



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

“PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE POLIURETANO: OPTIMIZACIÓN MEDIANTE DISEÑO EXPERIMENTAL DE TAGUCHI”

Tesis

Para obtener el grado de:

Licenciada en Física

Presenta:

P.L.F. Mónica Mayté Vásquez Alfaro

Dirigida por:

Dra. Lerma Hanaiy Chan Chan

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2016

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

“Si he logrado ver más lejos, ha sido
porque he subido **a hombros de gigantes**”

(Bernard de Chartres)

DEDICATORIAS

Gracias a todos aquellos amigos y maestros que me acompañaron en esta carrera de resistencia. Gracias por todas las palabras de aliento, abrazos reconfortantes, pláticas inspiradoras y por hacer más divertido el recorrido.

Pero en especial quiero agradecer a mis padres, María Teresa Alfaro Cázarez y Tomás Vásquez Palacios, por su apoyo incondicional, su confianza en mi capacidad, y sobre todo por su amor, ternura y comprensión. Los amo. También quiero agradecer a mi hermano Daniel por su apoyo y ánimos para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi asesora de tesis, Dra. Lerma Hanaiy Chan Chan, por darme la oportunidad de trabajar con ella y brindarme tantísimo apoyo para concluir este trabajo. Por animarme cuando sentía que iba muy atrasada y por enseñarme a trabajar con su ejemplo.

A mi comité revisor, Dr. Amir Maldonado, Irlanda Lagarda y Elisa martinez, por sus consejos y aportaciones a la tesis.

Al Consejo Nacional de ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo mediante el proyecto cátedras CONACyT No. 2266.

A la División de ciencias exactas y naturales (DCEN) de la universidad de Sonora por la beca de ayudantía 2016-1.

Gracias a la Dra. María Elisa Martínez Barbosa por su colaboración en el diseño del método experimental y la preparación de las nanopartículas, así como las facilidades brindadas en el laboratorio de nanomateriales del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora.

Se agradece al grupo de materia condensada blanda del departamento de física de la Universidad de Sonora, por facilitar el uso de Dispersión de Luz (BI-200SM). En especial al Dr. Heriberto Acuña Campa por su asesoría y apoyo con el uso del equipo.

Gracias a la I.Q Rossana F. Vargas Coronado por su apoyo técnico en la obtención de las micrografías por microscopía electrónica de barrido.

ÍNDICE

Índice.....	i
Lista de figuras.....	iv
Lista de tablas.....	vii
Resumen.....	viii
Introducción.....	ix
Objetivos.....	xi
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Nanomateriales.....	2
1.1.1 Nanopartículas de polímeros.....	3
1.1.1.1 Poliuretanos segmentados.....	4
1.1.1.2 Preparación por nanoprecipitación.....	6
1.2 Surfactantes.....	6
1.3 Diseño y análisis experimental.....	7
1.3.1 Pautas generales para diseñar experimentos.....	8
1.3.2 Ejemplo de diseños experimentales.....	10
1.3.2.1 Diseño factorial.....	10
1.3.2.2 Diseño y análisis de Taguchi.....	10
1.4 Análisis estadístico ANOVA.....	11

1.5 Técnicas de caracterización de nanopartículas de poliuretano.....	12
1.5.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	12
1.5.2 Dispersión dinámica de luz (DLS).....	13
1.5.2.1 Dispersión de luz por una molécula pequeña.....	14
1.5.2.. Fluctuaciones y dispersión.....	16
1.5.2.. Dispersión de luz por cuerpos grande.....	19
1.4.3.4 Aspectos instrumentales y analíticos.....	21
1.4.3.4.1 Función de autocorrelación.....	21
1.3.4.3.2 Distribución de polidispersidad.....	24
1.5.3 Liofilización.....	
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA.....	27
2.1 Materiales y equipo.....	28
2.2 Diseño Experimental.....	28
2.3 Preparación de nanopartículas de poliuretano.....	30
2.4 Caracterización de nanopartículas de poliuretano.....	32
2.4.1 Liofilización.....	33
2.4.2 DLS.....	33
2.4.3 SEM.....	34
CAPITULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	35
3.1 Nanopartículas obtenidas.....	36

3.2 Análisis de Taguchi.....	36
3.3 Diámetro efectivo.....	39
3.3.1. Análisis de medias y relaciones S/N.....	39
3.3.2. Análisis estadístico ANOVA de dos vías.....	43
3.3.3. Análisis por gráficas de contorno.....	45
3.3. Índice de Polidispersidad (IDP).....	51
3.3.1. Análisis de medias y relaciones S/N.....	51
3.3.2. Análisis estadístico ANOVA de dos vías.....	53
3.3.3. Análisis por gráficas de contorno.....	55
3.4 SEM.....	59
3.5 Liofilización.....	60
Conclusiones.....	63
Referencias.....	64

Lista de figuras

Figura 1.1. Objetos ordenados según su tamaño real en escala nanométrica.

Figura 1.2. Estructura química de los polímeros principalmente usados para la preparación de nanopartículas por el método de desplazamiento de disolvente o nanoprecipitación.

Figura 1.3. Esquema de poliuretano segmentado.

Figura 1.4. A) Micela formada en una disolución acuosa. B) Micela invertida formada en un solvente orgánico apolar.

Figura 1.5. Señales que se generan con la interacción haz-muestra.

Figura 1.6 Dispersión de radiación (linealmente polarizada) por una molécula. Se muestran los vectores de campo eléctrico y magnético para la radiación incidente. La radiación dispersada está en la dirección dada por θ y ϕ .

Figura 1.7 Vector de dispersión \vec{q} . Θ es el ángulo de dispersión.

Figura 1.8 Fluctuaciones de intensidad de luz dispersada por pequeñas partículas alrededor de un valor promedio $\langle I \rangle$.

Figura 1.9 Esquema de un instrumento para mediciones de dispersión de luz. Se usa un láser de onda continua y la salida del detector de dispersión (que puede rotar alrededor de la celda) se compara con aquella del detector directo del haz). Si es necesario se inserta un filtro para reducir la intensidad en este último.

Figura 1.10 Dispersión por un cuerpo de tamaño comparable a λ . Se muestran dos puntos dispersores en A y B. La fase de la radiación (y por lo tanto la de los dipolos inducidos) es diferente en los dos puntos, al igual que la distancia al observador.

Figura 1.11 Función de Autocorrelación de la intensidad dispersada.

Figura 1.12 a) FAC proporcionada por el analizador de tamaños de partícula para una muestra estándar de partículas de látex. B) Distribución monodispersidad de

tamaños de una muestra estándar d partículas de látex, tiene un máximo como correspondiente a 87.9 nm, un ancho de 19.2 nm.

Figura 2.1 Sonicador marca VWR, modelo 75D, programado para sonicar por 20 minutos con baño térmico con temperatura de 50°C

Figura 2.2 Muestra atemperandose en la placa magnética marca IKA, modelo RCT con el sensor de temperatura marca IKA, modelo ETS-D5 para controlar la temperatura.

Figura 2.3 Rotovapor utilizado, marca Buchi, modelo R215.

Figura 3.1. Muestras representativas con diferentes concentraciones de PU. a) 0.75m/ml, b)3 mg/mL y c)9 mg/mL.

Figura 3.2 Efectos principales para medias.

Figura 3.3 Efectos principales para relaciones S/N.

Figura 3.4 Efecto de la Concentración de polímero y la temperatura de precipitación respecto al diámetro efectivo.

Figura 3.5 Efecto de la concentración de polímero y la concentración de surfactante respecto al diámetro efectivo.

Figura 3.6 Efecto de la concentración de polímero y la velocidad de agitación respecto al diámetro efectivo.

Figura 3.7 Efecto de la concentración de la temperatura y la concentración de surfactante respecto al diámetro efectivo.

Figura 3.8 Efecto de la temperatura de precipitación y la velocidad de agitación respecto al diámetro efectivo.

Figura 3.9 Efecto de la concentración de surfactante y la velocidad de agitación respecto al diámetro efectivo.

Figura 3.10. Gráfica de efectos principales para medias de la polidispersidad.

Figura 3.11. Gráfica de efectos principales para relaciones SN para la polidispersidad.

Figura 3.12 Efecto de la Concentración de polímero y la temperatura de precipitación respecto a la polidispersidad.

Figura 3.13 Efecto de la concentración de polímero y la concentración de surfactante respecto a la polidispersidad.

Figura 3.14 Efecto de la concentración de polímero y la velocidad de agitación respecto a la polidispersidad.

Figura 3.15 Efecto de la temperatura y la concentración de surfactante respecto a la polidispersidad.

Figura 3.16 Efecto de la temperatura y la velocidad de agitación respecto a la polidispersidad.

Figura 3.17 Efecto de la concentración de surfactante y velocidad de agitación respecto a la polidispersidad.

Figura 3.18. Micrografía por microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de PU,

Figura 3.19. Micrografía representativa de las nanopartículas liofilizadas.

Lista de tablas

Tabla 1.1 Diseño estadístico Anova para un sistema de medición con dos factores.

Tabla 2.1. Factores a variar en el diseño experimental.

Tabla 2.2. Diseño experimental de Taguchi L9 utilizado.

Tabla 3.1. Diseño Taguchi L9 y resultados obtenidos por DLS.

Tabla 3.2 Análisis ANOVA de dos vías para en diámetro efectivo de las nanopartículas con respecto a la concentración de PU (factor A), la temperatura de precipitación (factor B), concentración de surfactante (factor C) y velocidad de agitación (factor D).

Tabla 3.3 Análisis ANOVA de dos vías para el índice de polidispersidad del tamaño de las nanopartículas con respecto a la concentración de PU (factor A), la temperatura de precipitación (factor B), concentración de surfactante (factor C) y velocidad de agitación (factor D).

Tabla 4.4. Pesos obtenidos de cada muestra después de liofilizar.

Resumen

La preparación de nanopartículas poliméricas por el método de nanoprecipitación se ve afectada por diversos factores (Cooper, 2016). En este trabajo se utilizó una metodología de diseño experimental para optimizar el proceso de preparación de nanopartículas de poliuretano.

El tipo de polímero, surfactante y disolvente no se variaron. Mientras que, para las variables independientes se utilizó el diseño experimental de Taguchi L9 de 4 factores y 3 niveles con los siguientes valores: Temperatura de precipitación (5, 25, 45 °C), concentración de poliuretano (poli(uretano urea)s segmentados) (0.75, 3, 5 mg/mL), concentración de surfactante (0.025, 0.125, 0.25 %m/v) y velocidad de agitación al precipitar (400, 800, 1200 RPM). Las nanopartículas fueron caracterizadas por microscopía electrónica de barrido y por dispersión dinámica de luz (DLS).

Se utilizó el paquete estadístico Minitab 17 para el diseño experimental y para analizar los resultados por medio de gráficas de medias, gráfica de señal-ruido (S/N) y gráficas de contorno. Esto con el fin de analizar los efectos que tienen las variables estudiadas respecto al diámetro efectivo y la polidispersidad de las nanopartículas de poliuretano preparadas. El análisis ANOVA de dos vías fue utilizado para determinar la significancia de los resultados y para estudiar las interacciones entre los factores.

Se encontró que las condiciones óptimas para la formación de nanopartículas pequeñas (aprox. 60 nm) es de 0.75mg/mL de PU, temperatura de 25°C, 0.125%m/v de surfactante y 1200 rpm de agitación. Mientras que si lo que se desea es una menor polidispersidad (aprox. 0.11) se requiere de 3mg/mL de PU, 5°C de temperatura, 0.125%m/v de surfactante y 800 rpm de agitación.

Introducción

En las últimas décadas, las nanopartículas poliméricas se han convertido en una plataforma poderosa para ser utilizada en aplicaciones biomédicas o nanomedicina. Por ejemplo, se han aplicado para administración terapéutica, imágenes médicas, la administración de fármacos y el diagnóstico simultáneo. Estas aplicaciones son posibles ya que las nanopartículas poliméricas pueden transportar y liberar especies bioactivas dentro de sistemas biológicos (Cooper, 2016).

Las nanopartículas, que tradicionalmente son definidas como materiales coloidales sólidos, con un diámetro en el rango de 10-1000 nm (Prasad R. et al., 2011) presentan características únicas, tales como alta estabilidad cinética, una variedad estructural y morfológica, capacidad para incorporar diferentes medicamentos hidrófilos o hidrófobos, y múltiples posibilidades de funcionalización (Cooper, 2016). Todas estas propiedades hacen de las nanopartículas poliméricas, prometedoras herramientas con propiedades deseables bio-físico-químicas para objetivos específicos, ya sea órganos, tejidos, células u organelos subcelulares.

Los procesos de transporte y funcionalidad de las nanopartículas, son afectados por atributos físicos y sus características químicas. Por lo tanto es de importancia crítica utilizar procedimientos para preparar nanopartículas con altos grados de uniformidad y control sobre sus características físicas y químicas (Elsabahy et al., 2012).

Las nanopartículas pueden ser construidas de varios materiales (polímeros, lípidos y metales) y pueden hospedar un amplio rango de componentes activos, incluyendo quimioterapéuticos, agentes de contraste, proteínas y ácidos nucleicos para varias aplicaciones biomédicas (Prasad et al., 2011).

Entre los materiales poliméricos, los poliuretanos representan uno de los materiales más versátiles empleados para aplicaciones biomédicas que se han utilizado ampliamente en el campo médico. Se ha utilizado el poliuretano en prótesis

de válvulas del corazón, catéteres, bombas de sangre, y apósitos para heridas (Cooper, 2016).

En el caso de nanopartículas poliméricas se tiene que el tamaño, morfología y superficie son características que dictan la estabilidad biológica en la sangre, biodistribución vía endocítica, distribución intracelular y biodisponibilidad de las nanopartículas (Elsabahy et al., 2012).

Utilizando el método de nanoprecipitación factores como: la temperatura, concentración de polímero, surfactante y agitación al momento de precipitar, pueden afectar el tamaño y la polidispersidad de las nanopartículas (Zambaux et al., 1998). En este trabajo se busca optimizar la preparación de nanopartículas de poliuretano mediante el control y modificación de estos factores, utilizando el diseño de Taguchi L9 de cuatro factores y tres niveles.

Por lo tanto los objetivos de este trabajo incluyeron la preparación de nanopartículas de poliuretano, la utilización del método de Taguchi para el diseño experimental y el análisis de las interacciones de los factores, así como caracterizar las muestras por medio de dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

Esta tesis consta de la presente introducción, objetivos y tres capítulos. El capítulo 1 contiene el marco teórico, donde se describe la importancia de los nanomateriales y las nanopartículas de poliuretano; se presentan conceptos introductorios al diseño experimental y sobre la caracterización de nanopartículas. En el capítulo 2 se mencionan los materiales y la metodología utilizada. En el capítulo 3 se exponen los resultados obtenidos, el análisis de dichos resultados y las discusiones. Finalmente se presentan las conclusiones a las que se llegaron.

Objetivos

Objetivo General

Optimizar la preparación de nanopartículas de poliuretano por medio del método de nanoprecipitación.

Objetivos específicos

- Preparar nanopartículas de poliuretano por el método de nanoprecipitación variando temperatura de precipitación, concentración de poliuretano, concentración de surfactante y velocidad de agitación al momento de precipitar.
- Utilizar el método experimental de Taguchi para el diseño y análisis de las interacciones entre las variables.
- Caracterizar las muestras por la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de barrido.

Capítulo I.

MARCO TEÓRICO

1.1 Nanomateriales

El término nano es un prefijo que se refiere a un orden de escala 10^{-9} (0.000 000 001). En dimensiones longitudinales tenemos el nanómetro, que se refiere a 10^{-9} metros. Con esto es más sencillo definir a los nanomateriales, como partículas coloidales entre el rango de 10- 1000 nm (Hernández Giottonini, 2016). En la figura 1.1 se observan diferentes objetos en escala nanométrica.

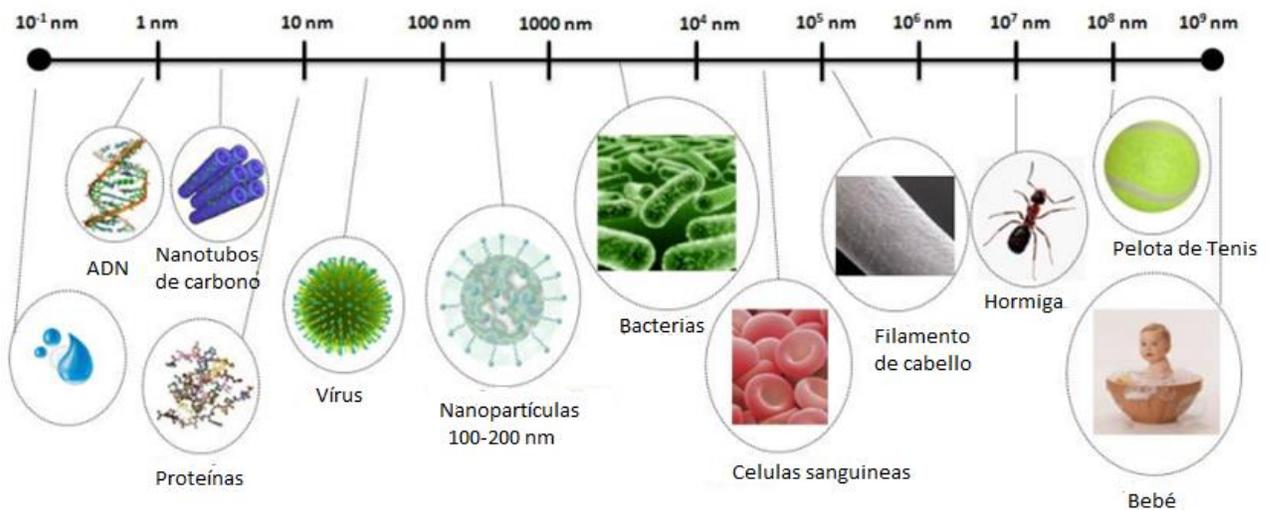


Figura 1.1. Objetos ordenados según su tamaño real en escala nanométrica.

Según algunos autores (Bobadilla Valencia, 2010) los nanomateriales se pueden clasificar de acuerdo al número de dimensiones del material que se encuentran en régimen nanométrico. Podemos clasificar a los nanomateriales de la siguiente manera:

- Materiales de dimensión cero. En este caso ninguno de sus tres grados de libertad se encuentran variando en el régimen nanométrico; a este grupo corresponden las nanopartículas.
- Materiales de una dimensión. Sólo uno de sus tres grados de libertad varía en el régimen de nanómetros; a estos corresponden los nanoalambres y nanotubos.
- Materiales de dos dimensiones. Con áreas de tamaño indefinido, es decir, varían dos de sus tres grados de libertad en el régimen nanométrico. Mantienen en su espesor entre 1 y 100 nm, como es el caso de películas delgadas.
- Materiales de tres dimensiones. Los tres grados de libertad entran en el régimen nanométrico, es decir, sólidos tridimensionales formados por unidades nanométricas.

1.1.1 Nanopartículas de Polímero

Las terapias basadas en nanopartículas poliméricas han sido desarrolladas para el diagnóstico y tratamiento de un amplio rango de enfermedades que van desde cáncer, infecciones virales, enfermedades cardiovasculares, enfermedades pulmonares, infecciones de tracto urinario, entre otros (Elsabahy et al., 2012).

Desde los trabajos pioneros de Fessi y colaboradores con numerosas nanopartículas, preparadas con diferentes polímeros y solventes, los polímeros utilizados más extensamente (figura 1.2) son: poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PLGA), poli(alquil cianoacrilato) (PACA), poli (caprolactona) (PCL) y los correspondientes co-polímeros con PEG, el cual cumple con los requerimientos de ser biodegradable, biocompatible y no inmunogénico (Lepeltier, Bourgaux, & Couvreur, 2014). Otro polímero más recientemente explorado para la preparación de nanopartículas poliméricas es el PBLG y sus derivados (Martínez B. et al., 2007).

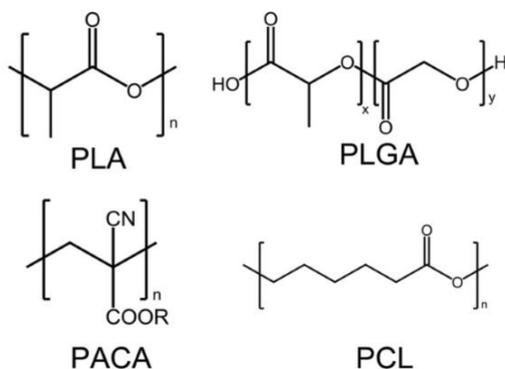


Figura 1.2. Estructura química de los polímeros principalmente usados para la preparación de nanopartículas por el método de desplazamiento de disolvente o nanoprecipitación.

Las nanopartículas de poliuretano se han obtenido por los métodos de nanoprecipitation/evaporación de disolvente o por síntesis en nanoemulsión (Lepeltier et al., 2014).

1.1.1.1 Poliuretanos segmentados

El poliuretano y los polímeros de poliurea se obtienen típicamente del ataque nucleofílico de hidroxilo o grupos de aminas de polioles o poliaminas con grupos carbonilo de monómero de diisocianato para formar enlaces de carbamato o urea. Aunque esta reacción se describe a menudo como algo que ocurre entre dos monómeros, los diisocianatos también pueden reaccionar con polímeros sintéticos preformados, tales como poli ε-caprolactona o polisacáridos, para lograr polímeros más biocompatibles y biodegradables(Lepeltier et al., 2014).

Los poliuretanos segmentados se caracterizan por su enlace uretano (-NHCOO-) en la cadena principal, y aunque éste sólo constituye un pequeño porcentaje de los grupos funcionales comprendidos en esta familia de polímeros, le

confiere las propiedades mecánicas y antitrombogénicas que han conducido a su uso en aplicaciones cardiovasculares(Chan Ch., 2012).

Las principales reacciones en la síntesis de poliuretanos segmentados se llevan a cabo entre sus tres componentes principales: un polioliol, un diisocianato y un extensor de cadena. El polioliol constituye el segmento flexible o suave, mientras que el diisocianato y extensor forman el segmento rígido o duro(Chan Ch., 2012). En la figura 1.3 se esquematizan este tipo de poliuretanos.

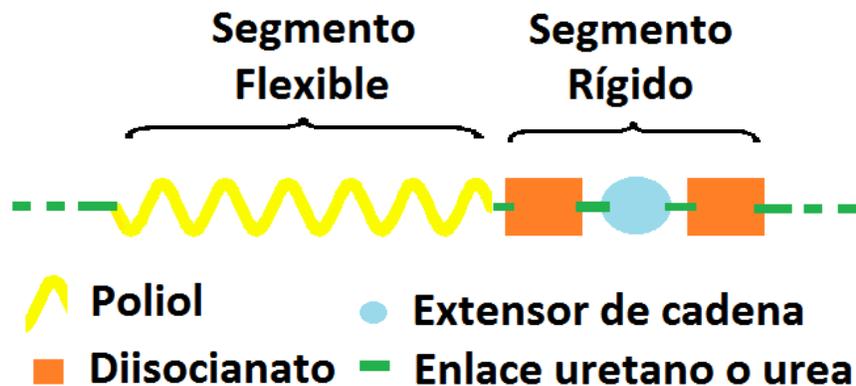


Figura 1.3 Esquema de poliuretano segmentado.

El polioliol usado para la síntesis de poliuretanos es una macromolécula hidroxilo terminada que generalmente es un poliéter, poliéster, polímero hidrocarbonado o polidimetilsiloxano; con un peso molecular comprendido entre 400 y 3000 g/mol.

El diisocianato por su parte puede ser aromático o alifático y reacciona vigorosamente con compuestos que contienen hidrógenos activos, como el polioliol el cual contiene grupos hidroxilo y el 'extensor' de cadena el cual es una molécula pequeña que puede contener grupos amino, hidroxilo y/o ácidos carboxílicos. Adicionalmente, los grupos diisocianato pueden reaccionar con impurezas como el

agua y con los grupos uretano, urea y amida formados, produciendo entrecruzamiento por la formación de ácido carbámico, alofanatos, biuret y acilureas (Chan Ch., 2012).

1.1.1.2. Método de preparación por nanoprecipitación

Uno de los métodos para la preparación de nanopartículas es el método de nanoprecipitación, también conocido como de desplazamiento de disolvente, que conlleva una metodología sencilla y rápida (Lepeltier et al., 2014).

Se lleva a cabo de la siguiente manera: el soluto hidrófobo (moléculas de polímero o lípidos) se disuelven primero en un disolvente orgánico polar (por lo general etanol, acetona o THF). A continuación se añade esta solución a una gran cantidad de un no disolvente (generalmente agua) del soluto con el que el disolvente es miscible en todas las proporciones. La solución mixta binaria se convierte en un no-solvente para las moléculas hidrófobas y el sistema evoluciona hacia la separación de fases, dando lugar a la formación de partículas del soluto hidrófobo. El disolvente orgánico se puede retirar por evaporación de las partículas y la formación de grandes agregados (Lepeltier et al., 2014).

1.2. *Surfactantes*

De considerable importancia en la nanoprecipitación, los surfactantes o tensoactivos, son moléculas anfifílicas con una parte hidrofílica, polar, iónica, o de ion híbrido y una parte hidrofóbica, o no polar, que comprende normalmente una cadena de hidrocarburos o fluorocarburos. Pueden ser de naturaleza iónica o no iónica. Las fuertes interacciones dipolo entre la parte hidrofílica y agua les hacen solubles en agua, y el equilibrio entre las propiedades duales de hidrofiliidad e hidrofobicidad les dota con una característica única de propiedades de superficie activa en soluciones (Valenzuela Loroña, 2014).

Estas moléculas anfifílicas tienden a acumularse en varias interfaces, reduciendo el contacto de la parte hidrofóbica con el medio acuoso, y tienden a

reducir la energía libre de la frontera de fase. La concentración crítica de absorción del tensoactivo en la interfase depende de su estructura y la naturaleza de las dos fases que forman la interfaz (Valenzuela Loroña, 2014). En la preparación de nanopartículas los surfactantes generalmente actúan como estabilizadores (Kvítek et al., 2008). La figura 1.4 muestra micelas formadas por surfactantes.

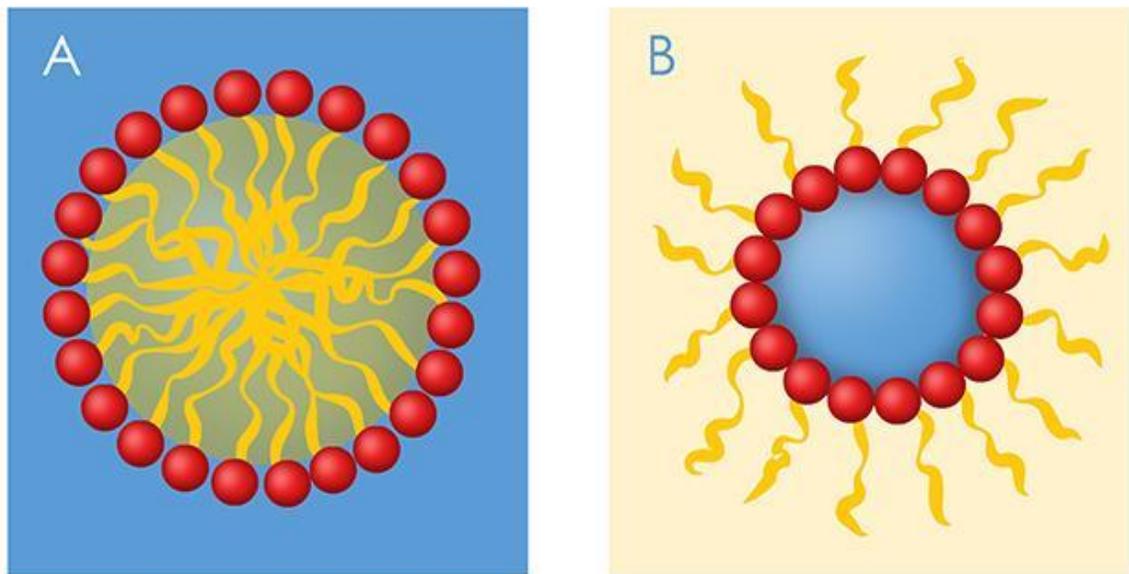


Figura 1.4 A) Micela formada en una disolución acuosa. B) Micela invertida formada en un solvente orgánico apolar (Ramos M., 2015).

1.3. Diseño y análisis experimental

El diseño experimental se define como una metodología para aplicar sistemáticamente la estadística a la experimentación. Consiste, en realizar una serie de pruebas en las que se inducen cambios deliberados en las variables de entrada a un proceso de manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios en la respuesta de salida elegida (Tanco Rainusso, 2008).

En la etapa de diseño experimental se debe tener en cuenta las características propias de la disciplina en donde se realiza; a pesar que los principios estadísticos son los mismos, las estrategias frecuentemente son distintas. La estrategia experimental depende del tiempo para realizar el experimento, el costo de la experimentación y la cantidad de variación en el material experimental (Pérez R., 2015).

Cuando se realiza un experimento de caracterización, el interés suele centrarse en determinar las variables del proceso que afectan la respuesta. El siguiente paso lógico es la optimización, es decir, determinar la región de los factores importantes que conduzca a la mejor respuesta posible (Montgomery, 2006).

1.3.1. Pautas generales para diseñar experimentos

A continuación se presentan los pasos a seguir, según Douglas Montgomery (Montgomery, 2006), para hacer el diseño experimental de un trabajo:

- I. *Identificación y enunciación del problema.* Es necesario desarrollar todas las ideas acerca de los objetivos del experimento. Se recomienda un enfoque de equipo para diseñar experimentos. En la mayoría de los casos es conveniente hacer una lista de los problemas o preguntas específicas que van a abordarse en el experimento. Una enunciación clara del problema contribuye sustancialmente a menudo para alcanzar una mejor comprensión de los fenómenos bajo estudio y la solución final del problema. Es importante tener presente el objetivo principal. Obviamente, los objetivos específicos que habrán de abordarse en el experimento se relaciona de manera directa con los objetivos principales.
- II. *Elección de los factores, los niveles y los rangos.* Una vez que el experimentador ha seleccionado los factores del diseño, debe elegir los rangos en los que hará variar estos factores, así como los niveles específicos

con los que se realizarán las corridas. También deberá pensarse cómo van a controlarse estos factores en los valores deseados y cómo van a medirse. Para ello se requiere del conocimiento del proceso.

- III. Selección de la variable de respuesta. Para seleccionar la variable de respuesta, el experimentador deberá tener la certeza de que esta variable proporciona en realidad información útil acerca del proceso bajo estudio. Suele ser de importancia determinante identificar los aspectos con la definición de las respuestas de interés y cómo van a medirse antes de llevar a cabo el experimento. En ocasiones se emplean experimentos diseñados para estudiar y mejorar el desempeño de los sistemas de medición.
- IV. Elección del diseño experimental. La elección del diseño implica la consideración del tamaño de la muestra (número de réplicas), la selección de un orden de corridas adecuado para los ensayos experimentales y la determinación de si entran en juego o no la formación de bloques u otras restricciones sobre la aleatorización. Al seleccionar el diseño, es importante tener en mente los objetivos experimentales.
- V. Realización de experimento. Cuando se lleva a cabo el experimento es vital monitorear con atención el proceso a fin de asegurarse de que todo se esté haciendo conforme a la planeación. Los errores en el procedimiento experimental en esta etapa destruirán por lo general la validez experimental. Poner en primer plano la planeación es crucial para el éxito.
- VI. Análisis estadísticos de los datos. Deberán usarse métodos estadísticos para analizar los datos a fin de que los resultados y las conclusiones sean objetivos y no de carácter apreciativo. Con frecuencia se encuentra que los métodos gráficos simples desempeñan un papel importante en el análisis e interpretación de datos. Aplicados en forma correcta, los métodos estadísticos no permiten la demostración experimental pero sí sirven para medir el error posible en una conclusión o asignar un nivel de confianza a un enunciado.

- VII. Conclusiones y recomendaciones. Una vez que se han analizado los datos, el experimentador debe sacar conclusiones prácticas acerca de los resultados y recomendar un curso de acción. Los métodos gráficos suelen ser útiles en esta etapa, en particular para presentar los resultados.

1.3.1 Ejemplos de diseños experimentales

1.3.1.1 Diseño Factorial

Los tratamientos en el análisis factorial contemplan todas las combinaciones posibles de los distintos niveles de los factores. Por ello, la característica esencial que hace necesario el estudio conjunto de factores es la posibilidad de que el efecto de un factor cambie en presencia de los niveles de otro factor, es decir, que los factores interactúen (Pérez R., 2015). Una de las principales desventajas de este diseño es la gran cantidad de experimentos que se requieren al aumentar los niveles y factores a estudiar.

1.3.1.2 Diseño y análisis Taguchi

La técnica de Taguchi tiene varias ventajas sobre otros diseños experimentales, una de las principales es que reduce drásticamente el número de experimentos requeridos para modelar la función de respuesta en comparación con el diseño factorial completo de experimentos. Esta técnica también tiene la ventaja de encontrar la posible interacción entre los parámetros (Farbod et al., 2016).

El análisis de los resultados experimentales utiliza una relación señal-ruido (S/N) para ayudar en la determinación de los mejores diseños de proceso. El diseño de Taguchi es un diseño de gran alcance, una herramienta experimental para la adquisición de datos de una manera controlada y para analizar la influencia de las variables de proceso a través de alguna variable específica, que es una función

desconocida de estas variables de proceso y para el diseño de sistemas de alta calidad. La técnica de Taguchi crea una matriz ortogonal estándar para acomodar el efecto de varios factores sobre el valor objetivo y define el plan del experimento (Farbod et al., 2016).

1.4 Análisis estadístico ANOVA

El método Anova, conocido también como análisis de varianza es el método más exacto para calcular la variabilidad de un sistema de medición porque posee la ventaja de cuantificar la variación debida a la interacción entre los operadores y las partes. Este método está basado en la misma técnica estadística utilizada para analizar los efectos de los diferentes factores en el diseño de experimentos (Botero, Arbeláez et al., 2007). El análisis ANOVA es una herramienta que se utiliza frecuentemente para complementar el análisis de Taguchi, ya que sirve para determinar cuál parámetro de diseño afecta significativamente a la variable de respuesta (Yang et al., 1998). La Tabla de Anova para un sistema de medición se muestra en la Tabla 1.1.

Fuente de variación	Suma cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios
Operador	SSA	$a - 1$	$MSA = \frac{SSA}{a - 1}$
Partes	SSB	$b - 1$	$MSB = \frac{SSB}{b - 1}$
Interacción	$SSAB$	$(a - 1)(b - 1)$	$MSAB = \frac{SSAB}{(a - 1)(b - 1)}$
Error	SSE	$ab(n - 1)$	$MSE = \frac{SSE}{ab(n - 1)}$
Total	SST	$N - 1$	

Tabla 1.1 Diseño estadístico Anova para un sistema de medición con dos factores donde a es el número de operadores, b es el número de partes, n es el número de medidas para cada parte por cada operador y N es el número total de datos (Botero et al., 2007).

1.5. Técnicas de caracterización de nanopartículas de poliuretano

1.5.1 Microscopía de barrido electrónico (SEM)

La microscopía electrónica de barrido, o SEM por sus siglas en inglés, es una de las técnicas usadas para caracterización de nanopartículas. El principio operativo de SEM utiliza un haz de electrones sobre la superficie de la muestra recubierta por algún material conductor. El principio de funcionamiento es muy similar a la de la microscopía óptica, pero con una resolución más alta de aproximadamente 250 veces. Los electrones son generados por los cañones termoiónicos o pistolas de emisión de campo y, a continuación se centran en una serie de "lentes" electromagnéticas. Cuando haces de electrones golpean la superficie de la muestra, la muestra emite rayos X y los tres tipos de electrones retrodispersados: electrones primarios, electrones secundarios y electrones Auger. En SEM, los electrones retrodispersados solamente primarios y electrones secundarios se recogen y se utilizan para generar imágenes de la muestra. La técnica SEM es una técnica muy versátil, pero semicuantitativa en materiales de poliuretano para visualizar la adsorción de proteínas, bacterias, adhesión de plaquetas y la degradación (Cooper, 2016).

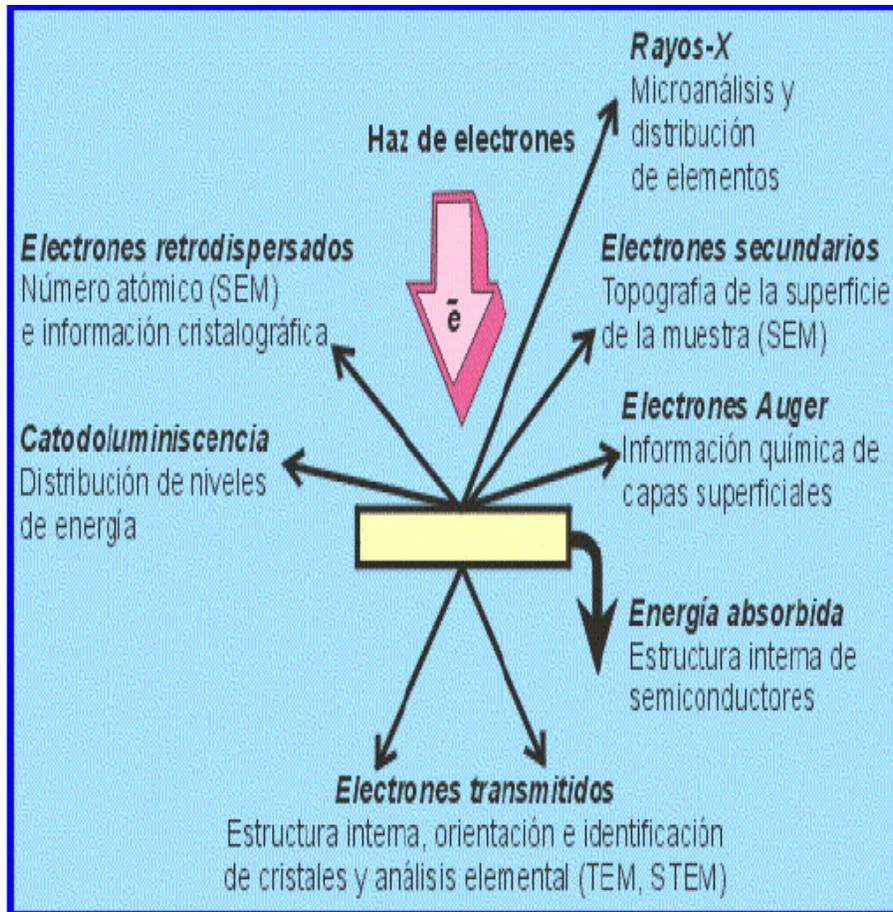


Figura 1.5. Señales que se generan con la interacción haz-muestra

(Prin et al., 2010).

1.5.2 Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión de luz, o DLS por sus siglas en inglés, se puede entender como el redireccionamiento de la luz que tiene lugar cuando una onda electromagnética (rayo de luz incidente) se encuentra con un obstáculo o inhomogeneidad (partículas). La onda electromagnética provoca que los orbitales electrónicos dentro de las moléculas constituyentes de la nanopartícula vibran periódicamente con la misma frecuencia del campo eléctrico de la onda incidente. La oscilación o perturbación de la nube electrónica resulta en una separación de carga dentro de

las moléculas (momento dipolar inducido). La oscilación del momento dipolar inducido se manifiesta como una fuente de radiación electromagnética (Luz dispersada) y la mayoría de la luz dispersada se emite a la misma frecuencia que la luz incidente (dispersión elástica) (Brito I., 2013).

1.5.2.1 *Dispersión de Luz por una molécula pequeña*

Consideremos la dispersión de luz monocromática por una molécula. El haz de luz está dirigida a lo largo del eje x y polarizado con su vector de campo eléctrico en la dirección z (ver figura 1.6). La molécula está en $x = 0$, $y = 0$, y $z = 0$. Se asume que la longitud de onda λ , es tan grande como para poner la molécula en el origen sin preocuparse de su tamaño, que es mucho menor que la longitud de onda.

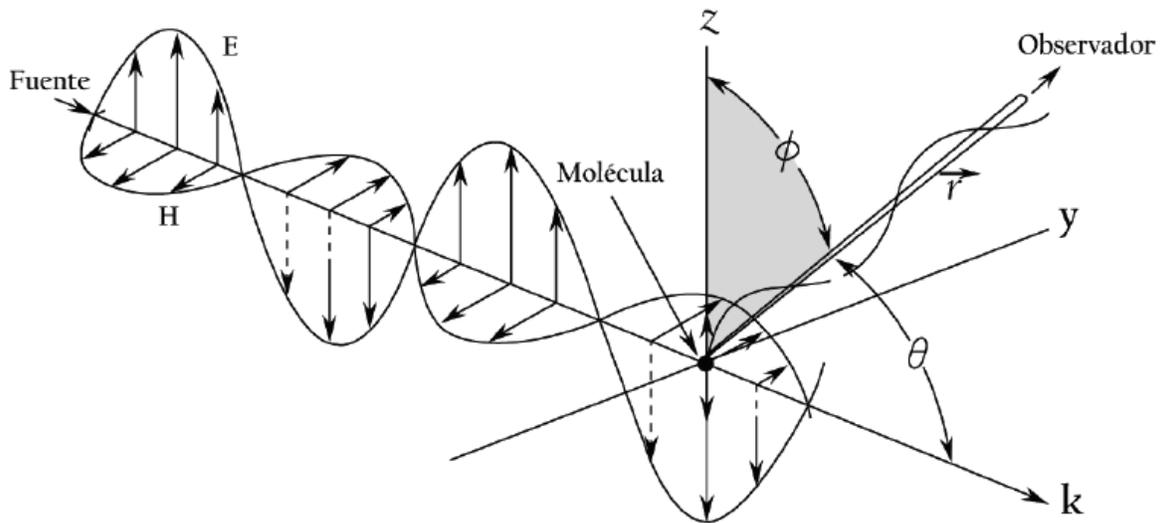


Figura 1.6 *Dispersión de radiación (linealmente polarizada) por una molécula. Se muestran los vectores de campo eléctrico y magnético para la radiación incidente. La radiación dispersada está en la dirección dada por θ y ϕ .*

Se puede escribir la ecuación para el vector de campo eléctrico para un vector r , para un tiempo t .

$$\vec{E}(x, t) = \vec{E}_0 \exp^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad (1.1)$$

En ($|\vec{r}| = 0$) donde se encuentra la molécula el campo eléctrico oscila con el tiempo

$$\vec{E}(0, t) = \vec{E}_0 \exp^{-i\omega t} \quad (1.2)$$

Clásicamente, esta oscilación del campo externo produciría la correspondiente oscilación de los electrones en la molécula y consecuentemente generará un momento dipolar oscilante. Si la molécula es isotrópica este momento estará en la dirección del campo eléctrico, es decir

$$\vec{p} = \alpha \vec{E} = \alpha \vec{E}_0 \exp^{-i\omega t} \quad (1.3)$$

Este momento oscilante actuará como una fuente de radiación, el campo de radiación correspondiente está dado por

$$\vec{E}_s = \frac{k^2}{4\pi\xi_0} \frac{\exp^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)}}{r} (\vec{n} \times \vec{p}) \times \vec{n} \quad (1.4)$$

n es el vector unitario en la dirección de observación y r es la distancia desde el dipolo, p es el momento dipolar (Ecuación 1.3). La amplitud del campo eléctrico producido por un dipolo oscilante, a una distancia r del dipolo y a un ángulo ϕ con respecto a la dirección de polarización (eje z), está dada por

$$E_s = \left[\frac{\alpha E_0 4\pi^2 \sin\phi}{4\pi\xi_0 r \lambda^2} \right] \exp^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad (1.5)$$

El término en los corchetes de la ecuación 1.5 es el término de interés. Esta respuesta la amplitud de la onda dispersada. La intensidad de la radiación (flujo de la energía por centímetro cuadrado) depende del cuadrado de la amplitud. Se desea comparar la intensidad I de la radiación dispersada con la intensidad de la radiación incidente I_0 , que es proporcional al cuadrado de su amplitud, E_0 .

$$\frac{I}{I_0} = \frac{(\alpha E_0 \pi \sin \phi)^2 / (\xi_0 r \lambda^2)^2}{E_0^2} = \frac{\pi^2 \alpha^2 \sin^2 \phi}{\xi_0 r^2 \lambda^4} \quad (1.6)$$

Esta ecuación dice mucho sobre la luz dispersada. Su intensidad disminuye con r^2 , como la de la radiación de una fuente puntual. La intensidad de la dispersión aumenta rápidamente con la disminución de la longitud de onda. La intensidad depende del ángulo ϕ ; no existe radiación a lo largo de la dirección en la que vibra un dipolo. Esta simple pero muy útil teoría para describir la dispersión de muestras coloidales es la teoría de Rayleigh-Gans-Debye (RGD), que asume que la luz no se refleja en el límite partícula-medio ni se atenúa dentro de la partícula. En algunos casos, se usa radiación no polarizada en los experimentos de dispersión de luz. Ya que se asume como la superposición de algunas ondas independientes polarizadas en direcciones aleatorias en el plano yz, la superficie de dispersión resultante corresponde a la suma de superficies rotada con respecto una a otra sobre el eje k. La ecuación para la dispersión de radiación no polarizada se puede obtener promediando sobre todas las direcciones en el plano yz.

$$\frac{I}{I_0} = \frac{\pi^4 \alpha^2}{2 \xi_0 r^2 \lambda^4} (1 + \cos^2 \theta) \quad (1.7)$$

Aquí θ es el ángulo entre el haz incidente y la dirección de observación. La distribución de la intensidad dispersada es simétrica hacia delante y hacia atrás. La ecuación 1.7 proporciona una descripción adecuada de la dispersión de luz por una sola partícula isotrópica, pequeña (Brito I., 2013).

1.5.2.2 Fluctuaciones y dispersión

Las fluctuaciones espaciales o temporales en el medio dispersivo generan un cambio en la permitividad dieléctrica del medio. Si la permitividad puede expresarse como

$$\varepsilon(\vec{r}) = \varepsilon_0 + \delta\varepsilon(\vec{r}) \quad (1.8)$$

la amplitud del campo dispersado es proporcional a

$$\int \delta\varepsilon(\vec{r}) \exp^{i\vec{q}\cdot\vec{r}} d^3r \quad (1.9)$$

donde \vec{q} es el vector de dispersión (ver Figura 1.7)

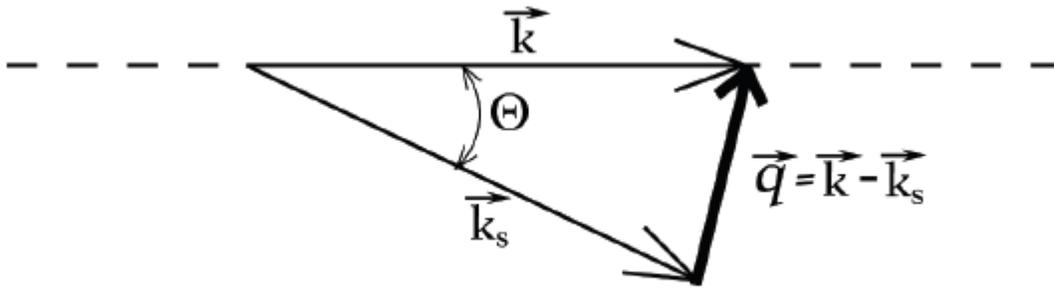


Figura 1.7 Vector de dispersión \vec{q} . Θ es el ángulo de dispersión.

La magnitud de este vector se puede obtener de la construcción de la Figura 1.5, que es un triángulo isósceles ($k=k_s$), por lo que se cumple que

$$q = 2k \sin(\Theta/2) \quad (1.10)$$

la magnitud del vector de onda incidente se puede expresar en función del índice de refracción del medio n

$$k = \frac{2\pi n}{\lambda_0} \quad (1.11)$$

La magnitud del vector de onda está expresada en la ecuación 1.12 donde Θ es el ángulo de dispersión, λ_0 es la longitud de onda del láser en el vacío y n es el índice de refracción del líquido de suspensión

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin(\Theta/2) \quad (1.12)$$

La luz dispersada por una suspensión varía rápidamente en intensidad debido a su movimiento Browniano (Figura 1.8). La variación de la intensidad en tiempos muy cortos puede ser “auto-correlacionada” para extraer información sobre la distribución de velocidades de las partículas que dispersaron la luz.

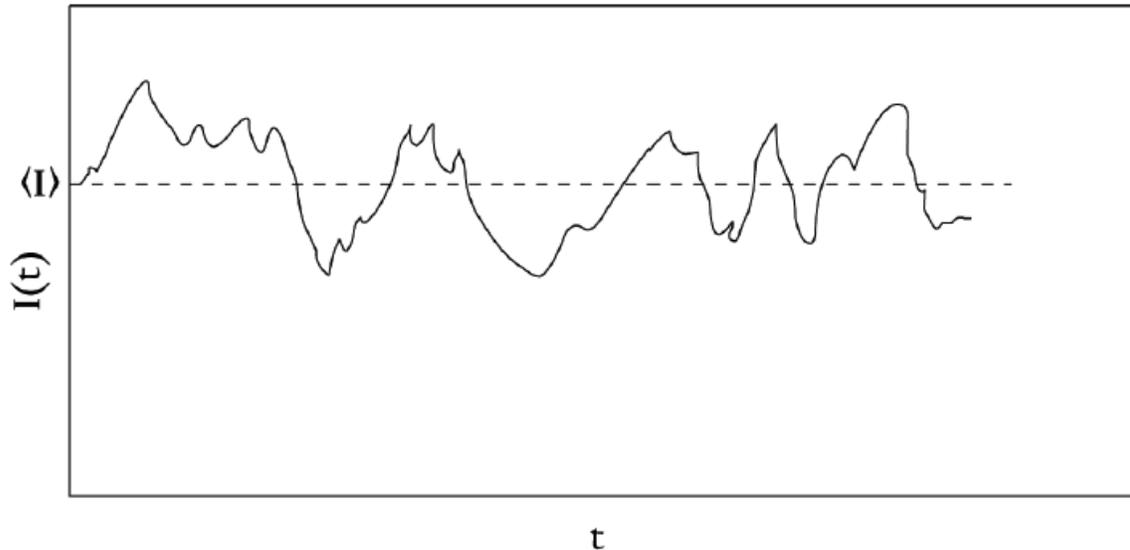


Figura 1.8 Fluctuaciones de intensidad de luz dispersada por pequeñas partículas alrededor de un valor promedio $\langle I \rangle$.

La medición de dispersión de luz normalmente se realiza con un montaje similar al mostrado en la Figura 1.9. Se usa un láser para proporcionar un haz monocromático bien colimado. La intensidad de la luz dispersada a un ángulo dado se compara con la intensidad de la luz incidente. Las soluciones deben ser filtradas o centrifugadas antes de usar, ya que pequeñas cantidades de polvo causan el mismo efecto que cuerpos dispersores grandes. llevando a errores considerables (Brito I., 2013).

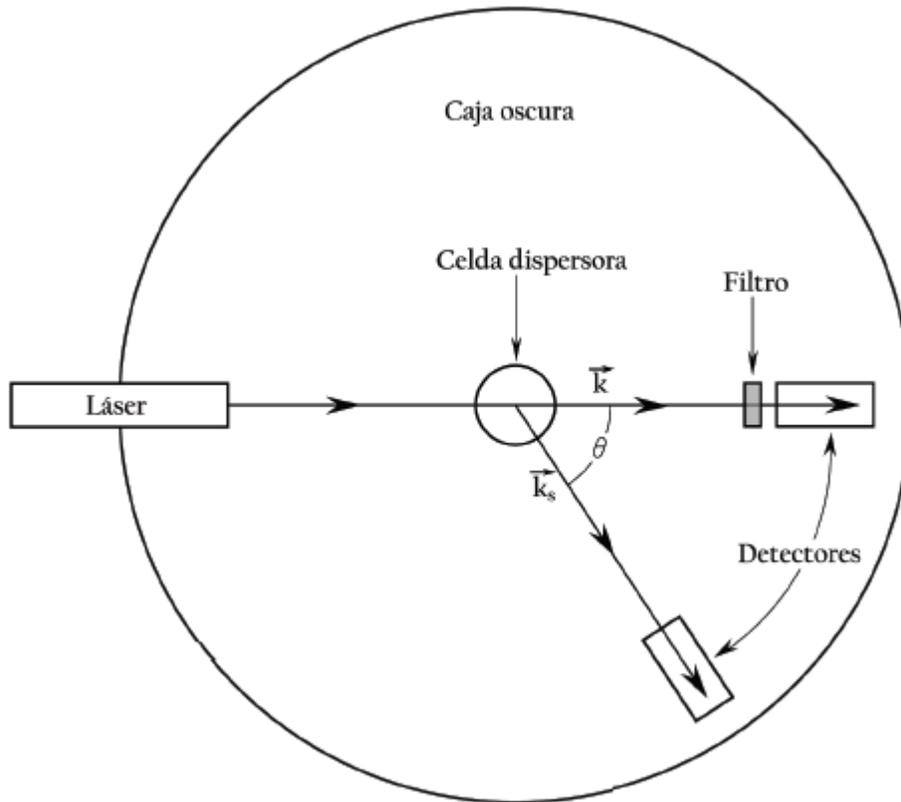


Figura 1.9 Esquema de un instrumento para mediciones de dispersión de luz. Se usa un láser de onda continua y la salida del detector de dispersión (que puede rotar alrededor de la celda) se compara con aquella del detector directo del haz. Si es necesario se inserta un filtro para reducir la intensidad en este último (Brito I., 2013).

1.5.2.3 Dispersión de luz por cuerpos grandes

Cuando hablamos de cuerpos grandes nos referimos a cuerpos grandes respecto a la longitud de onda de la onda electromagnética emitida. En el caso de que las dimensiones de los cuerpos dispersores sean considerables con respecto a la longitud de onda de la luz usada (637 nm) los experimentos de dispersión pueden ofrecer información sobre su tamaño. Este es el caso de las partículas que tienen un tamaño promedio aproximado de 100 nm (Brito I., 2013).

La figura 1.10 muestra un esquema de la dispersión de la luz por un cuerpo que tiene un tamaño comparable con la longitud de onda de la luz. La radiación incidente induce dispersión desde dos puntos A y B separados por una distancia comparable con la longitud de onda, por lo tanto los dipolos dentro de la molécula están oscilando fuera de fase y debido a las diferentes distancias al observador, los dos puntos del ejemplo tendrán una diferencia de fase significativa; por lo que se debe tomar en cuenta la interferencia entre la radiación de estos centros de dispersión que están fijos uno con respecto al otro.

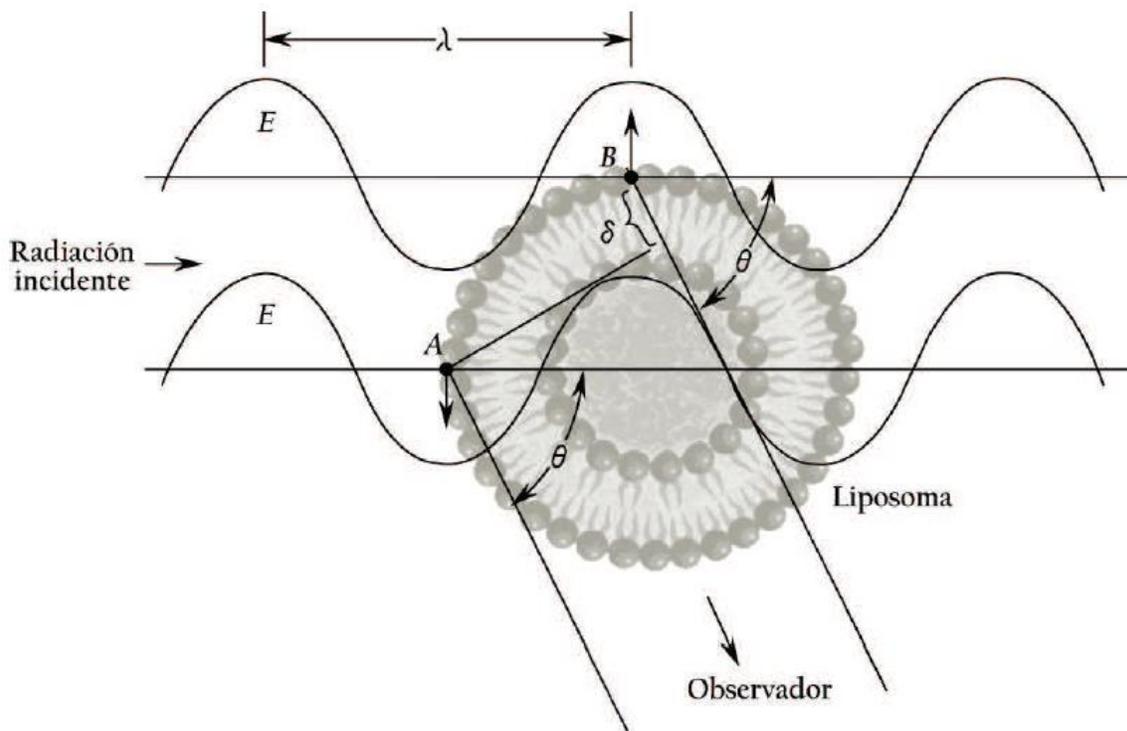


Figura 1.10 Dispersión por un cuerpo de tamaño comparable a λ . Se muestran dos puntos dispersores en A y B. La fase de la radiación (y por lo tanto la de los dipolos inducidos) es diferente en los dos puntos, al igual que la distancia al observador (Brito I., 2013).

El cálculo de este efecto para una partícula debe concluir la interferencia entre la luz dispersada por todos sus puntos en conjunto y, debido a que las partículas están orientadas aleatoriamente en la solución, la dispersión total debe ser promediada sobre todas las orientaciones. Por conveniencia, se expresa el resultado general definiendo una función $P(\theta)$, que describe la relación entre la dispersión en cierto ángulo θ con la dispersión que tendría la misma partícula si fuese mucho más pequeña que λ .

$$P(\theta) = \frac{\text{dispersión por un cuerpo real a un ángulo } \theta}{\text{dispersión por un cuerpo hipotético a un ángulo } \theta} \quad (1.13)$$

Ya que el supuesto cuerpo puntual exhibirá dispersión de Rayleigh, se puede calcular la dispersión de luz de una solución de grandes partículas simplemente multiplicando la ecuación 1.7 por $P(\theta)$ (Brito I., 2013).

1.5.2.4 Aspectos instrumentales y analíticos de la dispersión dinámica de luz

1.5.2.4.1 Función de autocorrelación

Experimentalmente, las características del medio dispersivo se manifiestan en las funciones de autocorrelación del campo dispersado, la más utilizada en estudios de dispersión de luz es la función de autocorrelación para la intensidad

$$G(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle = \langle I(0)I(\tau) \rangle \quad (1.14)$$

Para calcular la función de autocorrelación (FAC) se mide $G(\tau)$ la intensidad en intervalos de tiempo más pequeños que el tiempo de una fluctuación típica y se obtiene la acumulación del producto de las intensidades en función de τ como se muestra en la figura 1.11

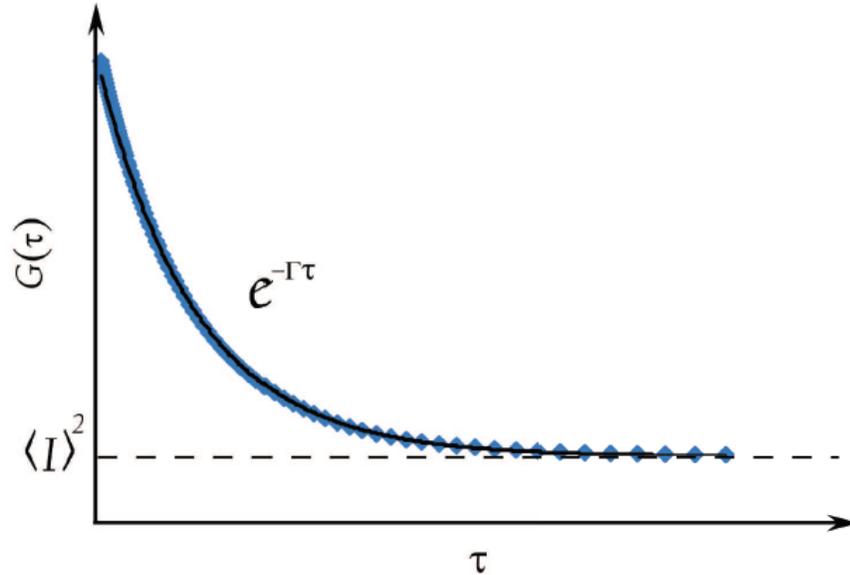


Figura 1.11 Función de Autocorrelación de la intensidad dispersada.

Ya que $I(t) \propto E_s(t)$ entonces

$$I(t) \propto \int \delta\varepsilon(\vec{r}) \exp i\vec{q} \cdot \vec{r} d^3r \quad (1.15)$$

Para el caso de elementos dispersores esféricos y considerando las fluctuaciones obedecen a una distribución gaussiana, $G(\tau)$ está dada por

$$G(\tau) = \langle I \rangle^2 + \langle I \rangle^2 \exp^{-2q^2 D_T \tau} \quad (1.16)$$

q es el módulo de vector de dispersión dada por la Ecuación 1.12 y D_T es el coeficiente de difusión de los elementos dispersores, $G(\tau)$ también puede escribirse como

$$G(\tau) = B + f \exp^{-2\Gamma\tau} \quad (2.17)$$

donde $B = \langle I \rangle^2$ es la línea base (línea entrecortada de la figura 1.11), f es la constante del instrumento (intersección de la curva exponencial con el eje vertical de la figura 1.8) y 2Γ es el recíproco del tiempo de decaimiento de las

fluctuaciones. $G(\tau)$ se normaliza dividiendo la ecuación 1.17 para la línea base B, dando lugar a la FAC normalizada

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + a[g(\tau)]^2 \quad (1.18)$$

Esta ecuación relaciona la FAC del campo eléctrico $g^{(1)}(\tau)$ con la FAC de la intensidad medida $g^{(2)}(\tau)$, mediante una constante del instrumento a que ahora está entre 0 y 1 debido a la normalización. Hay que notar que cualquier detector fotoeléctrico sensible a la intensidad de la luz, que es igual al cuadrado de la amplitud del campo. La FAC normalizada del campo eléctrico $g(\tau)$ puede escribirse como

$$g(\tau) = G_0 \exp^{-\Gamma\tau} \quad (1.19)$$

La constante de decaimiento Γ se relaciona con el coeficiente de difusión traslacional de las esferas D_T mediante la siguiente ecuación

$$\Gamma = D_T q^2 \quad (1.20)$$

G_0 es el valor de la función con $g(\tau = 0)$. El parámetro importante en la ecuación 2.19 es τ , que no varía con la intensidad dispersada $\langle I(q) \rangle$. Así, para medidas de DLS, la intensidad absoluta es secundaria, siempre y cuando sea lo suficientemente grande para completar el experimento. D_T está relacionado directamente al diámetro hidrodinámico d_h mediante la relación de Stokes-Einstein

$$D_T = \frac{k_B T}{3\pi\eta(T)d_h} \quad (1.21)$$

Aquí k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta y $\eta(T)$ es la viscosidad del líquido de suspensión (dependiendo de la temperatura, por lo que se requiere una temperatura constante durante las mediciones) y d_h es el diámetro hidrodinámico de la partícula dispersora que es mayor que el diámetro de la partícula seca debido a la “doble capa” que se forma en la superficie de las partículas cargadas. Los iones alrededor de la partícula forman una región difusa que se mueve con la partícula (Brito I., 2013).

1.5.2.4.2 Distribución de polidispersidad

La interpretación de datos de las muestras polidispersidad es considerablemente más difícil. Dado que la técnica no cuenta a las partículas individualmente, la información de la distribución de tamaño debe ser obtenida de la deconvolución de la suma sobre todos los exponenciales individuales que contribuyen a la FAC medida. La deconvolución general de una suma de exponenciales individuales es difícil. El problema puede ser resumido por las ecuaciones 1.22 y 1.23 que definen el campo de la FAC normalizando $g(\tau)$ como la suma de m tamaños de partícula, cada uno de los cuales contribuyen con una fracción $A(\Gamma_i)$ al tamaño de clase i -ésima

$$g(\tau) = A(\Gamma_1)\exp(-\Gamma_1\tau) + A(\Gamma_2)\exp(-\Gamma_2\tau) + A(\Gamma_3)\exp(-\Gamma_3\tau) + \dots$$

$$= \sum_{i=1}^m A(\Gamma_i)\exp(-\Gamma_i\tau) \quad (1.22)$$

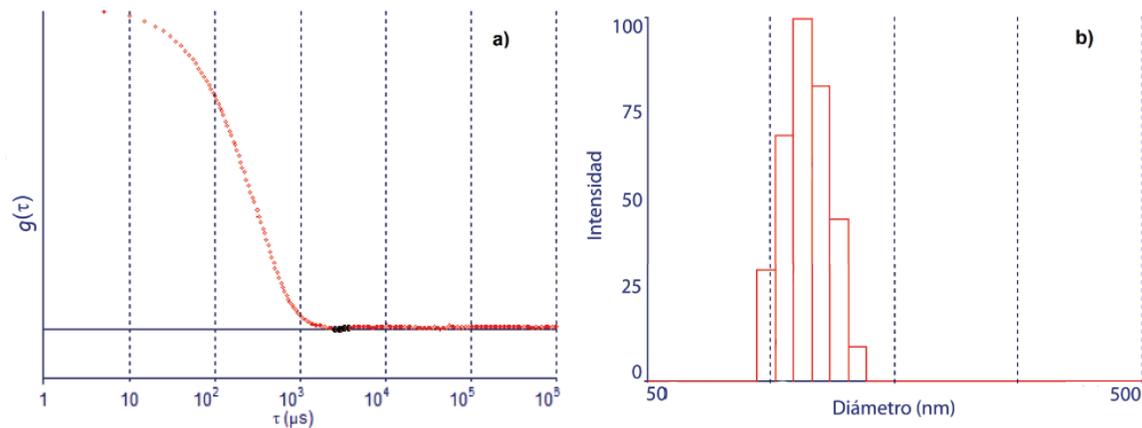


Figura 1.12 a) FAC proporcionada por el analizador de tamaños de partícula para una muestra estándar de partículas de látex. B) Distribución monodispersidad de tamaños de una muestra estándar d partículas de látex, tiene un máximo como correspondiente a 87.9 nm, un ancho de 19.2 nm.

Aquí Γ_i es el valor definido en la ecuación 1.18. $g(\tau)$ está definida en la ecuación 1.23 mediante la integración en todo el rango de tamaños de partícula

$$g(\tau) = \int_{\Gamma_{min}}^{\Gamma_{max}} A(\Gamma) \exp(-\Gamma\tau) d\Gamma \quad (1.23)$$

donde $A(\Gamma)$ representa la distribución de ancho de línea de la distribución de tamaños de partículas. Γ_{min} y Γ_{max} definen el rango del ancho; en principio, $\Gamma_{min} = 0$ y $\Gamma_{max} = \infty$. La función $g(\tau)$ se puede calcular a partir de una distribución conocida $A(\Gamma)$, pero la transformación inversa para extraer $A(\Gamma)$ a partir de $g(\tau)$ es extremadamente difícil de realizar. En presencia de ruido, existen diversas soluciones para la forma funcional de $A(\Gamma)$. Una repetición de la medición sobre la misma muestra producirá un $g(\tau)$ un poco diferente debido a la contribución de ruido, resultando en una diferente $A(\Gamma)$ y por lo tanto en una distribución de tamaño diferente $A(d)$. Este comportamiento puede hacer que los resultados de un instrumento DLS sean aparentemente “no reproducibles”. Por estas razones físicas fundamentales el DLS no es considerado como una técnica de alta resolución para determinar el tamaño de las partículas. Las soluciones numéricas de la ecuación 1.21 han demostrado que $A(\Gamma)$ se puede calcular en retrasos de tiempo espaciados experimentalmente. El método de muestreo exponencial introduce el parámetro w que limita la resolución de $A(\Gamma)$ para un nivel determinado de ruido en la ecuación 1.24

$$\Gamma_{i+1} = \Gamma_i \exp^{\frac{\pi}{\omega}} \quad (1.24)$$

Aquí ω es el valor más grande para una cantidad de ruido en g y por lo tanto define la mejor resolución posible para Γ_i y Γ_{i+1} . Si la rutina de inversión requiere una resolución más alta de la que puede ser provista por la FAC, las distribuciones de Γ exhibirán máximos adicionales y valores negativos para $A(\Gamma)$. El límite práctico para la relación Γ_{i+1}/Γ_i , es 2 y la mayoría de las restricciones que son necesarias aplicar son las de no negatividad (sólo se permite $A(\Gamma)$ cero o positivo).

Aparte del contenido de ruido de la FAC, los errores de la línea base aportan una cantidad significativa de ambigüedades a cualquiera de las rutinas de transformación, la normalización iterativa repetida de la FAC puede mejorar la estabilidad de los resultados. Sólo unos pocos parámetros de la distribución pueden ser calculados a partir de las mediciones experimentales de la función de la correlación, por lo que pueden ser consideradas relativamente insensibles a la distribución de tamaño particular y sólo se pueden obtener algunos momentos de la distribución, salvo para las muestras monodispersidad en las que la técnica funciona muy bien (Brito I., 2013).

1.5.3 Liofilización

La liofilización es un proceso de conservación mediante la sublimación utilizado con el fin de reducir la pérdida de los componentes volátiles o termosensibles. Es el más noble proceso de conservación de productos biológico conocido, porque aúna los dos métodos más fiables de conservación, la congelación y la deshidratación (Ramírez Nava, 2006).

La metodología de la liofilización es un proceso de estabilización en el cual el material primero se congela y se concentra el solvente, comúnmente agua, reduciéndolo mediante sublimación y desorción, a niveles que no sostendrán más el crecimiento biológico o las reacciones químicas. Consta de tres fases: sobrecongelación, desecación primaria y desecación secundaria (Moreira et al., 1994).

CAPÍTULO II.

METODOLOGÍA

2.1. Materiales y equipo

El polímero utilizado (poli(uretano urea) segmentado biodegradable con peso molecular promedio de 128,000 mg/mol fue sintetizado y proporcionado por el equipo de trabajo de la Dra. Lerma Hanaiy Chan Chan (Chan Ch., 2012). El surfactante utilizado fue Poloxamer 188 marca Lutrol®. El agua que se utilizó fue Agua desionizada calidad Milli-Q, filtrada en un equipo Millipore. El tetrahidrofurano (THF) fue adquirido en Sigma-Aldrich.

Los equipos utilizados fueron: báscula marca *Precisa*, modelo *XR205SM-DR*, sonicador marca VWR, modelo 75D, placa magnética marca IKA, modelo RCT basic safety control, sensor de temperatura marca IKA, modelo ETS-D5 y rotovapor marca Buchi, modelo R215.

Para medir el índice de refracción del Poloxamer 188 a sus diferentes concentraciones se utilizó el refractómetro marca Metler Toledo, modelo RE40D. El aparato de dispersión dinámica de luz utilizado fue de la marca Brookhaven Instruments, modelo BI-200SM y el microscopio electrónico de barrido de la marca JEOL, modelo JSM 6360LV.

2.2. Diseño Experimental

Las nanopartículas se prepararon por el método de nanoprecipitación y una metodología de diseño experimental. Previamente, se eligieron 4 variables independientes o factores: temperatura de precipitación, concentración de poliuretano, concentración de surfactante y velocidad de agitación. Se eligieron 3 niveles o valores para cada factor, como se muestra en la tabla 2.1.

Mediante el programa MINITAB 17, se generó el diseño experimental de Taguchi L9, para 4 factores y 3 niveles. El diseño obtenido se muestra en la tabla 2.2. Cada experimento se realizó por triplicado.

Factor	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Temperatura [°C]	5	25	45
Concentración de poliuretano [mg/mL]	0.75	3	9
Concentración de surfactante [%m/v]	0.025	0.125	0.25
Velocidad de agitación [RPM]	400	800	900

Tabla 2.1. Factores a variar en el diseño experimental.

Temperatura [°C]	Concentración de Polímero [mg/mL]	Concentración de surfactante [%m/v]	Velocidad de agitación [RPM]
5	0.75	0.025	400
5	3	0.125	800
5	9	0.25	1200
25	0.75	0.125	1200
25	3	0.25	400
25	9	0.025	800
45	0.75	0.25	800
45	3	0.025	1200
45	9	0.125	400

Tabla 2.2. Diseño experimental de Taguchi L9 utilizado.

2.3. Preparación de nanopartículas de poliuretano

Inicialmente se prepararon 250 ml de las soluciones de surfactante (Poloxamer 188) en las tres concentraciones necesarias para preparar las muestras. Las soluciones de poliuretano (PU) se prepararon disolviendo PU en Tetrahidrofurano (THF) necesario para alcanzar la concentración deseada. A continuación se procedió a sonicar durante 20 min con baño térmico constante de 50°C previo a la nanoprecipitación.



Figura 3.1 *Sonicador marca VWR, modelo 75D, programado para sonicar por 20 minutos con baño térmico con temperatura de 50°C.*

Mientras la solución de PU se disolvía, se estabilizó la temperatura de 4 ml del surfactante en la placa magnética. Además se fijó la velocidad de agitación correspondiente.



Figura 3.2 Sistema de precipitación con control de temperatura y agitación.

Una vez estabilizadas las condiciones, se tomó 2 ml de la solución de PU y se precipitó con ayuda de una jeringa en los 4 ml de medio con las condiciones correspondientes a cada experimento. La suspensión obtenida se colocó en el rotavapor Buchi. Una vez que fue evaporado el THF se completó un volumen de 4 ml con agua destilada.



Figura 3.3 Sistema de evaporación a presión reducida.

2.4. Caracterización de nanopartículas de poliuretano

La caracterización de las nanopartículas se llevó a cabo midiendo la polidispersidad y el tamaño del diámetro efectivo mediante el equipo DLS. Además se liofilizaron y se observaron al microscopio electrónico de barrido.

2.4.1 Liofilización

Se utilizaron microtubos de 1.5 ml que fueron pesados vacíos en una micro balanza. A continuación se les agregó 1 ml de suspensión de nanopartículas de cada tratamiento y se liofilizaron por 24 hrs. Después se pesaron los tubos con muestra y se recolectó este dato.

2.4.2 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Cada una de las muestras fue analizada en el DLS con un ángulo fijo de 90°, baño térmico a temperatura constante de 25°C, una abertura del obturador de 100 micras, láser de longitud de onda de 637 nm y con potencia de 5 mW.

Antes de comenzar con el análisis de las muestras en DLS se midió el índice de refracción y viscosidades de cada una de las concentraciones del Surfactante (Poloxamer 188), esto con el fin de introducir los datos correctos al momento de hacer las pruebas y tener resultados óptimos, ya que este dato se utiliza directamente en la ecuación de Stokes- Einstein para determinar el diámetro efectivo de manera indirecta.

El procedimiento para el DLS para cada una de las muestras fue el mismo. Primero se colocó 1.5 ml de la muestra deseada en un tubo de cuarzo y a continuación se introdujo la muestra en el DLS. Se dejó correr el experimento por 2 minutos. La lectura se realizó por triplicado. Las muestras muy turbias fueron diluidas en proporción 1:10 o 1:20.

Una vez finalizado el experimento se recolectaron los datos de diámetro efectivo, polidispersidad, la gráfica de autocorrelación y la gráfica de señal.

2.4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (JEOL, JSM 6360LV) para analizar la morfología de la superficie de las nanopartículas.

Una gota de cada suspensión fue colocada sobre cinta de carbono y evaporada bajo presión reducida. Una vez secas, las muestras fueron recubiertas con oro y analizadas en el microscopio.

Se realizó esta prueba para las muestras antes de liofilizar y después de liofilizar para ver cómo afectaba la liofilización a las nanopartículas de poliuretano.

CAPÍTULO III.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Nanopartículas obtenidas

En primera instancia se pudo observar que las muestras preparadas fueron afectadas por la concentración de polímero empleada para la nanoprecipitación como lo muestra la figura 3.1, donde se puede observar un aumento en la turbidez de las suspensiones proporcional al aumento de la concentración de polímero.

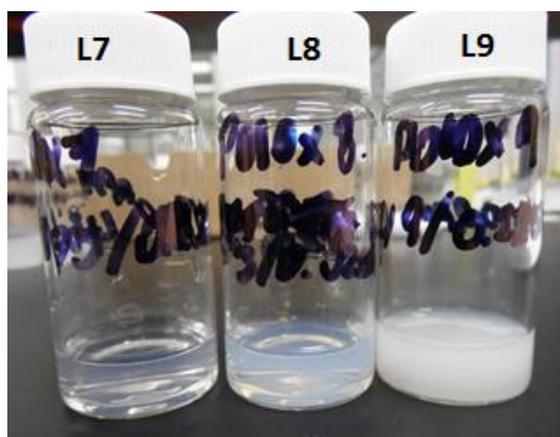


Figura 3.1. Muestras representativas con diferentes concentraciones de PU. L7) 0.75m/ml, L8) 3 mg/mL y L9) 9 mg/mL.

3.2 Análisis de Taguchi

El método experimental de Taguchi (también conocido como de arreglo ortogonal o Taguchi ortogonal) fue muy útil para analizar el efecto variables independientes, sobre las variables de respuesta; es decir, sobre el diámetro efectivo y el índice de polidispersidad obtenidos mediante el análisis de las muestras en el DLS.

El diseño Taguchi también es usado para identificar las condiciones óptimas para la preparación de las nanopartículas (Dinh-Duy & Elias F., 2015) para lo cual cuenta con tres modalidades: El más bajo es mejor, el más alto es mejor, y el nominal mejor. Consideramos óptimas a las nanopartículas más pequeñas e índices de polidispersidad reducidos, por lo que en los dos casos el análisis se llevó a cabo basado en la modalidad '*el más bajo es mejor*'.

El diseño experimental llevado a cabo mediante MINITAB 17, nos permitió elegir un arreglo ortogonal L9, el cual proporciona información de cuatro factores a tres niveles, utilizando nueve condiciones experimentales. Un L9 tiene ocho grados de libertad. Su uso permite hacer ocho comparaciones ortogonalmente. Los ocho grados de libertad pueden descomponerse en dos grados de libertad por columna, requiriendo una columna para cada factor.

La tabla 3.1 muestra la estructura del diseño Taguchi L9 y los resultados de la medición del diámetro efectivo e índice de polidispersidad obtenidos por DLS. Para cada muestra (n=9) se reporta el promedio de tres repeticiones en la preparación y cada a cada una de ellas se le realizaron tres lecturas en el DLS. Los resultados experimentales fueron analizados por medio del software MINITAB17 utilizando el análisis de Taguchi para extraer de manera independiente los efectos principales de los factores.

Se puede observar de los datos obtenidos por DLS que hay una relación entre concentración de poliuretano y el tamaño de nanopartícula. Entre menor es la concentración de poliuretano menor es el diámetro efectivo de la nanopartícula obtenida. No se observa una variabilidad muy clara en el diámetro efectivo respecto a la variabilidad de los otros tres factores.

Corrida	Surfactante [%m/v]	Concentración de poliuretano	Temperatura de precipitación	Velocidad de agitación	Diámetro Efectivo [nm]	Polidispersidad
1	0.025	0.75	5	400	89.32±1.14	0.179±0.051
2	0.125	3	5	800	92.14±5.08	0.119±0.016
3	0.25	9	5	1200	174.70±29.74	0.212±0.041
4	0.125	0.75	25	1200	62.88±2.45	0.163±0.005
5	0.25	3	25	400	113.08±13.04	0.122±0.017
6	0.025	9	25	800	204.39±12.51	0.197±0.039
7	0.25	0.75	45	800	76.50±1.49	0.250±0.037
8	0.025	3	45.2	1200	101.44±5.08	0.162±0.027
9	0.125	9	45	400	218.57±15.61	0.179±0.030

Tabla 3.1. Diseño Taguchi L9 y resultados obtenidos por DLS.

3.3 Diámetro efectivo

3.3.1. Análisis de medias y relaciones S/N

Para analizar estos resultados, el método de Taguchi utiliza una medida estadística llamada señal a ruido (S/N) tomada de la teoría de control eléctrico. La relación S/N desarrollado por el Dr. Taguchi es una medida de rendimiento para elegir niveles de control mejores que hacer frente al ruido. La relación S/ N tiene en cuenta tanto la media y la variabilidad. En su forma más simple, la relación S/N es la proporción de la media (señal) y a la desviación estándar (ruido) (Cruz T. et al., 2012).

La figura 3.2 y 3.3 presentan los resultados obtenidos por el análisis Taguchi mediante la gráfica de efectos principales para medias y la gráfica para efectos principales para relaciones S/N respectivamente. En cada una de las gráficas de efectos principales de medias tenemos en el eje y el diámetro efectivo de las nanopartículas obtenidas (en nanómetros), mientras que en el eje x están los cuatro factores con sus tres niveles correspondientes. Mientras que en el caso de las gráficas S/N en el eje y se encuentra la media de S/N y nuevamente en el eje x están los cuatro factores con sus tres niveles correspondiente. Como se realizó el análisis de Taguchi en modalidad el más bajo mejor, los puntos que son más óptimos se ubican arriba de la gráfica S/N.

En la figura 3.2 se observa que la media del diámetro efectivo en todos los casos varía aproximadamente entre los 70 y 200 nm bajo las condiciones estudiadas. Esto es importante ya que se considera que el límite aceptado para liberación pasiva de medicamentos mediante nanopartículas a través de la piel, es de 500nm y en muchos tumores las aberturas de los vasos sanguíneos son menores a 200nm, lo que permite a estas nanoparticulas ser consideradas para muchas aplicaciones en el campo de la nanomedicina (Prasad R. et al., 2011).

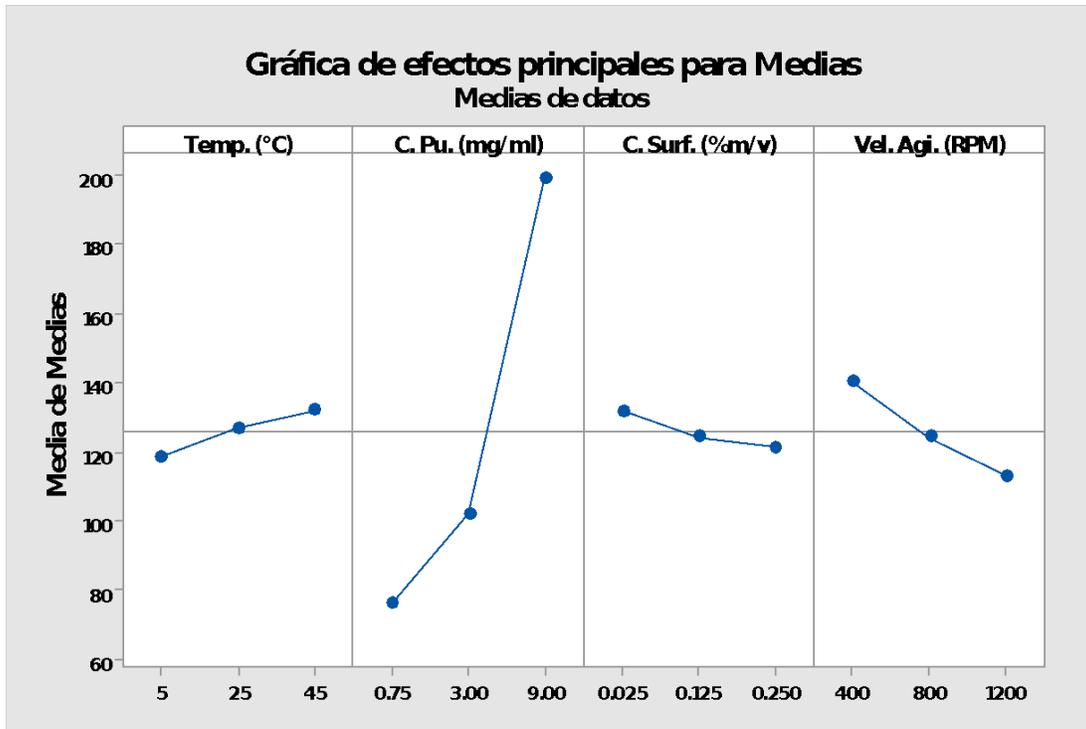


Figura 3.2 Efectos principales para medias.

Aunque la temperatura no parece afectar el diámetro de las partículas, en el caso de la concentración de poliuretano se puede observar que el diámetro efectivo aumenta significativamente conforme se aumenta la concentración de poliuretano. Por otro lado, las nanopartículas disminuyen su diámetro efectivo conforme se aumenta la concentración de surfactante, variando aprox. entre 120 y 130 nm. En el caso de la velocidad de agitación, cuando esta aumenta el diámetro efectivo disminuye, variando aproximadamente entre 110 y 140 nm.

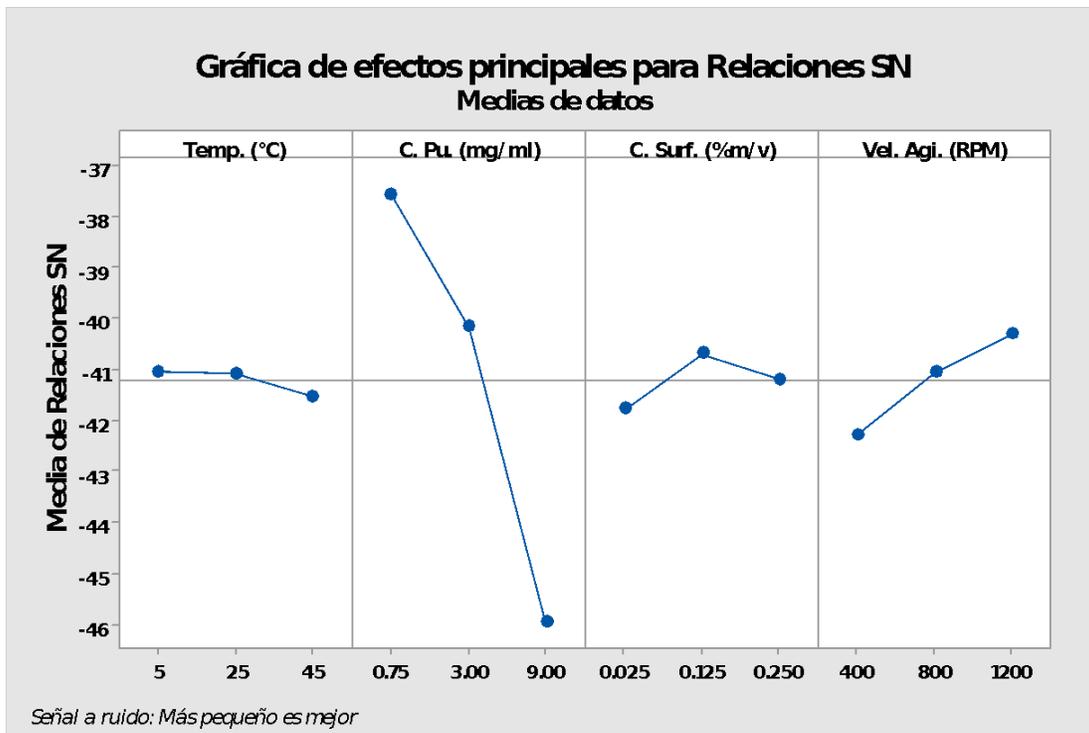


Figura 3.3 Efectos principales para relaciones S/N.

La gráfica 3.3 muestra los efectos principales para la relación señal-ruido. Para el caso de la temperatura vemos que varía ligeramente. En el caso de la concentración de poliuretano es muy notorio que para obtener partículas más pequeñas se debe de utilizar la concentración más baja, es decir, 0.75 mg/mL. El óptimo para la concentración de surfactante se encuentra en el nivel intermedio, 0.125 %m/v. Mientras que para la agitación se observa que el punto óptimo se encuentra a la mayor velocidad, 1,200 rpm.

Debido al cambio tan drástico en la pendiente, en ambas gráficas puede observarse el fuerte efecto de la concentración del PU. Mientras que los demás factores parecen afectar poco al tamaño de las nanopartículas ya que la pendiente no varía mucho. De acuerdo a la gráfica de relaciones S/N el óptimo se encuentra

a baja temperatura, baja concentración de PU, un porcentaje de surfactante intermedio y alta velocidad de agitación.

Este efecto obtenido usando concentraciones de polímero en la fase orgánica en el rango de 0.75 a 9 mg/mL es similar a los estudios realizados con otros polímeros (Galindo R. et al., 2004). En este caso, con la concentración de 9mg se formaron agregados adicionalmente a las nanopartículas, eso es debido a la tendencia general de las mezclas solvente-polímero a alcanzar una concentración crítica. Comparando las diferentes concentraciones, se observó en todos los casos, que el incremento en la concentración de polímero, resulta en un incremento del tamaño de partícula promedio. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura (Galindo R. et al., 2004).

Este comportamiento puede ser explicado por el efecto de: i) el número de cadenas poliméricas por unidad de volumen de solvente y ii) la influencia de la concentración de polímero sobre la viscosidad. En el primer caso, como consecuencia de un mayor número de cadenas poliméricas por unidad de volumen de solvente, el solvente se difunde a la parte acuosa sacando más cadenas poliméricas los cuales se agregan con otras cadenas y forman partículas más grandes (Galindo R. et al., 2004).

Este fenómeno también es favorecido por el hecho de que incrementando la concentración de polímero se incrementan las interacciones, lo cual significa que más cadenas poliméricas permanecen asociadas durante el proceso de difusión. Por otra parte, un aumento en la concentración del polímero aumenta la viscosidad de la fase orgánica, esto produce una alta resistencia a la transferencia de masa, entonces la difusión del polímero-disolvente a la fase acuosa es reducida y como consecuencia tenemos partículas más grandes. En contraste, una disminución en la concentración de polímero, disminuye la viscosidad de la fase orgánica lo cual incrementa la eficiencia en la distribución de la fase polímero-disolvente a la fase acuosa conduciendo a la formación de nanopartículas más pequeñas. Aquí un incremento de la viscosidad de la fase orgánica está relacionado a un incremento

de las interacciones polímero-polímero y polímero-disolvente (Galindo R. et al., 2004).

3.3.2. Análisis estadístico ANOVA de dos vías

Debido a que se llevaron a cabo tres experimentos por cada conjunto de condiciones y el análisis por DLS se llevó a cabo por triplicado (n=9), es posible realizar un análisis ANOVA de dos vías, para determinar qué factores son estadísticamente significantes y observar la interacción por cada par de factores.

Una tabla ANOVA es comúnmente usada para resumir las pruebas desarrolladas. La tabla 4.1 presenta los resultados obtenidos después de hacer el análisis a cada par de factores. Desarrollando la prueba Fisher (F-Test) deben ser calculados la suma cuadrática y el cuadrado medio para cada factor. El cuadrado medio es igual a la suma cuadrática dividida entre los grados de libertad asociados con el parámetro de diseño (factor). Entonces el valor F de cada parámetro de diseño es la razón del cuadrado medio entre el cuadrado medio del error. El valor F es comparado con una F crítica de 2 y 8 grados de libertad para los factores y una F crítica de 4 y 8 grados de libertad para las interacciones; es decir $F_{0.05}(2,8)=4.46$ y $F_{0.05}(4,8)=3.84$.

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumas cuadráticas	Cuadrados medios	valor F	Valor P
A	2	253716.960 2	126858.480 1	752.90062	0
B	2	727.00543	363.50272	2.15738	0.12305

C	2	718.32173	359.16086	2.13161	0.12607
D	2	6459.01136	3229.50568	19.167	2.12047E-7
A*B	4	7177.33309	1794.33327	10.6493	7.78954E-7
A*C	4	7186.01679	1796.5042	10.66219	7.66989E-7
A*D	4	1445.32716	361.33179	2.14449	0.08401
B*C	4	260175.971 6	65043.9929	386.03381	0
B*D	4	254435.281 9	63608.8204 9	377.51612	0
C*D	4	254443.965 6	63610.9914 2	377.529	0
Modelo	8	261621.298 7	32702.6623 5	194.08915	0
Error	72	12131.4955 6	168.49299	--	--
Total	80	273752.794 3	--	--	--

Tabla 4.2 Análisis ANOVA de dos vías para en diámetro efectivo de las nanopartículas con respecto a la concentración de PU (factor A), la temperatura de precipitación (factor B), concentración de surfactante (factor C) y velocidad de agitación (factor D).

Al examinar la tabla 4.2 podemos observar que la concentración de polímero y la velocidad de agitación afectan por sí solos al tamaño de partícula; sin embargo, los análisis de las interacciones muestran que todos los factores contribuyen de manera importante al diámetro efectivo resultante.

3.3.3. Análisis por gráficas de contorno

Una gráfica de contorno es útil para explorar la posible relación entre tres variables. Las gráficas de contorno muestran la relación tridimensional en dos dimensiones, con los factores X y Y (predictores) graficados en las escalas X, Y y los valores de respuesta representados por contornos. Una gráfica de contorno es como un mapa topográfico en el que se trazan valores de X, Y y Z en lugar de longitud, latitud y elevación (Minitab17, 2016). Las figuras 3.4 a 3.9 las combinaciones entre dos factores y una variable de respuesta.

Mediante la generación de gráficas de contorno utilizando software de computadora podemos caracterizar un punto óptimo, mediante la localización del punto estacionario.

El punto estacionario podría representar: 1) un punto de respuesta máxima, 2) un punto de respuesta mínima o 3) un punto de silla (Montgomery, 2006). Los sistemas de cordillera (o cresta) también son comunes, estos pueden ser estacionarias, crecientes o descendente.

La gráfica 3.4 muestra el efecto que tiene la concentración de polímero y la temperatura respecto al diámetro efectivo. Podemos ver que es una cordillera ascendente, lo que nos indica que conforme aumenta la concentración de polímero va aumentando el tamaño de partícula. La curvatura entre las franjas de colores nos indica la interacción entre los dos parámetros.

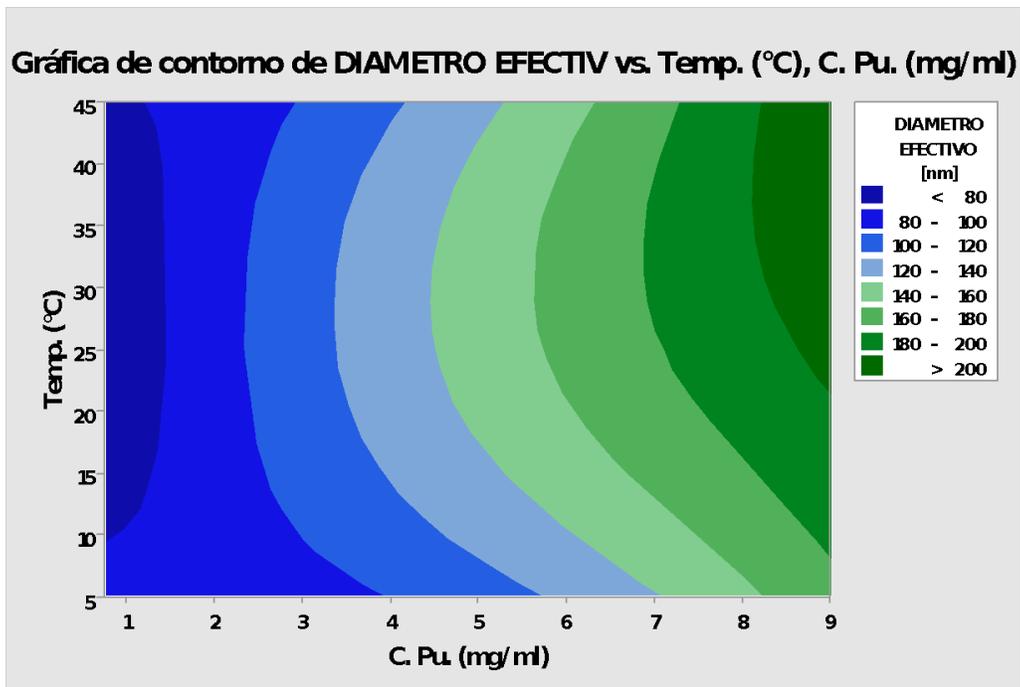


Figura 3.4. Efecto de la Concentración de polímero y la temperatura de precipitación respecto al diámetro efectivo.

En la figura 3.5 se observa el efecto de la concentración de surfactante y la concentración de polímero respecto al diámetro efectivo. Nuevamente se observa una cordillera ascendente, lo que indica que el diámetro efectivo de las nanopartículas aumenta conforme se aumenta la concentración de polímero con una ligera interacción con la concentración de surfactante.

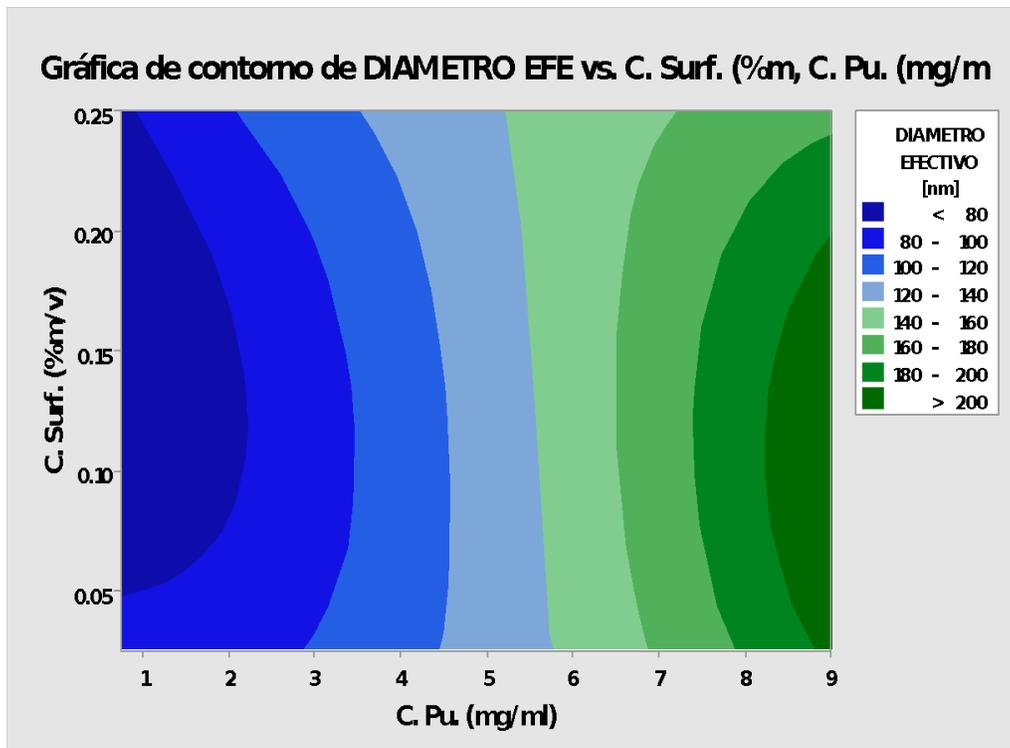


Figura 3.5. Efecto de la concentración de polímero y la concentración de surfactante respecto al diámetro efectivo.

En el caso de la figura 3.6 se observa algo un poco diferente. Aquí también se observa una cordillera ascendente, pero en este caso con una ligera inclinación debido a los que los dos factores influyen significativamente como se observó mediante el análisis Anova de dos vías. En este caso el tamaño de partícula disminuye conforme se disminuye la concentración de polímero y, también, conforme se va aumentando la velocidad de agitación al momento de hacer la nanoprecipitación.

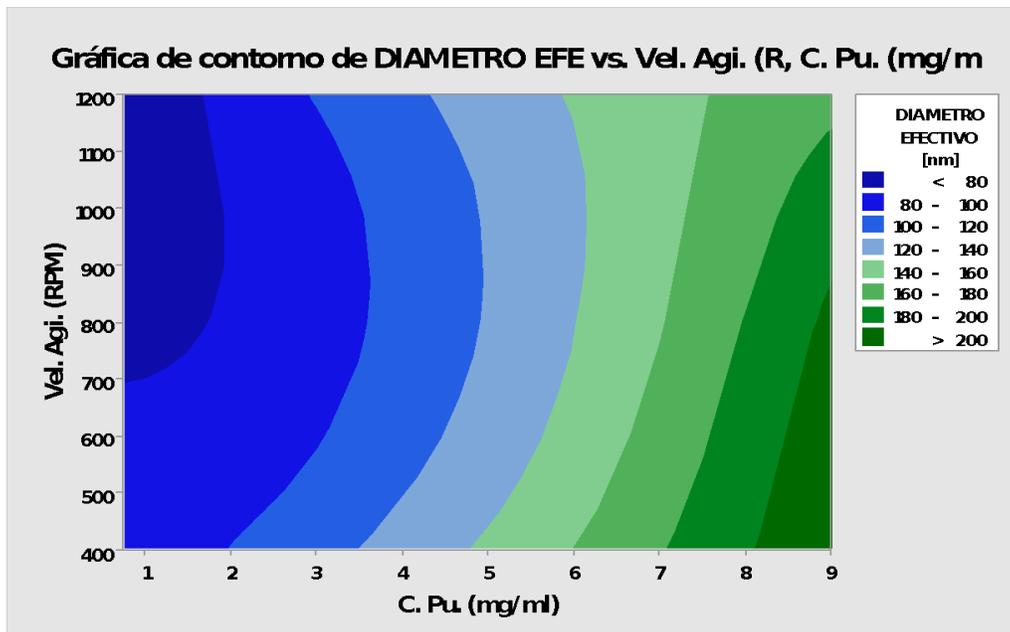


Figura 3.6. Efecto de la concentración de polímero y la velocidad de agitación respecto al diámetro efectivo.

La figura 3.7 analiza el efecto de la concentración del surfactante y la temperatura respecto al diámetro efectivo. En esta gráfica se encontró un sistema de respuesta máxima, es decir un óptimo. Esta área óptima está aproximadamente con temperatura entre 7 y 32 °C, y con concentración de surfactante entre 0.8 y 0.23 %m/v.

En el caso de la figura 3.8 se analiza la velocidad de agitación y la temperatura respecto al diámetro efectivo. Esta gráfica presenta sistemas de respuesta mínima, es decir, un área donde se forman partículas de mayor tamaño.

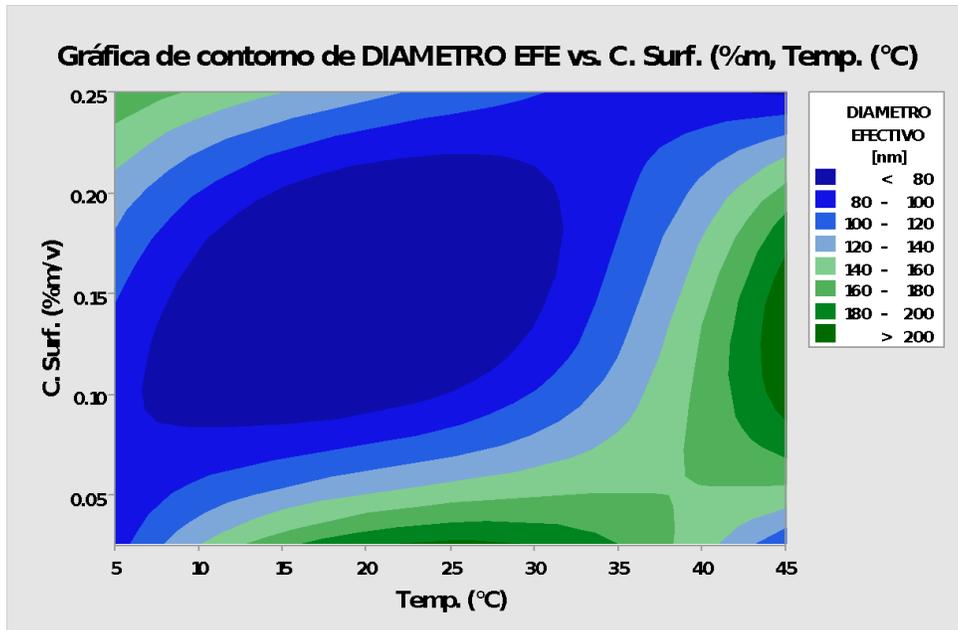


Figura 3.7 Efecto de la concentración de la temperatura y la concentración de surfactante respecto al diámetro efectivo.

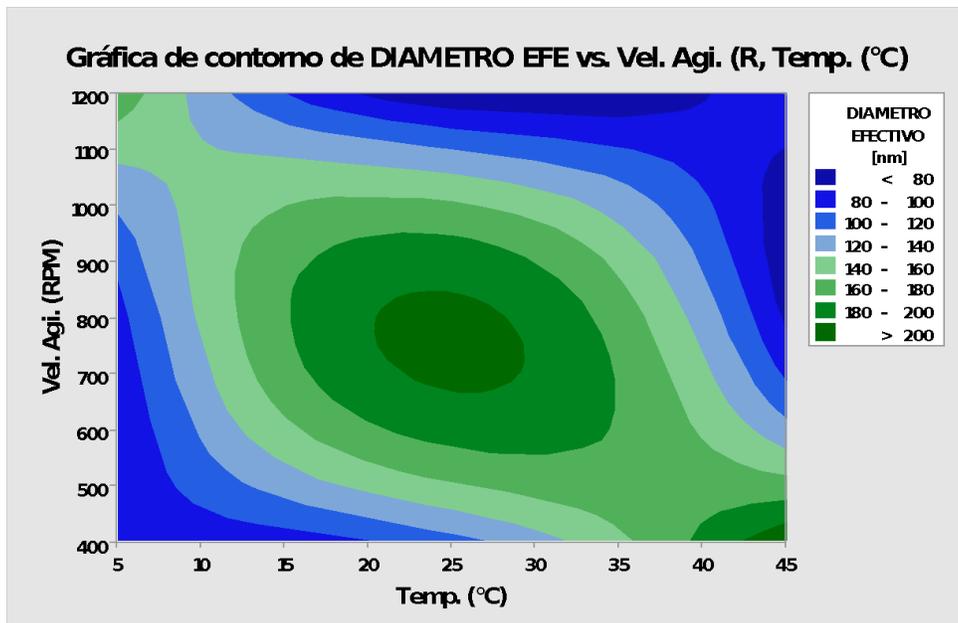


Figura 3.8 Efecto de la temperatura de precipitación y la velocidad de agitación respecto al diámetro efectivo.

Por otro lado, la figura 3.9, donde se analiza la concentración de surfactante y la velocidad de agitación respecto al diámetro efectivo, se muestra una cresta estacionaria. Esto quiere decir que no solo es un punto óptimo, sino que hay toda una franja, entre estos dos parámetros, donde se obtienen nanopartículas pequeñas.

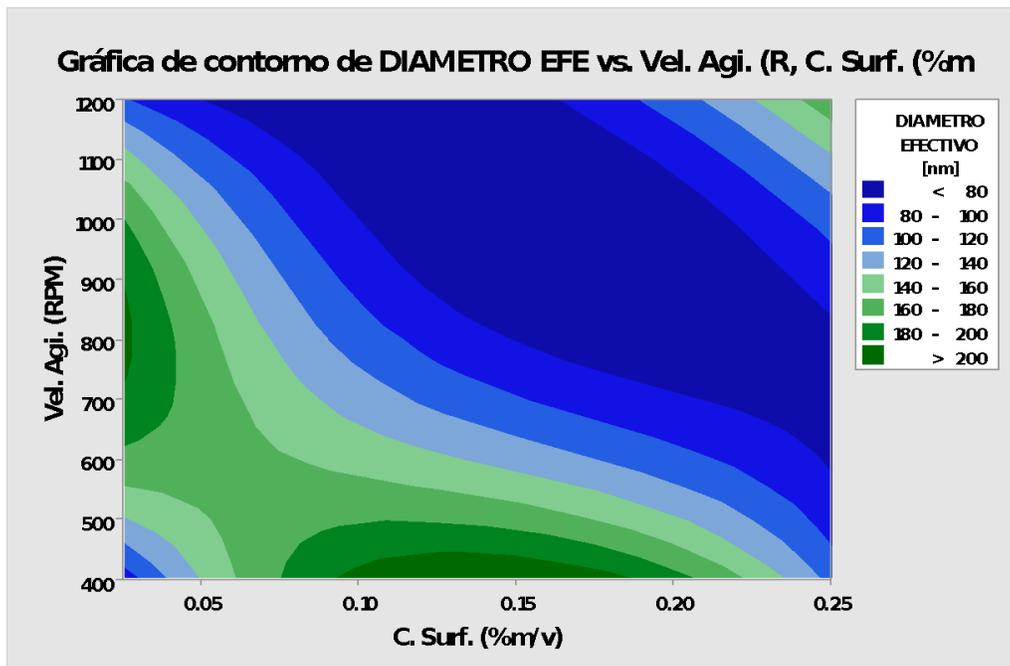


Figura 3.9 Efecto de la concentración de surfactante y la velocidad de agitación respecto al diámetro efectivo.

Mediante la observación de las tres gráficas deducimos que obtenemos una respuesta óptima a una concentración de surfactante intermedia, una velocidad alta y una temperatura alta.

3.4. Índice de Polidispersidad (IPD)

El índice de polidispersidad indica el ancho de la distribución de tamaño de partícula. El valor se encuentra en el rango de 0 a 1. Cuando es cerca de cero, las partículas son más homogéneas. Las muestras mostraron índices de polidispersidad entre 0.1-0.3 lo que puede considerarse una polidispersidad moderada (Zorzi, Carvalho, Von Poser, & Teixeira, 2015). El análisis estadístico realizado a los IPD mostró que estos se ven afectados por los factores que fueron controlados en la preparación de las nanopartículas, tal y como puede verse a continuación.

3.4.1. Análisis de medias y relaciones S/N

Analizando la gráfica de efectos principales para las medias del índice de polidispersidad (Figura 3.10), observamos que para el caso de la temperatura la polidispersidad disminuye conforme aumenta la temperatura, sin embargo, es poca la variación. Para la concentración de poliuretano no se observa un comportamiento lineal, teniendo un IDP más bajo en el nivel intermedio, es decir, con una concentración de polímero de 3 mg/mL. Además, se observa que conforme se va aumentando la concentración de surfactante el IDP disminuye. Por otra parte, en el caso de la velocidad de agitación también se observa que en el nivel intermedio se tiene menor IDP, es decir a 800 rpm.

En el caso de la figura 3.11 observamos la gráfica S/N. En este caso el óptimo se considera la polidispersidad más baja, por lo tanto, seguimos trabajando con el análisis en la modalidad de el “más bajo mejor”. Para la temperatura se puede observar que el punto óptimo se encuentra en el nivel más alto de temperatura, es decir, a 45°C. Además, para el nivel medio de concentración de poliuretano se encuentra el menor IDP, estando el óptimo en 3 mg/mL. Para la concentración de surfactante el óptimo de IDP se encuentra en 0.250 %m/v, siendo el nivel más alto.

Mientras que en el caso de la velocidad de agitación se puede observar el punto óptimo en el nivel medio, es decir, a una velocidad de agitación de 800 rpm.

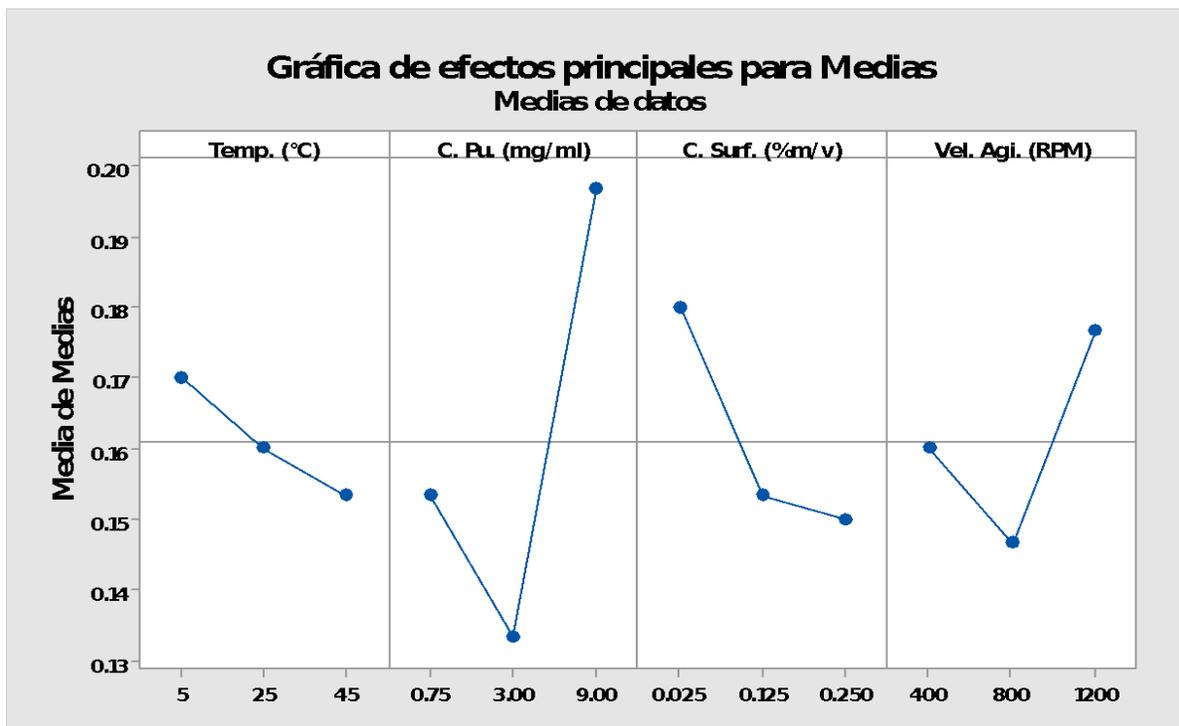


Figura 3.10. Gráfica de efectos principales para medias de la polidispersidad.

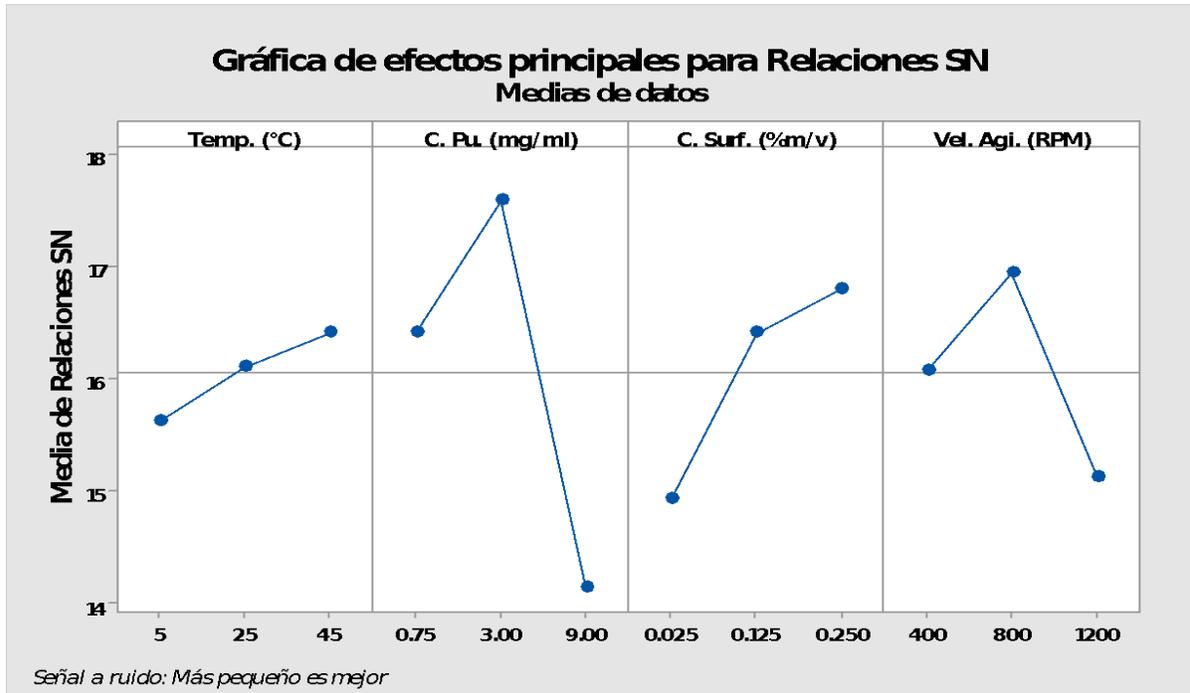


Figura 3.11. Gráfica de efectos principales para relaciones SN para la polidispersidad.

3.4.2. Análisis ANOVA de dos vías

El análisis ANOVA que se muestra en la tabla 3.3 nos permitió confirmar que las medias de los factores varían de manera significativa excepto con la variación de la temperatura. Sin embargo, el análisis de las interacciones muestra que todos los factores afectan de manera significativa.

Fuente de variación	Grados de libertad	Sumas cuadráticas	Cuadrados medios	valor F	Valor P
A	2	0.0553	0.02765	26.24369	2.7508E-9
B	2	0.0044	0.0022	2.08979	0.13115
C	2	0.01408	0.00704	6.68336	0.00218
D	2	0.01676	0.00838	7.95423	7.56601E-4
A*B	4	0.03085	0.00771	7.31879	5.28456E-5
A*C	4	0.02117	0.00529	5.02201	0.00126
A*D	4	0.01849	0.00462	4.38657	0.00314
B*C	4	0.07206	0.01802	17.09896	6.71862E-10
B*D	4	0.06939	0.01735	16.46352	1.27313E-9
C*D	4	0.05971	0.01493	14.16674	1.41217E-8
Modelo	8	0.09055	0.01132	10.74277	8.23854E-10
Error	72	0.07586	0.00105	-----	-----
Total	80	0.16641	-----	-----	-----

Tabla 3.3 Análisis ANOVA de dos vías para el índice de polidispersidad del tamaño de las nanopartículas con respecto a la concentración de PU (factor A), la temperatura de precipitación (factor B), concentración de surfactante (factor C) y velocidad de agitación (factor D).

3.4.3. Análisis por gráficas de contorno

En la figura 3.12 se observa cómo afecta la concentración de poliuretano y la temperatura respecto al IDP. Se encuentra un óptimo en concentraciones de poliuretano aproximadas entre 2.5 y 5 mg/mL, con una temperatura aproximada entre 3 y 25 °C.

Podemos ver en la figura 3.13 que una cresta ascendente a niveles bajos de concentración de PU y niveles altos de surfactante. Mientras que en la figura 3.14 se observa una cresta descendente en el comportamiento del IDP.

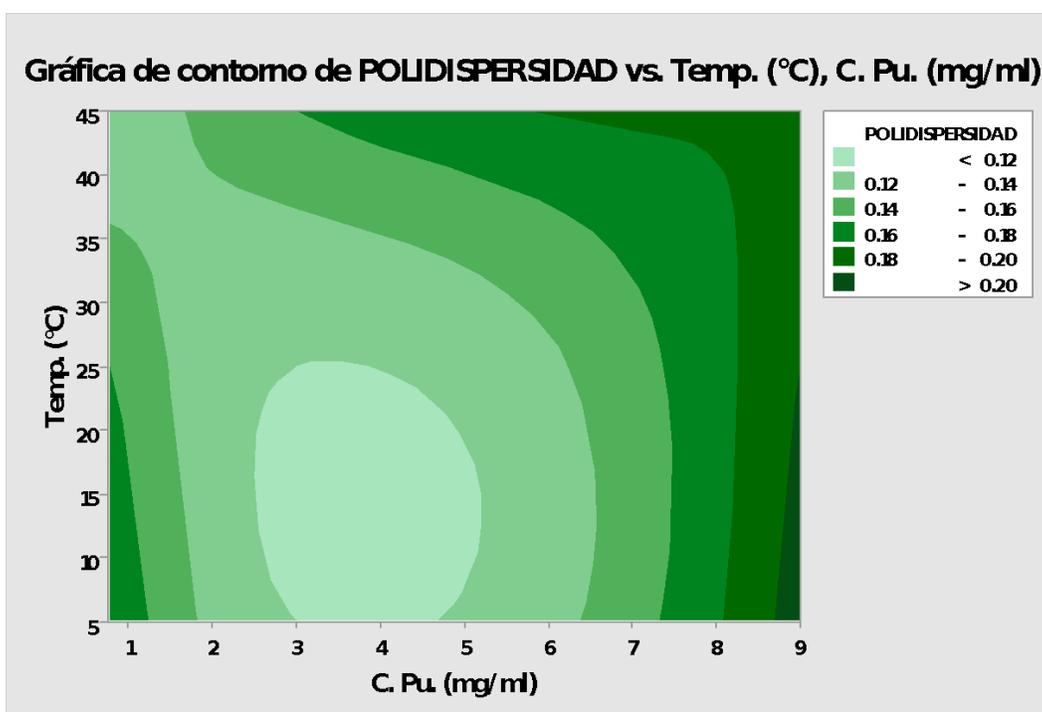


Figura 3.12 Efecto de la Concentración de polímero y la temperatura de precipitación respecto a la polidispersidad.

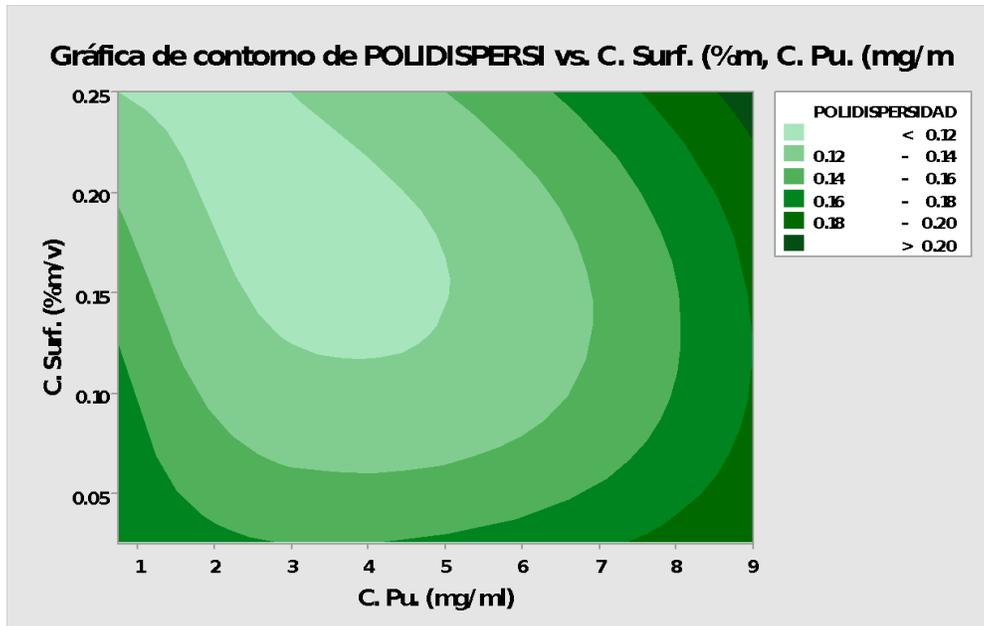


Figura 3.13 Efecto de la concentración de polímero y la concentración de surfactante respecto a la polidispersidad.

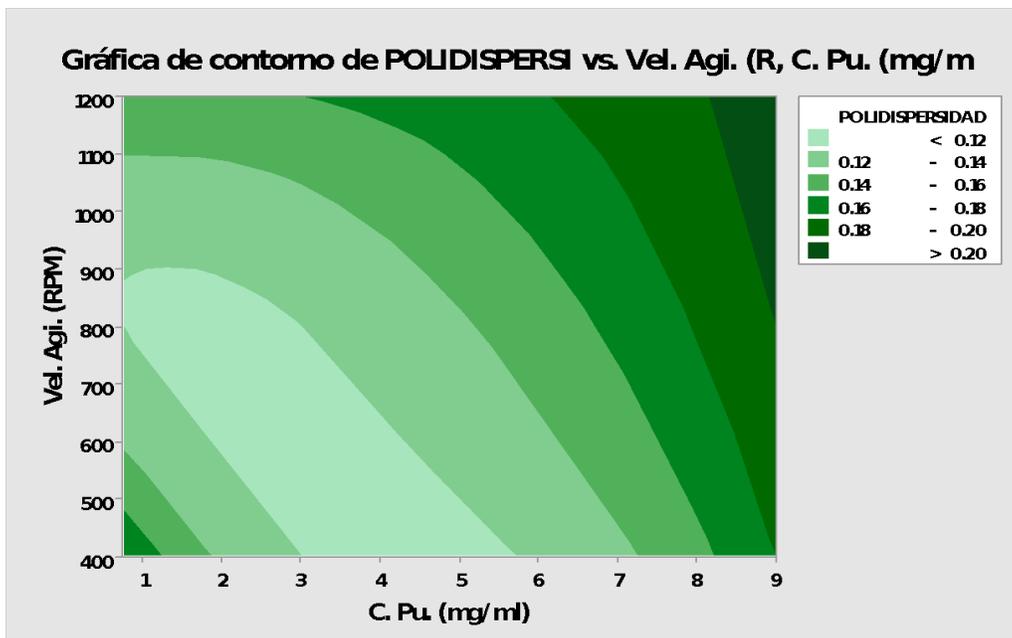


Figura 3.14 Efecto de la concentración de polímero y la velocidad de agitación respecto a la polidispersidad.

En el caso del comportamiento de la temperatura y concentración de surfactante respecto al IDP (Figura 3.15) se observa un óptimo, pero casi fuera de los rangos que estudiados.

La figura 3.16 nos muestra la gráfica de contorno de la temperatura y la velocidad de agitación respecto a el IDP. En esta gráfica se observa un punto de mínima respuesta, es decir, lo contrario de un punto óptimo. Mientras que en la figura 3.17 se observa el efecto de la concentración del surfactante y la velocidad de agitación respecto al IDP. En esta gráfica se tiene el IDP más bajo en una cordillera descendiente

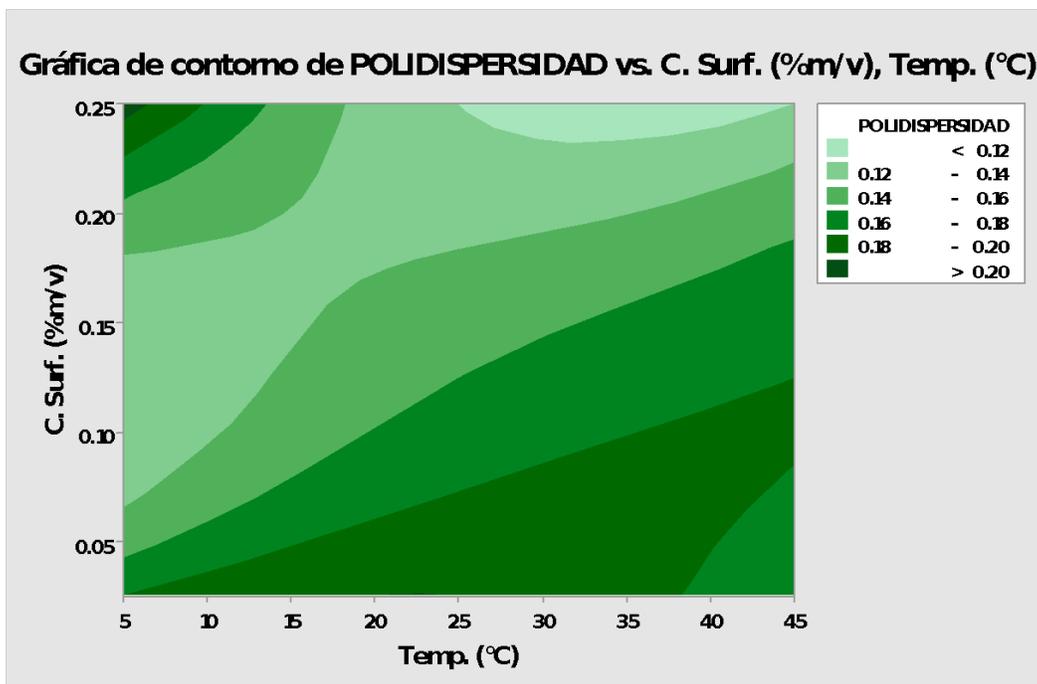


Figura 3.15 Efecto de la temperatura y la concentración de surfactante respecto a la polidispersidad.

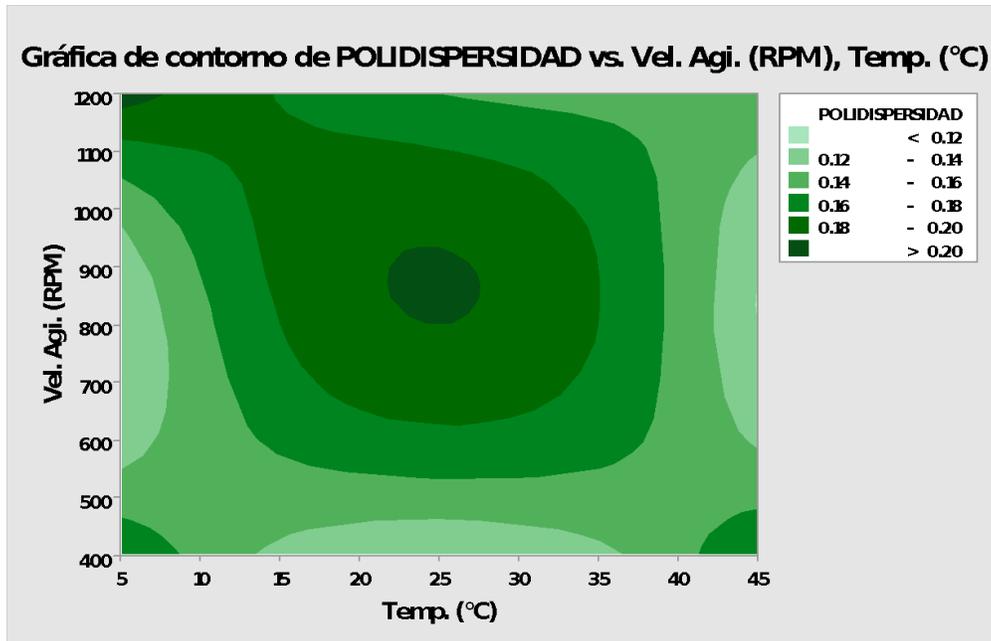


Figura 3.16 Efecto de la temperatura y la velocidad de agitación respecto a la polidispersidad.

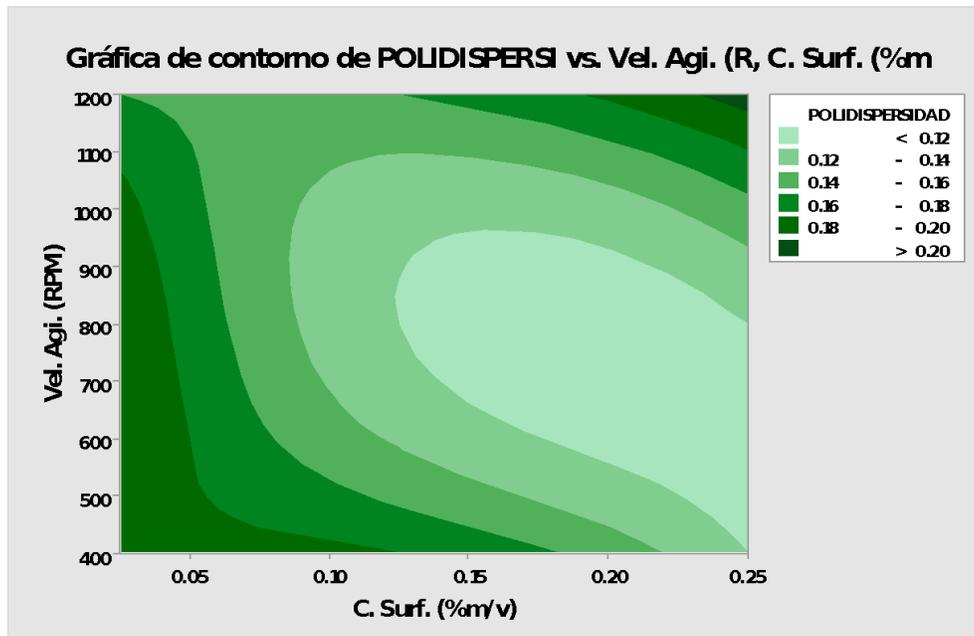


Figura 4.17 Efecto de la concentración de surfactante y velocidad de agitación respecto a la polidispersidad.

En resumen, las gráficas de contorno de las figuras 4.12, 4.13 y 4.14 muestran el efecto de la concentración de polímero. Se pueden observar patrones de cresta ascendente y descendente con un óptimo de IPD bajo, a una concentración de PU de 3mg/mL y un efecto ascendente de la temperatura y velocidad de agitación, pero un efecto descendente con la concentración de surfactante. Las gráficas 3.15, 3.16 y 3.17, puede verse estas mismas tendencias. Confirmando las observaciones realizadas por medio del análisis Taguchi.

3.5 SEM

La morfología de las nanopartículas de poliuretano fue observada por microscopía electrónica de barrido. Las imágenes obtenidas por SEM mostraron que las nanopartículas tienden a agregarse en el proceso de secado. La figura 3.18 presenta algunas de las imágenes obtenidas de las nanopartículas secadas al vacío y a temperatura ambiente. En las micrografías puede observarse partículas de tamaño similar a las encontradas por DLS.

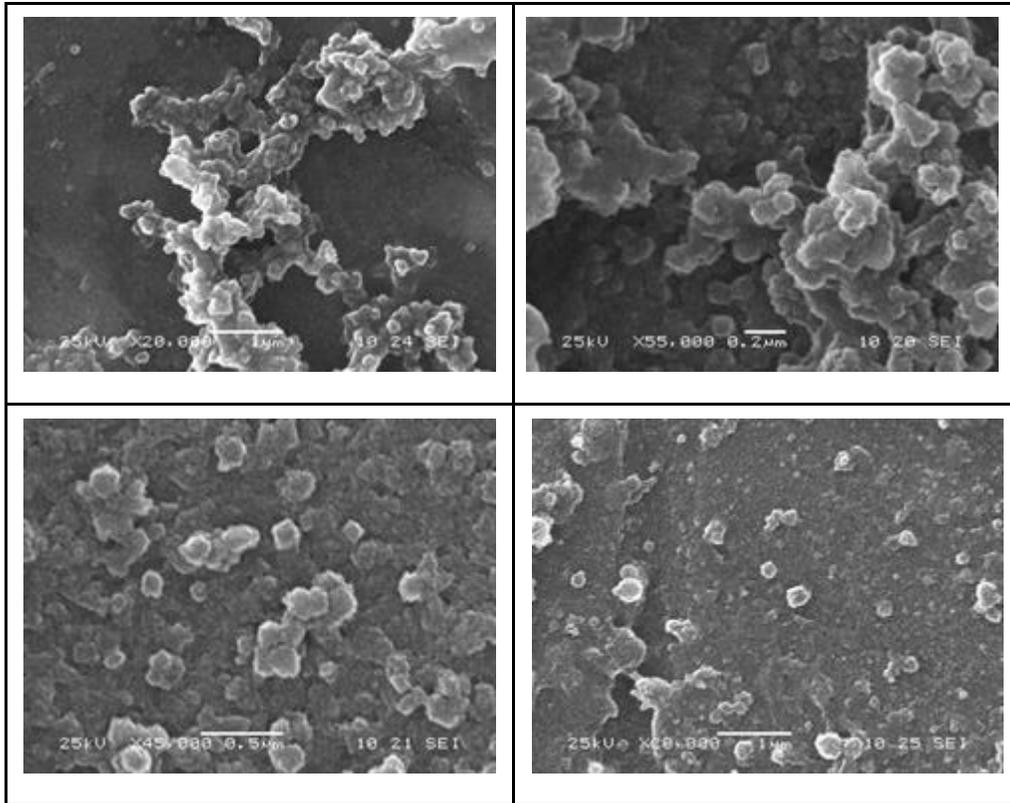


Figura 3.18. Micrografía por microscopía electrónica de barrido de nanopartículas de PU.

3.6 Liofilización

La liofilización es frecuentemente usada para la estabilización de procesos. Sin embargo las condiciones en que se lleva a cabo puede afectar la dispersabilidad de las partículas. Dependiendo de la velocidad de enfriamiento y el surfactante utilizado puede producirse una agregación de las nanopartículas como ha sido reportado (Zambaux et al., 1998) y como pudimos observar en las nanopartículas. Como puede observarse en la figura 3.19. Sin embargo, las muestras liofilizadas fueron útiles para analizar el rendimiento en la obtención de las nanopartículas.

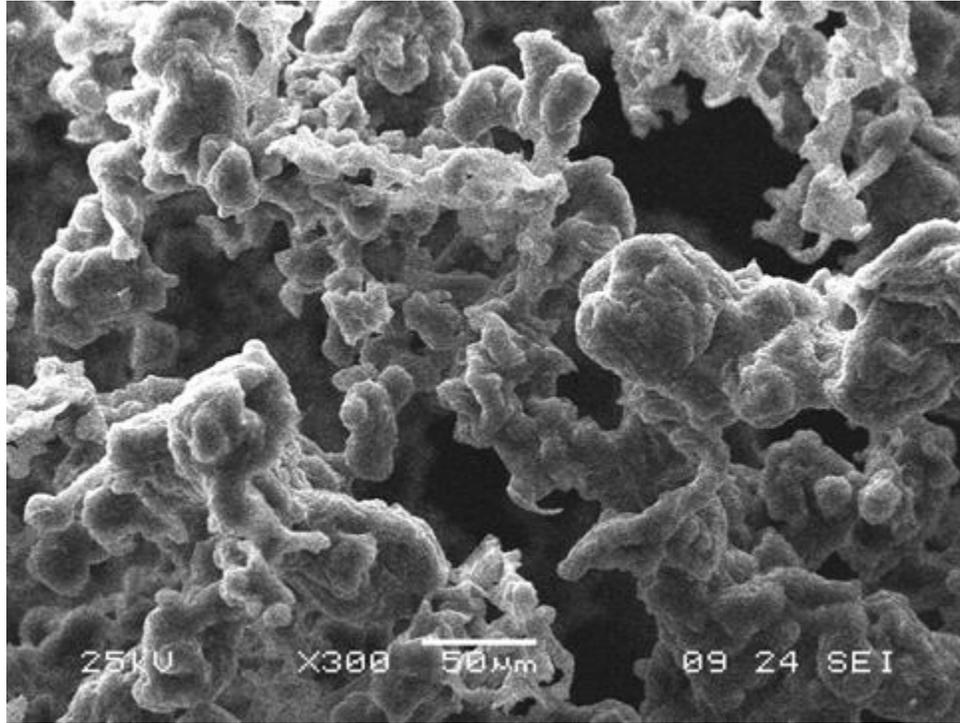


Figura 4.19. Micrografía representativa de las nanopartículas liofilizadas.

La tabla 3.4 muestra los resultados obtenidos de los polímeros recuperados por liofilización. Como se puede observar a concentraciones altas disminuye el rendimiento, debido a que se llega a la concentración crítica en el que se forman aglomerados que son retirados de la suspensión polimérica.

# muestra	Concentración (mg/mL)	Masa recuperada
1	0.75	0.8
2	3	4.5
3	9	3.5
4	0.75	0.7
5	3	2.7
6	9	4.6
7	0.75	0.7
8	3	4.3
9	9	4.5

Tabla 3.4. Pesos obtenidos de cada muestra después de liofilizar.

Conclusiones

Los resultados mostraron que el factor que más afecta al tamaño de partícula es la concentración de polímero, aumentando el tamaño de partícula conforme aumenta la concentración. Estos resultados son coherentes con lo reportado en la literatura.

Aunque los otros factores afectan poco o nada de manera individual, el análisis ANOVA de dos vías mostró que los factores interaccionan afectando el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad.

Las condiciones óptimas para la formación de nanopartículas pequeñas (aprox. 60 nm) es de 0.75mg/mL de PU, temperatura de 25°C, 0.125%*m/v* de surfactante y 1200 rpm de agitación.

Mientras que si lo que se desea es una menor polidispersidad (aprox. 0.11) se requiere de 3mg/mL de PU, 5°C de temperatura, 0.125%*m/v* de surfactante y 800 rpm de agitación.

Con la información obtenida en este trabajo se puede observar el efecto de la variabilidad de los factores, sin embargo se puede realizar un análisis más exhaustivo en el área de interés.

Referencias

- Bobadilla Valencia, Jesus Gustavo. (2010). *Síntesis de nanopartículas de Paladio en microemulsiones y su caracterización*. (Ing. Químico), Universidad de Sonora.
- Botero, M., Arbeláez, O., & Mendoza, J. . (2007). Método anova utilizado para realizar el estudio de repetibilidad y reproducibilidad dentro del control de calidad de un sistema de medición. *Scientia et Technica*, 37.
- Brito I., David A. . (2013). *Determinación de tamaño de liposomas en solución mediante el análisis de las funciones de autocorrelación asociadas a la dispersión de luz*. (Licenciatura), Escuela politécnica nacional, México, D.F.
- Cooper, Stuart L. . (2016). *Advances in Polyurethane Biomaterials*. Cambridge, USA: Woodhead Publishing.
- Cruz T., Eduardo A., Medina V., Pedro D., & Silva D., Carlos A. . (2012). Una revisión crítica de la razón señal ruido usada por Taguchi. *Scientia et Technica*, 2(50).
- Chan Ch., Lerma H. (2012). *Síntesis, Caracterización, degradación y evaluación biológica de poli(uretano urea)s segmentados biodegradables a base de aminoácidos*. (Doctorado), Centro de investigación científica de Yucatan A.C., Mérida, Yucatan.
- Dinh-Duy, Pham, & Elias F., Nicolas T. (2015). Pyrazinamide-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Optimization by experimental design. *Journal of Drug Delivery Science and technology*, 30(B), 384-390.
- Elsabahy, M., & Wooley, K. (2012). Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chem. Soc. Rev.*, 41, 2545-2561.
- Farbod, M. , Rafati, Z., & Shoushtari, M. Z. (2016). Optimization of parameters for the synthesis of Y2Cu2O5 nanoparticles by Taguchi method and comparison of their magnetic and optical properties with their bulk counterpart. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 407 266-271.
- Galindo R., Sergio, Allémann, Eric, Fessi, Hatem, & Doelker, Eric (2004). Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharmaceutical research*, 21(8), 1428-1439.
- Hernández Giottonini, Karol Yesenia. (2016). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de PLGA para la administración controlada de 1,10 epoxipartenólido*. (Maestría en ciencias), Universidad de Sonora.
- Kvítek, Libor, Panáček, Aleš, Soukupová, Jana, Kolář, Milan, Večeřová, Renata, Pucek, Robert, . . . Zbořil, Radek. (2008). Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *J. Phys. Chem*, 112(15), 5825-5834.
- Lepeltier, Elise , Bourgaux, Claudie, & Couvreur, Patrick (2014). Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 71, 86-94.
- Martínez B., M. E., Montembault, Véronique, Cammas-Marion, Sandrine, Ponchel, G., & Fontaine, L. (2007). Synthesis and characterization of novel poly(γ -benzyl-L-glutamate) derivatives tailored for the preparation of nanoparticles of pharmaceutical interest. *Polymer International*, 56(3), 317-324.
- Minitab17. (2016). Gráficas de contorno y gráficas de superficie 3D – Minitab. 2016
- Montgomery, Douglas C. (2006). *Diseño y análisis de experimentos*. México.

- Moreira, T., Gutierrez, A., & Delgado, H. . (1994). Aspectos físicos relacionados con los aditivos en el proceso de liofilización. Papel relevante en los carbohidratos. *Biotecnología aplicada*, 11(2), 113-119.
- Pérez R., Lorena (2015). *Estudio de la microporosidad en aceros al manganeso mediante la aplicación de la técnica de diseño de experimentos*. (Doctorado), Universidad de Oviedo, Asturias, España.
- Prasad R., J., & Geckeler, K. E. . (2011). Polymer nanoparticles : Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer science*, 36, 887-913.
- Prin, J.L, Hernandez, G., & Rojas de Gáscue, B. (2010). Operando el microscopio electrónico como herramienta para el estudio de los polímeros y otros materiales.I. El microscopio electrónico de barrido (MEB). *Revista iberoamericana de polímeros*, 11(1).
- Ramírez Nava, Juan Sebastián (2006). Liofilización de alimentos. *Revista ReCiTeIA*, 6(2).
- Ramos M., Georgina G. . (2015). Proteínas atrapadas en micelas. *Revista digital universitaria*, 16(1).
- Tanco Rainusso, Pablo Martín. (2008). *Metodología para la aplicación del Diseño de Experimentos (DoE) en la industria*. (Doctorado), Universidad de Navarra, San Sebastián.
- Valenzuela Loroña, Ana Ruth. (2014). *Síntesis y caracterización de nanopartículas poliméricas de PLGA por el método de emulsificación- evaporación en nanomedicina2014*. (Ing. Químico), Universidad de sonora.
- Yang, W. H., & Tarng, Y. S. (1998). Design optimization of cutting parameters for turning operations based on the Taguchi method. *Journal of Materials Processing Technology*, 84(1-3), 122-129.
- Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., & Dellacherie, E. (1998). Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *Journal of controlled release*, 50(1-3), 31-40.
- Zorzi, G. K., Carvalho, E. L. S., Von Poser, G. L., & Teixeira, H. F. . (2015). On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts. . *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25(4), 426-436.