mu\text{L}/10\text{mL}$), VAR4: Concentración de tensoactivo (%), VAR5: Tamaño promedio de partícula (nm).

Para la producción óptima de nanopartículas de etilcianoacrilato con una distribución de tamaño de partícula debajo de 100 nm, se encontró que el pH y la concentración de tensoactivo eran las variables que más correlación tenían con el tamaño de nanopartícula.

1.2 Resultados del diseño experimental empleado para la producción de nanopartículas de polietilcianoacrilato (segunda etapa).

Al realizarse la primera etapa de experimentación para la producción de nanopartículas de polietilcianoacrilato se determinó que las variables que más influían sobre el tamaño promedio de partícula eran el pH y la concentración de tensoactivo. Lo anterior conduce a la realización de una segunda etapa de experimentos para el refinamiento de los niveles de las dos variables que más influyen en la variable de respuesta. A continuación se muestra la matriz del diseño experimental y los resultados promedio obtenidos.

Tabla 6: Resultados del diseño experimental de la producción de nanopartículas de polietilcianoacrilato (segunda etapa).

Corrida Número	pH	Velocidad de agitación (rpm)	Concentración de Monómero ($\mu\text{L}/10\text{mL}$)	Concentración de tensoactivo (% w/v)	Tamaño promedio de nanopartícula (nm)
1	1.61	1000	100	5	104.60
2	1.61	1000	100	7	85.10
3	1.93	1000	100	5	70.50
4	1.93	1000	100	7	64.45
5	2.78	1000	100	5	42.78
6	2.78	1000	100	7	84.80
7	3.06	1000	100	5	54.33
8	3.06	1000	100	7	73.90

La forma de determinar la zona de la respuesta óptima se realizó en este trabajo por medio del método de superficie de respuesta. Y se realiza graficando dos de las variables versus una respuesta, generándose un gráfico en tres dimensiones fácilmente interpretable.

La elección de las dos variables que se utilizarán para construir una superficie de respuesta puede ser difícil. Muchas veces se pueden escoger las dos variables más importantes o aquellas dos que más se desea estudiar.

Una vez que se corrieron los experimentos de este diseño para optimizar las variables principales, se procedió a construir la superficie de respuesta para ver la zona donde se encontraban las respuestas mínimas de tamaño de partícula promedio.

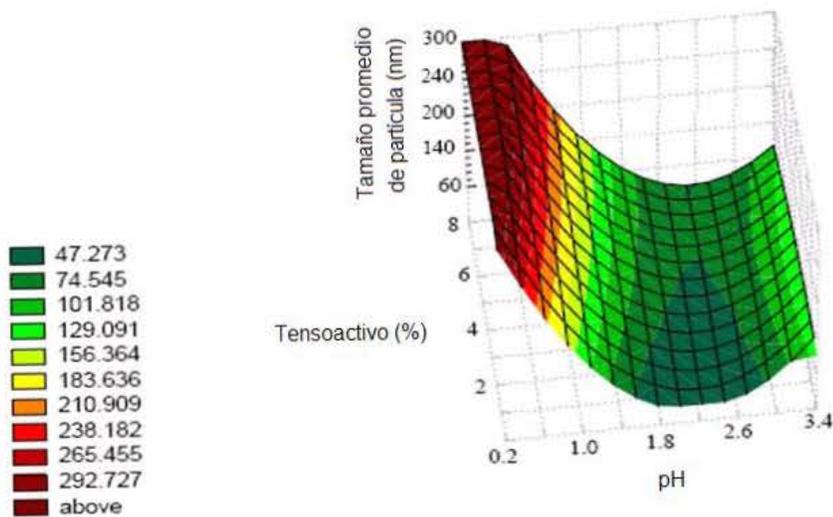


Figura 22: Superficie de respuesta de los datos resultantes del diseño de experimentos de la segunda etapa. pH y concentración de tensoactivo vs Tamaño promedio de partícula.

Se obtuvieron los valores óptimos de pH y de concentración de tensoactivo para sintetizar nanopartículas de etilcianoacrilato por debajo de 100 nm. El conjunto total de valores para pH y concentración del tensoactivo obtenidos en el estudio de optimización para producir nanopartículas de tamaño inferior a 100nm, se presenta en las tablas 5 y 7, demostrando que los valores óptimos para el pH están entre 2.0 y 2.8, mientras que la concentración óptima del tensoactivo se encuentra entre 3 y 5 (% de w/v).

1.3 Efecto de la concentración micelar crítica y el tipo de tensoactivo.

Los resultados demuestran que no se requiere tensoactivo para dar inicio a la formación de nanopartículas.

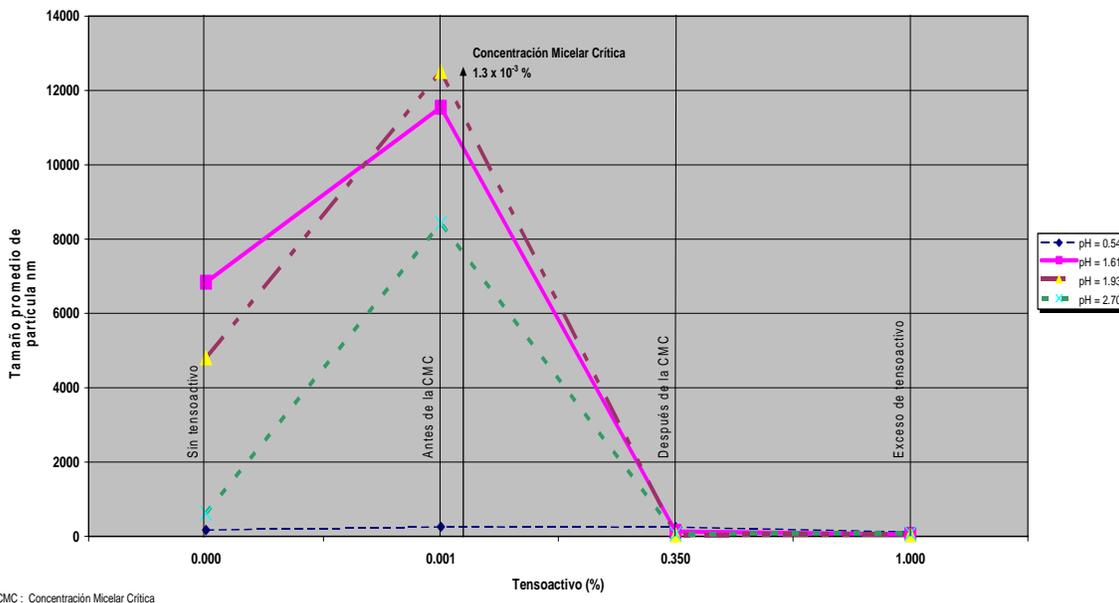


Figura 23: Efecto de la concentración del tensioactivo antes y después de la Concentración Micelar Crítica (CMC).

La influencia de la estructura química del tensioactivo en la distribución de tamaño de las nanopartículas de polietilenoacrilato también fue estudiada, usando como tensioactivos Pluronic F68, F127 de la marca SIGMA ALDRICH, PVA y PVP.

Las estructuras químicas de los tensioactivos utilizados se presentan a continuación:

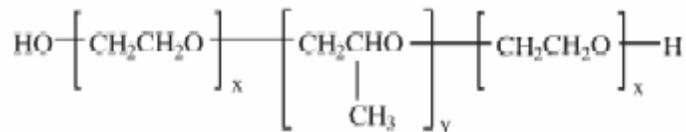


Figura 24: Estructura química de Pluronic cuando es Pluronic F68 tiene de x 152.73 y de y 28.97 en promedio y cuando es Pluronic F127 tiene de x 200.45 y de y 65.17 en promedio.

La estructura del PVA es :

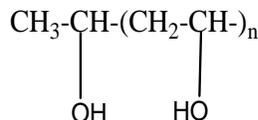


Figura 25: Estructura química de Polivinilalcohol (PVA).

La del PVP:

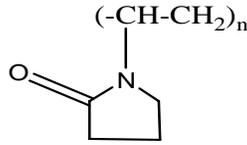


Figura 26: Estructura química de la Polivinilpirrolidona (PVP)

El promedio de tamaño de las nanopartículas y la desviación estándar obtenidas son similares para todos los tensoactivos cuando el pH es muy bajo (es decir para tasas de síntesis lentas). Para valores de pH más grandes (tasas de síntesis más rápidas) aparecen grandes diferencias. Se obtienen los valores de promedio y desviación estándar más grande cuando se utiliza PVP. Los valores más pequeños se obtienen cuando se usa PVA.

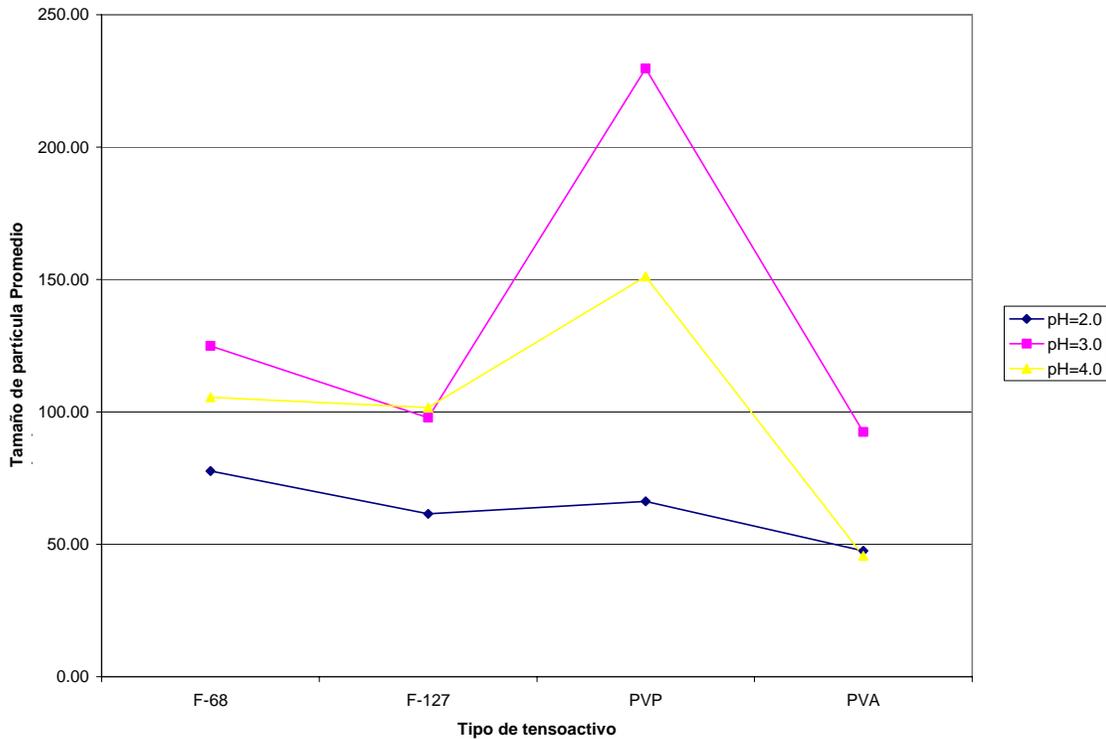
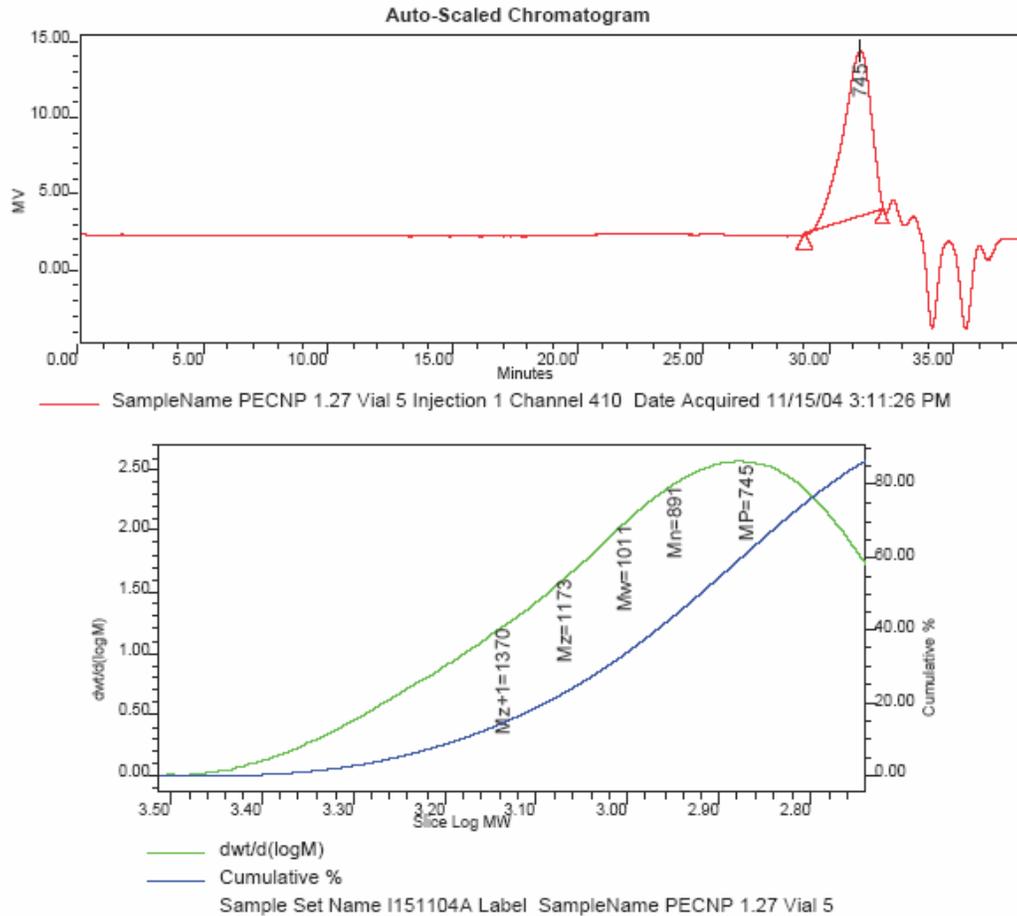


Figura 27: Efecto del tipo de tensoactivo y del pH sobre el tamaño promedio de partícula.

2 CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOCARILATO.

2.1 Peso Molecular de las unidades poliméricas.

Para pH=2.4 el peso molecular obtenido (Mw) es 1108Da, para pH=1.27 es 1011Da. Estos valores son del orden de sistemas similares en la literatura. Por ejemplo, Behan y colaboradoresⁱ, reportaron para pH=2.0 y 2.5 pesos moleculares (Mw) alrededor de 1000Da y Katti y Krishnamurtiⁱⁱ reportaron pesos moleculares (Mw) de 617Da a pH=3.0. De esto concluimos que nuestras nanopartículas de etilcianoacrilato están formadas por cadenas del oligómeros.



GPC Results

	SampleName	Label	Mn	Mw	MP	Mz	Mz+1	Mv	Polydispersity	MW Marker 1
1	PECNP 1.27		891	1011	745	1173	1370		1.134772	

Figura 28: Resultados de la evaluación de peso molecular de polietilcianoacrilato a pH 1.27 por medio de la técnica de permeación en gel.

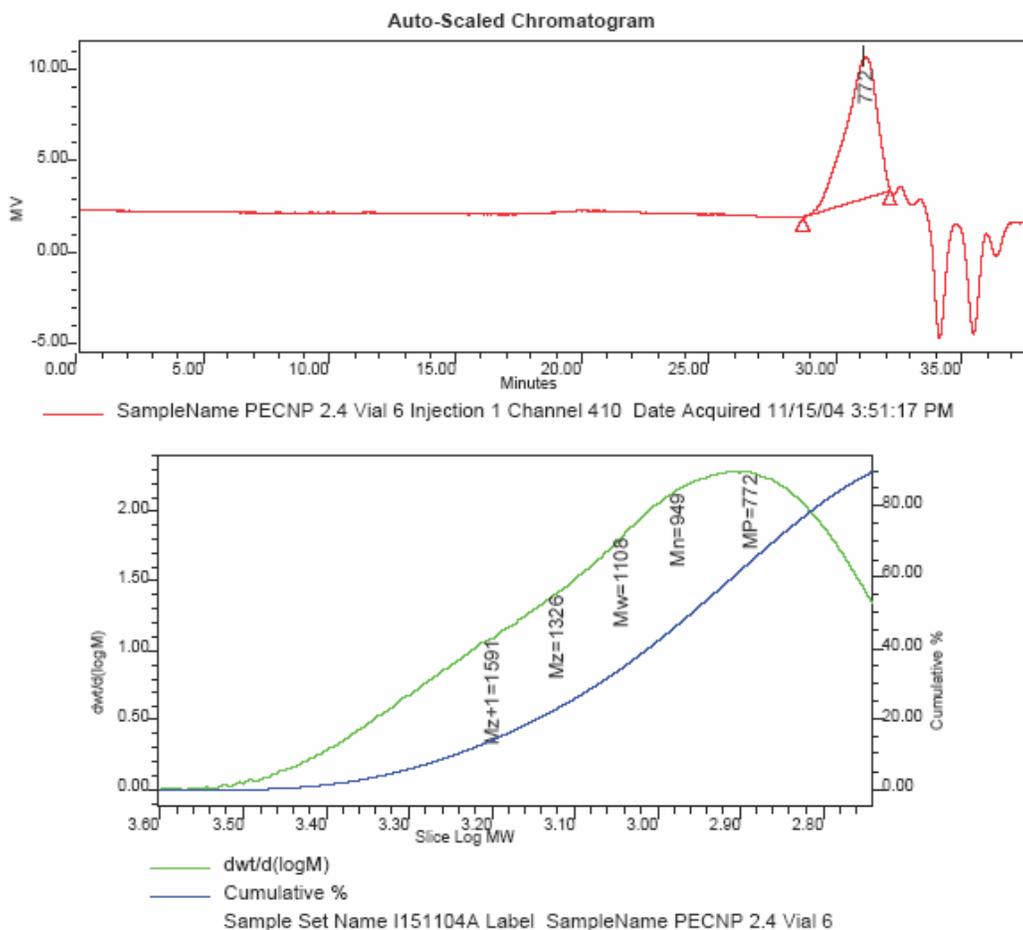


Figura 29: Resultados de la evaluación de peso molecular de polietilcianoacrilato a pH 2.4 por medio de la técnica de permeación en gel.

2.2 Microscopía de Barrido Electrónico (SEM) (morfología).

Las imágenes de SEM de las Nanopartículas de etilcianoacrilato producidas bajo estas condiciones pueden verse como esferas que se aglomeran fácilmente (Figura 31). El ancho de la foto en la Figura 31 es equivalente a una micra. Una característica interesante de estas preparaciones es que para los sistemas

producidos a concentraciones más bajas del iones hidroxilo ($\text{pH}=1.27$) el grado de aglomeración es alto y conduce a la formación de películas, éste no es el caso para $\text{pH}=2.4$. Creemos que esto puede ser una consecuencia directa del monómero residual presente en el sistema. Datos similares fueron reportados por Behan y colaboradores.

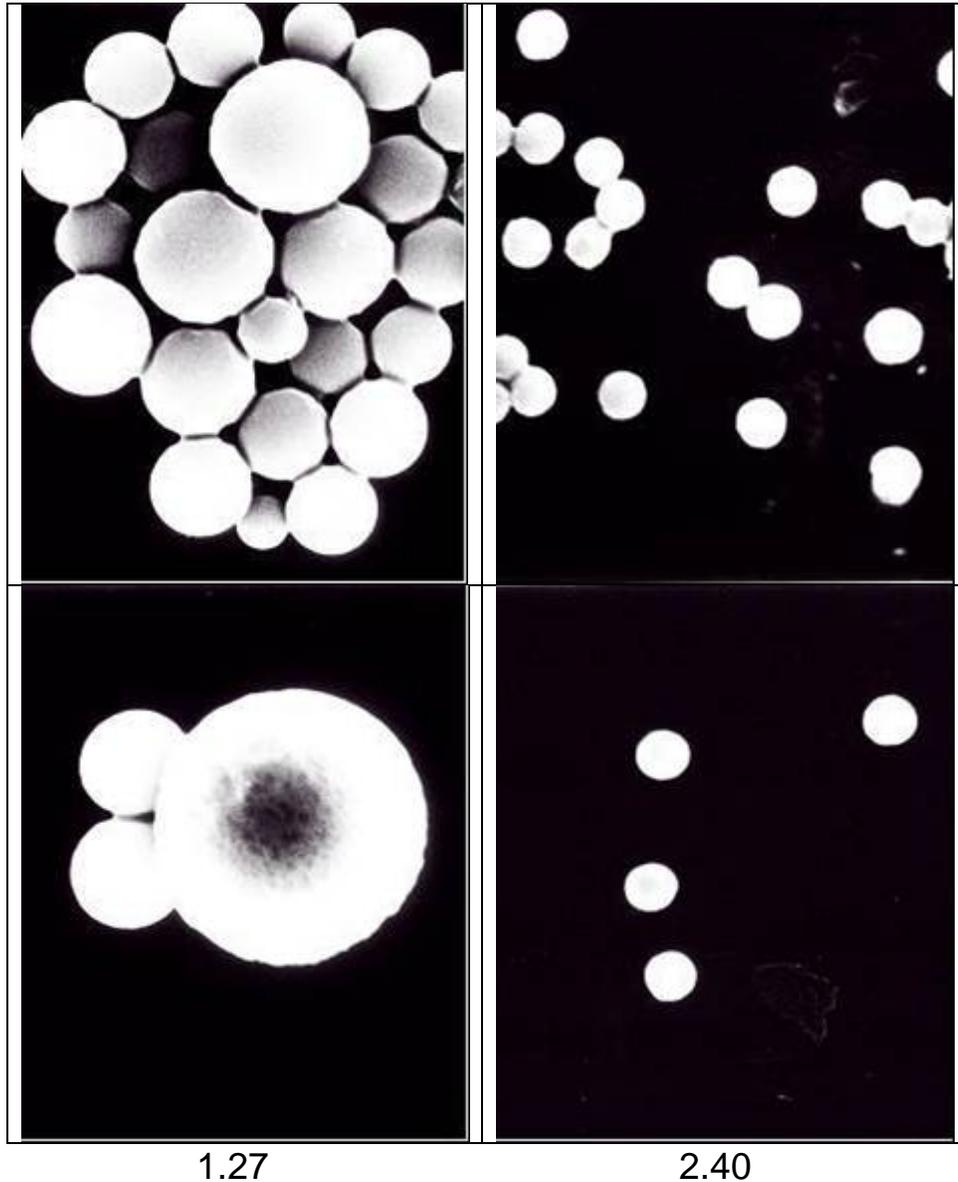


Figura 30: Micrografías de las nanopartículas de polietilcianoacrilato formadas a pH 1.27 y 2.40. El ancho de la micrografía es equivalente a 1 μm .

2.3 Resonancia Magnética Nuclear.

Se encontraron los espectros esperados, más algunos picos que corresponde a los enlace dobles característicos del monómero aún presente en el sistema a pH=1.27, este no es el caso para pH=2.4. Nuestros resultados concuerdan completamente con la literatura.

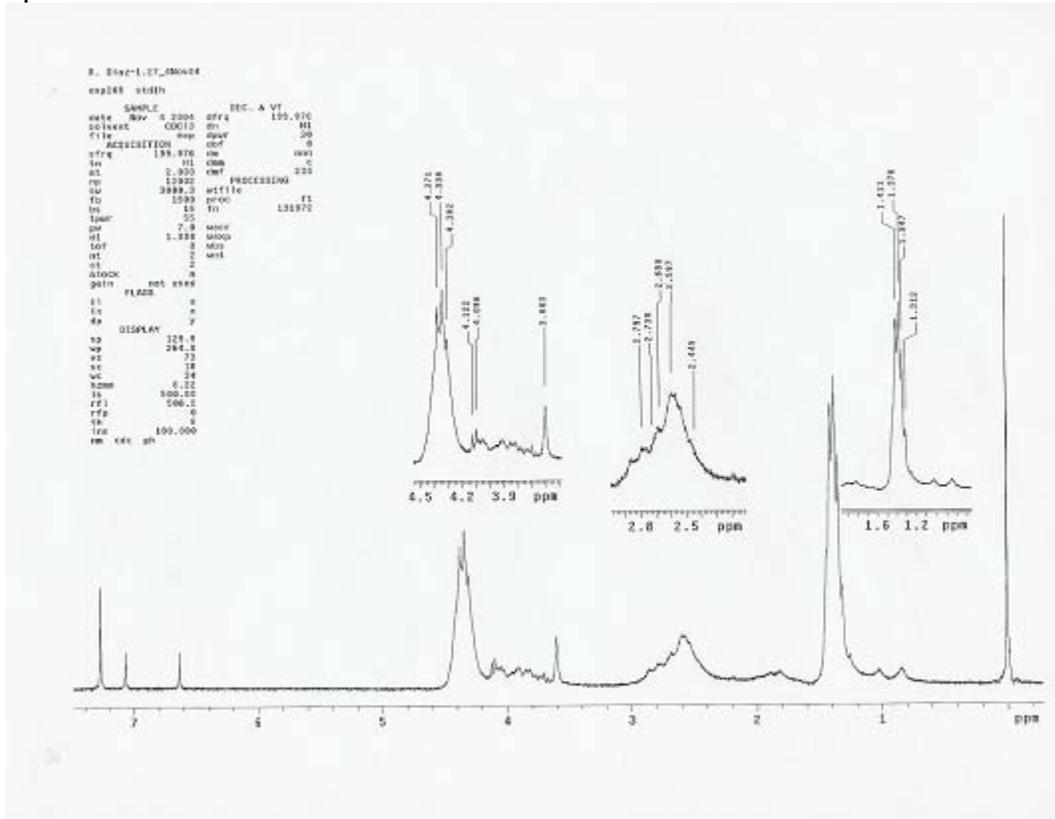


Figura 31: Resultados de RMN H de las nanopartículas de polietilcianoacrilato a pH 1.27.

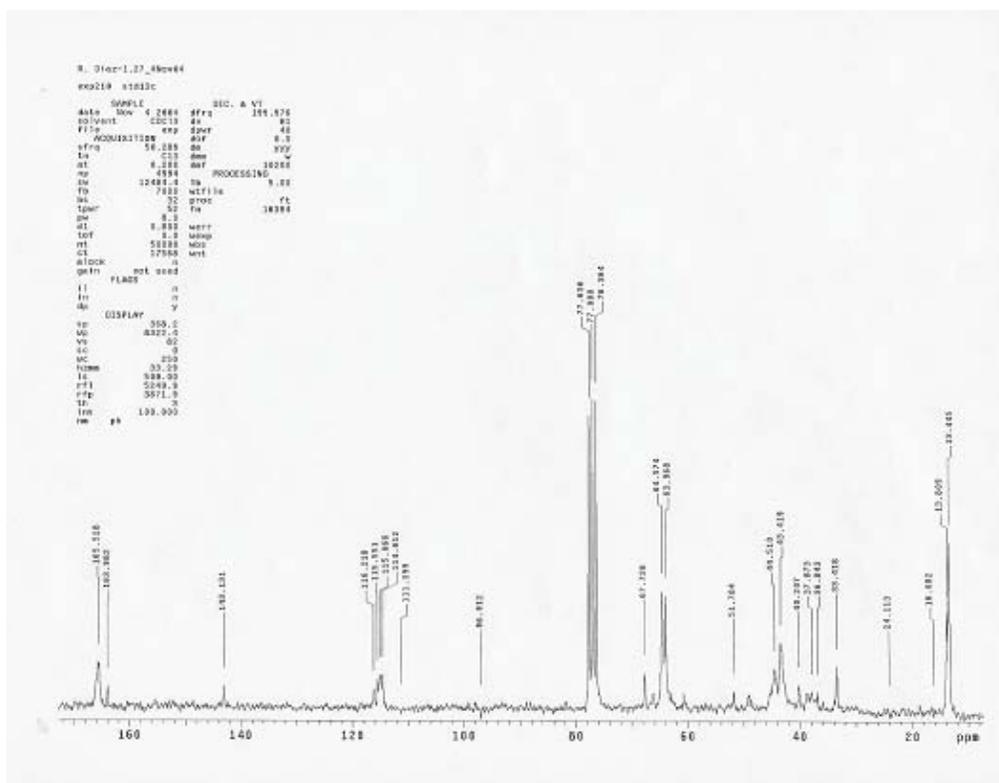


Figura 32: Resultados de RMN C de las nanopartículas de polietilcianoacrilato a pH 1.27.

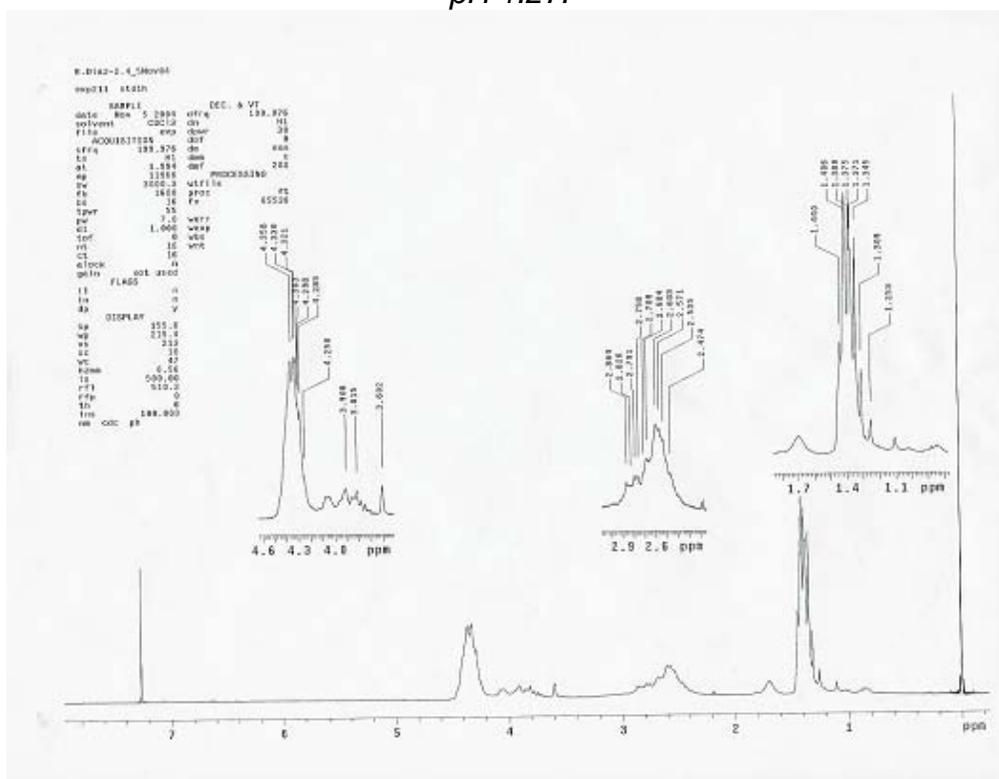


Figura 33: Resultados de RMN H de las nanopartículas de polietilcianoacrilato a pH 2.40.

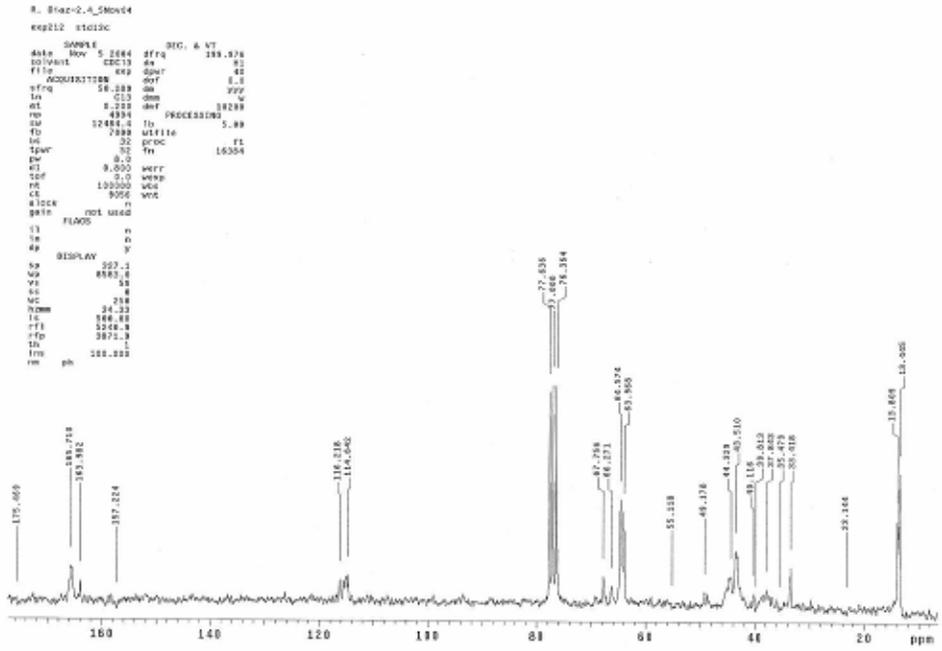


Figura 34: Resultados de RMN C de las nanopartículas de polietilcianoacrilato a pH 2.40.

3 EL MODELO Y SU COMPARACIÓN CON DATOS EXPERIMENTALES

3.1 Comparación del Modelo Teórico contra los datos experimentales de la cinética de formación de nanopartículas de polietilcianoacrilato.

Los resultados experimentales, se encuentran en el rango de la ley de Lambert-Beer, la cinética de formación de las nanopartículas de etilcianoacrilato se muestran en la figura 36. No se observa crecimiento de nanopartículas después de 3 horas debido a la agregación de las partículas primarias, por lo que se concluye que se ha alcanzado un estado estacionario. El equilibrio que ocurre entre los fenómenos de nucleación y descomposición en la dinámica de clusters es altamente dependiente de la temperatura. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente.

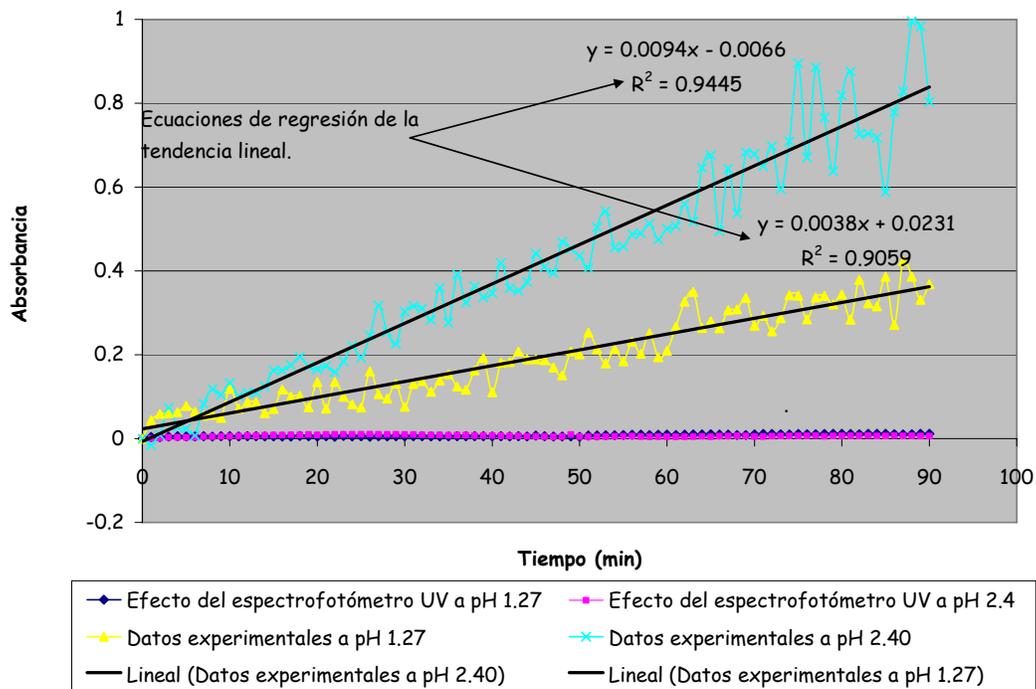


Figura 35: Gráfica de resultados de cinética de formación de nanopartículas de polietilcianoacrilato.

3.2 El modelo de formación de nanopartículas de polietilcianoacrilato.

La síntesis de nanopartículas que este trabajo ocupa puede ser considerada como un sistema complejo y presenta un patrón oscilante dentro de un conjunto particular de condiciones experimentales. En particular el pH es un parámetro fundamental en la reacción de polimerización del etilcianoacrilato como ya se ha explicado en este trabajo. Las oscilaciones, usualmente consideradas como ruido (ruido blanco), se modelan en este trabajo por medio de un modelo multi-escala donde el Brusselator explica las variaciones locales los cuales están dados por los procesos de disolución del monómero, polimerización aniónica y dinámica no lineal de clusters. Como ejemplo, esta idea ha sido usada anteriormente en la búsqueda de canales neuronales abiertosⁱⁱⁱ. Es bien sabido que el Brusselator describe oscilaciones; en este trabajo se muestra como, a través de un análisis multi-escala desarrollado en esta sección, esto también puede ser utilizado para tratar los datos experimentales aún si presentan una tendencia ascendente o descendente, como se muestra en la figura 37.

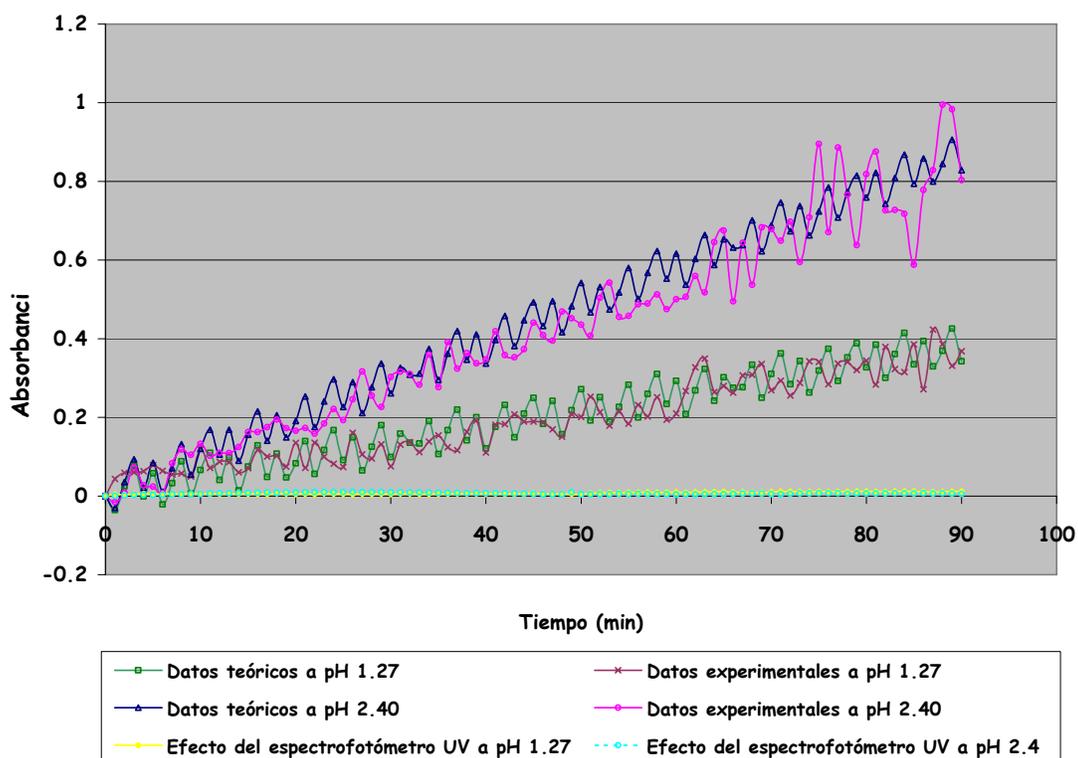


Figura 36: Datos resultantes del modelo teórico vs datos experimentales.

La naturaleza presenta un amplio rango de escalas temporales. Por ejemplo, la vibración atómica que conlleva a la elevación del ruido térmico sucede en una escala de tiempo de femtosegundos (10^{-15} s), y los procesos de interés de nuestra vida diaria frecuentemente se llevan a cabo en el orden de segundos o más allá, dejando muchísimo espacio para que eventos raros causados por ruido térmico se hagan presentes. Las reacciones químicas, la nucleación y los cambios conformacionales de biomoléculas son ejemplos de eventos raros. El cálculo exacto de fenómenos multi-escala presenta un reto debido al amplio rango de las escalas de longitud de las soluciones. Resolver dinámicas de pequeña-escala ha sido un cuello de botella en ciencias de la computación. En este trabajo se presenta un intento exitoso aplicado a la síntesis de nanopartículas de etilcianoacrilato.

En este modelo introdujimos dos escalas temporales: una escala de “tiempo grande” la cual explica la tendencia global, que esencialmente es una tendencia lineal resultado del efecto combinado de la cinética total (consumo de monómero y producción de nanopartículas) y el balance de materia; y una escala de “tiempo pequeña” que incluye un patrón oscilante e involucra la presencia de eventos raros, que es una parte fundamental de este modelo. Es bien sabido, que el método de elección para el entendimiento cuantitativo de eventos raros puede ser un método de acción mínima, aún en el caso de sistemas sin

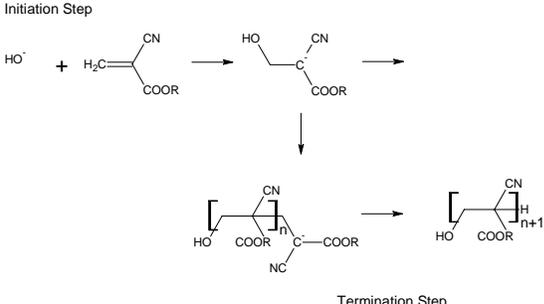
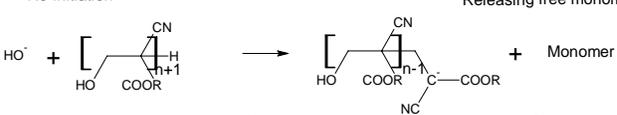
gradiente como lo es el Brusselator. En este trabajo elegimos una ruta alternativa.

Los datos experimentales mostrados en la figura 36 claramente incluyen un patrón oscilante en una escala de “tiempo pequeña” la cual es parte esencial del modelo. Se propone un modelo tipo Brusselator para esta escala la cual representa claramente el conjunto total de eventos raros que queremos incluir en el modelo. En una escala de “tiempo grande” (por ejemplo la tendencia global de los datos en periodos de tiempo largos) se observa una cinética lineal estándar. La aproximación multi-escala que proponemos se puede entender fácilmente de la siguiente manera. El número total de absorbancias experimentales fue dividido (en este trabajo se trabajaron hasta 90 datos) en un número determinado de conjuntos (en este trabajo fueron 22 conjuntos). Se considera a cada conjunto como un objeto simple sin estructura interna y se estudia la dinámica que siguen los conjuntos; esto es el llamado análisis de escala de “tiempo grande”. En la siguiente etapa, con algunas restricciones son estudiados los datos dentro de cada conjunto usando una dinámica tipo Brusselator (conectadas con el análisis de escala de “tiempo grande”); esta es llamada análisis de escala de “tiempo pequeña”. Yendo más a fondo, esto es equivalente a magnificar una escala local con un microscopio llamado Brusselator.

El estudio general del crecimiento de nanopartículas involucra el seguimiento de la cinética durante el progreso de la polimerización, la difusión de las moléculas y de los clusters, y la dinámica cluster-cluster (nucleación y descomposición). Las partículas sobreviven de la competencia por el crecimiento rápido pero algunos clusters pequeños por debajo de un valor de tamaño crítico se descomponen a clusters más pequeños o aún a monómeros debido a la depolimerización así como a la dinámica de clusters. La cinética de formación de nanopartículas de etilcianoacrilato, es controlada por la polimerización, la depolimerización, la re-polimerización y la dinámica cluster-cluster.

El mecanismo utilizado para explicar la formación de nanopartículas de etilcianoacrilato de un tamaño apropiado propuesto en este trabajo, consta de cuatro etapas paralelas; ver tabla 8. Primeramente, el monómero adicionado al sistema forma grandes gotas, llamadas M , estas gotas se disuelven en el seno de la mezcla de reacción a una tasa dada por la constante cinética K_a produciendo moléculas de monómero y de oligómero disueltas en la solución y también se producen gotas muy pequeñas, a estas especies monómero, oligómeros de peso molecular muy pequeño y a las gotas pequeñas se les llamará X en este modelo.

Tabla 7: Etapas propuestas para la formación de nanopartículas de polietilcianoacrilato.

ETAPA	PROCESO
1) $M \xrightarrow{K_a} X$	DISOLUCIÓN DE LAS GOTAS.
2) $OH^- + X \xrightarrow{K_b} Y + C1$	<p>Initiation Step</p>  <p>Termination Step</p> <p>POLIMERIZACIÓN ANIÓNICA.</p>
3) $2X + Y \xrightarrow{K_c} 3X$	<p>Re-initiation</p>  <p>De-polymerization. Releasing free monomer</p> <p>DE-POLIMERIZACIÓN, RE-POLIMERIZACIÓN Y DISOLUCIÓN DE CLUSTERS PEQUEÑOS.</p>
4) $X \xrightarrow{K_d} C2$	AGREGACIÓN.
$M + OH^- \rightarrow C1 + C2$	PROCESO GLOBAL.

En la segunda etapa, el monómero polimeriza a una tasa K_b . Esta es la constante cinética global del proceso de polimerización que incluye las etapas de iniciación, propagación y terminación. Se producen en esta etapa clusters estables así como pequeños clusters inestables, los cuales son denominados **C1** y **Y**, respectivamente. La polimerización sigue un mecanismo aniónico ya que es iniciada en presencia de iones hidroxilo que toma el papel de iniciador nucleofílico, llevando a la reacción a la formación de nanopartículas de etilcianoacrilato **C1** las cuales son clusters estables. Cada nanopartícula producida por polimerización directa esta muy probablemente en una sola fase, es esférica y compuesta de muchos oligómeros. El monómero de etilcianoacrilato y el polímero están en un rápido equilibrio dinámico. Los clusters

Y los cuales no alcanzan un tamaño crítico son partículas inestables formadas por oligómeros de muy bajo peso molecular susceptibles a la de-polimerización. En la tercera etapa, se propone una dinámica cluster-cluster genérica, junto con una re-polimerización y de-polimerización. Se llevan a cabo transformaciones entre los mismos clusters inestables. Esta etapa es considerada altamente no trivial y es controlada por la constante cinética global K_c . Similarmente a todos los polialquilcianoacrilatos, el polietilcianoacrilato es inherentemente inestable, todos ellos tienen un decremento drástico en su peso molecular cuando se encuentran en solución^{iv}. Se ha sugerido que el final de la cadena del polímero se de-protona, dando lugar a la rápida de-polimerización de la cadena polimérica, seguida por una re-polimerización simultánea de los monómeros liberados. El alto peso molecular inicial desaparece en el curso de unas pocas horas en solución y es remplazado por un material de peso molecular mucho más bajo. Para polímeros sintetizados por polimerización aniónica, la muestra se degrada totalmente. Sorprendentemente la degradación en el peso molecular ocurre también en el estado sólido. Este efecto ha sido claramente observado aún a temperatura ambiente^v.

Finalmente, las especies X (llámese monómero disuelto, gotas pequeñas, oligómeros de bajo peso molecular) se agregan para crear la estructura meta-estable $C2$ a una tasa dada por K_d . Esta estructura compuesta por las especies X tiene muchas fases que se mantienen juntas por fuerzas débiles. En este trabajo las llamamos impurezas debido a su alta histotoxicidad. $C2$ puede formar películas. El porcentaje de impurezas en la muestra se estima con la siguiente relación $\frac{K_d}{K_b}$. Este valor se ve afectado por el pH. Todas las constantes K_a , K_b ,

K_c , K_d , pertenecen a la cinética oscilante (Brusselator) y pueden ser calculados del mejor ajuste a los datos experimentales disponibles y usando el modelo presentado aquí. Procederemos ahora a dar detalles adicionales del modelo. Consideramos que M , X , Y , $C1$ y $C2$ contribuyen a la absorbancia y usamos el análisis multi-escala para desacoplar la absorbancia experimental total (A) como a continuación se muestra. Primero, es fácil darse cuenta que en una escala de "tiempo grande", M , $C1$ y $C2$ contribuyen a la absorbancia lineal y monótonamente. M decrece; mientras $C1$ y $C2$ aumentan en un tiempo dado. Este ciertamente no es el caso para X y Y ; pues su evolución en el tiempo es oscilante. Entonces, el comportamiento oscilante de los datos experimentales en la escala de "tiempo pequeña" mostrados en la figura 36 es debido a la dinámica de X y Y exclusivamente; por lo tanto el valor oscilante de la absorbancia se considera proporcional al valor total de los intermediarios de reacción (X y Y). Las contribuciones de M , $C1$ y $C2$ a la absorbancia (A) van a ser considerados como comportamientos de "tiempo grande" y calculados de los experimentos. Del modelo, se obtienen las ecuaciones diferenciales que describen la evolución de los componentes inestables X y Y del sistema.

$$\begin{aligned}\frac{dX}{dt} &= K_a M - K_b X(OH^-) + K_c X^2 Y - K_d X \\ \frac{dY}{dt} &= K_b X(OH^-) - K_c X^2 Y\end{aligned}\tag{1}$$

En la ecuación (5), X , Y , M y OH^- son las concentraciones de las correspondientes sustancias químicas.

El sistema de ecuaciones (tabla 8) recuerda al Brusselator (donde M y OH^- permanecen constantes) el cual describe las reacciones oscilantes. En el caso experimental que aquí se trata, OH^- se fija a un valor constante, pero este nos es el caso para M , al menos en la escala de “tiempo grande”. El análisis multi-escala se realiza y M se considera constante solamente para la escala de “tiempo pequeña”. Solamente se aplica un balance de materia al monómero y a las estructuras poliméricas, en la fase que sea que estas presenten, y nos lleva a una ecuación algebraica la cual es absorbida en la cinética global con la escala de “tiempo grande”.

El análisis multi-escala que se presenta en este trabajo produce la siguiente aproximación numérica: En la escala de “tiempo pequeño” definimos una ventana de tiempo como el conjunto de valores (tiempo y absorbancia) donde M es considerada constante (y calculada de la dinámica de “tiempo grande”. Este método utiliza las ideas de ventana de refinamiento utilizada en la literatura anteriormente^{vi}. Por supuesto, en esta aproximación numérica la solución exacta esta dada estableciendo a M como constante para cada punto (t, A) , pero esto es inútil en nuestro esquema multi-escala pues no podríamos trabajarlo por ventanas de refinamiento. En contraste, si una ventana de tiempo es definida por demasiados pares (t, A) , esto sería una muy cruda aproximación a la realidad. La siguiente aproximación práctica se lleva a cabo en este trabajo; definimos una ventana de tiempo usando un conjunto de cinco puntos consecutivos (t, A) . En otras palabras, para cinco tiempos consecutivos, medimos los datos experimentales (o calculados de nuestro modelo teórico) de la absorbancia de nuestro sistema y se estudia su evolución, considerando M como constante, usando una dinámica tipo Brusselator. En cada ventana, la constante M es la inicial de un conjunto particular de valores (t, A) y la cinética experimental global de la escala de tiempo grande, sigue la siguiente ecuación:

$$-\frac{dM}{dt} = K\tag{2}$$

K se obtiene del mejor ajuste lineal de los datos experimentales como se muestra en la figura 36. Se necesitan veintidós ventanas de tiempo para describir todos los resultados experimentales y teóricos. Para garantizar la continuidad, el último par (t, A) de una ventana de tiempo es el primer par de la siguiente. Nuestra aproximación numérica esta inspirada por el método de elemento finito multi-escala^{vii} donde las condiciones de frontera de la función base multi-escala, están establecidas con el fin de resolver las ecuaciones diferenciales localmente.

Entonces procedemos como sigue. Partimos los datos teóricos en conjuntos llamados ventanas, donde se asume un comportamiento local tipo Brusselator, empezando del tiempo inicial hasta 4 minutos, de 4 a 8 minutos, de 8 a 12 minutos, hasta 90 minutos. Estos resultados vienen de la solución numérica del Brusselator para un conjunto particular de constantes cinéticas dentro de cada grupo, y por lo tanto es de naturaleza local, y esta dado por la ecuación (5). La tendencia global es considerada como una restricción a la tendencia local; esto es, tomamos la tasa de descomposición del monómero como constante como se muestra en la ecuación (6). Se calcula un valor particular para la concentración del monómero y se mantiene constante como una restricción en la dinámica local no lineal.

Segundo, se parten los datos experimentales precisamente en la misma forma como se hizo con los datos teóricos, es decir en ventanas de cinco mediciones de absorbancia consecutivamente (del inicial a 4 minutos, de 4 a 8 minutos y así sucesivamente hasta 90 minutos).

Finalmente estamos listos para comparar dentro de cada ventana los datos teóricos y experimentales; ver figura 33 y 34 para pH 1.27 y 2.40, respectivamente. La mejor comparación se lleva acabo por medio de las derivadas debido a que nos da el punto de vista global y no por ventanas. Actualmente el comportamiento en la escala de "tiempo pequeña" depende estrictamente solo de las derivadas, ya que la tendencia en la escala de "tiempo grande" es tomada en cuenta solamente como una restricción externa apropiada (o cinética global) sobre la primera. Esto es equivalente a desacoplar las dos escalas de tiempo. El patrón oscilante es claro sobre todo para valores de tiempo grandes. Al principio del proceso (al menos los primeros 20 minutos) se observa un valor suave de casi cero en la derivada de la absorbancia con respecto al tiempo.

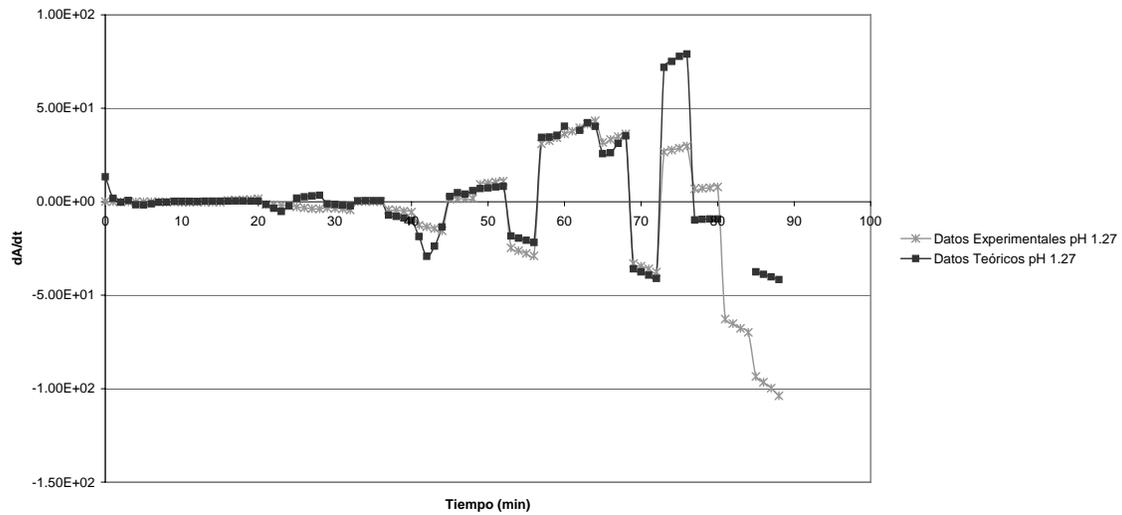


Figura 37: Comparación de los datos teóricos vs experimentales de la derivada de la absorbancia con respecto al tiempo pH 1.27.

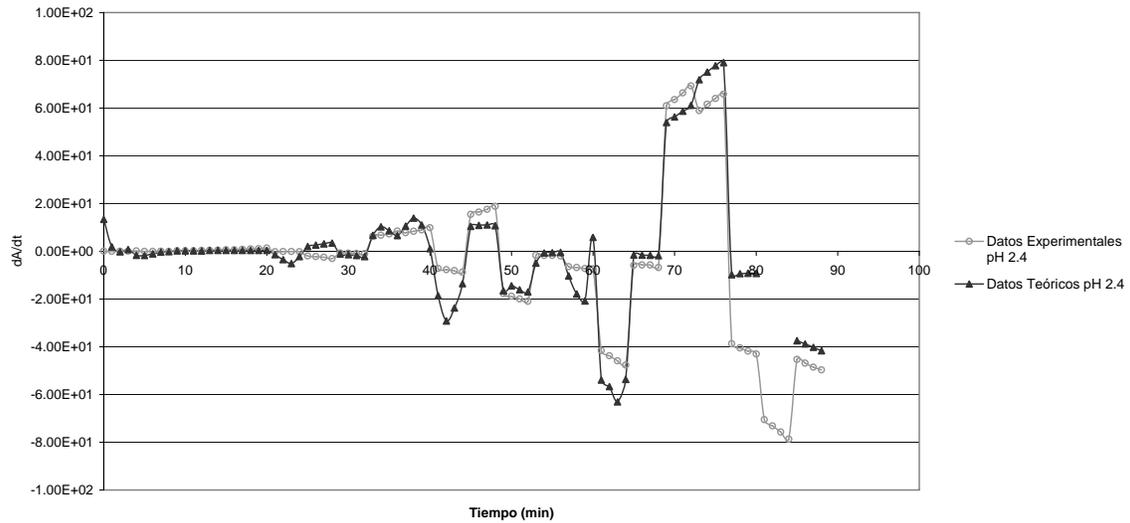


Figura 38: Comparación de los datos teóricos vs experimentales de la derivada de la absorbancia con respecto al tiempo pH 2.40.

Recuerde que el mejor conjunto de variables cinéticas (K_a , K_b , K_c y K_d) se prueba dentro de cada ventana independientemente, así, a menos que se use el modelo correcto, estos conjuntos de datos se espera que sean diferentes a través de intervalo de tiempo total.

3.3 Análisis de resultados del modelado de la formación de nanopartículas de polietilcianoacrilato.

Hasta donde sabemos, nuestro modelo es el primero en tomar en cuenta todos los datos experimentales documentados de sistemas similares. El monómero de etilcianoacrilato se disuelve y entonces el monómero y el polímero están en un equilibrio rápido y dinámico. El análisis del tamaño de partícula *in situ* indica que a través de la síntesis hay una transferencia de material de las grandes gotas de monómero a las nanopartículas más pequeñas, y se cree que es dentro de las nanopartículas, con su área superficial grande, que ocurre el proceso de crecimiento^{viii}. A valores de pH por arriba de 3.0, la reacción es muy rápida, y es aparente que el sitio de reacción principal son las gotas de monómero muy pequeñas. Durante la síntesis, la concentración del monómero es muy alta, esta es una condición que favorece la producción de cadenas relativamente largas^{ix}. La terminación aniónica del polímero se protona debido al ambiente ácido al final de la reacción de polimerización, formando una especie en estado latente. Para clusters que no alcanzan el tamaño crítico para ser estables, las terminaciones de cadenas de especies latentes se de-protonan, reactivando la de-polimerización y la dinámica de clusters. El monómero y los oligómeros de muy bajo peso molecular que se generan durante este proceso, se adicionan a los nucleófilos presentes, formando nuevas cadenas. Debido a que la concentración del monómero en el nuevo equilibrio es mucho más baja que durante la polimerización, las nuevas cadenas formadas tienen un peso molecular drásticamente más bajo. Estas cadenas pueden quedar atrapadas dentro de la matriz de las nanopartículas estables produciendo una aglomeración que tiende a formar películas. El proceso de secado fuerza a las partículas a estar muy juntas y también drena los monómeros de la matriz del polímero hacia la superficie donde puede polimerizar posteriormente.

Para ajustar todos nuestros datos experimentales, se pueden necesitar muchos conjuntos diferentes de constantes K_a , K_b , K_c , K_d . Un hecho digno de mención es que para validar nuestro modelo basta con usar el mismo conjunto de constantes cinéticas para explicar casi todos los datos experimentales, especialmente para tiempos iniciales y valores de pH bajos (ver figura 36). Después de 75 minutos, se presentan oscilaciones importantes, las cuales no son predichas por el modelo. En esta tesis todo el trabajo numérico se realizó utilizando MAPLE 8.0.

Para el pH de 1.27 se obtiene: $\frac{K_d}{K_b} \approx 0.017 \pm 0.004$. Para el pH de 2.40 se obtiene:

$\frac{K_d}{K_b} \approx 0.0012 \pm 0.0005$. Estos datos se obtienen del mejor ajuste del modelo multi-

escala y de los datos experimentales presentados en este trabajo. De esto concluimos que el porcentaje de impurezas producidas de la síntesis de las nanopartículas de etilcianoacrilato es aproximadamente del 1.7% para el pH de

1.27 y de 0.12% para el pH de 2.40. Estos nuevos cálculos sobre las impurezas obtenidas durante la síntesis de nanopartículas de etilcianoacrilato son de un interés potencial en la evaluación del daño en tejido causado por su uso como acarreadores de fármaco en cualquier órgano humano.

En general, se concluye de manera categórica que la polimerización es una reacción muy rápida con una constante cinética grande K_b , la cual se incrementa con el pH, como es de esperarse. Nosotros podemos ver también que $K_c \approx K_d$ para ambos pHs 1.27 y 2.40. Hay un patrón muy claro: $K_b > K_a > K_c \approx K_d$, $K_a \approx 10K_c$ para ambos pH 1.27 y 2.40. De lo anterior, sabemos que la disolución del monómero es una reacción relativamente rápida comparada con la de-polimerización, la re-polimerización y la dinámica de clusters que produce las impurezas.

Es importante puntualizar que el análisis efectuado en este trabajo permite la validación de este modelo multi-escala (al menos a tiempos iniciales) para la síntesis de nanopartículas de etilcianoacrilato. Esto es, dado que se utilizan en el modelo el mismo juego de constantes K_a , K_b , K_c , K_d para obtener la mejor aproximación a los datos experimentales, al menos para tiempos iniciales. Una conclusión muy importante de este trabajo es que, para la síntesis de nanopartículas de etilcianoacrilato (40-100nm), la separación de escalas y la micro-estructura oscilante se ajusta a los datos experimentales; esta separación de escalas no aparece fácilmente en la naturaleza. Todas las etapas de nuestro modelo se necesitan con el fin de entender el patrón oscilante (escala de “tiempo pequeña”) y la tendencia global (escala de “tiempo grande”) producidas por los experimentos.

4 TRANSPORTE EN PIEL.

4.1 Evaluación del efecto de cada factor involucrado en las determinaciones del transporte de nanopartículas de polietilcianoacrilato a través de estrato córneo.

Cada factor fue evaluado para determinar si interfería en la señal dada por las nanopartículas de polietilcianoacrilato o no. Se realizaron lecturas de la cinta, cinta con piel y cinta con piel y nanopartículas.

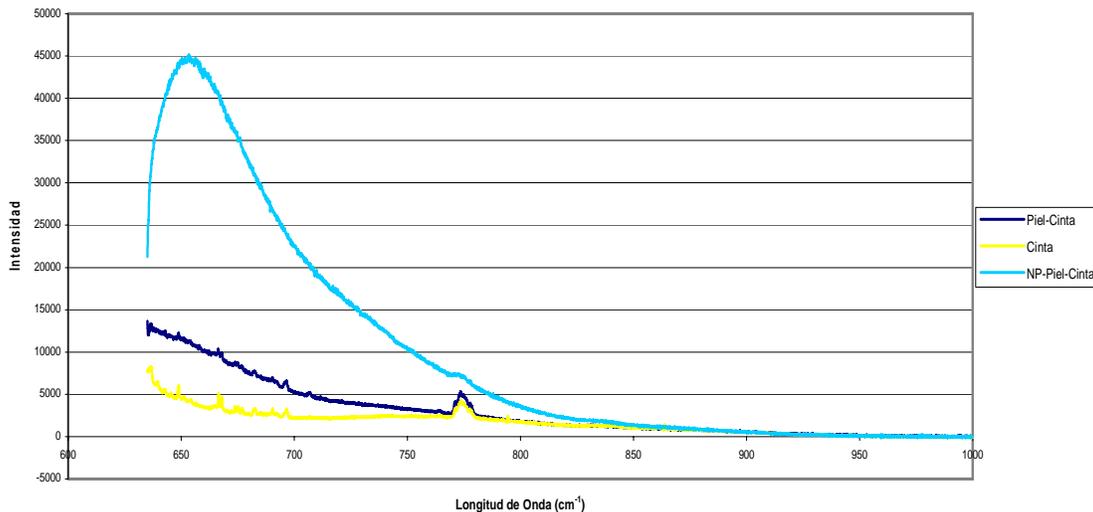


Figura 39: Efecto de la cinta adhesiva, de la cinta adhesiva con piel y de la cinta adhesiva con piel y nanopartículas sobre la respuesta de microfotoluminiscencia.

Las mediciones fueron realizadas a temperatura ambiente en un sistema micro Raman marca Dilor, modelo Labram, el cual cuenta con un láser de He-Ne que emite a 632.8 nm. La luz fue enfocada sobre la superficie de la muestra con un objetivo de 50 X que permitió reducir el diámetro del haz láser a 2 micras. El equipo cuenta con un sistema óptico que permite observar en una pantalla la región de la muestra a analizar. Con esta posibilidad, se tuvo cuidado de estudiar regiones de piel similares en cada capa. Esto es, regiones con una apariencia óptica similar en cuanto a tamaño y espesor. La señal obtenida fue separada en sus componentes espectrales mediante una rejilla de difracción de 1200 líneas/mm y analizada con la ayuda de un detector tipo CCD termoeléctricamente enfriado. En algunos casos la luminiscencia fue tan intensa que hubo necesidad de usar filtros de densidad neutra para evitar la saturación del detector.

4.2 Resultados de la evaluación de las nanopartículas de polietilcianoacrilato a través de piel.

Las evaluaciones a cada tiempo de aplicación de las nanopartículas de polietilcianoacrilato se realizaron por triplicado y los resultados presentados son resultados promedio.

La siguiente es la matriz de experimentos realizados en este proyecto y los resultados obtenidos:

Tabla 8: Resultados del seguimiento de las nanopartículas de polietilcianoacrilato a través del estrato corneo a diferentes tiempos de aplicación. Respuesta de microfotoluminiscencia (intensidad) versus cintas retiradas a diferentes tiempos de aplicación.

		Tiempo de Aplicación de las nanopartículas (h)			
		0.5h	1h	2h	3h
Cintas retiradas (Número de capas)	1	34766	9447.33333	33738.75	37513
	2	59836.33333	8023	20354.25	29250.6667
	3	31742	12859.33333	28788.75	22750.6667
	4	17148	23460	19072.25	53961.5
	5	17558.33333	21573.5		46255.3333
	6	20511	14023.33333	32863.6667	19565.5
	7	34698.33333	28498	30496	35457
	8	33864.6667	24324.6667	38249.6667	51627
	9	14877.6667	53760	27050.25	18421
	10	7660.5	59256.6667	51733.6667	16791.3333
	11	14844.5	20272	52370.25	14005.5
	12	17228.33333	21837.6667	51525.3333	21456.3333
	13	12365.5	31309	22978	12550.6667
	14	11935	13760.75	27980.75	18696
	15	7011.25	22122.3333	18761	18193.3333

La siguiente es la gráfica resultante en la que se pone de manifiesto que la distribución de las nanopartículas de polietilcianoacrilato, no es de forma lineal.

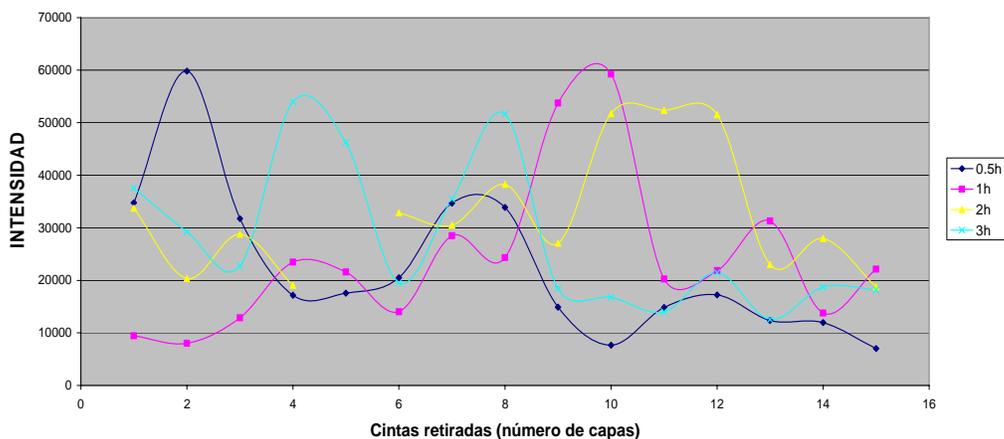


Figura 40: Distribución de las nanopartículas en el estrato corneo a diferentes tiempos. Gráfica de cintas retiradas de la zona de aplicación versus respuesta de microfotoluminiscencia (intensidad) a diferentes tiempos.

La dispersión de los datos en la cinta 5 para el tiempo 2h fue tan grande que se decidió no reportar dicho dato.

4.3 Evaluación de la linealidad del método de Evaluación de las nanopartículas de polietilcianoacrilato a través de piel.

Una vez que evaluamos las nanopartículas a diferentes tiempos de aplicación y a diferentes profundidades surgió la pregunta de que tan adecuados eran los datos. La correlación entre la intensidad y la concentración de las nanopartículas en las cintas se evaluaron para estar seguros que los datos de intensidad correspondían a cantidades de nanopartículas.

Se colocaron cintas adhesivas de las mismas dimensiones que aquellas usadas en el estudio de difusión de nanopartículas a través de piel (5X3 cm). Se prepararon suspensiones de nanopartículas de polietilcianoacrilato. Se colocó una gota a cada cinta y se espero a que seicara totalmente la suspensión en la cinta adhesiva. Las determinaciones mediante microfotoluminiscencia se realizan de la misma manera que aquellas realizadas a las muestras resultantes de la técnica de "Tape Stripping"

La siguiente gráfica muestra los resultados de dicho estudio:

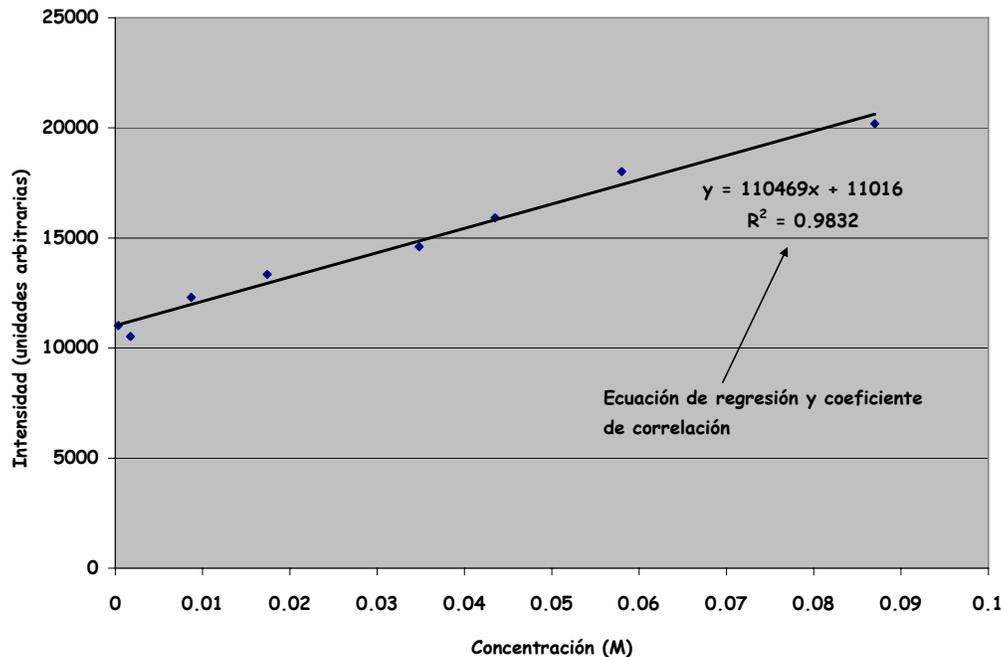


Figura 41: Gráfica de la concentración versus respuesta de microfotoluminiscencia (intensidad) para evaluar linealidad de la intensidad versus concentración.

La respuesta (intensidad) del método de microfotoluminiscencia tiene una correlación lineal con la concentración, por lo que podemos estar seguros que

las respuestas obtenidas en el estudio de difusión de las nanopartículas en piel evaluada mediante la técnica de "Tape Stripping" y cuantificadas mediante microfotoluminiscencia, corresponden que a mayor concentración de nanopartículas la intensidad de la respuesta es mayor linealmente.

REFERENCIAS

- ⁱ Behan, N., Birkinshaw, C., Clarke, N., (2002) *Biomaterials* **22**: 1335
- ⁱⁱ Katti, D., Krishnamurti, N., (1999) *J. Appl. Polym. Sci.* **74** :336
- ⁱⁱⁱ Buchholtz, F., Schinor, N., Schneider, F. W. (2002) *J. Phys. Chem. B* **106**:5086
- ^{iv} Ryan, B., McCan, G. (1996) *Macromol. Rapad Commun.* **17**:217
- ^v Behan, N., Birkinshaw C. (2000) *Macromol. Rapad Commun.* **21**:884
- ^{vi} Dayantis, J., Palierne J. F. (1991) *J. Chem. Phys.* **95**: 6088
- ^{vii} Hou, T. Y., Wu, X. H., Cai, Z. (1999) *Math. Comput.* **68**:913
- ^{viii} Behan, N., Birkinshaw, C., Clarke, N. (1999) *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **26**:1132
- ^{ix} Robello, D. R., Eldridge, T. D., Swanson, M. T. (1999) *J. Polym. Sci. A.* **37**:4570

CAPÍTULO IV: **CONCLUSIONES**

A continuación se exponen las conclusiones del presente trabajo doctoral:

1.- Se determinaron las variables de proceso y sus niveles óptimos para la elaboración de nanopartículas de polietilcianoacrilato de tamaño inferior a 100nm utilizando un diseño experimental factorial en dos etapas; la primera etapa para conocer las variables que más afectan al tamaño de las nanopartículas de polietilcianoacrilato y la segunda etapa que fue de optimización de las variables que más afectan al tamaño de las nanopartículas. Se determinó que el intervalo óptimo de pH es de 1.6 a 3.0 y el porcentaje de tensoactivo es de 0.5% a 4.0%.

2.- Se evaluó el efecto del tipo de tensoactivo y la concentración micelar crítica sobre el tamaño de las nanopartículas encontrándose que el tensoactivo es un estabilizante que no interviene en la formación pero por arriba de la concentración micelar crítica alcanza un efecto estabilizante máximo y que la estructura del tensoactivo es muy importante para lograr el tamaño de partícula deseado.

3.- Se caracterizaron las nanopartículas obtenidas en cuanto a estructura, forma y peso molecular de los polímeros que las forman. En cuanto a la estructura se demostró la formación de los oligómeros (pH 1.27 y 2.40) y a ciertos pH se encontró la presencia de monómero sin reaccionar (pH 1.27). Se determinó que la geometría de las nanopartículas es esférica y que a ciertos pH tienden a aglomerarse (1.27) debido al monómero remanente. El peso molecular es relativamente bajo lo que nos indica que las nanopartículas se forman de un cúmulo de oligómeros de peso molecular alrededor de 1000 Da, siendo también el peso molecular de los oligómeros dependiente del pH.

4.- El modelo de formación de las nanopartículas es sin duda una aportación importante ya que es la primera vez que se logra proponer un modelo que toma en cuenta los procesos involucrados en la formación de nanopartículas desde un punto de vista cinético. Dichos procesos son la polimerización, la depolimerización y la dinámica de clusters. Se determinaron las constantes cinéticas y se encontró que éstas dependen del tiempo, de ahí su patrón oscilante. La producción total de nanopartículas depende únicamente del pH del medio.

ANEXOS

Tabla de resultados primera serie experimental (datos completos)

Corrida	pH	Agitación (rpm)	Monómero (μL/10mL)	Tensoactivo (% w/v)	Promedio (nm)	Std Dev (nm)
1	0.54	500	20	1	256.80	105.50
1	0.54	500	20	1	240.00	96.50
1	0.54	500	20	1	223.40	72.30
2	0.54	500	20	3	189.60	87.20
2	0.54	500	20	3	167.50	75.00
2	0.54	500	20	3	189.50	70.40
3	0.54	500	200	1	529.10	225.90
3	0.54	500	200	1	519.10	162.70
3	0.54	500	200	1	432.00	153.30
4	0.54	500	200	3	397.90	84.80
4	0.54	500	200	3	400.00	145.40
4	0.54	500	200	3	344.70	107.80
5	0.54	1500	20	1	213.70	88.80
5	0.54	1500	20	1	310.80	145.00
5	0.54	1500	20	1	290.50	129.80
6	0.54	1500	20	3	1736.40	818.70
6	0.54	1500	20	3	1935.60	881.40
6	0.54	1500	20	3	1836.00	850.05
7	0.54	1500	200	1	226.50	61.40
7	0.54	1500	200	1	191.50	49.80
7	0.54	1500	200	1	209.00	55.60
8	0.54	1500	200	3	360.80	127.20
8	0.54	1500	200	3	278.40	85.60
8	0.54	1500	200	3	235.30	32.50
9	2.70	500	20	1	88.50	39.70
9	2.70	500	20	1	91.20	40.50
9	2.70	500	20	1	91.00	40.90
10	2.70	500	20	3	89.50	39.50
10	2.70	500	20	3	90.70	39.50
10	2.70	500	20	3	91.70	40.10
11	2.70	500	200	1	74.20	27.10
11	2.70	500	200	1	76.70	27.10
11	2.70	500	200	1	75.50	26.00

12	2.70	500	200	3	92.70	37.70
12	2.70	500	200	3	89.90	37.50
12	2.70	500	200	3	91.40	37.70
13	2.70	1500	20	1	100.90	42.60
13	2.70	1500	20	1	105.50	45.20
13	2.70	1500	20	1	98.30	41.60
14	2.70	1500	20	3	65.90	24.10
14	2.70	1500	20	3	67.30	24.60
14	2.70	1500	20	3	68.30	24.90
15	2.70	1500	200	1	45.80	8.10
15	2.70	1500	200	1	46.00	10.90
15	2.70	1500	200	1	45.90	12.00
16	2.70	1500	200	3	40.40	13.20
16	2.70	1500	200	3	39.70	14.30
16	2.70	1500	200	3	40.70	10.90

Tabla de resultados segunda serie experimental (datos completos)

Corrida	pH	Tensoactivo (% w/v)	Monómero ($\mu\text{L}/10\text{mL}$)	Agitación (rpm)	Promedio (nm)	STD DEV (nm)
1	1.61	5	200	1500	105.20	29.30
1	1.61	5	200	1500	105.10	30.80
1	1.61	5	200	1500	103.50	15.00
1	1.61	5	200	1500	104.60	25.60
2	1.61	7	200	1500	86.70	22.20
2	1.61	7	200	1500	84.50	19.50
2	1.61	7	200	1500	83.10	21.80
2	1.61	7	200	1500	86.10	20.10
3	1.93	5	200	1500	72.60	18.30
3	1.93	5	200	1500	69.70	2.30
3	1.93	5	200	1500	68.00	15.30
3	1.93	5	200	1500	71.70	8.20
4	1.93	7	200	1500	64.60	7.20
4	1.93	7	200	1500	64.40	12.30
4	1.93	7	200	1500	63.90	9.70
4	1.93	7	200	1500	64.90	11.50
5	2.78	5	200	1500	42.00	17.40

5	2.78	5	200	1500	42.00	16.60
5	2.78	5	200	1500	43.10	16.90
5	2.78	5	200	1500	44.00	17.30
6	2.78	7	200	1500	87.40	34.10
6	2.78	7	200	1500	83.90	30.20
6	2.78	7	200	1500	84.10	30.10
6	2.78	7	200	1500	83.80	30.20
7	3.06	5	200	1500	55.80	22.50
7	3.06	5	200	1500	54.50	21.90
7	3.06	5	200	1500	53.60	21.30
7	3.06	5	200	1500	53.40	21.20
8	3.06	7	200	1500	76.70	31.50
8	3.06	7	200	1500	71.20	29.10
8	3.06	7	200	1500	73.40	29.80
8	3.06	7	200	1500	74.30	31.00

BIBLIOGRAFIA.

- ¹ Stix, G. (2001). *Scientific American*, **285**: 35.
- ¹ Jenkins, A. D.(1998). in *Chemical Nomenclature*, (K. J. Thurlow, ed.) Kluwer Academic Publishers.
- ¹ Sperling, L.H. (1985). *J. Chem Ed.* **62**:1030.
- ¹ Mark, J.E., Allcock, H.R., West, R. (1992). *Inorganic Polymers*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- ¹ Epstein, I.R., Pojman, J.A. (1998). *An Introduction to Non Linear Chemical Dynamics*. New York:Oxford University Press, p. 3-14.
- ¹ Fitch, R.M., Prenosil, M. B., Sprick, K. J. (1966). *Amer. Chem. Soc., Polym. Preprints* **7**:707
- ¹ Fitch, R.M., Prenosil, M. B., Sprick, K. J. (1969). *J. Polymer Sci. C* **27**:95
- ¹ Fitch, R.M., Tsai, C. (1970). *J. Polymer Sci., Polymer Lett.* **8**:703.
- ¹ Fitch, R.M. (1973). *Brit. Polymer J.* **5**:467.
- ¹ Roe, C.P. (1968). *Ind. Eng. Chem.* **60**:20.
- ¹ Robb, I.D. (1969). *J. Polymer Sci., Part A-1* **7**:417.
- ¹ Gardon, J. L. (1977). *Interfacial Synthesis, Vol. 1* (F. Millich and C.E. Carraher, eds.) New York:Marcel Dekker, p. 205.
- ¹ Kreuter, J. (1983). *Pharm. Acta Helv.* **58**:196
- ¹ Berg, U. E., Kreuter, J., Speiser, P.P., Soliva, M. (1986). *Pharm. Ind.* **48**:75
- ¹ Kreuter, J. (1982). *J. Polym. Sci., Polym. Lett.* **20** :543
- ¹ El-Egakey, M.A., Bentele, V., Kreuter J. (1983) *Int. J. Pharm.* **13**:349
- ¹ Bentele, V., Berg, U.E., Kreuter, J. (1983) *Int. J. Pharm.* **13**:109
- ¹ Douglas, S. J., Davis, S.S., Holding, S.R. (1985) *Brit. Polym. J.* **17**:339
- ¹ Vansnick, L., Couvreur, P., Cristianes-Leyh, D., Roland, M. (1985) *Pharm. Res.* **1** :36
- ¹ Douglas, S. J., Illum, L., Davis, S.S. (1985) *J. Colloid Interface Sci.* **103**:154
- ¹ Douglas, S. J., Illum, L., Davis, S.S., Kreuter J. (1984) *J. Colloid Interface Sci.* **101**:149
- ¹ Seijo, B., Fattal, E., Roblot-Treupel, L., Couvreur, P. (1990) *Int. J. Pharm.* **62**:1.
- ¹ Birrenbach, G., Speiser, P.P. (1976) *J. Pharm. Sci.* **65**:1763
- ¹ Ekman, B., Lofter, C., Sjöholm, I. (1976) *Biochem.* **15**:5115.
- ¹ Ekman, B., Sjöholm, I. (1978) *J. Pharm. Sci.* **67**:693.
- ¹ Ljungstedt, I., Ekman, B., Sjöholm, I. (1978) *Biochem. J.* **170**:161.
- ¹ Edman, P., Ekman, B., Sjöholm, I. (1980) *J. Pharm. Sci.* **69**:838.
- ¹ Krause, H. J., Schwarz, A., Rohdewald, P. (1986) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **12**:527
- ¹ Watanabe, A., Higashitsuji, K., Nishizawa, K. (1978) *J. Colloid Interface Sci.* **64**:278
- ¹ Al Khouri Fallouh, N., Roblot-Treupel, L., Fessi, H., Devissaguet, J.P., Puisieux, F. (1986) *Int. J. Pharm.* **28**:125
- ¹ Chouinard, F., Kan, F. W. K., Leroux, J. C., Foucher, C., Lenaerts, V. (1991) *Int. J. Pharm.* **72** : 211.
- ¹ Rollot, J. M., Couvreur, P., Roblot-Treupel, L., Puisieux, F. (1986) *J. Pharm. Sci.* **75** : 361.
- ¹ Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. Ph., Ammoury, N., Benita, S. (1989) *Int. J. Pharm.* **55** : R 1

- ¹ Ammoury, N., Fessi, H., Devissaguet, J. P., Puisieux, F., Benita, S. (1990) *J. Pharm. Sci.* **79** :163
- ¹ Marchal-Heussler, L., Fessi, H., Devissaguet, J. P., Hoffman, M., Maincent, P. (1992) *S.T.P. Pharma Sci.* **2** :98
- ¹ Gurny, R., Peppas, N. A., Harrington, D.D., Banker, G. S. (1981) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **7**:1
- ¹ Bodmeier, R., Chen, H. (1990) *J. Controlled Rel.* **12**:223
- ¹ Kreuter, J. (1983) *Int. J. Pharm.* **14**:43
- ¹ Zimmer, A., Kreuter, J., Robinson, J. R. (1991) *J. Microencapsul.* **8** : 497
- ¹ Kopf, H., Joshi, R. K., Soliva, M., Speiser, P. (1976) *Pharm. Ind.* **38** : 281
- ¹ Magenheimer, B., Benita, S. (1991) *S.T.P. Pharm. Sci.* **1**: 221
- ¹ Hansma, P. K., Tersoff, J. (1987) *Appl. Phys.* **61**: R1
- ¹ Hansma, P. K., Elings, V. B., Marti, O., Bracker, C. E. (1988) *Science* **242**: 209
- ¹ Gedde, U. W. (1990) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **16**: 2465
- ¹ Benoit, J. P., Benita, S., Puisieux, F., Thies, C. (1984) *Microspheres and Drug Therapy* (S. S. Davis, L. Illum, J. G. McVie, and E. Tomlinson, eds.). Amsterdam: Elsevier, p. 91
- ¹ Yalabik-Kas, H. S., Kreuter, J., Hincal, A. A., Speiser, P. P. (1986) *J. Microencapsul.* **3**: 213
- ¹ Kreuter, J. (1983) *Topics in Pharmaceutical Sciences* (D. D. Breimer and P. Speiser, eds). Amsterdam: Elsevier, p. 359
- ¹ Bissery, M. C., Puisieux, F., Thies, C. (1983) *Proc. 3rd Int. Confer. Pharm. Technol.*, Paris, **3** : 233
- ¹ Harmia, T., Speiser, P., Kreuter, J. (1986) *J. Microencapsul.* **3** : 3
- ¹ Wilkins, D. J., Myers, P. A. (1966) *Brit. J. Exp. Pathol.* **47**: 568
- ¹ Tröster, S. D., Kreuter, J. (1988) *Int. J. Pharm.* **45**:91
- ¹ Carstensen, H., Müller, B. W., Müller, R. H. (1991) *Int. J. Pharm.* **67**: 29
- ¹ Müller, R. H., Wallis, K. H., Tröster, S. D., Kreuter, J. (1992) *J. Controlled Rel.* **20**:237
- ¹ Tröster, S. D., Wallis, K. H., Müller, R. H., Kreuter, J. (1992) *J. Controlled Rel.* **20**:247
- ¹ Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., Rudzinski, W. E. (2001) *J. Contr. Rel.* **70**:1
- ¹ Müller, R.H., Lherm, C., Herbort, J., Blunk, T., Couvreur, P. (1992) *Int. J. Pharm* **84**:1
- ¹ Coover, H. N., et al (1959) *J. Plast. Surg. Engl.* **15** :5
- ¹ Matsumoto, T., et al (1968) *Aron Alpha a Sanyo Am. Surg.* **24**:263
- ¹ Park, D-H, Kim, B-S, Ahn, K-D, Kim, E-Y, Kim, Y-J, Han, D. K. (2003) *J. Appl. Polym. Sci.* **89**:3272
- ¹ Harkins, W. D. (1947) *J. Am. Chem. Soc.* **69**:1428
- ¹ Prigogine, I., Lefever, R. (1968) *J. Chem. Phys.* **48**: 1695
- ¹ Tyson, J. (1973) *J. Chem. Phys.* **58**: 3919
- ¹ Schork, F. J., Ray, W. H. (1987) *J. Appl. Polym. Sci.* **34**: 1259
- ¹ Pannatier, A., Jenner, P., Testa, B., Etter, J.C., (1978) *Drug Metab. Rev.* **8**:319
- ¹ Neville, A.M. (1994) *Am. Physiol. Soc.* 2870
- ¹ Lavker, R.M., Sun, T., (1982) *Science* **215**: 1239

- ¹ Cross, S.E., Roberts, M.S. (1993) *J. Pharm. Pharmacol.* **45**:606
- ¹ Suba, A., Rockson, S.G. (1997) *Vasc. Med.* **2**:321
- ¹ Cameli, N., Picardo, M., Perrin, C. (1994) *Br. J. Dermatol.* **130**:583
- ¹ Roberts, M.S., Walter, M. (1993) *Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement*. New York.: Marcel Dekker, pp 1-30
- ¹ Vavosour, I., Kitson, N., Mackay, A. (1998) *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **3**:101
- ¹ Gniadecka, M., Nielsen, O.F., Christensen, D.H., Wulf, H.C. (1998) *J. Invest. Dermatol.* **110**:393
- ¹ Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Salomons-de Vries, van der Spek, J.A., Bras, W. (1992) *Int. J. Pharm.* **84** : 205
- ¹ van Hal, D.A., Jeremiasse, E., Junginger, H.E., Spies, F., Bouwstra, J.A. (1996) *J. Invest. Dermatol.* **106**:89
- ¹ Menon, G.K., Elias, P.M. (1997) *Skin Pharmacol.* **10**:235
- ¹ Hou S.Y.E., Mitra, A.K., White, S.H., Menon, G.K., Ghadially, R., Elias, P.M. (1991) *J. Invest. Dermatol.* **96**:215
- ¹ Suponen, T.M., Bouwstra, J.A., Urti, A. (1999) *J. Controlled Release* **59**:149
- ¹ Malkinson, F.D., Ferguson, E.H. (1955) *J. Invest. Dermatol.* **25**:281
- ¹ Vickers, C.F.H. (1963) *Arch. Dermatol.* **88**:20
- ¹ Munro, D.D. (1969) *Br. J. Dermatol.* **81(suplemento 4)**: 92
- ¹ Dupuis, D., Rougier, A., Roguet, R., Lotte, C., Kalopissis, G. (1984) *J. Invest. Dermatol.* **82** :353
- ¹ Dupuis, D., Rougier, A., Roguet, R., Lotte, C. (1986) *Br. J. Dermatol.* **115** :233
- ¹ Rougier, A., Lotte, C., Dupuis, D. (1987) *J. Soc. Cosmet. Chem.* **38** :397
- ¹ Rougier, A., Lotte, C., Maibach, H.I. (1987) *J. Invest. Dermatol.* **88** :577
- ¹ Rougier, A., Rallis, M., Krien, P., Lotte, C. (1990) *Arch. Dermatol. Res.* **282**:498
- ¹ Lakowicz J.R., (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York: Plenum Press
- ¹ Schulman S., *Molecular Luminescence Spectroscopy*, Ed. New York: Wiley, Part 1, (1985), Part 2, (1988), Part 3, (1993)
- ¹ Pitsillides, C.M., Joe, E.K., Wei, X.B., Anderson, R.R., Lin, CP., (2003) *Biophysical Journal*, **84**: 4023
- ¹ Marsal, L., Besombes, L., Tinjod, F., Kheng, K., Wasiela, A., Gilles, B., Rouviere, J.L., Mariette, H., (2002) *Journal of Applied Physics*, **91**: 4936
- ¹ Haberland, H., (1994) *Clusters of atoms and Molecules I*, Ed. Springer-Verlag, 1^a ed, pag 1-12
- ¹ Qi, J.F., Mao, C.B., White, J.M., Belcher, A.M. (2003) *Physical Review B* **68** (12): art. no.-125319
- ¹ Tachibana, K., Someya, T., Ishida, S., Arakawa, Y. (2000) *Applied Physics Letters* **76**:3212
- ¹ Samuelson, L., Carlsson, N., Castrillo, P., Gustafsson, A., Hessman, D., Lindahl, J., Montelius, L., Petersson, A., Pistol, M.E., Seifert, W. (1995) *Japanese Journal of Applied Physics part 1-Regular Papers short notes and Review Papers* **34**:4392
- ¹ Valenta, J., Linnros, J., Juhasz, R., Rehspringer, J.L., Huber, F., Hirlimann, C., Cheylan, S., Elliman, R.G. (2003) *Journal of Applied Physycs* **93**:4471

- ¹ Demangeot, F., Gleize, J., Frandon, J., Renucci, M.A., Kuball, M., Peyrade, D., Manin-Ferlazzo, L., Chen, Y., Grandjean, N. (2002) *Journal of Applied Physics* **91**: 6520
- ¹ Liu, Y.X., Liu, Y.C., Shen, D.Z., Zhong, G.Z., Fan, X.W., Kong, X.G., Mu, R., Henderson, D.O. (2002) *Solid State communications* **121**: 531
- ¹ Marsal, L., Besombes, L., Tinjod, F., Kheng, K., Wasiela, A., Gilles, B., Rouviere, J.L., Mariette, H. (2002) *Journal of Applied Physics* **91**:4936
- ¹ Jahn, U., Notzel, R., Hey, R., Grahn, H.T., Ploog, K.H. (2000) *Japanese Journal of Applied Physics part 1-Regular Papers short notes and Review Papers* **39**:4512
- ¹ Voliotis, V., Bellessa, J., Grousson, R., Wang, X.L., Ogura, M., Matsuhata, H. (1998) *Solid-State Electronics* **42**:1217
- ¹ Zhao, H., Moehl, S., Wachter, S., Kalt, H. (2002) *Applied Physics Letters* **80**:1391
- ¹ Gustafsson, A., Pistol, M.E., Montelius, L., Samuelson, L. (1998) *Journal of Applied Physics* **84**:1715
- ¹ Heiras, J., Pichardo, E., Mahmood, A., Lopez, T., Perez-Salas, R., Siqueiros, J.M., Blanco, O., Castellanos, M. (2002) *Journal of Physics and Chemistry of solids* **63**:591
- ¹ Buzaneva, E., Gorchinsky, A., Popova, G., Veblaya, T., Zankovych, S., Boiko, Y., Zolotarev, P., Pogorelov, V., Bukalo, V., Benilov, A., Lazarouk, S., Beyliss, S., Starovoitov, A., Senkevich, A. (2000) *Materials Science in Semiconductor processing* **3**:529
- ¹ Behan, N., Birkinshaw, C., Clarke, N., (2002) *Biomaterials* **22**: 1335
- ¹ Katti, D., Krishnamurti, N., (1999) *J. Appl. Polym. Sci.* **74** :336
- ¹ Buchholtz, F., Schinor, N., Schneider, F. W. (2002) *J. Phys. Chem. B* **106**:5086
- ¹ Ryan, B., McCan, G. (1996) *Macromol. Rapid Commun.* **17**:217
- ¹ Behan, N., Birkinshaw C. (2000) *Macromol. Rapid Commun.* **21**:884
- ¹ Dayantis, J., Palierne J. F. (1991) *J. Chem. Phys.* **95**: 6088
- ¹ Hou, T. Y., Wu, X. H., Cai, Z. (1999) *Math. Comput.* **68**:913
- ¹ Behan, N., Birkinshaw, C., Clarke, N. (1999) *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **26**:1132
- ¹ Robello, D. R., Eldridge, T. D., Swanson, M. T. (1999) *J. Polym. Sci. A.* **37**:4570