

Universidad Nacional del Litoral - Facultad de Ingeniería Química



Diseño de síntesis para manufactura reproducible de nanopartículas superparamagnéticas orientadas a aplicaciones biomédicas

Tesis Doctoral para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ingeniería Química
Instituto de Desarrollo y Diseño (INGAR) - CONICET

Autora: Ing. Estefanía Colombo
Director: Dr. Ernesto C. Martínez

Miembros del Jurado:
Dra. Laura Gutierrez
Dr. Aldo Vecchietti
Dr. José Alberto Bandoni

Santa Fe, 2017

Índice General

RESUMEN.....	10
1 INTRODUCCIÓN	13
1.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA PROBLEMÁTICA: LA NANOMEDICINA COMO UNA POTENCIAL ALTERNATIVA PARA TRATAMIENTOS ONCOLÓGICOS LOCALIZADOS.....	13
1.2 MODELO CONCEPTUAL DE DISEÑO DEL PRODUCTO.....	18
1.2.1 <i>Aplicación del modelo de diseño de producto al diseño de síntesis de nanopartículas para usos médicos.....</i>	<i>20</i>
1.3 APLICACIÓN DE SPIONS EN TERAPIAS ONCOLÓGICAS	23
1.3.1 <i>Características requeridas de las SPIONS para su uso en biomedicina.....</i>	<i>26</i>
1.3.2 <i>Tratamiento anti cancerígeno con SPIONS.....</i>	<i>28</i>
1.3.3 <i>Productos similares disponibles en el mercado.....</i>	<i>28</i>
1.4 ASPECTOS QUE LO DIFERENCIAN DE LO YA EXISTENTE Y CONOCIDO EN EL ÁREA.....	30
1.4.1 <i>Nuevo proceso de síntesis de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita recubiertas con PEG.....</i>	<i>31</i>
1.4.2 <i>Diseño óptimo de experimentos para garantizar propiedades de uso final.....</i>	<i>32</i>
1.5 CONCLUSIONES.....	35
1.6 BIBLIOGRAFÍA.....	36
2 DISEÑO ÓPTIMO DE EXPERIMENTOS.....	39
2.1 INTRODUCCIÓN.....	39
2.2 METODOLOGÍA DE DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA OPTIMIZACIÓN CONSIDERANDO LAS ESPECIFICACIONES DE USO DEL PRODUCTO.....	40
2.3 DISEÑO ÓPTIMO BASADO EN LA PROBABILIDAD DE ÉXITO.....	43
2.4 OPTIMIZACIÓN CON RESPUESTAS ESTOCÁSTICAS BINARIAS.....	45
2.5 CASOS DE ESTUDIO.....	49
2.5.1 <i>Acetoacetilación de pirrol con diqueteno.....</i>	<i>50</i>
2.5.1.1 <i>Análisis de la influencia de la constante de mezcla α.....</i>	<i>53</i>
2.5.1.2 <i>Análisis de la influencia del diseño experimental inicial.....</i>	<i>56</i>
2.5.1.3 <i>Aplicación de la metodología propuesta.....</i>	<i>59</i>
2.5.1.4 <i>Aplicación del algoritmo con un perfil de alimentación más complejo.....</i>	<i>61</i>
2.5.2 <i>Polimerización por emulsión de estireno.....</i>	<i>62</i>
2.6 CONCLUSIONES.....	67
2.7 BIBLIOGRAFÍA.....	70
3 DISEÑO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE SPIONS	72
3.1 MODELO CONCEPTUAL DE DISEÑO DE PRODUCTO: PLANTEO DEL SUB-PROBLEMA 3	72
3.2 MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS.....	72
3.2.1 <i>Co-precipitación.....</i>	<i>74</i>

3.2.2	<i>Microemulsión</i>	76
3.2.3	<i>Descomposición térmica</i>	77
3.2.4	<i>Hidrotermia</i>	77
3.2.5	<i>Ultrasonido</i>	78
3.3	MÉTODOS DE RECUBRIMIENTOS DE SPIONS	79
3.4	DISEÑO DE UNA NUEVA SÍNTESIS DE PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS.....	81
3.4.1	<i>Análisis y selección de síntesis</i>	81
3.4.2	<i>Nueva ruta de síntesis de SPIONS</i>	82
3.5	CONCLUSIONES.....	86
3.6	BIBLIOGRAFÍA.....	87
4	PROPIEDADES Y CARACTERIZACIÓN DE SPIONS.....	89
4.1	PROPIEDADES DE USO FINAL DE SPIONS	89
4.2	CARACTERIZACIÓN DE SPIONS	90
4.2.1	<i>Medición de tamaño</i>	91
4.2.1.1	DLS.....	91
4.2.1.2	TEM	94
4.2.2	<i>Medición de características de superficie</i>	95
4.2.2.1	Potencial zeta	95
4.2.2.2	TGA.....	96
4.2.3	<i>Identificación del compuesto magnetita</i>	102
4.2.3.1	FTIR.....	102
4.2.3.2	Raman	107
4.2.3.3	DRX.....	111
4.2.3.4	Cualitativo	116
4.2.4	<i>Medición de propiedades magnéticas</i>	116
4.2.4.1	SQUID o VSM.....	116
4.2.4.2	Cualitativo	117
4.3	CONCLUSIONES.....	119
4.4	BIBLIOGRAFÍA.....	120
5	OPTIMIZACIÓN EXPERIMENTAL DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE SPIONS	127
5.1	PROCESO DE SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA SUPERPARAMAGNÉTICAS	127
5.2	OPTIMIZACIÓN EXPERIMENTAL DE LA PROBABILIDAD DE ÉXITO.....	128
5.3	CONCLUSIONES.....	135
6	CONCLUSIONES	136
6.1	CONCLUSIONES FINALES.....	136
6.1.1	<i>Principales contribuciones e importancia de la tesis</i>	137
6.1.1.1	Principales características de la metodología de diseño de experimentos basada en la probabilidad de éxito.....	138
6.1.1.2	Principales características de la nueva ruta de síntesis de SPIONS	139
6.2	PROPUESTAS DE TRABAJOS FUTUROS.....	139
6.2.1	<i>Presentación de trabajos con base en la investigación de la presente tesis</i>	139

6.2.2	<i>Continuación de la línea de investigación</i>	140
ANEXOS		146
ANEXO I:	INFLUENCIA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL INICIAL (CAPÍTULO 2).....	140
ANEXO II:	MODELO MATEMÁTICO DEL PROCESO DE POLIMERIZACIÓN POR EMULSIÓN DE ESTIRENO (CAPÍTULO 2).....	144
ANEXO III:	GRÁFICAS DE LA PRIMERA ETAPA DEL ANÁLISIS TGA (CAPÍTULO 4).....	148

Índice de Figuras

FIGURA 1.1: (A) ILUSTRACIÓN DE UNA NANOPARTÍCULA MULTI-FUNCIONALIZADA; (B) CUATRO POSIBLES MODOS DE ACCIÓN DE DIVERSOS AGENTES TERAPÉUTICOS: A) UNIÓN A RECEPTORES DE SUPERFICIE CELULAR (ES DECIR, ENZIMAS/PROTEÍNAS) PARA FACILITAR SU INTERNALIZACIÓN ESPECÍFICA, B) LIBERACIÓN CONTROLADA INTERCELULAR DE AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS, C) LIBERACIÓN DE GENES TERAPÉUTICOS Y POSTERIOR FOCALIZACIÓN DE NÚCLEO, D) DESCOMPOSICIÓN INTRACELULAR DE MATERIALES RADIACTIVOS. ¹⁵	14
FIGURA 1.2: ESQUEMA DE UN SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS MAGNÉTICO EN SECCIÓN TRANSVERSAL: SE COLOCA UN IMÁN FUERA DEL CUERPO CON EL FIN DE QUE SU GRADIENTE DE CAMPO MAGNÉTICO PUEDA CAPTURAR SOPORTES MAGNÉTICOS QUE FLUYEN EN EL SISTEMA CIRCULATORIO. ¹⁹	16
FIGURA 1.3: CONCEPTO DE ORIENTACIÓN MAGNÉTICA DE DROGAS. ²⁴	16
FIGURA 1.4: IMÁGENES TEM DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA. (A) PREPARADAS MEDIANTE EL MÉTODO DE SUGIMOTO ³² EN EXCESO DE [OH ⁻]; (B) PREPARADAS MEDIANTE EL MÉTODO DE SUGIMOTO SIN AGITACIÓN Y SIN EXCESO DE [OH ⁻] O [Fe ²⁺]; (C) PREPARADAS MEDIANTE EL MÉTODO DE MASSART ³³ EN PRESENCIA DE NH ₄ OH; (D) PREPARADAS MEDIANTE EL MÉTODO DE MASSART EN PRESENCIA DE AGENTE DISPERSANTE TETRAMETILAMONIO (TMAOH) Y SIN NH ₄ OH. ²¹	18
FIGURA 1.5: MODELO CONCEPTUAL DE DISEÑO DE UN PRODUCTO QUÍMICO. ³¹	19
FIGURA 1.6: ESQUEMA DEL PROCESO DE SÍNTESIS DE SPIONS.	32
FIGURA 1.7: PROPIEDADES DE USO FINAL EN FUNCIÓN DE LAS VARIABLES CRÍTICAS DEL PROCESO.	34
FIGURA 1.8: ALGORITMO DE DISEÑO DE EXPERIMENTOS BASADO EN LA PROBABILIDAD DE ÉXITO. ⁴²	35
FIGURA 2.1: ALGORITMO PARA IDENTIFICAR UNA REGIÓN REDUCIDA DE OPERACIÓN CON MÁXIMA PROBABILIDAD DE ÉXITO. 47	
FIGURA 2.2: PERFIL DE ALIMENTACIÓN DE DIQUETENO DEFINIDO POR DOS VARIABLES CONTROLADAS. EL TIEMPO TOTAL DE REACCIÓN SE ASUME FIJO.....	52
FIGURA 2.3: DISEÑOS EXPERIMENTALES INICIALES UTILIZADOS PARA COMENZAR LAS ITERACIONES DEL BUCLE INTERNO. (A) DISEÑO CENTRAL COMPUESTO FRACCIONAL; (B) DISEÑO FACTORIAL MÁS UN PUNTO EN EL CENTRO Y UN PUNTO EN EL MEDIO DE UNO DE LOS LÍMITES; (C) ELECCIÓN AL AZAR DE SEIS PUNTOS DENTRO DE LA ROI.	57
FIGURA 2.4: EVOLUCIÓN DE LA ROI LUEGO DE LA PRIMERA ITERACIÓN DEL BUCLE EXTERNO, PARA LOS DIFERENTES DISEÑOS INICIALES CONSIDERADOS. LOS CUADRADOS BLANCOS PERTENECEN A LOS PUNTOS DEL DISEÑO INICIAL CORRESPONDIENTE, MIENTRAS QUE LOS CÍRCULOS NEGROS SON LOS PUNTOS AGREGADOS DURANTE LAS ITERACIONES DEL PRIMER BUCLE INTERNO. (A) CCD FRACCIONAL CON UN PUNTO EN UNO DE SUS LÍMITES; (B) DISEÑO FACTORIAL AGREGANDO UN PUNTO EN EL CENTRO Y UN PUNTO EN EL MEDIO DE UNO DE LOS LÍMITES; (C) ELECCIÓN AL AZAR DE SEIS PUNTOS SELECCIONADOS DENTRO DE LA ROI.	59
FIGURA 2.5: EJEMPLO DE UN ENSAYO COMPLETO DE LA METODOLOGÍA DE OPTIMIZACIÓN DE DISEÑO DE EXPERIMENTOS DE LA FIGURA 2.1 PARA LA ACETOACETILACIÓN DE PIRROL CON DIQUETENO (SP=10% Y A=0.25).	60
FIGURA 2.6: PERFIL DE ALIMENTACIÓN DE DIQUETENO DEFINIDO POR CUATRO PARÁMETROS. EL TIEMPO FINAL ES ASUMIDO FIJO.....	61
FIGURA 2.7: PROBABILIDAD DE ÉXITO DENTRO DE LA ROI INICIAL, PARA EL PROCESO DE POLIMERIZACIÓN POR EMULSIÓN DE ESTIRENO, CON SP=10%.....	65
FIGURA 2.8: UNA EJECUCIÓN COMPLETA DEL ALGORITMO (HASTA LA CONVERGENCIA DE AMBOS BUCLES) DE LA FIGURA 2.1 PARA EL PROCESO DE POLIMERIZACIÓN POR EMULSIÓN DE ESTIRENO (SP=10%, A=0.25).	66
FIGURA 3.1: ESTRUCTURAS REPRESENTATIVAS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDOS DE HIERRO FUNCIONALIZADAS CON RECUBRIMIENTOS ORGÁNICOS. ⁷	79
FIGURA 3.2: REACTOR REDOX, RECIPIENTE CON NaOH CONCENTRADA Y REACTOR DE SÍNTESIS.	85
FIGURA 3.3: REACTOR DE SÍNTESIS.	85
FIGURA 4.1: EQUIPO ZETASIZER DE MALVERN INSTRUMENTS.	92
FIGURA 4.2: DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE LAS RUTAS DE SÍNTESIS PROPUESTAS CONSERVADAS EN SOLUCIÓN DE SÍNTESIS: (A) RN19, (B) RN20, (C) RN21 Y (D) RN22.	93

FIGURA 4.3: MICROSCOPIO DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA. ³⁸	94
FIGURA 4.4: CURVAS DE POTENCIAL ZETA EN FUNCIÓN DEL PH, PARA LAS SPIONS PRODUCIDAS CON LAS DIFERENTES RUTAS DE SÍNTESIS.	96
FIGURA 4.5: EQUIPO TGA METTLER TOLEDO TGA/SDTA851E.	97
FIGURA 4.6: ANÁLISIS TGA PARA MUESTRA DE PEG PURO.....	98
FIGURA 4.7: ANÁLISIS TGA PARA LA MUESTRA RN19.	99
FIGURA 4.8: ANÁLISIS TGA PARA LA MUESTRA RN20.	99
FIGURA 4.9: ANÁLISIS TGA PARA LA MUESTRA RN21.	100
FIGURA 4.10: ANÁLISIS TGA PARA LA MUESTRA RN22.	100
FIGURA 4.11: ANÁLISIS TGA PARA TODAS LAS MUESTRAS.	101
FIGURA 4.12: EQUIPO FTIR, SHIMADZU IRPRESTIGE-21.....	103
FIGURA 4.13: FTIR DE LA MUESTRA DE PEG PURO.	104
FIGURA 4.14: FTIR DE LA MUESTRA RN19.	104
FIGURA 4.15: FTIR DE LA MUESTRA RN20.	105
FIGURA 4.16: FTIR DE LA MUESTRA RN21.	105
FIGURA 4.17: FTIR DE LA MUESTRA RN22.	106
FIGURA 4.18: FTIR DE TODAS LAS RUTAS DE SÍNTESIS Y PEG PURO.	106
FIGURA 4.19: EQUIPO DE ESPECTROSCOPIA RAMAN, HORIBA RAMAN DIVISION MODELO LABRAM HR - OLYMPUS BX41.	108
FIGURA 4.20: ESPECTROSCOPIA RAMAN DE LA MUESTRA DE PEG PURO.	109
FIGURA 4.21: ESPECTROSCOPIA RAMAN DE LA MUESTRA RN19.	109
FIGURA 4.22: ESPECTROSCOPIA RAMAN DE LA MUESTRA RN20.	110
FIGURA 4.23: ESPECTROSCOPIA RAMAN DE LA MUESTRA RN21.	110
FIGURA 4.24: ESPECTROSCOPIA RAMAN DE LA MUESTRA RN22.	111
FIGURA 4.25: EQUIPO DRX, SHIMADZU MODELO XD-D1.	112
FIGURA 4.26: DRX DE LA MUESTRA DE PEG PURO.	113
FIGURA 4.27: DRX DE LA MUESTRA RN19.	113
FIGURA 4.28: DRX DE LA MUESTRA RN20.	114
FIGURA 4.29: DRX DE LA MUESTRA RN21.	114
FIGURA 4.30: DRX DE LA MUESTRA RN22.	115
FIGURA 4.31: DRX DE TODAS LAS RUTAS DE SÍNTESIS Y PEG PURO.	115
FIGURA 4.32: ANÁLISIS CUALITATIVO DE COLOR DE LAS SPIONS OBTENIDAS EN CADA RUTA DE SÍNTESIS. (A) RN19, (B) RN20, (C) RN21 Y (D) RN22.	116
FIGURA 4.33: EQUIPO SQUID, QUANTUM DESIGN INC. ⁷⁷	117
FIGURA 4.34: ANÁLISIS CUALITATIVO DE SUPERPARAMAGNETISMO DE RN19.	118
FIGURA 4.35: ANÁLISIS CUALITATIVO DE SUPERPARAMAGNETISMO DE RN20.	118
FIGURA 4.36: ANÁLISIS CUALITATIVO DE SUPERPARAMAGNETISMO DE RN21.	118
FIGURA 4.37: ANÁLISIS CUALITATIVO DE SUPERPARAMAGNETISMO DE RN22.	119
FIGURA 5.1: CURVAS DE RESPUESTA SUCESIVAS, OBTENIDAS EN CADA ITERACIÓN DEL MÉTODO DE DISEÑO DE EXPERIMENTOS BASADO EN LA PROBABILIDAD APLICADO AL PROCESO DE SÍNTESIS DE SPIONS. CUADRADOS AZULES: PUNTOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS PARA LA REGRESIÓN DE LA CURVA MOSTRADA EN LA IMAGEN; CÍRCULOS AZULES: SIGUIENTE PUNTO EXPERIMENTAL, SUGERIDO POR EL MÉTODO. (A) BUCLE EXTERNO = 1, BUCLE INTERNO = 1; (B) BUCLE EXTERNO = 1, BUCLE INTERNO = 2; (C) BUCLE EXTERNO = 2, BUCLE INTERNO = 1; (D) BUCLE EXTERNO = 2, BUCLE INTERNO = 2; (E) BUCLE EXTERNO = 2, BUCLE INTERNO = 3.....	134
FIGURA I.1: EVOLUCIÓN DE LAS SUPERFICIES DE RESPUESTA $\pi(\theta_k, x)$ UTILIZANDO EL DISEÑO INICIAL ξ_0 CORRESPONDIENTE A LA FIG. 3A. (A) ITERACIÓN #1; (B) ITERACIÓN #2; (C) ITERACIÓN #3.....	141

FIGURA I.2: EVOLUCIÓN DE LAS SUPERFICIES DE RESPUESTA $\pi(\theta_k, x)$ UTILIZANDO EL DISEÑO INICIAL ξ_0 CORRESPONDIENTE A LA FIG. 3B. (A) ITERACIÓN #1; (B) ITERACIÓN #2; (C) ITERACIÓN #3; (D) ITERACIÓN #4; (E) ITERACIÓN #5; (F) ITERACIÓN #6; (G) ITERACIÓN #7.....142

FIGURA I.3: EVOLUCIÓN DE LAS SUPERFICIES DE RESPUESTA $\pi(\theta_k, x)$ UTILIZANDO EL DISEÑO INICIAL ξ_0 CORRESPONDIENTE A LA FIG. 3C. (A) ITERACIÓN #1; (B) ITERACIÓN #2; (C) ITERACIÓN #3; (D) ITERACIÓN #4; (E) ITERACIÓN #5; (F) ITERACIÓN #6; (G) ITERACIÓN #7.....142

FIGURA III.1: PRIMER ETAPA DEL ANÁLISIS TGA DE LA MUESTRA DE PEG PURO.....149

FIGURA III.2: PRIMER ETAPA DEL ANÁLISIS TGA DE LA MUESTRA RN19.....150

FIGURA III.3: PRIMER ETAPA DEL ANÁLISIS TGA DE LA MUESTRA RN20.....150

FIGURA III.4: PRIMER ETAPA DEL ANÁLISIS TGA DE LA MUESTRA RN21.....151

FIGURA III.5: PRIMER ETAPA DEL ANÁLISIS TGA DE LA MUESTRA RN22.....151

Índice de Tablas

TABLA 1.1: SET DE VARIABLES DEL MODELO CONCEPTUAL DE DISEÑO DE PRODUCTO PARA LA SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS PARA USOS MÉDICOS. ³¹	21
TABLA 2.1: VALORES DE LOS HÍPER-PARÁMETROS PARA EL PROCESO DE ACETOACETILACIÓN DE PIRROL CON DIQUETENO.	53
TABLA 2.2: PORCENTAJE DE ENSAYOS QUE ENCUENTRAN UNA POLÍTICA DE OPERACIÓN QUE CUMPLE CON LAS ESPECIFICACIONES DE USO FINAL, PARA DIFERENTES VALORES DE α Y DIFERENTES NIVELES DE ÉXITO, CON $SP=5\%$	54
TABLA 2.3: PORCENTAJE DE ENSAYOS QUE ENCUENTRAN UNA POLÍTICA DE OPERACIÓN QUE CUMPLE CON LAS ESPECIFICACIONES DE USO FINAL, PARA DIFERENTES VALORES DE α Y DIFERENTES NIVELES DE ÉXITO, CON $SP=10\%$. .	55
TABLA 2.4: PORCENTAJE DE ENSAYOS QUE ENCUENTRAN UNA POLÍTICA DE OPERACIÓN QUE CUMPLE CON LAS ESPECIFICACIONES DE USO FINAL, PARA DIFERENTES VALORES DE α Y DIFERENTES NIVELES DE ÉXITO, CON $SP=20\%$. .	55
TABLA 2.5: RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ENSAYO CORRESPONDIENTE A LA FIGURA 2.5.....	60
TABLA 2.6: PORCENTAJE DE CORRIDAS DE LA METODOLOGÍA QUE ENCUENTRAN UNA POLÍTICA DE OPERACIÓN QUE CUMPLE CON LAS ESPECIFICACIONES DE PUNTO FINAL, PARA DIFERENTES NIVELES DE ÉXITO Y DIFERENTES VALORES DE SP , UTILIZANDO EL PERFIL DE ALIMENTACIÓN DE LA FIGURA 2.6.	62
TABLA 2.7: VALORES DE LOS HÍPER-PARÁMETROS PARA LA POLIMERIZACIÓN POR EMULSIÓN DE ESTIRENO.	64
TABLA 2.8: RESUMEN DE RESULTADOS PARA LA CORRIDA CORRESPONDIENTE A LA FIGURA 2.8 ($SP=10\%$, $A=0.25$).	66
TABLA 2.9: PORCENTAJE DE EJECUCIONES DEL ALGORITMO QUE ENCUENTRAN UNA POLÍTICA DE OPERACIÓN QUE SATISFICE LAS ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO OBTENIDO PARA DIFERENTES NIVELES DE ÉXITO ($SP=10\%$, $A=0.25$).	67
TABLA 3.1: DIFERENTES OPCIONES DE SÍNTESIS DE SPIONs PROPUESTAS Y EVALUADAS.	86
TABLA 4.1: TAMAÑOS Y DISTRIBUCIONES OBTENIDOS PARA CADA RUTA DE SÍNTESIS PROPUESTA.	92
TABLA 4.2: TÉCNICAS ANALÍTICAS COMUNES PARA DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE NANOPARTÍCULAS. ²³	94
TABLA 4.3: RESUMEN DE LAS BANDAS RAMAN CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPUESTOS MAGNETITA, MAGHEMITA Y HEMATITA. ^{37,52,55,57-63}	107
TABLA 4.4: CARACTERÍSTICAS CUALITATIVAS DE LAS NANOPARTÍCULAS PRODUCIDAS.....	119
TABLA 5.1: VALORES DE LOS HÍPER-PARÁMETROS PARA LA SÍNTESIS DE SPIONs.	130
TABLA 5.2: RESUMEN DE DATOS EXPERIMENTALES.....	131
TABLA 5.3: RESUMEN DE RESULTADOS PARA LA APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE DISEÑO DE EXPERIMENTOS BASADA EN LA PROBABILIDAD, AL PROCESO DE SÍNTESIS DE SPIONs.	134

Agradecimientos

A toda "mi gente". Soy afortunada, la vida me fue rodeando de los mejores, sin duda, los mejores. Familia y amigos. A ellos gracias, por su presencia, su franqueza, su incondicionalidad y su "aguante". En las buenas, y sobre todo en las malas. ¡Gracias!

A mis compañeros de estudio, que hicieron más ameno el cursado en los primeros años del doctorado.

A Martín, que desinteresadamente me ayudó con el desarrollo de la metodología presentada en el Capítulo 2.

A Charly y Jorge, que fueron mi mano derecha en el laboratorio, solucionando todos los imprevistos con la mejor onda.

A la Dra. Laura Gutierrez y su grupo de trabajo, quienes me facilitaron los equipos correspondientes y el asesoramiento para realizar las caracterizaciones de los productos sintetizados.

A mi director, que me permitió investigar en un tema que es de enorme interés para mí.

Al Ingar, por la infraestructura y equipamiento que permitieron el desarrollo del trabajo experimental y computacional.

A los jurados, por su trabajo y su tiempo, que reflejaron una lectura crítica de la tesis, aportando comentarios y sugerencias constructivas.

Resumen

Las nanociencias surgen en las últimas décadas como una novedosa herramienta que permite plantear una solución alternativa en el abordaje de problemas comunes en ciencia y tecnología. Actualmente, este campo toma un importante auge, debido a que los materiales de dimensiones nanométricas presentan características particulares que ofrecen la posibilidad de afrontar incluso nuevas soluciones, que con los materiales clásicos no podían ser alcanzadas. Gran parte de estos nuevos materiales, son diseñados y sintetizados para desempeñar usos muy específicos y delicados, como lo es por ejemplo la utilización en el área de la salud humana, por lo cual es necesario que se garanticen determinadas características y propiedades que permitan cumplir con los requisitos particulares para su uso o aplicación.

Al tratarse entonces de nuevas tecnologías, los procesos y productos que se hallan dentro de este campo, se encuentran en su gran parte aun en desarrollo, y sus primeros principios de funcionamiento aún no han sido desarrollados de manera teórica. Dentro de este marco, en esta tesis se plantea una metodología de optimización que permite garantizar el cumplimiento de determinadas propiedades de uso final del producto con alta probabilidad de ocurrencia, sin necesidad de recurrir a ecuaciones fundamentales que definan el proceso, sino basándose exclusivamente en datos experimentales. Así, mediante un modelado basado en datos que ajustan la probabilidad de éxito binomial, la metodología pretende equilibrar la precisión paramétrica con la búsqueda de una región reducida de operación, donde haya una alta probabilidad de satisfacer las especificaciones de punto final. De este modo, mediante una serie de pruebas experimentales, el algoritmo de la metodología conduce a la zona óptima de trabajo que permite operar el proceso cumpliendo con las propiedades de uso final de los productos.

Dentro de esta área, es de destacada importancia el interés actual que existe en el ámbito de las nanociencias aplicadas a la medicina, ya que las mismas ofrecen potenciales nuevas soluciones en lo que respecta a diagnósticos y tratamientos. En particular, las nanopartículas magnéticas representan una alternativa viable en cuanto al tratamiento localizado de determinados tumores, ya sea mediante hipertermia o liberación controlada de drogas. Si bien existen en la bibliografía diversas rutas de síntesis de las mismas, resulta trascendental lograr una síntesis que garantice las propiedades de uso final del producto obtenido y que a su vez permita la escalabilidad del proceso para poder ser escalado a nivel industrial. Considerando este panorama,

en esta tesis se desarrolló un nuevo método de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas (SPIONs, según sus siglas en inglés) que cumple con estas necesidades planteadas. El producto obtenido fue caracterizado mediante técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS), espectroscopia Raman, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (DRX) y análisis termogravimétrico (TGA); a modo de evaluar sus propiedades de tamaño, superficie y composición. Además, haciendo uso de la metodología de diseño de experimentos desarrollada, se realizó un estudio de reproducibilidad de esta nueva síntesis, optimizando a la vez la variable crítica del proceso. De este modo finalmente se puede concluir que la nueva ruta de síntesis cumple con los requerimientos lograr el mismo producto final que el obtenido en síntesis tradicionales, pero ahora mediante un proceso escalable y reproducible.

El siguiente artículo publicado fue realizado dentro del marco de esta tesis, con el material desarrollado en la misma:

- Colombo, E., Luna, M.F., Martínez, E.C (2016). "Probability-based design of experiments for batch process optimization with end-point specifications". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55(5), 1254-1265.

A su vez, el siguiente artículo ha sido enviado para su publicación:

- Colombo, E., Luna, M.F., Martínez, E.C. "Optimal experimental design for process optimization with stochastic binary outcomes". *Iberoamerican Journal of Industrial Engineering*.

También se presentaron los siguientes trabajos en congresos:

- Colombo, E., Luna, M.F., Martínez, E.C. (2015). "Diseño óptimo de experimentos para garantizar las especificaciones de productos y procesos". *VIII Congreso Argentino de Ingeniería Química - CAIQ2015 y 3JASP*.

- Colombo, E., Luna, M.F., Martínez, E.C. (2015). "Optimal experimental design for process optimization with stochastic binary outcomes". *Argentine Symposium on Industrial Informatics SII 2015 44th Argentine Conference on Informatics (44 JAIIO)*.

1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo se presenta la problemática que da origen al trabajo de tesis, se plantean la hipótesis de tesis, los objetivos perseguidos y se mencionan las metodologías planteadas para el abordaje del problema. Asimismo, se presenta un resumen de la bibliografía existente y se enuncian los aspectos novedosos del trabajo.

1.1 Descripción general de la problemática: La nanomedicina como una potencial alternativa para tratamientos oncológicos localizados.

La *nanotecnología* puede ser definida como la ciencia que se basa en los efectos físicos que se producen en objetos a escala nanométrica, existentes en la interfaz entre el mundo molecular y el mundo macroscópico. Se entiende entonces a la *nanomedicina*, como la ciencia que hace uso médico de materiales nanoestructurados, los cuales de acuerdo a su tamaño y estructura, tienen propiedades únicas, como ser la capacidad de atravesar barreras biológicas o el posible direccionamiento hacia ciertos tejidos objetivos para aumentar la efectividad del tratamiento y disminuir los efectos secundarios.¹⁻¹¹ Las nanopartículas son materiales de dos o más dimensiones, con uno de sus lados de un tamaño en el rango de 1-100 nm.^{12,13} Las mismas muestran propiedades físicas y químicas únicas en base a su tamaño, por ejemplo, propiedades ópticas, magnéticas, catalíticas, termodinámicas y electroquímicas. La composición química y la forma de la nanopartícula son factores determinantes de sus propiedades específicas.¹⁴⁻¹⁷

De este modo, la nanotecnología es utilizada en diversas aplicaciones relacionadas con el cuidado de la salud y la mejora de la calidad de vida de los pacientes. Entre estas aplicaciones se puede mencionar:^{2,7,18,19}

- el suministro de fármacos oncológicos, que corresponde al uso de las nanopartículas como medio de transporte de las sustancias activas hacia los tejidos afectados;
- el tratamiento de tumores mediante hipertermia, debido a que las nanopartículas superparamagnéticas son capaces de absorber la energía de un campo magnético oscilante y convertirla en calor, y mediante esta propiedad pueden ser utilizados *in vivo* para aumentar significativamente la temperatura del tejido tumoral y así destruir las células afectadas;
- el diagnóstico mediante imágenes *in vivo*, dónde las nanopartículas se emplean como agentes de contraste especialmente para resonancia magnética y ultrasonido;

- el diagnóstico *in vitro*, que consiste en el uso de novedosos sensores basados en nanotubos o nanocables, y microscopía de fuerza atómica aplicada a dispositivos de diagnóstico;
- los biomateriales, donde las nanopartículas se utilizan para mejorar las propiedades mecánicas y la biocompatibilidad de los biomateriales que se usan en los implantes médicos.

Las nanopartículas que pueden ser preparadas mediante síntesis química incluyen a polímeros orgánicos (nanopartículas orgánicas) y/o elementos inorgánicos (nanopartículas inorgánicas).¹⁴ Liposomas, dendrímeros, nanomateriales de carbono y micelas poliméricas, son ejemplos de nanopartículas orgánicas. Las nanopartículas inorgánicas, tales como puntos cuánticos, nanopartículas magnéticas, cerámicas y metálicas, están conformadas por un núcleo central compuesto de materiales inorgánicos que definen sus propiedades magnéticas, electrónicas y ópticas. Las nanopartículas magnéticas son nanocristales con un núcleo de Fe^{2+} y Fe^{3+} usualmente rodeado de algún polímero, como ser, dextran o polietilenglicol (PEG).³ En la Figura 1.1¹⁵ se presenta de manera ilustrativa una nanopartícula funcionalizada con diversos agentes específicos y los posibles modos de acción de los agentes terapéuticos.

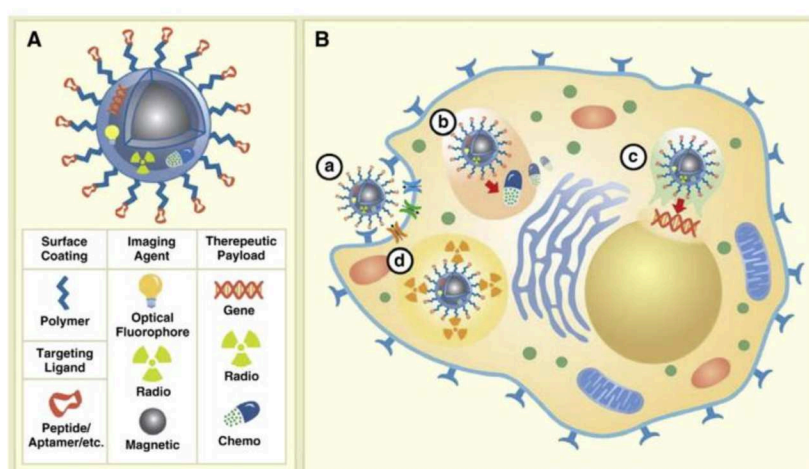


Figura 1.1: (A) Ilustración de una nanopartícula multi-funcionalizada; (B) Cuatro posibles modos de acción de diversos agentes terapéuticos: a) unión a receptores de superficie celular (es decir, enzimas/proteínas) para facilitar su internalización específica, b) liberación controlada intercelular de agentes quimioterapéuticos, c) liberación de genes terapéuticos y posterior focalización de núcleo, d) descomposición intracelular de materiales radiactivos.¹⁵

Actualmente, los principales problemas asociados con la administración sistémica de fármacos (administración vía sanguínea, que permite la circulación general del fármaco distribuyéndose el mismo hacia los diversos tejidos corporales) incluyen: la

distribución general de drogas terapéuticas, la falta de especificidad hacia un sitio patológico, la necesidad de una alta dosis para lograr una alta concentración local, la toxicidad no específica y muchos otros efectos secundarios adversos. Los intentos actuales para resolver estos problemas se centran en el uso de nanopartículas específicas. Si estos tratamientos pudieran ser localmente intensificados, el tratamiento local de ciertos tumores podría ser una opción efectiva de tratamiento, evitándose los efectos adversos de un tratamiento sistémico.²¹ La combinación de nanopartículas con otros agentes anticancerosos permite mejorar la eficacia antitumoral en aproximadamente el 45% de los casos.²² Entonces, entre las principales razones que evidencian el fracaso de un tratamiento antitumoral se destacan: la farmacocinética desfavorable del agente anticanceroso (rápido aclaramiento plasmático, rápida biodegradación y corta semivida plasmática), que determina el uso de dosis altamente tóxicas y una rigurosa pauta de tratamiento para conseguir el efecto terapéutico deseado; la extensa biodistribución y extravasación (traspaso por fuera de su canal -por lo general, una vena- hacia los tejidos circundantes) del fármaco antitumoral en zonas no deseadas que conlleva a una elevada toxicidad; la selectividad del fármaco por las células malignas que generalmente es muy pobre; la susceptibilidad de desarrollar resistencia a los anticancerígenos por parte de las células tumorales; y, las propiedades fisicoquímicas desfavorables de los agentes quimioterapéuticos, por ejemplo su hidrofobia, que induce una escasa acumulación en el lugar de acción.²² En base a lo expuesto, se puede considerar que la administración de fármacos a base de nanopartículas proporciona muchas ventajas, como la mejora de la eficacia terapéutica de las drogas utilizadas y de sus características farmacológicas. Más específicamente, las nanopartículas mejoran la solubilidad de fármacos poco solubles en agua, modifican la farmacocinética, aumentan la vida media del fármaco mediante la reducción de la inmunogenicidad, aumentan la especificidad hacia la célula o tejido diana (y por lo tanto, permiten reducir los efectos secundarios), mejoran la biodisponibilidad, disminuyen el metabolismo del fármaco y permiten una liberación de compuestos terapéuticos más controlable y el suministro de dos o más fármacos simultáneamente para terapias combinadas.^{14,23} Mediante la incorporación de tratamientos con nanopartículas se pueden lograr estrategias de transporte pasivos de fármacos (basadas en el efecto de permeación y retención incrementada propio de la masa tumoral -EPR, según sus siglas en inglés, Enhanced Permeation and Retention-) y de transporte activo de fármacos (fundamentadas en interacciones ligando-receptor y en el uso de nanomateriales sensibles a estímulos externos).²²

En el campo del suministro dirigido de medicamentos, la administración intravenosa de nanopartículas sigue tres pasos sucesivos: primero, las nanopartículas son guiadas magnéticamente hacia el tejido diana; luego, éstas se inmovilizan en dicho tejido

utilizando un campo magnético externo, mientras el fármaco se libera; y por último, son eliminadas del cuerpo. El transporte de las nanopartículas inyectadas por vía intravenosa a través de los vasos sanguíneos se ve favorecido por las fuerzas hidrodinámicas del flujo de sangre.¹ En la Figura 1.2 y Figura 1.3 se puede ver esquemáticamente el modo de acción de las nanopartículas magnéticas y cómo repercutiría en el organismo una terapia localizada.

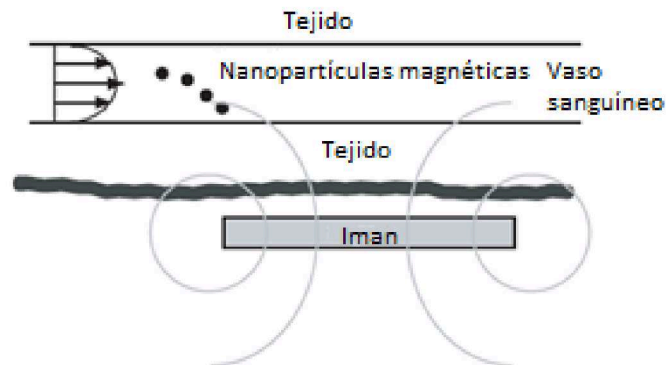


Figura 1.2: Esquema de un sistema de administración de fármacos magnético en sección transversal: se coloca un imán fuera del cuerpo con el fin de que su gradiente de campo magnético pueda capturar soportes magnéticos que fluyen en el sistema circulatorio.¹⁹

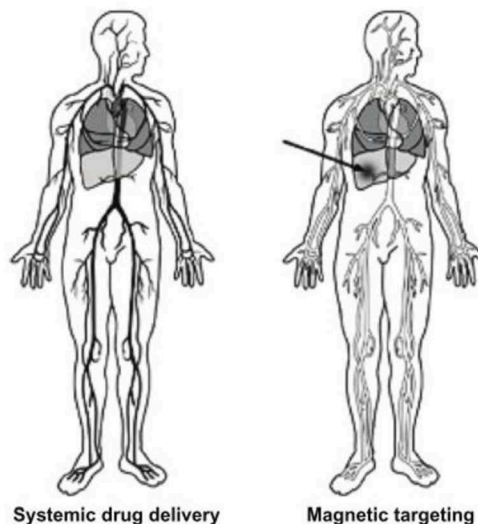


Figura 1.3: Concepto de orientación magnética de drogas.²⁴

El sistema vascular de suministro a las lesiones cancerosas suele tener fenestraciones (poros que proveen canales a través de las paredes capilares) endoteliales aumentadas y una arquitectura independiente, que da como resultado una extravasación

preferencial y da lugar al alojamiento prolongado de las partículas inyectadas. Este mecanismo de focalización de sustancias en un tejido canceroso es conocido como permeabilidad y retención mejorada (EPR).²³ Entonces, para el caso de los tumores, la larga circulación de las nanopartículas en el organismo, permite a las mismas llegar a la zona enferma por extravasación pasiva, aprovechando el aumento de la permeabilidad tumor resultante de la vasculatura tumoral. Alternativamente, las nanopartículas pueden ser acumuladas activamente en los tejidos tumorales por orientación con un campo magnético externo de resistencia adecuada. La organización The Food and Drug Administration (FDA) ha establecido que los imanes inductores de campos de hasta a 8 T no presentan ningún riesgo fisiológico significativo para los adultos. Campos de hasta aproximadamente 1 T se pueden conseguir fácilmente utilizando dispositivos externos con electroimanes o imanes permanentes basados en aleaciones de neodimio-hierro (Nd-Fe, para hasta 15 cm de profundidad) o mediante la implantación de imanes internamente mediante una cirugía mínimamente invasiva (para profundidades más grandes).¹

En cuanto a la difusión de nanopartículas en los tejidos, un diámetro medio de las mismas mayor a 10 nm impide la difusión a través de los pequeños poros vasculares del endotelio normal o saludable.¹ La biodistribución de las mismas puede verse afectada por interacciones no deseadas con sistemas biológicos (como ser el sistema fagocítico mononuclear, que consiste en monocitos y macrófagos que captan y metabolizan moléculas y partículas extrañas) y moléculas (tales como proteínas, mediante un proceso conocido como opsonización). En este contexto, un revestimiento de la nanopartícula con el polímero polietilenglicol (PEG) minimiza el reconocimiento no deseado de la nanopartícula como material extraño y aumenta la circulación y vida media de la misma.²⁵⁻²⁷ Idealmente, una vez que han ejercido su función, es deseable que las nanopartículas puedan ser secretadas o degradadas, sin efectos secundarios tóxicos. El recubrimiento de las nanopartículas con una capa de materiales poliméricos biodegradables, que ya se encuentran en uso en el suministro de fármacos, brinda una solución efectiva a esta problemática.¹⁴

Dentro de este contexto general introducido brevemente, en esta tesis nos enfocamos particularmente la producción de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita, orientadas a utilizarse como vectores de fármacos, lo que requiere el desarrollo de partículas a nanoescala que permitan mejorar la biodisponibilidad y la farmacocinética del medicamento.^{21,28-30} En la Figura 1.4²¹ se muestra una imagen representativa de estas nanopartículas de magnetita observadas con microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para el abordaje de esta problemática, se recurre a la implementación de un modelo conceptual de diseño de producto³¹, el cual brinda una

estructura para resolver el problema de diseño de productos químicos, basada en tres funciones centrales: función de calidad, función de propiedad y función de proceso.

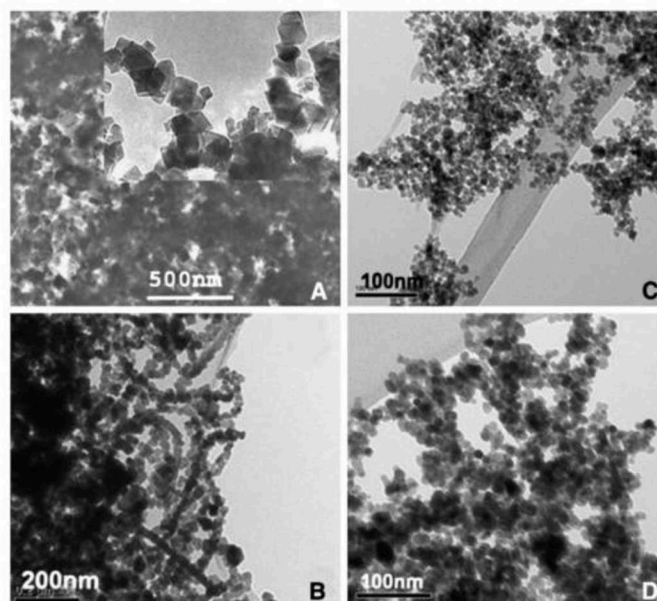


Figura 1.4: Imágenes TEM de nanopartículas de magnetita. (A) Preparadas mediante el método de Sugimoto³² en exceso de $[\text{OH}^-]$; (B) Preparadas mediante el método de Sugimoto sin agitación y sin exceso de $[\text{OH}^-]$ o $[\text{Fe}^{2+}]$; (C) Preparadas mediante el método de Massart³³ en presencia de NH_4OH ; (D) Preparadas mediante el método de Massart en presencia de agente dispersante tetrametilamonio (TMAOH) y sin NH_4OH .²¹

1.2 Modelo conceptual de diseño del producto

La síntesis de nanopartículas para usos médicos requiere del desarrollo de un proceso de producción que logre obtener el producto final con las características deseadas, a fin de poder ser empleado para un uso específico en salud humana lo que impone unas condiciones de alta exigencia tanto de seguridad como de performance. Para afrontar la resolución de esta problemática de síntesis, como herramienta metodológica para el diseño, Bernardo y Saraiva³¹ presentan un modelo conceptual para el diseño de un producto químico que incluye tres funciones centrales de diseño: de *calidad*, de *propiedad* y de *proceso*. Los clásicos ciclos iterativos de los problemas de diseño de producto pueden ser vistos mediante la evaluación de estas tres funciones. En la Figura 1.5 se muestra esquemáticamente este modelo y se pueden apreciar las siguientes relaciones y funciones: la función de proceso relaciona la composición y estructura del producto con las variables de manufactura del proceso; la función de propiedades relaciona las métricas de performance del producto con la composición, estructura y

condiciones de uso del mismo; y la función de calidad relaciona los factores de calidad del producto con las métricas de performance del mismo.

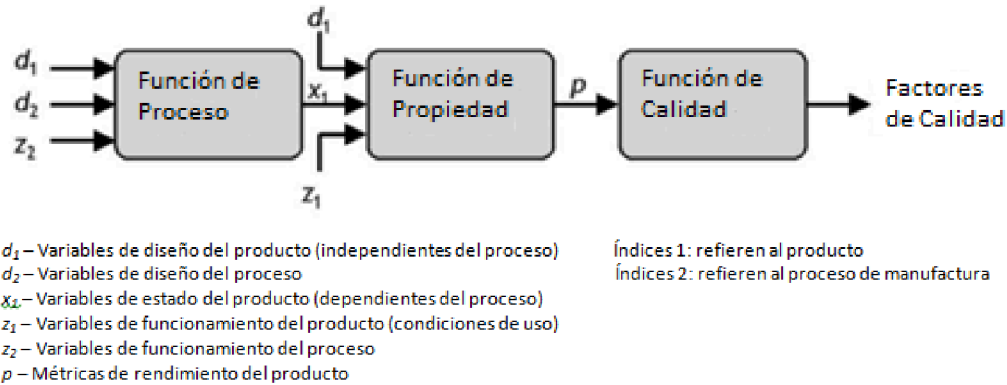


Figura 1.5: Modelo conceptual de diseño de un producto químico.³¹

La función de proceso puede ser representada mediante: $f_2(d_1, d_2, z_2, x_1) = 0$, donde el número de ecuaciones es $n_2 = \dim(x_1)$ y x_1 es el conjunto de variables dependientes. Del mismo modo, la función de propiedad se escribe como: $f_1(d_1, x_1, z_1, p) = 0$, donde el número de ecuaciones es $n_1 = \dim(p)$. Por otro lado, la función de calidad no tiene una descripción cuantitativa completa, ya que los factores de calidad (o las necesidades del cliente) son por definición proposiciones cualitativas que indican los atributos según la valoración de los clientes. Estos atributos primero deben traducirse en especificaciones objetivas del performance del producto, del tipo $p \propto p^*$, donde p^* son valores objetivo de las métricas de rendimiento p . Una vez que los factores de calidad son traducidos eficazmente en un set de métricas de performance, es relativamente simple efectuar un tratamiento cuantitativo de la función de calidad. Así, para cada métrica p , se pueden definir restricciones del tipo $|p - p^*| \leq \delta$, siendo δ una tolerancia dada, o mediante la forma más general $g(p, p^*) \leq 0$.

El modelo formula el problema de diseño de producto mediante una serie de sub-problemas, que se detallan a continuación:³¹

- Sub-problema 1: Traducir los factores de calidad del producto en un set de métricas de performance de producto (p), preferentemente con un significado fisicoquímico, y cuantificar la performance de producto deseada utilizando restricciones del tipo $g(p, p^*) \leq 0$.
- Sub-problema 2: Teniendo en cuenta los modelos cuantitativos y restricciones de calidad del producto, encontrar $\{d_1, x_1\}$ (y eventualmente un subconjunto de z_1) tal que $f_1(d_1, x_1, z_1, p) = 0$. Este problema busca encontrar un material o producto con propiedades pre-especificadas.

- Sub-problema 3: Hallar $\{d_2, z_2\}$ tal que $f_2(d_1, d_2, z_2, x_1) = 0$. Este es el problema clásico de diseño del proceso, cuyo objetivo es especificar un proceso de fabricación capaz de producir el estado del producto x_1 .

En términos generales, con excepción de casos de rutinas simples, la solución de estos tres sub-problemas centrales de diseño no se puede realizar como una secuencia lineal.

El problema de optimización a resolver para el diseño del producto, se plantea considerando una función objetivo global que incluye los costos de manufactura del proceso y pérdidas de calidad del producto. Se puede escribir el problema global como se muestra a continuación:

$$\begin{aligned} \max_{d_1, d_2, z_1, z_2} F(d_1, x_1, z_1, p) &= 0 && \text{[Rendimiento global del proceso]} \\ \text{s.t. } f_1(d_1, x_1, z_1, p) &= 0 && \text{[Función de proceso]} \\ f_2(d_1, d_2, z_2, x_1) &= 0 && \text{[Función de propiedad]} \\ g(p, p^*) &\leq 0 && \text{[Restricciones de performance del producto]} \end{aligned}$$

La concretización de estas formulaciones en la práctica, plantea dos principales dificultades, particularmente en las primeras etapas del diseño. En primer lugar, cuando los conceptos básicos de producción y los principios de funcionamiento aún se encuentran en etapa de desarrollo y la incertidumbre es muy elevada, no se dispone de una comprensiva definición del dominio de búsqueda $\{d_1, x_1, z_1\}$ por lo que las búsquedas sistemáticas son difíciles de realizar. En segundo lugar, incluso cuando el dominio de diseño del proceso es claro y sujeto a menos incertidumbre, las funciones cuantitativas de propiedad del producto final pueden ser muy difíciles de construir.³¹

1.2.1 Aplicación del modelo de diseño de producto al diseño de síntesis de nanopartículas para usos médicos

Aplicando este modelo conceptual de diseño de producto al caso del diseño de producto de nanopartículas para aplicaciones biomédicas, se tendrían las variables descriptivas que se indican en la Tabla 1.1. En primer lugar, cada uno de los factores de calidad se traduce en métricas de performance con un significado fisicoquímico preciso y luego éstas se relacionan con las variables de diseño del producto y del proceso. Así, se podría decir en el caso de las nanopartículas magnéticas caso, que las métricas p_1 y p_2 indican, respectivamente: la concentración de nanopartículas en el sitio específico

transcurrido un determinado tiempo después de la administración del fármaco en sangre y la tasa de liberación de droga en el sitio deseado.

Tabla 1.1: Set de variables del modelo conceptual de diseño de producto para la síntesis de nanopartículas para usos médicos.³¹

	Definición	Producto: nanopartículas para usos médicos
d_1	Variables de diseño del producto (independientes del proceso)	Núcleo: magnetita, recubrimiento: polietilenglicol, droga: doxorubicina, suspensión acuosa a pH=7.
d_2	Variables de diseño del proceso	Configuración del proceso y diseño de equipos.
x_1	Variables de estado del producto (dependientes del proceso)	Tamaño de las partículas en suspensión, potencial zeta de la suspensión de nanopartículas, superparamagnetismo.
z_1	Variables de funcionamiento del producto (condiciones de uso)	Condiciones externas que afectan la liberación de la droga: volumen y concentración de la solución de administración al organismo, frecuencia de aplicación, características propias del paciente (edad, peso, volumen sanguíneo, etc.).
p	Métricas de rendimiento del producto	Direccionamiento magnético hasta el sitio específico, tasa de liberación de droga en el sitio específico.
Factor de calidad		Administración controlada y direccionamiento magnético del fármaco, liberación de droga en el sitio deseado.

El detalle de los sub-problemas a resolver para el caso de la síntesis de nanopartículas se puede describir según:

- La solución del **sub-problema 1** demanda: i) traducir los factores de calidad en métricas de performance de producto cuantificadas preferentemente mediante aspectos fisicoquímicos, ii) construir modelos globales que integren todas las métricas de performance, y iii) resolver la función de pérdida de calidad global $g(p, p^*) \leq 0$. Este planteo, que resulta difícil de esbozar ya que implica cuantificar atributos complejos y subjetivos, queda fuera del alcance del desarrollo de esta tesis, ya que se dispone de bibliografía cuales son las características que deben poseer las nanopartículas magnéticas para cumplir con las especificaciones de uso en aplicaciones biomédicas.
- La solución del **sub-problema 2** requiere encontrar las variables $\{d_1, x_1\}$ que permitan lograr la performance p (lo más cercana posible a p^*) en el producto y delimitar el dominio de interés. Para este caso, existen en bibliografía diversos trabajos, en los

cuales se ha ahondado en este aspecto, llegándose a definir dicho conjunto de variables como:

d_1 = nanopartícula magnética con núcleo de magnetita y recubrimiento de polietilenglicol, con la incorporación de drogas oncológicas específicas, y estables en suspensión acuosa de pH=7.

x_1 = tamaño de partícula en suspensión: de 10 a 100 nm, potencial zeta de la suspensión de nanopartículas $\geq \pm 30$ [mV].

Más adelante en el presente capítulo, se presentará una breve descripción bibliográfica de las características requeridas en las nanopartículas de usos médicos, dónde se detalla la selección de estas variables enunciadas. En este sub-problema también se consideran las variables z_1 , que para este caso corresponden a las condiciones externas que afectan la liberación de la droga, que implican tanto las condiciones de administración del medicamento (volumen y concentración de la solución y frecuencia de aplicación) como las características propias del paciente (edad, peso, volumen sanguíneo, etc.); lo que se busca entonces es diseñar un proceso que permita obtener un producto con estas características con alta probabilidad de ocurrencia.

- El **sub-problema 3** aborda específicamente el problema de diseño del proceso de síntesis y la determinación de los valores óptimos de las variables del proceso de manufactura que permitan producir un producto final que cumpla las especificaciones x_1 . Es decir hallar $\{d_2\}$, dónde:

d_2 = Configuración del proceso y diseño de equipos.

La resolución de este sub-problema abarca la selección de las materias primas y tecnologías del proceso, el diseño de los equipos, el análisis de la incertidumbre asociada y la optimización del proceso productivo. Es específicamente este sub-problema 3 el que se aborda en detalle en esta tesis, ya que se dispone de información en la literatura existente acerca de las especificaciones de uso del producto final.

De manera más específica, en el Capítulo 3 se describe la selección de materias primas y el diseño de la nueva ruta de síntesis, mientras que en el Capítulo 4 se analizan las características del producto obtenido mediante esta nueva síntesis propuesta, a fin de verificar que cumpla con las características de producto deseadas, y por último en el Capítulo 5 se optimiza el proceso a fin de buscar la política de operación que garantice el cumplimiento de las propiedades de uso del producto, con alta probabilidad de ocurrencia. Como herramienta para esta búsqueda de la zona de operación óptima para cumplir con las propiedades de uso final del producto, en el Capítulo 2 se presenta el desarrollo de una metodología de diseño experimental basada en la probabilidad de satisfacer las propiedades de uso final, la

cual aplicada a la nueva ruta de producción, permite hallar la política óptima de operación de las variables del proceso.

1.3 Aplicación de SPIONs en terapias oncológicas

Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (denominadas SPIONs, por sus siglas en inglés, Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles) típicamente tienen dos configuraciones estructurales: (i) un núcleo de partículas magnéticas, por lo general magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), recubierto con un polímero biocompatible o (ii) un polímero biocompatible poroso dentro del cual son precipitadas las SPIONs. Los revestimientos tienen la función de proteger a la partícula magnética del medio ambiente circundante y también pueden ser funcionalizados por la unión de grupos carboxilo, biotina, avidina, carbodiimida y otras moléculas, con el fin de aumentar el rendimiento de focalización. Desde el punto de vista físico, la orientación magnética se deriva de la fuerza magnética ejercida sobre las SPIONs por un gradiente de campo magnético. La eficacia de la terapia depende de varios parámetros físicos, que incluyen: la intensidad de campo, el gradiente, las propiedades volumétricas y magnéticas de las partículas. El proceso de localización de drogas utilizando SPIONs se basa en la competencia entre las fuerzas ejercidas sobre las partículas por el compartimento de la sangre y las fuerzas magnéticas generadas a partir del campo magnético aplicado.²¹

Las SPIONs, como la magnetita o su forma oxidada y más estable la maghemita, son más adecuadas que otras nanopartículas de óxidos metálicos debido a su biocompatibilidad y estabilidad y son, por amplia diferencia, las SPIONs más comúnmente empleadas para aplicaciones biomédicas.³⁴ Las SPIONs de tamaños de 10-100 nm son óptimas para la administración *in vivo*, ya que escapan rápidamente del aclaramiento renal (<10 nm) y de ser secuestradas por el sistema reticuloendotelial (RES) del bazo y el hígado (>200 nm).³⁴ Cada propiedad de las nanopartículas (es decir, tamaño pequeño, gran superficie específica, composición química, solubilidad y geometría) determina la respuesta biológica. En consecuencia, es imperativo caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas bajo consideración para correlacionarlas con los resultados biológicos.¹⁴

Algunos SPIONs con tamaños de 3-6 nm y revestimiento de dextran (con tamaños hidrodinámicos de 20-150 nm) como Feridex, Endorem, Combidex y Sinerem están aprobados para MRI en pacientes. Del mismo modo, SPIONs funcionalizadas con medicamentos pueden ser guiados a la zona objetivo deseada utilizando un campo

magnético externo. Este enfoque las hace verdaderamente terapéuticas (terapéuticas y de diagnóstico).^{34,35} Su aplicación en biología, diagnóstico y terapia médica requiere que las SPIONs sean estables en agua a pH neutro, temperatura y salinidad fisiológicas.³⁶ Tal estabilidad coloidal depende de las dimensiones de las partículas, que deben ser lo suficientemente pequeñas para que la precipitación debido a las fuerzas de gravitación pueda ser evitada. Otros factores importantes son la carga y la química de superficie, que dan lugar a dos tipos de repulsiones: estéricas y debido a las fuerzas Coulomb. Para controlar las propiedades superficiales de las SPIONs, estas son recubiertas con un polímero biocompatible durante o después del proceso de síntesis, con el fin de evitar la formación de agregados, cambios de la composición química por oxidación superficial y la destrucción cuando son expuestas al sistema biológico.³⁷ Además, el recubrimiento de polímero también puede permitir la unión de fármacos por unión covalente, adsorción o atrapamiento en la etapa de funcionalización. La biocompatibilidad y toxicidad de las SPIONs son otros criterios importantes a tener en cuenta para su utilización en aplicaciones biomédicas. Parámetros que determinan la biocompatibilidad y toxicidad incluyen: la naturaleza del componente magnéticamente sensible y el tamaño final de las partículas incluyendo su núcleo y revestimientos. Idealmente, también deben tener una alta magnetización de modo que su movimiento en la sangre se pueda controlar con un campo magnético externo y para que puedan ser inmovilizadas cerca del tejido patológico objetivo. Otro aspecto importante del suministro de SPIONs es su internalización en células específicas, lo cual está severamente limitado por tres factores: (a) corta vida media de las partículas en la sangre, (b) focalización no específica, y (c) baja eficiencia de internalización. Se están llevando a cabo varios esfuerzos en el estudio de la mejora de estas propiedades y se analiza modificar los métodos de síntesis para controlar mejor los tamaños y superficies^{20,21}, y es en este aspecto del diseño del proceso de síntesis donde se centra esta tesis.

El hierro finamente dividido es extremadamente reactivo frente a agentes oxidantes y en presencia de agua o aire húmedo. Por lo tanto, la protección de las SPIONs es de primordial importancia para la obtención de sistemas coloidales física y químicamente estables. Cuando se emplean materiales poliméricos como estabilizadores, la adsorción de los polímeros sobre las SPIONs confiere una repulsión estérica protectora y actúa como una barrera contra la atracción superficial entre las partículas, manteniendo de ese modo las partículas distanciadas las unas de las otras. Si se cargan las nanopartículas con cadenas de polímeros, se puede producir una repulsión electrostática adicional, lo que confiere un efecto de estabilización iónico y estérico (electrostérico) combinado.¹ El PEG es por lejos considerado el más apropiado y más ampliamente utilizado polímero hidrófilo, utilizado para evitar que las SPIONs

administradas por vía intravenosa sean rápidamente fagocitadas por parte del RES (sistema reticuloendotelial). Se han propuesto diversas estrategias para la fijación de PEG a SPIONs, tales como polimerización en la superficie, modificación mediante el enfoque de sol-gel, o silano añadido sobre las superficies de óxido. PEGs de longitudes de cadena a partir de 2 kDa de pesos moleculares son los más adecuados para este fin, como se ha demostrado con varios sistemas de nanopartículas desarrolladas para aplicaciones de liberación de fármacos.¹

En cuanto a la administración vascular (intravenosa o intraarterial) de SPIONs, la sedimentación gravitacional en el flujo sanguíneo puede ser considerada como despreciable, gracias a los recubrimientos poliméricos que generalmente disminuyen la densidad media de los núcleos magnéticos. Sin embargo, al considerar las aplicaciones biomédicas, algunas características claves del polímero deben ser tomadas en consideración, tales como ser: longitud y peso molecular, estructura química (biodegradabilidad y carácter hidrófobo/hidrófilo), conformación, grado de cobertura de la superficie y mecanismo de fijación a la superficie de la partícula (unión covalente, hidrófoba o iónica). Las SPIONs recubiertas con polímeros hidrofílicos (normalmente polisacáridos como dextran, PEG, almidón o polivinilpirrolidona) o con proteínas (por ejemplo, lactoferrina o ceruloplasmina) pueden aumentar su vida media plasmática de unos pocos minutos a varias horas o incluso hasta a días, en algunos casos, como resultado de las propiedades de sigilo (capacidad de pasar desapercibidas para el sistema reticuloendotelial) conferidos por la cobertura polimérica. Entre los polímeros hidrófilos anteriormente mencionados, el PEG es lejos el polímero más ampliamente utilizado para el recubrimiento de SPIONs en nanomedicina debido a su no toxicidad y a sus impresionantes propiedades repulsivas estéricas.¹

En el metabolismo, típicamente, después de su internalización intracelular a través de endocitosis (proceso por el cual se introduce la nanopartícula dentro de la estructura celular), las SPIONs se agrupan dentro de los lisosomas donde, presumiblemente, son degradadas en iones de hierro por una serie de enzimas hidrolizantes a bajo pH, de acuerdo con las vías endógenas del metabolismo del hierro. El tamaño, la carga, la química superficial y la vía de la suministro de las SPIONs influyen en su tiempo de circulación y en los patrones de biodistribución en el cuerpo. La biodistribución final típica de partículas es de 80-90% en el hígado, 5-8% en el bazo y 1-2% en la médula ósea.³⁴

1.3.1 Características requeridas de las SPIONs para su uso en biomedicina

Forma, tamaño y distribución de tamaño.^{15,21,37} El tamaño y la distribución de tamaño de las SPIONs son parámetros importantes relacionados con sus aplicaciones biomédicas. Además, la propiedad magnética de las SPIONs es dependiente del tamaño. Algunas de las ventajas principales del uso de partículas de tamaños inferiores a 100 nm incluyen: mayor superficie específica lo que facilita la fijación de ligandos, menores tasas de sedimentación (es decir, alta estabilidad en suspensión) y mejor difusión a través de los tejidos. Las partículas deben ser lo suficientemente pequeñas para escapar del sistema reticuloendotelial (RES), permanecer en la circulación después de ser inyectadas y ser capaces de pasar a través de los sistemas capilares de órganos y tejidos, evitando la embolia de los vasos. Del mismo modo, el tamaño de partícula es importante para lograr un mayor efecto de permeabilidad y retención (EPR). Por ejemplo, partículas mayores de 10 nm no pueden penetrar en el endotelio en condiciones fisiológicas normales, pero pueden penetrar en tejidos en condiciones patológicas tales como inflamación o tumor.

Estabilidad coloidal.^{21,27} La estabilidad de las SPIONs en suspensión es controlada por tres fuerzas principales: (a) hidrófoba-hidrófila, (b) magnética y (c) van der Waals. Las SPIONs tienden a agregarse debido a las interacciones hidrófobas entre las partículas de tamaños nanométricos, como consecuencia de una elevada relación superficie/volumen, formando grupos en suspensión de tamaños en el orden de algunos micrones. A su vez, los racimos de tamaño del orden de micrones son magnetizados por sus vecinos y se agregan debido a las interacciones magnéticas del tipo dipolo-dipolo. En presencia de un campo magnético externo, éste puede magnetizar también estos grupos, aumentando así su agregación. En general, las partículas de tamaños nanométricos se agregan en suspensión debido a la fuerza atractiva de van der Waals, con el fin de minimizar la superficie total o la energía interfacial. Dicha agregación puede obstaculizar la eficacia de las SPIONs en la administración de fármacos (menos carga de fármaco) debido a la baja área superficial disponible y a los grandes tamaños de las partículas. Por lo tanto, la estabilización de las SPIONs en suspensión mediante la modificación de su superficie es un tema importante en el contexto de la administración de fármacos. La modificación superficial de las SPIONs puede llevarse a cabo ya sea durante su síntesis o en un proceso post-síntesis. Las moléculas ideales utilizadas para la estabilización deben ser biocompatibles y biodegradables. Los materiales de revestimiento como el PEG protegen al núcleo contra la oxidación y, por lo tanto, mantienen la propiedad magnética de las SPIONs.

*Carga superficial.*²¹ La carga superficial de las SPIONs juega un papel significativo en la estabilidad coloidal. Cuantitativamente, la carga superficial se puede medir como un potencial eléctrico en la doble capa interfacial en la superficie de las nanopartículas en suspensión. Un valor de potencial zeta elevado (± 30 mV) es una indicación de la estabilidad de la dispersión de SPIONs debido a la interacción electrostática entre las partículas.

*Composición.*²¹ La composición y estructura de las SPIONs resultan muy importantes en su interacción con los fluidos biológicos y su comportamiento como “drivers” de fármacos. Las características de SPIONs tales como la composición química del núcleo y la cubierta, el tamaño y su distribución, forma y ángulo de curvatura, la cristalinidad, la hidrofobicidad/hidrofilicidad, son importantes para sus aplicaciones *in vivo*. Estas características podrían determinar el tiempo de residencia de SPIONs en el sistema circulatorio. Cuanto menor es el tamaño y más alta es la hidrofilicidad de las SPIONs, menos eficiente es el proceso de opsonización (atrapamiento y expulsión de las nanopartículas del cuerpo por parte del sistema reticuloendotelial).

*Toxicidad de SPIONs: en las células.*²¹ La comprensión de las interacciones entre SPIONs y las proteínas es muy importante. En un fluido biológico, las proteínas pueden ser adsorbidas en la superficie de las SPIONs. Esta adsorción puede tener impactos significativos en el comportamiento biológico, bioquímico y celular. Los cambios desfavorables en las configuraciones de proteínas, debido a las interacciones proteína-SPIONs, deben ser firmemente probados con el fin de predecir lesiones biológicas resultantes de los posibles cambios, como la fibrilación, la exposición a nuevos antígenos y la pérdida de funcionalidad de dichas proteínas. Más específicamente, la desnaturalización de las proteínas después de la interacción con las SPIONs podría causar la exposición de nuevos sitios antigénicos, que pueden iniciar una nueva respuesta inmune.²¹ Las interfaces ingenieriles de las SPIONs utilizadas junto con la ayuda de un campo magnético externo se reconoce como una tecnología moderna para introducir partículas en un sitio deseado, donde el fármaco se libera localmente. Tal sistema tiene el potencial de reducir al mínimo los efectos secundarios y la dosis requerida de los fármacos. Sin embargo, una vez que las SPIONs se internalizan dentro de las células, el revestimiento se digiere dejando las partículas al desnudo expuestas a otros componentes celulares y orgánulos, lo cual influye potencialmente en la integridad general de las células.²¹ La citotoxicidad de SPIONs recubiertas de polivinilalcohol (PVA) con diferentes formas y morfologías ha sido explorada en células de fibroblastos de ratón y células de leucemia humana. Las SPIONs ensayadas mostraron poca o ninguna toxicidad. Por otro lado, se estudió la toxicidad de SPIONs (20 y 40 mg/ml) en células cancerígenas de cáncer pulmón humano, dónde no se

observaron daños en el ADN ni efectos tóxicos de especies de oxígeno reactivas (ROS) intracelulares. Sin embargo, fueron observadas pequeñas lesiones oxidativas de ADN.

*Toxicidad de SPIONs: según su composición.*³⁴ De varias SPIONs comparativamente probadas, el óxido de hierro mostró ser el más seguro, produciendo cambios citotóxicos a niveles de 100 mg/ml (concentración de nanopartículas en solución de administración al organismo) o superiores. La citotoxicidad reducida de nanopartículas de óxido de hierro se asocia con el aumento de la solubilidad de las partículas y la modificación de la química superficial. Los datos de toxicidad *in vivo* en SPIONs son esperanzadores, y demuestran que no hay consecuencias a largo plazo de su uso cuando son administradas a concentraciones clínicamente relevantes a través de las vías pertinentes. Varios informes encontraron hierro acumulado en los tejidos, pero con cambios histológicos insignificantes en órganos vitales, concluyendo la seguridad de las respectivas formulaciones.

1.3.2 Tratamiento anti cancerígeno con SPIONs

En la mayoría de los casos, el gradiente de campo magnético es generado por un potente imán permanente, como ser Nd-Fe-B, situado en un lugar fijo fuera del cuerpo sobre el sitio de destino. Los complejos de fármaco/vehículo, generalmente en la forma de ferrofluidos biocompatibles, son inyectados en el paciente a través del sistema circulatorio. Cuando las fuerzas magnéticas exceden los flujos sanguíneos en las arterias o capilares, las partículas magnéticas son retenidas en el lugar de destino por los campos externos de alto gradiente magnético. Una vez que el medicamento vehiculizado se concentra en el sitio objetivo, el fármaco puede ser liberado ya sea a través de la actividad enzimática o cambios en las condiciones fisiológicas (tales como el pH, la osmolalidad o la temperatura), y puede ser internalizado por las células endoteliales del tejido diana o ser absorbido por las células del tumor. El uso de SPIONs en aplicaciones biomédicas tiene, en teoría, importantes ventajas sobre los métodos terapéuticos convencionales.²¹

1.3.3 Productos similares disponibles en el mercado

Actualmente, las SPIONs son investigadas principalmente a escala laboratorio (excepto en el caso de productos aprobados por la FDA para aplicaciones en humanos, como los agentes de contraste MRI, tales como Endorem™, Feridex®, y Resovist®) y hay una

serie de sofisticadas tecnologías desarrolladas para la síntesis, recubrimiento y funcionalización de SPIONs multifuncionales.²¹

A nivel mundial existen empresas que producen y venden nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas a nivel laboratorio, es decir, para usos en investigación.^{2,14,21} Analizamos en particular los productos ofrecidos por aquellas que brindan nanopartículas magnéticas para ser usadas en aplicaciones de administración de fármacos.

- **Empresa:** NanoComposix, Inc. San Diego, Estados Unidos. Sitio web: nanocomposix.com. **Producto y características:** Nanopartículas magnéticas de magnetita; monodispersas y sin aglomerar; diámetro medio: 20 nm \pm 5 nm; distribución de tamaño < 30%; superficie: polivinilpirrolidona (PVP); formulación: 20 mg/mL en solución de citrato 2 mM o como polvo seco. Precios: 1 ml, USD 40; 25 ml, USD 500.
- **Empresa:** Sigma Aldrich. Sitio web: sigmaaldrich.com. **Producto y características:** Nanocristales superparamagnéticos de óxido de hierro. Precios: partículas de 5 nm, 5 mg/mL en H₂O: 5 ml, USD 1302; 10 nm de diámetro, funcionalizadas con PEG, 1 mg/mL Fe, dispersas en H₂O: 10 ml, USD 861.
- **Empresa:** micromod Partikeltechnologie GmbH. Rostock, Alemania. Sitio web: micromod.de. **Producto y características:** Partículas magnéticas con diámetros de 20 a 100 nm, disponibles con recubrimientos de polisacáridos biocompatibles: dextran (nanomag[®]-D-spio), dextran reticulado (nanomag[®]-CLD-spio), nanoferritos bionizados (BNF-Dextran and BNF-Starch, 80 nm).
- **Empresa:** CAN GmbH. Alemania. Sitio web: can-hamburg.com. **Producto y características:** Partículas dispersas homogéneamente, diámetro de partículas funcionalizadas entre 4 y 20 nm, distribución de tamaño pequeño, superparamagnetismo, dispersables homogéneamente en medios polares o acuosos. Para el uso en investigación biomédica estas partículas también están disponibles con un recubrimiento de PEG para permitir su dispersabilidad en agua o tampón.
- **Empresa:** Nanospectra. Texas, Estados Unidos. Sitio web: nanospectra.com. **Producto y características:** Las partículas AuroShell sólo están disponibles para estudios clínicos designados por la FDA. El potencial beneficio principal de la terapia AuroLase es la destrucción altamente selectiva y rápida del tumor con un daño mínimo

al tejido sano circundante. Los estudios preclínicos han demostrado que la terapia AuroLase es eficaz y no causa toxicidad sistémica detectable.

1.4 Aspectos que lo diferencian de lo ya existente y conocido en el área

Según se ha presentado en este capítulo a modo introductorio, para situar en el contexto de la problemática que da origen a este trabajo, y considerando la bibliografía y trabajos científicos citados, se puede ver que en los últimos años se ha abordado con gran auge la investigación en el campo de las partículas nanométricas para usos en medicina, debido a sus potenciales beneficios. Asimismo, se puede ver que existe en el mercado cierta disponibilidad de productos de esta índole, comercializados por empresas de manufactura de precisión a pequeña escala.

En cuanto a los avances científicos en el área, es importante notar que si bien se han ido desarrollado diversos mecanismos de síntesis, aún ninguno de ellos podría ser escalable a nivel industrial, debido fundamentalmente a dos motivos: por un lado, todas las síntesis conocidas hasta el momento utilizan como reactivos principales sales de cloruros, las cuales resultan corrosivas para equipos industriales; y por otro lado, la gran cantidad de etapas y procedimientos que incluyen estas síntesis, resultan engorrosos o altamente costosos como para pensar en la posibilidad de implementarlos en grandes escalas de producción. Además, las síntesis disponibles en bibliografía no cuentan con estudios o análisis de reproducibilidad, de modo de garantizar el cumplimiento de determinadas propiedades de uso final requeridas en el producto elaborado. Considerando estos aspectos, orientados a diseñar un producto para uso en medicina humana, resulta imprescindible poder contar con un proceso de síntesis que logre cumplir con las propiedades finales y específicas solicitadas del producto, de modo de asegurar una administración inocua en el organismo.

Como se puede apreciar observando el listado de empresas y productos ofrecidos por las mismas en el campo de las nanopartículas para usos en administración de fármacos, actualmente en el mercado hay disponibilidad de este tipo de partículas pero todas se producen y venden en pequeñas cantidades, a escala laboratorio, por lo cual sólo son útiles para aplicaciones en ensayos de esta índole. Además, los precios de venta son considerablemente elevados, teniendo en cuenta las cantidades y diluciones en que se venden las mismas. Al disponer entonces de lotes tan pequeños, estas partículas no son aptas para ensayos clínicos en humanos, ya que para ello, se necesitaría una cantidad de medicamento homogéneo (es decir, con iguales características y propiedades de uso final) suficientemente grande como para replicar

el tratamiento en varios pacientes, administrando en cada uno de ellos las dosis requeridas según indicaciones médicas pertinentes.

Por todos estos motivos, resulta importante investigar y desarrollar un nuevo proceso de producción reproducible de SPIONs, que permita obtener un producto final de características idénticas en cada lote, y que a su vez sea replicable a mayores escalas de producción, e incluso a escala industrial, si se piensa por ejemplo, en la futura comercialización de estos productos farmacéuticos. El diseño de un proceso de síntesis química que permita cumplir con las necesidades de escalado, suficientes para obtener las cantidades de medicamento requeridas para los procedimientos de pruebas clínicas, es aún un desafío que está siendo investigado, y que brindará un paso más para el desarrollo de un nuevo tratamiento, más localizado y con menores efectos adversos, para el tratamiento de determinados cánceres y tumores.

La **hipótesis de la tesis** se puede expresar entonces diciendo: *“Mediante la optimización experimental del proceso de producción de SPIONs recubiertas con PEG, se logra diseñar un proceso reproducible y escalable, que permite obtener nanopartículas aptas para la administración en el cuerpo humano”*.

1.4.1 Nuevo proceso de síntesis de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita recubiertas con PEG

Habiendo presentado un breve detalle de la forma de acción del medicamento buscado y de los requerimientos en cuanto a propiedades que el mismo debe cumplir para poder emplearse con los fines médicos deseados (definiéndose de este modo el producto final deseado, tal como se requiere en los pasos iniciales del modelo conceptual de diseño de producto –subproblemas 1 y 2-), esta tesis entonces, se focaliza en el diseño y desarrollo de un nuevo proceso de producción de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita recubiertas con PEG que logre obtener un producto final que cumpla con todos los requisitos planteados (resolución del sub-problema 3 del modelo conceptual de diseño de producto). Con este objetivo, se puede ver que es importante, además de lograr una síntesis escalable, brindar reproducibilidad y poder garantizar un producto final con alta probabilidad de cumplir con las especificaciones de uso requeridas.

Como estrategia de resolución, siguiendo el planteo conceptual del diseño, se realiza en principio un análisis minucioso de las síntesis de producción disponibles en bibliografía, y con base en esta información, se proponen y prueban nuevas

alternativas de producción hasta encontrar una que logre sintetizar el producto deseado. En la Figura 1.6 se muestra el esquema del proceso de producción propuesto, el cual se presenta en detalle en el Capítulo 3 del presente trabajo.

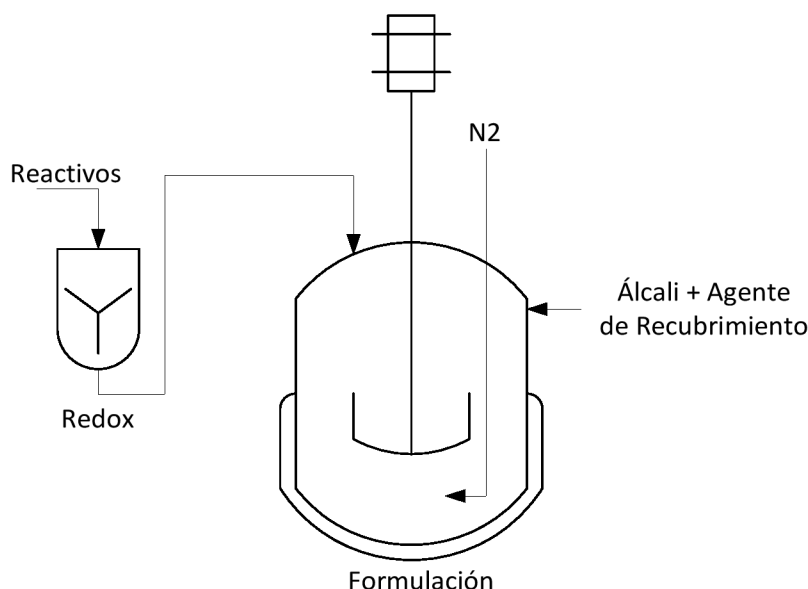


Figura 1.6: Esquema del proceso de síntesis de SPIONs.

Por otra parte, para poder verificar que el producto obtenido mediante la nueva síntesis cumple con las características y propiedades necesarias, se analizan las muestras mediante técnicas de caracterización pertinentes, que permiten identificar el compuesto formado, su composición, tamaño, estabilidad en solución y superparamagnetismo. Este análisis se aborda en detalle en el Capítulo 4, dónde se presentan y evalúan los resultados obtenidos de someter la muestras a las siguientes técnicas de caracterización: dispersión de luz dinámica (DLS), análisis termogravimétrico (TGA), espectroscopia Raman, espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (DRX) y análisis cualitativos de identificación de magnetita y superparamagnetismo.

1.4.2 Diseño óptimo de experimentos para garantizar propiedades de uso final

Las características y propiedades que deben respetar las nanopartículas para poder utilizarse con fines de administración de fármacos, son muy estrictas, y por estos motivos, el diseño de un proceso de síntesis que pueda garantizar las propiedades de

uso de este producto, con alta probabilidad, es indispensable para poder pensar en la posibilidad de un escalado a nivel industrial. Por esto, la búsqueda de una ruta de síntesis de nanopartículas magnéticas para usos médicos debe incluir un estudio de reproducibilidad, análisis y optimización de variables de operación en pos de asegurar un producto final que garantice todas las especificaciones de uso con una elevada probabilidad.³⁹⁻⁴¹

En esta tesis se aborda el diseño y desarrollo de un nuevo proceso, reproducible y escalable a nivel industrial, de producción de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita orientadas a aplicarse en el campo de la medicina. Como herramienta necesaria para la resolución de este problema de síntesis, se desarrolla una metodología de diseño de experimentos basada en datos de la probabilidad de ocurrencia de un evento, a fin de poder aplicarla al diseño experimental de la nueva ruta de síntesis y así poder estudiar su reproducibilidad. Es importante señalar la necesidad de disponer de esta metodología para el estudio de reproducibilidad de este nuevo proceso, ya que la misma opera basándose exclusivamente en datos experimentales (al tratarse de un nuevo proceso, aún no se dispone de ecuaciones fundamentales que describan su comportamiento, y por ende, no se pueden aplicar métodos de diseño que requieran de modelos basados en principios fundamentales).

La búsqueda de una política de operación óptima que asegure el cumplimiento de las especificaciones con alta probabilidad, es un problema de optimización estocástica bajo incertidumbre. Para el caso de procesos innovadores (como es el caso de la nueva síntesis de nanopartículas superparamagnéticas) de los cuales aún no se conocen los principios fundamentales de los mismos y no se dispone de ecuaciones que describan sus comportamientos, el modelado de la probabilidad de éxito del proceso dentro de una región de interés resulta una labor casi imposible de realizarse. Por esto, se propone una metodología que utiliza un modelado de superficie de respuesta basado en datos de experimentos y sus correspondientes observaciones, como alternativa para abordar el problema de optimización necesario para evaluar la nueva ruta de síntesis propuesta.

El modelado basado en datos exclusivamente experimentales permite incluir en el análisis el impacto de aquellos efectos no controlados y/o desconocidos, lo cual resulta imposible de contemplar cuando se modela el proceso de síntesis con base en los principios fundamentales que determinan el comportamiento del proceso. Asimismo, este enfoque de diseño experimental planteado, busca conseguir la máxima información posible considerando un dado presupuesto de experimentación (por ejemplo, número de experimentos). Resumidamente, la metodología desarrollada

construye un modelo de superficie de respuesta que interpola el rendimiento del proceso y suministra una pauta para mejorar las condiciones de funcionamiento. De esta forma, se genera una secuencia de condiciones experimentales a ser ensayadas, a fin de identificar una política de funcionamiento con alta probabilidad de éxito y una región reducida de condiciones de operación que garanticen una alta probabilidad de éxito de alcanzar las especificaciones requeridas en el producto.

En la Figura 1.7 se muestra de manera general una superficie de respuesta, a modo de ilustrar el funcionamiento del método de diseño basado en la probabilidad, el cual mediante datos de experimentos realizados en puntos estratégicos propuestos en cada iteración del algoritmo desarrollado, va conduciendo, bucle a bucle, hacia la zona de máxima probabilidad de cumplimiento de especificaciones (zona en color rojo). En la Figura 1.8⁴¹ se presenta el algoritmo de la metodología desarrollada, lo cual se muestra y analiza en detalle en el Capítulo 2.

En última instancia, teniendo la metodología de diseño experimental y la nueva ruta de síntesis de nanopartículas, se aplica la metodología al proceso de síntesis, de manera de analizar la reproducibilidad y optimizar las condiciones de operación a fin de asegurar el cumplimiento de las propiedades de uso final del producto con alta probabilidad

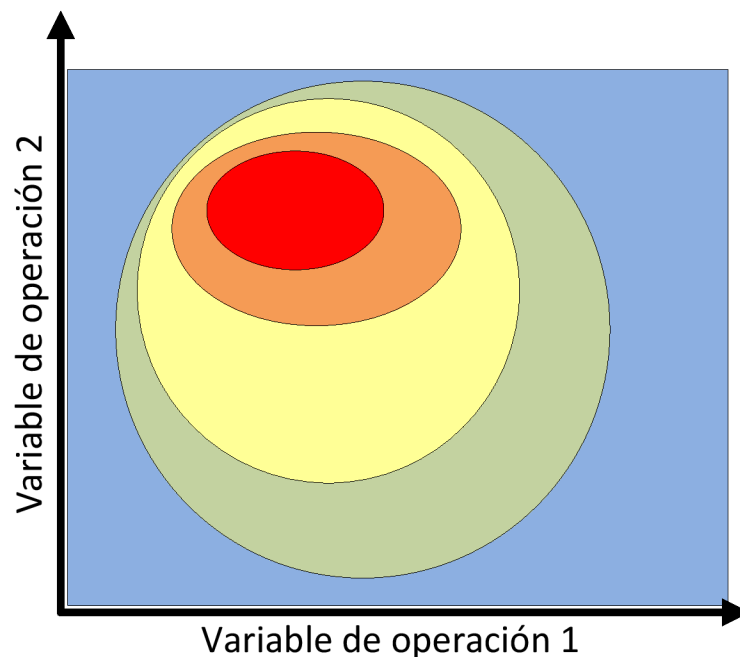


Figura 1.7: Propiedades de uso final en función de las variables críticas del proceso.

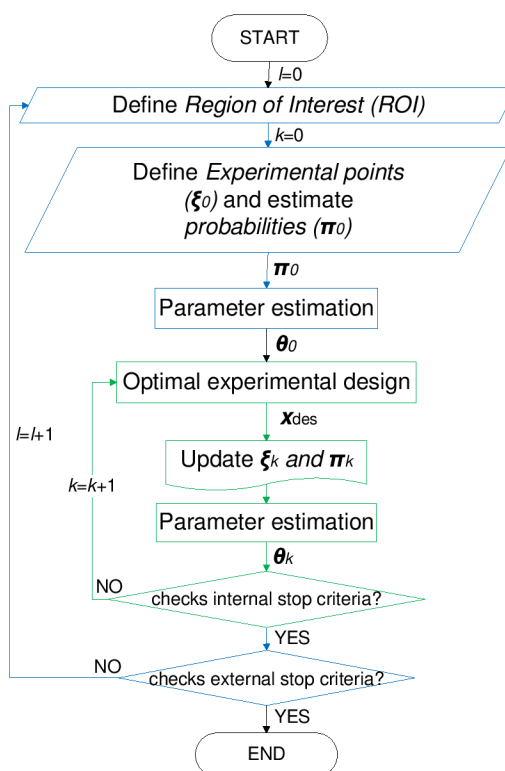


Figura 1.8: Algoritmo de diseño de experimentos basado en la probabilidad de éxito.⁴²

1.5 Conclusiones

De todo lo expuesto en este capítulo introductorio, se puede concluir resaltando específicamente el objetivo general de esta tesis, que implica el desarrollo y diseño de un nuevo proceso productivo de SPIONs para aplicación en biomedicina. Para lograr este objetivo general, se abordan objetivos específicos que se pueden enunciar según la metodología planteada para el abordaje de la problemática, que abarca las siguientes tareas: i) el desarrollo de una metodología de diseño experimental basada en datos que permite predecir la influencia de las condiciones de operación del proceso con las propiedades de uso final de las SPIONs resultantes; ii) el estudio y análisis exhaustivo de las síntesis disponibles (todas ellas a escala laboratorio) a fin de diseñar una síntesis nueva, apta para ser escalable a nivel industrial; iii) el ensayo y evaluación experimental en planta piloto de las rutas de síntesis planteadas; iv) la caracterización de los productos obtenidos en las síntesis propuestas; v) el desarrollo del diseño óptimo de experimentos que posibilita identificar condiciones operativas que maximizan la probabilidad de que las SPIONs resultantes cumplan las especificaciones de uso final y garanticen la reproducibilidad del proceso propuesto.

Como resultado del desarrollo de esta tesis, se busca presentar un nuevo proceso productivo de síntesis de SPIONs para usos médicos, que sea reproducible y escalable a nivel industrial y que garantice la obtención de un producto con alta probabilidad de cumplir con las especificaciones de uso. La importancia del aporte que realiza esta tesis, combina, por un lado el desarrollo de una metodología de diseño experimental que puede ser aplicada para la optimización de operación de nuevos procesos, de los que aún no se dispone de un modelado fundamental de ecuaciones que describan su comportamiento, ya que la misma se basa exclusivamente en datos experimentales; y por otro lado, el desarrollo, diseño, análisis y optimización de una nueva ruta de síntesis, que puede dar lugar a un escalado que permita a futuro producir SPIONs en escala suficiente para habilitar el desarrollo de pruebas clínicas de este nuevo medicamento oncológico.

1.6 Bibliografía

- (1) Reddy, L. H.; Arias, J. L.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (11), 5818.
- (2) Wagner, V.; Dullaart, A.; Bock, A.-K.; Zweck, A. The Emerging Nanomedicine Landscape. *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24* (10), 1211.
- (3) Allard-Vannier, E.; Cohen-Jonathan, S.; Gautier, J.; Hervé-Aubert, K.; Munnier, E.; Soucé, M.; Legras, P.; Passirani, C.; Chourpa, I. Pegylated Magnetic Nanocarriers for Doxorubicin Delivery: A Quantitative Determination of Stealthiness in Vitro and in Vivo. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *81* (3), 498.
- (4) Krol, S.; Macrez, R.; Docagne, F.; Defer, G.; Laurent, S.; Rahman, M.; Hajipour, M. J.; Kehoe, P. G.; Mahmoudi, M. Therapeutic Benefits from Nanoparticles: The Potential Significance of Nanoscience in Diseases with Compromise to the Blood Brain Barrier. *Am. Chem. Soc.* **2011**.
- (5) Faraji, M.; Yamini, Y.; Rezaee, M. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications. *J. Iran. Chem. Soc.* **2010**, *7* (1), 1.
- (6) Sakamoto, J. H.; van de Ven, A. L.; Godin, B.; Blanco, E.; Serda, R. E.; Grattoni, A.; Ziemys, A.; Bouamrani, A.; Hu, T.; Ranganathan, S. I.; et al. Enabling Individualized Therapy through Nanotechnology. *Pharmacol. Res.* **2009**, *62* (2), 57.
- (7) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (6), 2064.
- (8) Atta, A. H.; El-ghamry, M. A.; Hamzaoui, A.; Refat, M. S. Synthesis and Spectroscopic Investigations of Iron Oxide Nano-Particles for Biomedical Applications in the Treatment of Cancer Cells. *J. Mol. Struct.* **2015**, *1086*, 246.

- (9) Ivashchenko, O.; Lewandowski, M.; Pepliska, B.; Jarek, M.; Nowaczyk, G.; Wiesner, M.; Załęski, K.; Babutina, T.; Warowicka, A.; Jurga, S. Synthesis and Characterization of Magnetite/silver/antibiotic Nanocomposites for Targeted Antimicrobial Therapy. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *55*, 343.
- (10) Vo-Dinh, T. *Nanotechnology in Biology and Medicine: Methods, Devices, and Applications*; Press, C., Ed.; 2006.
- (11) Papazoglou, E. S.; Parthasarathy, A. *BioNanotechnology*; 2007; Vol. 2.
- (12) Lim, J.; Yeap, S. P.; Che, H. X.; Low, S. C. Characterization of Magnetic Nanoparticle by Dynamic Light Scattering. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8* (1), 381.
- (13) Goya, G. F.; Berquó, T. S.; Fonseca, F. C.; Morales, M. P. Static and Dynamic Magnetic Properties of Spherical Magnetite Nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **2003**, *94* (5), 3520.
- (14) Sanvicens, N.; Marco, M. P. Multifunctional Nanoparticles-Properties and Prospects for Their Use in Human Medicine. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26* (8), 425.
- (15) Veiseh, O.; Gunn, J. W.; Zhang, M. Design and Fabrication of Magnetic Nanoparticles for Targeted Drug Delivery and Imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *62* (3), 284.
- (16) Rahman, M. M. *Nanomaterials*; INTECH, Ed.; Croatia, 2011.
- (17) Kelkar, A. D.; Herr, D. J. C.; Ryan, J. G. *Nanoscience and Nanoengineering. Advances and Applications.*; CRC Press, 2014.
- (18) Hofmann-Antenbrink, M.; von Rechenberg, B.; Hofmann, H. *Superparamagnetic Nanoparticles for Biomedical Applications*; 2009; Vol. 65.
- (19) Pankhurst, Q. A. A.; Connolly, J.; Jones, S. K.; Dobson, J. Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2003**, *36* (13), R167.
- (20) Thanh, N. T. K.; Green, L. A. W. Functionalisation of Nanoparticles for Biomedical Applications. *Nano Today* **2010**, *5* (3), 213.
- (21) Mahmoudi, M.; Sant, S.; Wang, B.; Laurent, S.; Sen, T. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs): Development, Surface Modification and Applications in Chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *63* (1–2), 24.
- (22) Arias Mediano, J. L.; Sáez Fernández, E. A.; Ruiz Martínez, M. A.; Gallardo Lara, V. Potenciación de La Actividad Antitumoral de Doxorubicina Mediante Su Formulación En Nanoplateformas Magnéticas. **2011**, 344.
- (23) Ferrari, M. Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5* (3), 161.
- (24) Akbarzadeh, A.; Mikaeili, H.; Zarghami, N.; Mohammad, R.; Barkhordari, A.; Davaran, S. Preparation and in Vitro Evaluation of Doxorubicin-Loaded Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Modified with Biocompatible Copolymers. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 511.
- (25) Dias, A. M. G. C.; Hussain, A.; Marcos, A. S.; Roque, A. C. A. A Biotechnological Perspective on the Application of Iron Oxide Magnetic Colloids Modified with Polysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29* (1), 142.
- (26) Mahmoudi, M.; Simchi, A.; Imani, M. Recent Advances in Surface Engineering of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *J. Iran. Chem. Soc.* **2010**, *7* (July), 1.

- (27) Hałupka-Bryl, M.; Bednarowicz, M.; Dobosz, B.; Krzyminiewski, R.; Zalewski, T.; Wereszczyńska, B.; Nowaczyk, G.; Jarek, M.; Nagasaki, Y. Doxorubicin Loaded PEG-B-poly(4-Vinylbenzylphosphonate) Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. *J. Magn. Magn. Mater.* **2015**, *384*, 320.
- (28) Gao, J.; Gu, H.; Xu, B. Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (8), 1097.
- (29) Gao, J.; Xu, B. Applications of Nanomaterials inside Cells. *Nano Today* **2009**, *4* (1), 37.
- (30) Lübbe, A. S.; Alexiou, C.; Bergemann, C. Clinical Applications of Magnetic Drug Targeting. *J. Surg. Res.* **2001**, *95* (2), 200.
- (31) Bernardo, F. P.; Saraiva, P. M. Modeling and Simulation of the Polymeric Nanocapsule Formation Process. *Am. Inst. Chem. Eng.* **2015**, *61* (3), 802.
- (32) Sugimoto, T.; Matijević, E. Formation of Uniform Spherical Magnetite Particles by Crystallization from Ferrous Hydroxide Gels. *J. Colloid Interface Sci.* **1980**, *74* (1), 227.
- (33) Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magmetics* **1981**, *M* (2), 1980.
- (34) Shubayev, V. I.; Pisanic, T. R.; Jin, S. Magnetic Nanoparticles for Theragnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61* (6), 467.
- (35) Farokhzad, O. C.; Langer, R. Nanomedicine: Developing Smarter Therapeutic and Diagnostic Modalities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58* (14), 1456.
- (36) Lu, A. S.; Bergemann, C.; Brock, J.; McClure, D. G.; Lübbe, A. S.; Bergemann, C.; Brock, J.; McClure, D. G. Physiological Aspects in Magnetic Drug-Targeting. *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *194* (1), 149.
- (37) Issa, B.; Obaidat, I. M.; Albiss, B. a; Haik, Y. Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (11), 21266.
- (38) Mangual, J. O.; Avilés, M. O.; Ebner, A. D.; Ritter, J. A. In Vitro Study of Magnetic Nanoparticles as the Implant for Implant Assisted Magnetic Drug Targeting. *J. Magn. Magn. Mater.* **2011**, *323* (14), 1903.
- (39) Kong, X.; Yang, Y.; Chen, X.; Shao, Z.; Gao, F. Quality Control via Model-Free Optimization for a Type of Batch Process with a Short Cycle Time and Low Operational Cost. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, *50* (5), 2994.
- (40) Zhao, F.; Lu, N.; Lu, J. Quality Control of Batch Processes Using Natural Gradient Based Model-Free Optimization. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53*, 17419–17428.
- (41) Georgakis, C. Design of Dynamic Experiments: A Data-Driven Methodology for the Optimization of Time-Varying Processes. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, *52* (35), 12369.
- (42) Colombo, E.; Luna, M.; Martínez, E. Probability-Based Design of Experiments for Batch Process Optimization with End-Point Specifications. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2016**, *55* (5), acs.iecr.5b01295.

2 DISEÑO ÓPTIMO DE EXPERIMENTOS

En este capítulo se presenta, describe detalladamente y evalúa *in silico* la nueva metodología de diseño de experimentos propuesta, basada en la probabilidad de éxito de ocurrencia de un evento deseado, por ejemplo, cumplir con las especificaciones de uso. Dicha metodología constituye una herramienta fundamental para el posterior análisis de performance del nuevo proceso de síntesis de SPIONs que se presenta en esta tesis.

2.1 Introducción

Según se ha presentado en el Capítulo 1, en esta tesis se aspira a diseñar un proceso de síntesis de SPIONs con las propiedades requeridas para ser utilizado en biomedicina. Para lograr este objetivo, se recurre al modelo conceptual de diseño de producto¹, dónde más específicamente, se debe resolver el sub-problema 3, que implica el diseño de un proceso de síntesis de SPIONs que garantice, con alta probabilidad, la obtención de nanopartículas magnéticas con las características requeridas de forma reproducible a escala industrial.

Una vez diseñado el nuevo proceso de síntesis de SPIONs, resulta necesario evaluar experimentalmente el proceso de modo de verificar que éste sea reproducible y que se garantice el cumplimiento de las propiedades de uso final del producto con alta probabilidad de éxito. Para afrontar este análisis de reproducibilidad y hallar la óptima política de operación del nuevo proceso de síntesis, resulta necesario disponer de una metodología de diseño experimental que permita analizar el comportamiento de un proceso del cual no se disponen modelos fundamentales o ecuaciones que describan su comportamiento, por tratarse de un proceso innovador. En el presente capítulo de la tesis, se propone una novedosa metodología de diseño experimental, que es capaz de buscar la zona óptima de operación de un nuevo proceso, garantizando el cumplimiento con alta probabilidad de éxito de las especificaciones de uso del producto final del proceso.

2.2 Metodología de diseño de experimentos para optimización considerando las especificaciones de uso del producto

Los problemas de optimización experimental de procesos por lotes o “batch” están relacionados en su mayoría, con la necesidad de cumplir determinadas especificaciones del producto obtenido al final de cada lote de producción, de manera de minimizar la variabilidad en la calidad del producto obtenido y en el rendimiento del proceso.² Con el desarrollo de procesos innovadores asociados a nanomateriales, fármacos, cosméticos y alimentos, etc., la satisfacción de las propiedades de uso final del producto es un problema fundamental que debe abordarse en la etapa de diseño del producto/proceso para garantizar la manufactura reproducible a escala industrial.^{3,4} Por ejemplo, la producción de nanopartículas magnéticas para su uso como portadores direccionables de drogas oncológicas, requiere que las SPIONs posean determinadas características de tamaño, forma, composición, revestimiento superficial, magnetización y paramagnetismo, entre otras; la reproducibilidad de las propiedades de uso de las nanopartículas magnéticas define un estrecho rango de condiciones de operación con alta probabilidad de éxito para obtener el producto deseado de manera repetida.⁴

La elección de los valores adecuados de las variables controladas del proceso son fundamentales para cumplir con las especificaciones de punto final en cada lote, incluyendo lo que respecta a las propiedades de uso del producto en particular.⁵⁻⁷ La búsqueda de la política óptima de funcionamiento para garantizar que se cumplan, con alta probabilidad, las especificaciones del proceso y/o producto, es un problema de optimización estocástica bajo incertidumbre. Las propiedades y características de la resultante en un dado lote de producción se observan a través de una salida estocástica binaria -éxito o fracaso del experimento- que depende tanto de los valores de las entradas *controlables*, que definen las condiciones de operación del proceso, como también de un número de factores no controlados que afectan las propiedades del producto. En consecuencia, el modelo del proceso es de naturaleza probabilística y correlaciona la probabilidad binomial de éxito de un experimento con los valores elegidos de las variables controladas.

El modelado de la probabilidad de éxito basado en principios fundamentales que describen el comportamiento del proceso en cuestión, dentro de una región de interés, es una tarea difícil en la mayoría de los procesos industriales y casi imposible para el caso de productos innovadores. Por lo tanto, proponemos un modelado de superficie de respuesta, basado en datos de experimentos y sus correspondientes observaciones (éxito/fracaso) como alternativa para abordar el problema de

optimización planteado. Para lograr este objetivo, el diseño óptimo de los experimentos es una herramienta importante debido a la creciente necesidad de disminuir drásticamente los tiempos y costos de experimentación en procesos innovadores.⁴

El diseño de experimentos dinámicos basado en modelos, para la optimización de procesos batch ha sido desarrollado de manera reciente utilizando aprendizaje activo e inferencia bayesiana.⁸⁻¹⁰ El diseño de experimentos orientado a la toma de decisiones¹¹ considera de qué manera los datos obtenidos, y por consiguiente, el modelo desarrollado en base a ellos, pueden ser utilizados en optimización y toma de decisiones. Para esto, el objetivo del diseño experimental no implica necesariamente reducción de la incertidumbre en la estimación de parámetros o la discriminación de modelos, pero si la toma de decisiones óptimas y la optimización del proceso. De acuerdo con ello, el contenido de información de los datos obtenidos es de suma importancia debido a la creciente necesidad de reducir los recursos necesarios para lograr el objetivo o meta específica hacia el cual el modelo está apuntando. Por lo tanto, la identificación del modelo y optimización de manera simultánea^{11,1}, resalta un objetivo distintivo para el diseño óptimo de experimentos dinámicos.⁴ La principal limitación de un modelado basado en principios fundamentales y leyes constitutivas, es que el impacto de los efectos no controlados y desconocidos sobre la probabilidad de éxito es difícil de tener en cuenta debido al empleo de modelos imperfectos y datos escasos. Si el modelo no puede representar estos efectos, sus predicciones pueden no ser lo suficientemente fiables para garantizar las especificaciones de punto final deseadas. Por lo tanto, un modelo empírico, basado en datos, que sólo contempla los experimentos y sus observaciones (éxito/fracaso) es la alternativa de elección. El enfoque de diseño experimental tiene como objetivo conseguir la máxima información para un esfuerzo experimental dado. En la mayoría de los casos, se construye un modelo de superficie de respuesta que resume e interpola el comportamiento del proceso y proporciona una guía valiosa para optimizar las variables controladas.

Fiordalis y Georgakis¹² han propuesto una metodología de diseño experimental basado en datos de experimentos dinámicos como un medio para desarrollar un modelo de superficie de respuesta que se puede utilizar para optimizar los procesos batch complejos, de los cuales es difícil desarrollar un modelo basado en principios fundamentales. Desafortunadamente, en el enfoque propuesto por Fiordalis y Georgakis¹² la probabilidad de cumplir con las especificaciones de punto final no se modela de forma explícita. Para lograr este objetivo, es necesario desarrollar un diseño de experimentos que incluya un criterio compuesto que represente el doble propósito de estimar eficientemente los parámetros del modelo y simultáneamente maximice la

probabilidad de ocurrencia de un evento en particular. McGree et al.¹³ han propuesto diferentes enfoques para combinar la estimación de parámetros con criterios de diseño contrapuestos para modelos no lineales. Más específicamente, McGree y Eccleston¹⁴ han desarrollado un diseño óptimo basado en la probabilidad que busca simultáneamente la optimización de un diseño con respecto al criterio de D-optimalidad y, al mismo tiempo, maximizar una función de la probabilidad de observar el resultado deseado.

En este capítulo se propone una novedosa metodología de diseño secuencial de experimentos que incluye un criterio compuesto que aborda el doble propósito de estimación eficiente de los parámetros y al mismo tiempo maximizar la probabilidad de ocurrencia de un particular evento al final de cada experimento.¹⁴ La búsqueda incremental de una región reducida de condiciones de operación que garanticen una alta probabilidad de éxito, se modela formalmente como sigue: dado un espacio de definición de las variables controladas $X \subset \mathfrak{X}$ y una función desconocida $\pi: X \rightarrow [0,1]$ que representa la probabilidad binomial de éxito de un experimento, una secuencia reducida de experimentos es generada de tal manera que una política de funcionamiento con alta probabilidad de éxito x^* pueda ser identificada a partir de un reducido número de ensayos experimentales. Vale la pena señalar que, después de cada experimento, la única información recibida es el éxito o fracaso en el cumplimiento de las especificaciones del producto o proceso resultantes del ensayo.

Este procedimiento de optimización integra el diseño óptimo de experimentos con un modelo $\pi(x)$ de superficie de respuesta para la probabilidad de éxito, de manera de que, iterativamente, se seleccionen las condiciones de operación para el siguiente experimento que se realice. Esto da lugar a la necesidad de un compromiso entre la mejora de la precisión paramétrica en un modelo de superficie de respuesta $\pi(x)$ y la búsqueda de una región reducida de políticas de operación con elevadas probabilidades de éxito. El objetivo final del procedimiento es recomendar, después de un número relativamente pequeño de experimentos, una política de funcionamiento x_r que maximice la probabilidad de éxito de alcanzar las especificaciones requeridas. Con este objetivo, la secuencia de ensayos experimentales debe ser generada a fin de aprovechar el conocimiento disponible acerca de cómo maximizar las probabilidades de éxito, y al mismo tiempo, explorar el espacio de las variables independientes para la estimación eficiente de parámetros en el modelo que describe la función $\pi(x)$.

2.3 Diseño óptimo basado en la probabilidad de éxito

Para el modelado de la probabilidad de éxito $\pi(x)$ a partir de datos experimentales, normalmente se recurre a modelos lineales generalizados (GLM por sus siglas en inglés, *Generalized Linear Models*).^{14,15} En el desarrollo de modelos inductivos para regresión, los GLMs amplían el marco de modelado lineal para predecir variables de respuesta que no tienen distribución normal y que están acotadas a un rango restringido, por lo que son más comúnmente utilizados para modelar datos binarios o datos de conteo en problemas de clasificación. Estos modelos extienden la regresión lineal permitiendo al modelo lineal relacionarse con la variable de respuesta mediante una función link o de enlace.^{16,17} Los GLMs utilizan una *función de respuesta* σ para convertir un modelo lineal con rango $(-\infty, \infty)$ en una salida que se encuentra dentro del intervalo $[0; 1]$ (por ejemplo, la probabilidad de ocurrencia de un evento). Por lo tanto, dado un modelo de regresión generalizada $\eta(x; \theta)$, la probabilidad de éxito predicha $\pi(x_i)$ en x_i es $\sigma(\eta(x_i; \theta))$.

Para un diseño experimental dado, ξ , constituido por los puntos que conforman las variables $x_i \in X$, $i = 1, \dots, n$, para los cuales se han obtenido las correspondientes observaciones (respuestas) y_i ; un GLM está definido por tres componentes: una distribución de la respuesta, un predictor lineal y una función de enlace $g(\bullet)$ que relaciona la respuesta con el predictor lineal. Si la variable de respuesta binaria tiene una distribución de Bernoulli con probabilidad de éxito $\pi(x_i) = \sigma(y_i) = g^{-1}(y_i)$, una función de enlace adecuada es la función logística:¹⁵

$$g(\pi) = \log\left(\frac{\pi}{1-\pi}\right) \quad (1)$$

Si se utiliza la función de enlace logística, se tiene $\log\left(\frac{\pi_i}{1-\pi_i}\right) = x_i\theta$, dónde π_i es la probabilidad de éxito para x_i .

El objetivo de un diseño experimental óptimo es encontrar un diseño ξ^* que maximice un criterio de optimalidad de interés. En este caso, el objetivo es generar una secuencia breve de experimentos cuyos resultados ayuden a lograr el doble objetivo de proporcionar información sobre los parámetros del modelo θ y al mismo tiempo permita identificar la zona dónde la probabilidad de éxito π es máxima. Para este propósito, McGree y Eccleston¹⁴ han propuesto un criterio compuesto de diseño experimental que equilibra dos criterios contrapuestos: el criterio de D-optimalidad,

que proporciona estimaciones eficientes de los parámetros del modelo desarrollado para la probabilidad de éxito; y el criterio de P-optimalidad, que maximiza dicha probabilidad.

D-optimalidad: Los diseños experimentales D-óptimos proporcionan estimaciones eficientes de los parámetros del modelo inductivo, ya que minimizan el volumen de las regiones de confianza elipsoidales alrededor de una estimación puntual. Para un conjunto de datos de distribución de Bernoulli con una función de enlace logística, la matriz de información de Fisher esperada puede expresarse según:¹⁴

$$M(\theta, \xi) = X^T W X \quad (2)$$

dónde la matriz W es $\text{diag}(\pi_1(1-\pi_1), \dots, \pi_n(1-\pi_n))$. La D-eficiencia de cualquier diseño ξ se define respecto al diseño D-óptimo ξ_D^* según:

$$D_{eff} = \left(\frac{|M(\theta, \xi)|}{|M(\theta, \xi_D^*)|} \right)^{1/q} \quad (3)$$

dónde q es el número de parámetros del modelo de superficie de respuesta $\pi(\theta, x)$.

P-optimalidad: El criterio de P-optimalidad maximiza la función de probabilidad de obtener un resultado específico. En este trabajo se emplea específicamente el criterio *maximin* donde se maximiza la mínima probabilidad de éxito. La P-eficiencia de un diseño dado ξ con respecto al diseño P-óptimo ξ_P^* se define según:

$$P_{eff} = \left(\frac{\min\{\pi_i(\theta, \xi)\}}{\min\{\pi_i(\theta, \xi_P^*)\}} \right) \quad (4)$$

Criterio compuesto: El criterio compuesto considera el compromiso entre los dos criterios descritos anteriormente, según el producto de las D- y P-eficiencias de un diseño experimental ξ , ponderadas por una constante de mezcla $0 \leq \alpha \leq 1$. Esto es:¹⁴

$$\Phi^{(DP)} = [D_{eff}(\xi)]^\alpha [P_{eff}(\xi)]^{1-\alpha} \quad (5)$$

Sobre la base de lo expuesto anteriormente, la búsqueda de un diseño óptimo de experimentos considerando el criterio compuesto, requiere resolver el siguiente programa matemático no lineal (NLP):

$$\max_{\xi} \Phi^{(DP)}(\xi) \quad (6a)$$

$$\log(\Phi^{(DP)}) = (\alpha/q) \log|M(\theta, \xi)| + (1-\alpha) \log(\min\{\pi_i(\theta, \xi_i)\}), \text{ for } i = 1, \dots, n \quad (6b)$$

$$\pi(\xi) = \frac{\exp(X\theta)}{1 + \exp(X\theta)} \quad (6c)$$

Con cotas inferiores y superiores tales que:

$$LB_w \leq x_w \leq UB_w, w = 1, \dots, \dim(x) \quad (6d)$$

y donde α es la constante de mezcla que determina el mayor o menor énfasis que se da a los objetivos de precisión paramétrica y probabilidad de éxito en el criterio compuesto.

2.4 Optimización con respuestas estocásticas binarias

A partir del diseño óptimo de experimentos basado en la probabilidad de éxito, se propone una metodología de optimización que persigue identificar una pequeña región de operación del proceso, dónde existe una alta probabilidad de satisfacer las especificaciones del punto final ya sea para el proceso o el producto. La metodología propuesta genera una secuencia de experimentos que, mediante la progresiva reducción de la zona de operación considerada, permite focalizar la experimentación en una región de operación donde la probabilidad de obtener un resultado deseado es significativamente alta, a la vez que se aumenta la precisión paramétrica de la superficie de respuesta $\pi(\theta, x)$. El algoritmo iterativo de optimización experimental utiliza dos bucles (externo e interno) anidados, tal como se muestra en la Figura 2.1.

El primer paso para aplicar el algoritmo de la Figura 2.1 consiste en establecer la región de interés inicial (*ROI*) de funcionamiento del proceso, es decir, establecer los límites o cotas inferiores (LB) y superiores (UB) para todas las variables de operación en el vector de variables controladas x . Estos límites son definidos teniendo en cuenta datos disponibles y conocimientos previos sobre el proceso bajo estudio. Una vez definidos estos límites, el algoritmo comienza la primera iteración del bucle externo ($l=0$), realizando experimentos seleccionados de un diseño de experimentos compuesto central (CCD)¹⁸ dentro de la *ROI*. El diseño CCD consiste básicamente en un diseño factorial junto con los puntos estrella y el punto central, por lo cual, tiene más cantidad de puntos que aquellos requeridos para estimar los $(n+2)(n+1)/2$

coeficientes en un modelo cuadrático completo con n factores, correspondiente a esta aplicación. Entonces, por razones de economía, sólo una fracción de puntos del CCD son utilizados para cada iteración del bucle externo, los cuales son elegidos de la siguiente manera: el punto central y los puntos estrella son siempre elegidos, mientras que los puntos factoriales se eligen aleatoriamente hasta completar el número necesario de puntos para la estimación de los parámetros en la superficie de respuesta $\pi(\theta, x)$.

Para toda iteración del bucle externo l , en cada iteración del bucle interno (ver Figura 2.1) se incorpora un punto adicional al diseño anterior ξ_{k-1} , correspondiente al punto óptimo estimado usando el modelo de superficie de respuesta de la probabilidad de éxito $\pi(\theta, x)$

El diseño experimental ξ_k incluye todos los puntos de datos desde la primera iteración ($k=0$) hasta la iteración actual, y está representado por:

$$\xi_k = \begin{Bmatrix} x_{1,k} \\ x_{2,k} \\ \vdots \\ x_{n,k} \end{Bmatrix} \quad (7)$$

dónde $x_{i,k}^l$ es el punto experimental i^{th} incorporado en la iteración interna k^{th} .

Para cualquier punto en ξ_k , la probabilidad de éxito se estima mediante el ensayo de un número de réplicas, de modo que el vector de probabilidad de éxito se conforma como se muestra a continuación:

$$\pi_k = \begin{Bmatrix} \pi_{1,k}(x_{1,k}) \\ \pi_{2,k}(x_{2,k}) \\ \vdots \\ \pi_{n,k}(x_{i,k}) \end{Bmatrix} \quad (8)$$

Con los datos de los vectores ξ_k y π_k , se modela la superficie de respuesta de la probabilidad de éxito utilizando GLMs con la función de enlace logística. El vector correspondiente a los parámetros del modelo para la iteración interna k^{th} es θ_k . En consecuencia, el modelo de la probabilidad de éxito en la ROI para iteración del bucle externo l^{th} es:

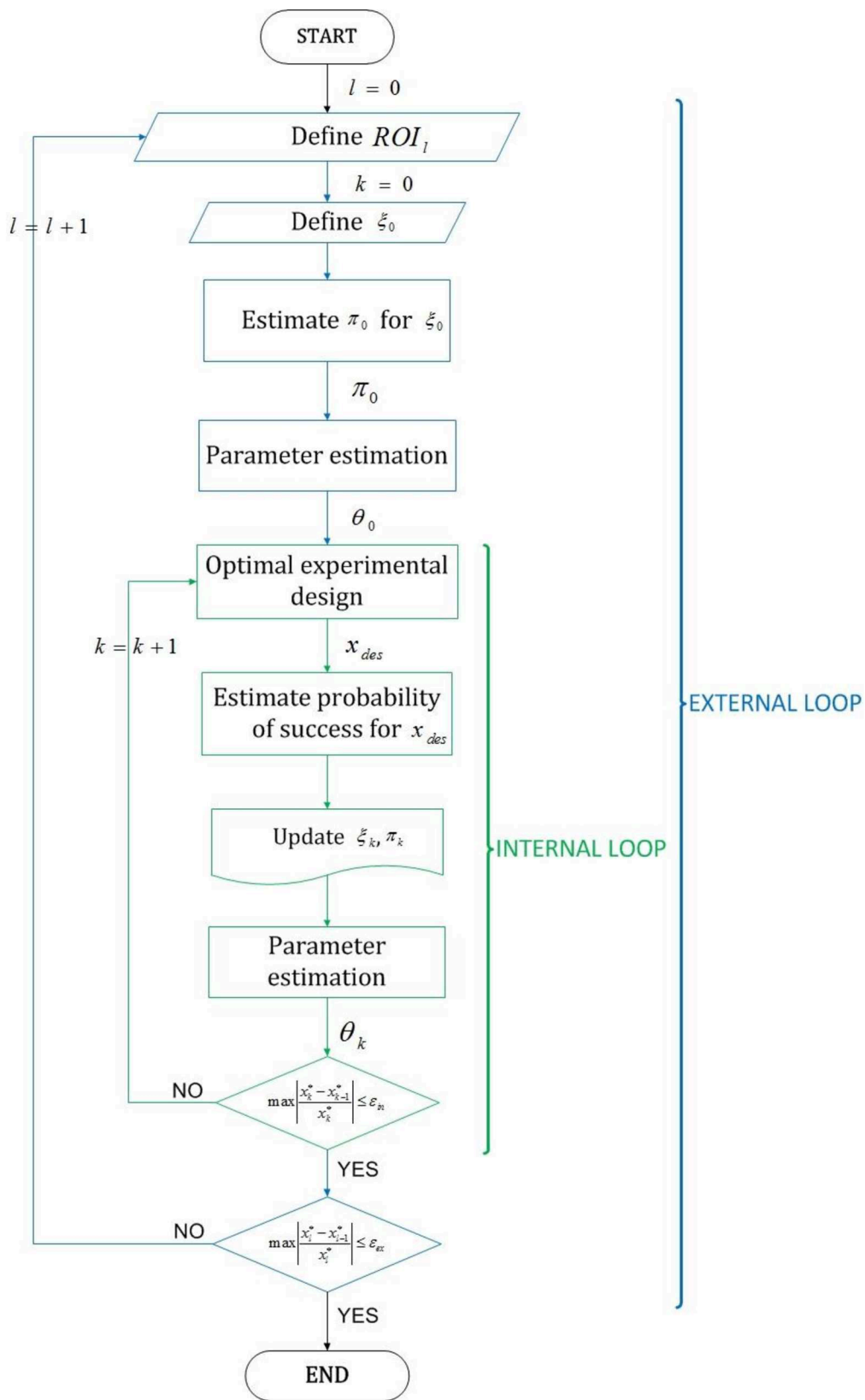


Figura 2.1: Algoritmo para identificar una región reducida de operación con máxima probabilidad de éxito.

$$\pi_k = \frac{\exp(\eta(\theta_k; x))}{1 + \exp(\eta(\theta_k; x))}, x \in ROI \quad (9)$$

Usando el modelo de la Ec. (9) con θ_{k-1} de la iteración anterior, en la iteración interna k^{th} se añade un nuevo punto experimental x_{des} mediante la resolución del programa matemático de la Ec. (6), usando el criterio compuesto descrito anteriormente en la Ec. (5), con $\xi_k = [\xi_{k-1}, x_{des}]$. Tan pronto se estima la probabilidad de éxito en x_{des} , ensayando un número de réplicas experimentales, se obtendrá un nuevo vector de parámetros del modelo θ_k . Luego, se estima el nuevo óptimo x_k^* que maximiza la probabilidad de éxito y se compara con el óptimo de la iteración anterior para comprobar la convergencia del bucle interno mediante el siguiente criterio de interrupción:

$$\max \left| \frac{x_k^* - x_{k-1}^*}{x_k^*} \right| \leq \varepsilon_{in} \quad (10)$$

Cuando se logra satisfacer el criterio de interrupción del bucle interno, el óptimo de la iteración actual del bucle externo se calcula como $x_j^* = x_k^*$ y se verifica el criterio de interrupción del bucle externo según:

$$\max \left| \frac{x_j^* - x_{j-1}^*}{x_j^*} \right| \leq \varepsilon_{ex} \quad (11)$$

Para obtener el punto máximo del modelo de superficie de respuesta de la probabilidad de éxito $\pi(\theta_k, x)$, se resuelve el siguiente programa matemático en la iteración interna k^{th} .

$$\begin{aligned} & \max_x \pi(\theta_k, x) \\ & LB_w^l \leq x_w \leq UB_w^l, w = 1, \dots, \dim(x) \end{aligned} \quad (12)$$

dónde LB_w^l y UB_w^l son los límites inferiores y superiores de las variables w^{th} en la iteración externa j^{th} .

Siempre que no se cumpla el criterio de interrupción del bucle externo (Ec. 11), el algoritmo vuelve a comenzar con una nueva iteración del bucle externo, pero ahora la ROI_j se reduce a una fracción (un cuarto) de la región de iteración anterior, con centro

en el óptimo x_{j-1}^* , pero permaneciendo siempre dentro de la región inicial. Si el óptimo se encuentra en un límite de la inicial ROI o cerca del mismo, la nueva ROI_l estará definida de manera de permanecer dentro de la ROI inicial y con centro en el punto más cercano al óptimo x_{j-1}^* . En este trabajo los límites LB_w^l y UB_w^l en cada iteración del bucle externo, se definen como sigue:

Para: $l = 1$, se definen LB_w^1 y UB_w^1 basados en literatura o conocimiento experto.

Para: $l \geq 2$, se define la actual ROI_l como un cuarto de la ROI_{l-1} con centro en x_{j-1}^* .

Toda vez que comienza una nueva iteración del bucle externo reduciendo la ROI de la iteración anterior, la primera iteración del bucle interno correspondiente comienza con un diseño CCD fraccionado aplicado en la reducida (nueva) ROI_l . Cada iteración del bucle interno incorpora un nuevo punto experimental utilizando el diseño óptimo basado en la probabilidad (ver Ec. 6). Cuando ambos bucles convergen, el último punto óptimo obtenido es considerado como el punto de funcionamiento óptimo del proceso que permite operar con la más alta probabilidad de garantizar las especificaciones finales del proceso o producto.

Otra alternativa para decidir cuándo debe detenerse el algoritmo en cualquiera de ambos bucles, es establecer un número máximo de iteraciones. Por un lado, la definición de un número máximo de iteraciones del bucle externo impide la búsqueda de un punto óptimo dentro de una ROI_l demasiado pequeña. Por otro lado, la definición de un número máximo de iteraciones para el bucle interno impide hacer pruebas experimentales para condiciones de funcionamiento que están muy cercanas entre sí, por lo que aportarían casi la misma información sobre el modelo de superficie de respuesta de la probabilidad de éxito y por tanto no se lograría mejorar significativamente la precisión paramétrica del mismo.

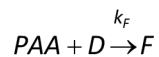
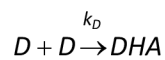
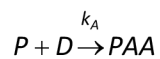
2.5 Casos de estudio

Con el fin de evaluar la eficacia de la metodología propuesta, aplicamos la misma a dos casos de estudio: la acetoacetilación de pirrol con diqueteno, y la polimerización por emulsión de estireno. En cada uno de estos procesos analizados, se busca optimizar dos variables controladas de los mismos, a fin de garantizar determinadas características finales del proceso o del producto correspondiente. Los resultados obtenidos reflejan cómo el método es capaz de identificar, en cada caso, una política de operación que permite cumplir con las especificaciones con alta probabilidad. De esta manera, se demuestra que el algoritmo de optimización experimental propuesto

es efectivamente una adecuada herramienta para el diseño óptimo de experimentos cuando los datos y/o conocimiento acerca del proceso son insuficientes para desarrollar un modelo fundamental.

2.5.1 Acetoacetilación de pirrol con diqueteno

La acetoacetilación de pirrol con diqueteno se presenta como caso de estudio para analizar el funcionamiento de la metodología de diseño óptimo de experimentos propuesta. Este proceso en particular, fue estudiado en detalle por Ruppen et al¹⁹, quienes han propuesto el siguiente conjunto de reacciones:



dónde P, D, PAA y DHA representan al pirrol, diqueteno, 2-acetoacetilpirrol y ácido deshidroacético, respectivamente, mientras que F es un subproducto. Las velocidades de reacción correspondientes para el conjunto de reacciones anteriores son las siguientes:

$$r_{PAA} = k_A C_D C_P$$

$$r_{DHA} = k_D C_D^2$$

$$r_O = k_O C_D$$

$$r_F = k_F C_{PAA} C_D$$

Los valores nominales de los parámetros cinéticos proporcionados en el trabajo de Ruppen et al¹⁹ son los siguientes: $k_A^\circ = 0.053$ L/(mol·min); $k_D^\circ = 0.128$ L/(mol·min); $k_O^\circ = 0.028$ min⁻¹ y $k_F^\circ = 0.001$ L/(mol·min). El sistema reaccionante se modela como un reactor isotérmico semi-batch al cual se alimenta, a flujo constante y durante un determinado tiempo, una solución de diqueteno. Asumiendo además densidad constante, el modelo de reactor se puede formular como:¹⁹

$$\frac{dC_D(t)}{dt} = -\frac{k_A}{v_R(t)}C_P(t)C_D(t) - 2\frac{k_D}{v_R(t)}C_D^2(t) - k_O C_D(t) - \frac{k_F}{v_R(t)}C_{PAA}(t)C_D(t) - \frac{f(t)}{v_R(t)}[C_{Df} - C_D(t)], \quad (13a)$$

$$C_D(0) = C_{D0}$$

$$\frac{dC_P(t)}{dt} = -\frac{k_A}{v_R(t)}C_P(t)C_D(t) - \frac{f(t)}{v_R(t)}C_P(t), C_P(0) = C_{P0} \quad (13b)$$

$$\frac{dC_{PAA}(t)}{dt} = \frac{k_A}{v_R(t)}C_P(t)C_D(t) - \frac{k_F}{v_R(t)}C_{PAA}(t)C_D(t) - \frac{f(t)}{v_R(t)}C_{PAA}(t)C_D(t), C_{PAA}(0) = C_{PAA0} \quad (13c)$$

$$\frac{dC_{DHA}(t)}{dt} = \frac{k_D}{v_R(t)}C_D^2(t) - \frac{f(t)}{v_R(t)}C_{DHA}(t), C_{DHA}(0) = C_{DHA0} \quad (13d)$$

$$\frac{dv_R(t)}{dt} = f(t), v_R(0) = v_{R0} \quad (13e)$$

dónde C_{Df} es la concentración diqueteno en la corriente de alimentación (mol/L), v_R es el volumen del reactor (L) y $f(t)$ es la velocidad de alimentación (L/min). Las condiciones iniciales para las concentraciones y volumen del reactor en la Ec. (13) son: $C_{D0} = 0.05$ mol/L, $C_{P0} = 0.72$ mol/L, $C_{PAA0} = 0.08$ mol/L, $C_{DHA0} = 0.01$ mol/L y $v_{R0} = 1$ L.

A modo de evaluar el enfoque de optimización propuesto, se desarrolla un modelo probabilístico del reactor que es utilizado como modelo *in silico* para llevar a cabo una aproximación de los ensayos experimentales. Siguiendo lo informado por Ruppen et al¹⁹, se establece el valor de k_F en 0.001 min⁻¹. Por otro lado, el efecto probabilístico de las variables no controladas en las condiciones de punto final es incorporado mediante la imposición de una variabilidad aleatoria sobre los valores nominales de los otros tres parámetros cinéticos del modelo de simulación, quedando éstos establecidos de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} k_A &= k_A^\circ \left(1 + (\text{rand}(1,1) - 0.5) \cdot \frac{SP}{100} \right) \\ k_D &= k_D^\circ \left(1 + (\text{rand}(1,1) - 0.5) \cdot \frac{SP}{100} \right) \\ k_O &= k_O^\circ \left(1 + (\text{rand}(1,1) - 0.5) \cdot \frac{SP}{100} \right) \end{aligned} \quad (14)$$

dónde SP es el porcentaje de variabilidad considerado para los valores de las constantes cinéticas. Se debe tener en cuenta que en la Ec. (14), el intervalo en el que se define cada parámetro se centra en su valor nominal correspondiente.

Para la optimización de la probabilidad de éxito, las variables de entrada en este caso son el flujo de alimentación al reactor (en litros por minuto) y el periodo de tiempo de alimentación del diqueteno (en minutos). Para lograr este objetivo, se debe resolver un problema de optimización dinámica dónde la política corresponde a un perfil de alimentación variable en el tiempo que consta de dos parámetros. Para cumplir con las especificaciones al final del lote, resulta necesario entonces encontrar la configuración óptima de estos parámetros. La Figura 2.2 muestra gráficamente el perfil considerado con los parámetros utilizados para maximizar la probabilidad de éxito. Las variables de respuesta son las concentraciones de diferentes especies (en moles por litro) en el reactor al final de cada lote. Para cumplir con las especificaciones de punto final, estas concentraciones de reactivos y productos deben mantenerse dentro de ciertos valores deseados. Más específicamente, por razones de productividad y de seguridad del proceso, las concentraciones finales de reactivos y productos deben cumplir con:

$$C_{PAA}(t_f) \nu_R(t_f) \geq 0.46 \text{ mol}$$

$$C_{DHA}(t_f) \leq 0.15 \text{ mol / L}$$

$$C_D(t_f) \leq 0.025 \text{ mol / L}$$

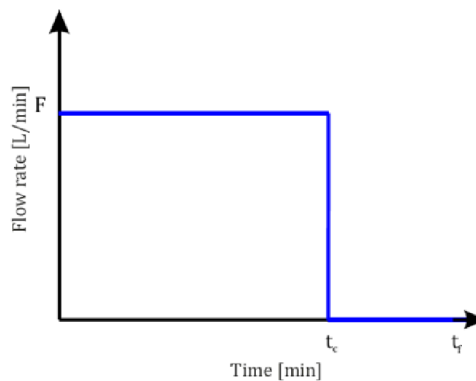


Figura 2.2: Perfil de alimentación de diqueteno definido por dos variables controladas. El tiempo total de reacción se asume fijo.

Para implementar el algoritmo de la Figura 2.1, es necesario definir primeramente el siguiente conjunto de hiper-parámetros: límites inferiores y superiores de cada variable de entrada (LB y UB), número de puntos experimentales a diseñar en cada iteración del bucle interno (ep), número de réplicas a realizar en cada punto experimental (r), número máximo de bucles internos (il), número máximo de bucles externos (el) y los criterios de parada internos y externos (ε_{in} y ε_{ex}). Los valores

elegidos para estos hiper-parámetros correspondientes al caso de estudio se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Valores de los hiper-parámetros para el proceso de acetoacetilación de pirrol con diqueteno.

Parámetro	Valor
LB	$[150,0.9 \times 10^{-3}]$
UB	$[235,1.5 \times 10^{-3}]$
ep	1
r	10
il	6
el	4
ε_{in}	0.5×10^{-2}
ε_{ex}	1×10^{-3}

2.5.1.1 Análisis de la influencia de la constante de mezcla α

A continuación se analiza la influencia de la constante de mezcla α en el algoritmo de optimización experimental de la Figura 2.1, con el fin de elegir el valor óptimo de este parámetro. Para este objetivo, se consideran diferentes valores de α y SP . Cinco valores de α (0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1) son evaluados utilizando el modelo de simulación. El valor de $\alpha = 0$ corresponde al criterio de P-optimalidad puro (Ec. 5), de modo que cada nuevo punto añadido en cada iteración interna solamente busca maximizar la probabilidad de éxito. Por otro lado, cuando $\alpha = 1$ el diseño experimental óptimo se basa puramente en el criterio de D-optimalidad, que enfatiza una estimación eficiente de los parámetros para el modelo $\pi(\theta, x)$. Además, cada uno de estos valores de α se analiza con tres valores alternativos del parámetro de variabilidad SP . Los valores de SP utilizados para simular la variabilidad intrínseca del proceso son: 5%, 10% y 20%, para cada uno de los tres parámetros cinéticos de la Ec. (14).

Para cada valor de SP y para cada uno de los valores de α considerados, se realizan 100 ensayos independientes de la metodología de optimización hasta lograr la convergencia de los bucles, interno y externo. En cada uno de estos ensayos se encuentra una política óptima de funcionamiento y la probabilidad de éxito para esta política específica se calcula mediante la implementación de la misma en el modelo *in silico* 100 veces. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas: Tabla 2.2, Tabla 2.3 y Tabla 2.4. Como es de esperarse, los valores de SP y α , influyen significativamente en el porcentaje de número total de ensayos realizados que

alcanzan efectivamente una condición de operación que cumple con las especificaciones de la probabilidad de éxito considerado. Teniendo en cuenta los amplios niveles de variabilidad intrínseca utilizados en los estudios de simulación, se han considerado umbrales escalonados de la probabilidad de éxito. Es decir, se consideran umbrales excesivamente bajos de probabilidad de éxito, sólo a modo de demostrar el rendimiento del método propuesto. Así, los umbrales considerados de probabilidad de cumplir con las especificaciones de punto final son: 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, y 95%.

Como se ve en la Tabla 2.2, cuando el nivel de variabilidad es bajo $SP = 5\%$, todos los ensayos realizados alcanzan las especificaciones de punto final, incluso para el caso más exigente (probabilidad mínima de éxito del 95%). Por otra parte, con un alto nivel de eficacia como el de este caso, los resultados alcanzados son independiente del valor de α . Por lo tanto, los resultados obtenidos demuestran que el método funciona correctamente cuando la variabilidad intrínseca del proceso es aceptable. Cuando se duplica la variabilidad del proceso ($SP = 10\%$), el método de optimización propuesto todavía logra encontrar un punto de funcionamiento óptimo en la mayoría de los ensayos, con independencia del valor utilizado de α (ver Tabla 2.3). Además, cuando $\alpha = 0$ o 0.25 , el método de optimización encuentra una ROI reducida con 95% de probabilidad de éxito. Por último, cuando el valor de SP se aumenta aún más (20%), puede verse como el método de optimización propuesto comienza a disminuir su performance en cuanto al porcentaje de veces que logra una zona de alta probabilidad de éxito (ver Tabla 2.4).

Tabla 2.2: Porcentaje de ensayos que encuentran una política de operación que cumple con las especificaciones de uso final, para diferentes valores de α y diferentes niveles de éxito, con $SP=5\%$.

Mínima probabilidad de éxito requerida	Porcentaje de ensayos que alcanzan una ROI con un mínimo nivel de éxito				
	$\alpha = 0$	$\alpha = 0.25$	$\alpha = 0.5$	$\alpha = 0.75$	$\alpha = 1$
95%	100%	100%	100%	100%	100%
90%	100%	100%	100%	100%	100%
85%	100%	100%	100%	100%	100%
80%	100%	100%	100%	100%	100%
70%	100%	100%	100%	100%	100%
60%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabla 2.3: Porcentaje de ensayos que encuentran una política de operación que cumple con las especificaciones de uso final, para diferentes valores de α y diferentes niveles de éxito, con $SP=10\%$.

Mínima probabilidad de éxito requerida	Porcentaje de ensayos que alcanzan una <i>ROI</i> con un mínimo nivel de éxito				
	$\alpha = 0$	$\alpha = 0.25$	$\alpha = 0.5$	$\alpha = 0.75$	$\alpha = 1$
95%	100%	100%	99%	96%	99%
90%	100%	100%	100%	98%	99%
85%	100%	100%	100%	99%	99%
80%	100%	100%	100%	99%	100%
70%	100%	100%	100%	100%	100%
60%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabla 2.4: Porcentaje de ensayos que encuentran una política de operación que cumple con las especificaciones de uso final, para diferentes valores de α y diferentes niveles de éxito, con $SP=20\%$.

Mínima probabilidad de éxito requerida	Porcentaje de ensayos que alcanzan una <i>ROI</i> con un mínimo nivel de éxito				
	$\alpha = 0$	$\alpha = 0.25$	$\alpha = 0.5$	$\alpha = 0.75$	$\alpha = 1$
95%	30%	39%	42%	36%	50%
90%	65%	75%	65%	62%	76%
85%	89%	87%	77%	74%	85%
80%	97%	97%	87%	80%	89%
70%	99%	99%	93%	92%	95%
60%	100%	100%	100%	100%	98%

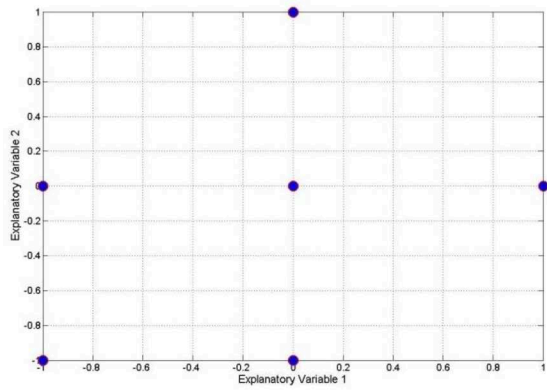
Se puede notar que sólo para valores de α iguales a 0, 0.25 y 0.5, es posible identificar una *ROI* reducida con al menos 60% de probabilidad de garantizar las especificaciones de punto final del proceso. De todos los valores considerados, el valor óptimo para α resulta ser de 0.25, el cual es el elegido entonces para la aplicación de esta metodología.

Si bien este significativamente alto nivel de variabilidad intrínseca ($SP = 20\%$) es poco probable en la industria de procesos, aquí se analiza solamente a modo de demostrar la capacidad del enfoque propuesto. La *ROI* reducida resultante define una política de funcionamiento óptimo que garantiza una probabilidad de éxito de 95% para el 39% de los ensayos realizados. A pesar de la elevada variabilidad intrínseca, la política óptima obtenida logra una probabilidad de éxito por encima del 80% en la mayoría de las corridas (97%). Así, sólo el 3% de todos los ensayos caen en una región con una probabilidad de éxito de menos del 80%, mientras que todos los ensayos realizados (100%) logran una región en la que la probabilidad de éxito es superior al 60%. Vale la

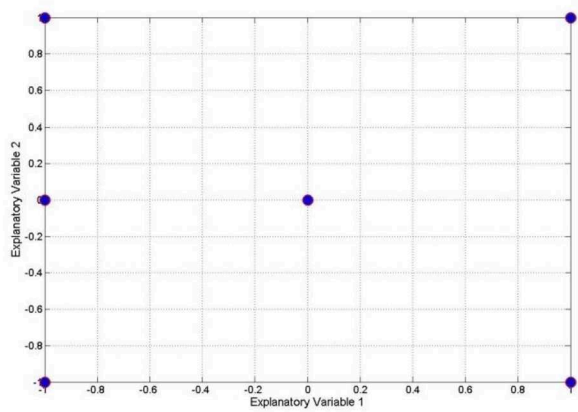
pena señalar que dentro de la *ROI* inicial, sólo una pequeña región (cerca del 9.75%) tiene una probabilidad de éxito mayor al 80%. Pese a esto, el algoritmo de la Figura 2.1 es capaz de encontrar una región reducida de condiciones de funcionamiento con una alta probabilidad de éxito.

2.5.1.2 Análisis de la influencia del diseño experimental inicial

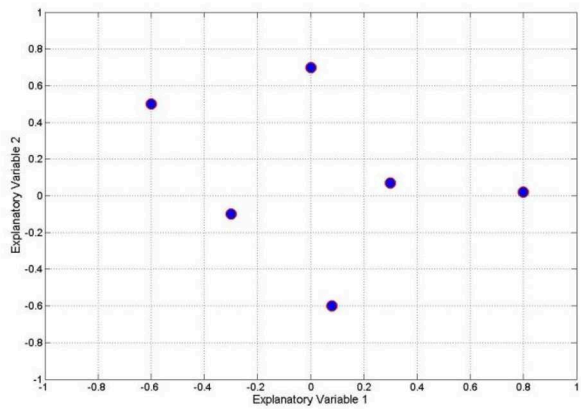
Con el fin de analizar el efecto del diseño experimental inicial ξ_0 (el cual da comienzo a la metodología propuesta) en la tasa de convergencia del método, se analizan a continuación tres variantes posibles del mismo y se muestran las evoluciones de las superficies de respuestas para la probabilidad de éxito $\pi(\theta_k, x)$ en cada uno de los casos considerados. Teniendo presente que la política de operación tiene dos variables independientes, se requieren un mínimo de seis puntos experimentales iniciales para dar comienzo a las iteraciones del bucle externo. Las opciones consideradas de ξ_0 son: (i) diseño compuesto central fraccional, (ii) diseño factorial más un punto en el centro y un punto en el medio de uno de los límites de la inicial *ROI*, y (iii) elección al azar de seis puntos dentro de la *ROI* inicial. En la Figura 2.3 se presentan de manera gráfica los diseños iniciales ξ_0 propuestos y en la Figura 2.4 se muestra la evolución de la metodología en base al diseño inicial utilizado. De manera de hacer una comparación entre los diseños analizados, se muestran los resultados obtenidos hasta completarse la primera iteración del bucle externo en cada caso, es decir, hasta que se lleva a cabo la primera reducción de la *ROI*. Así, en la Figura 2.4 se pueden observar: la inicial *ROI*, los puntos experimentales iniciales de cada diseño, los puntos experimentales que va incorporando el método en cada iteración del bucle interno y la reducción de la *ROI* cuando converge el primer bucle externo. Las sucesivas superficies de respuesta que resultan de aplicar el algoritmo de la Figura 2.1 y cada nuevo punto experimental incorporado en cada iteración del bucle interno, se muestran en el Anexo I. A partir de la Figura 2.4, se puede ver entonces que la mejor alternativa para dar comienzo al inicio de cada bucle externo y a la metodología en sí misma, es el diseño central compuesto, el cual asegura una reducción apropiada de la *ROI* inicial con sólo unos pocos puntos experimentales.



(a)

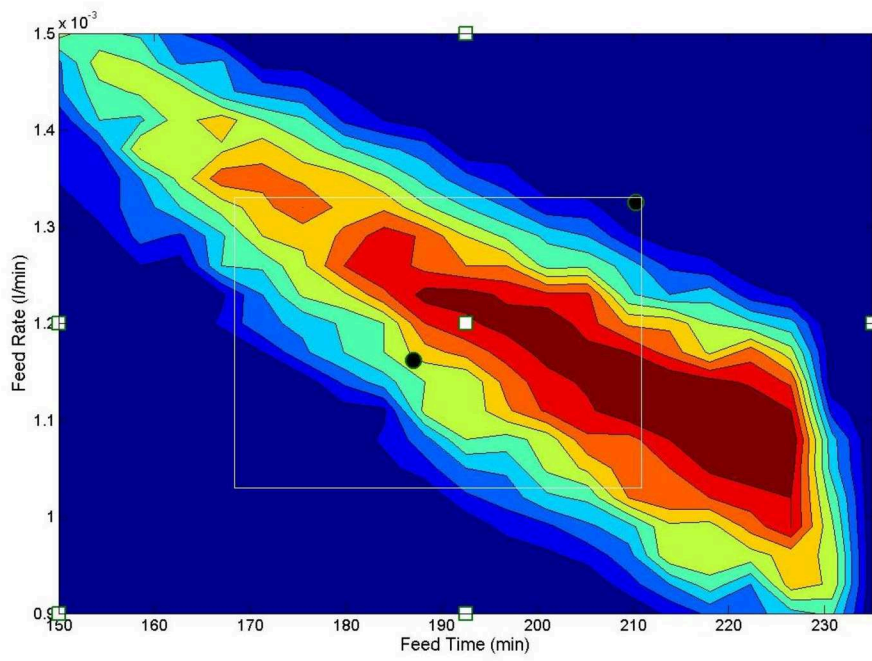


(b)

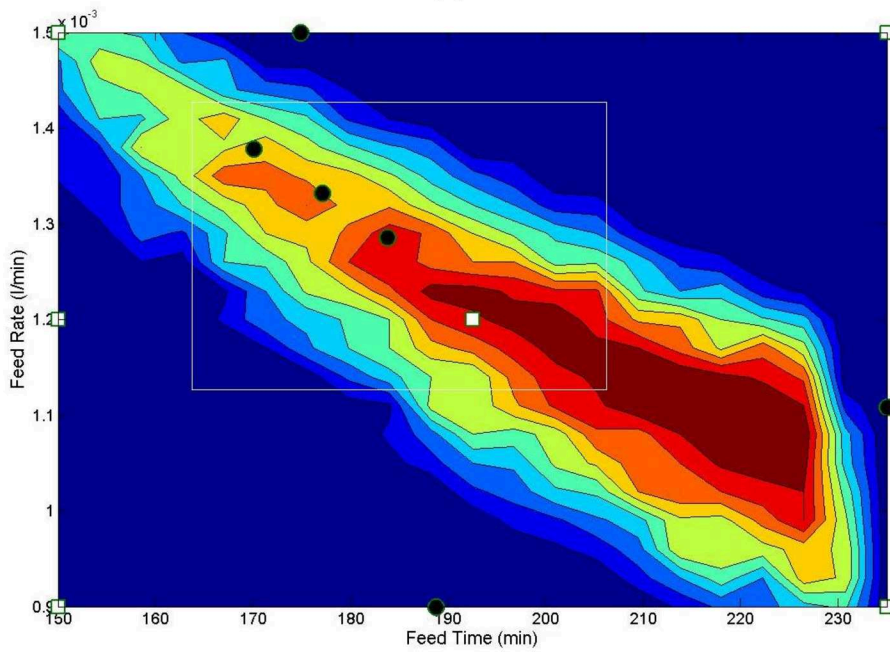


(c)

Figura 2.3: Diseños experimentales iniciales utilizados para comenzar las iteraciones del bucle interno. (a) Diseño central compuesto fraccional; (b) diseño factorial más un punto en el centro y un punto en el medio de uno de los límites; (c) elección al azar de seis puntos dentro de la *ROI*.



(a)



(b)

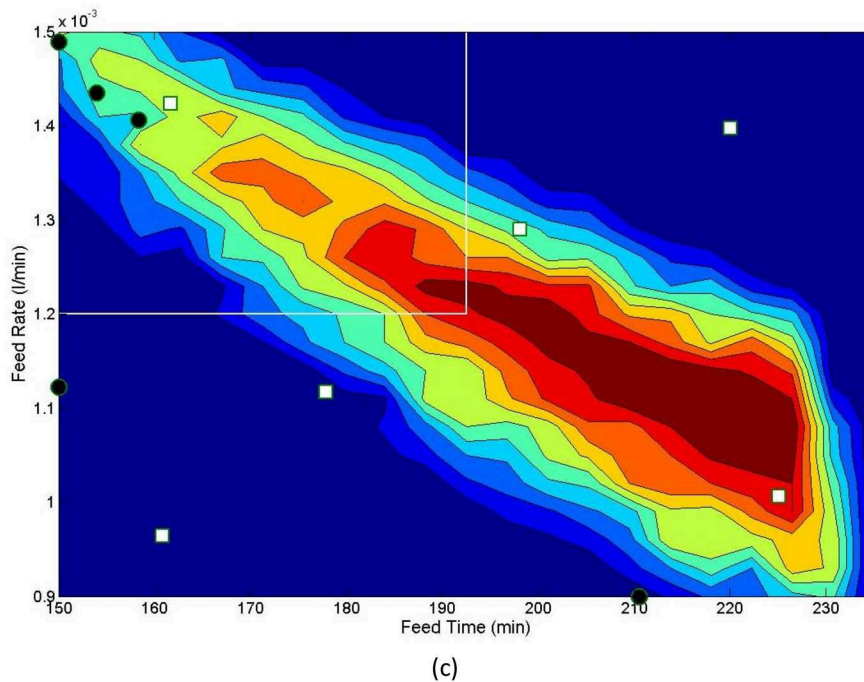


Figura 2.4: Evolución de la *ROI* luego de la primera iteración del bucle externo, para los diferentes diseños iniciales considerados. Los cuadrados blancos pertenecen a los puntos del diseño inicial correspondiente, mientras que los círculos negros son los puntos agregados durante las iteraciones del primer bucle interno. (a) CCD fraccional con un punto en uno de sus límites; (b) diseño factorial agregando un punto en el centro y un punto en el medio de uno de los límites; (c) elección al azar de seis puntos seleccionados dentro de la *ROI*.

2.5.1.3 Aplicación de la metodología propuesta

Para finalizar este caso de estudio, en la Figura 2.5 se muestran los resultados obtenidos en una corrida completa de la metodología propuesta, con $SP = 10\%$ y $\alpha = 0.25$, donde se pueden ver las reducciones sucesivas de las *ROI* y los puntos experimentales diseñados e incorporados por el algoritmo propuesto. Como puede verse en este ensayo en particular, existe una reducción sucesiva de la *ROI* inicial hacia una pequeña región de condiciones de funcionamiento con alta probabilidad de éxito. Los resultados de este ensayo específico se presentan en la Tabla 2.5, donde se muestra, para cada bucle externo: los límites de la nueva *ROI* obtenida, la política óptima de funcionamiento determinada y el número de puntos experimentales necesarios para completar dicho bucle externo. Después de la última iteración del bucle externo, se obtiene una pequeña *ROI*, con alta probabilidad de éxito. La política óptima de funcionamiento hallada corresponde a un tiempo de alimentación de 205.26 min y una velocidad de alimentación de 1.1×10^{-3} moles/s. Esta política óptima

tiene una probabilidad de éxito del 100% y se requiere un total de 35 puntos experimentales para determinar este punto óptimo sin disponer de un modelo fundamental del proceso.

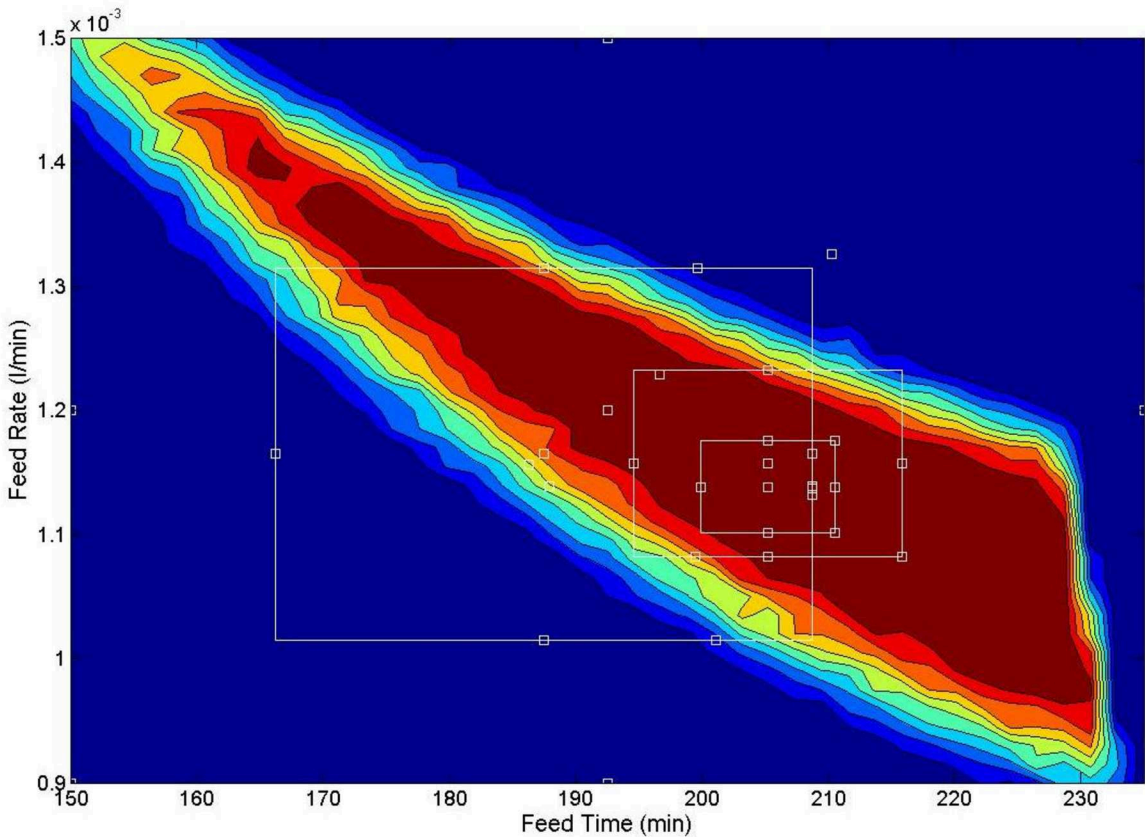


Figura 2.5: Ejemplo de un ensayo completo de la metodología de optimización de diseño de experimentos de la Figura 2.1 para la acetoacetilación de pirrol con diqueteno ($SP=10\%$ y $\alpha=0.25$).

Tabla 2.5: Resultados obtenidos en el ensayo correspondiente a la Figura 2.5 ($SP=10\%$ y $\alpha=0.25$).

Bucle externo	Tiempo de alimentación óptimo (min)	Flujo de alimentación óptimo (mol/s)	Probabilidad de éxito	Puntos experimentales requeridos
1	187.48	1.2×10^{-3}	0.9300	8
2	205.25	1.2×10^{-3}	0.9900	12
3	205.26	1.1×10^{-3}	0.9900	8
4	205.26	1.1×10^{-3}	1.0000	7

2.5.1.4 Aplicación del algoritmo con un perfil de alimentación más complejo

A modo de destacar el concepto del diseño óptimo dinámico de experimentos usando la probabilidad de éxito, se analiza un caso más complejo, considerando un perfil de alimentación que contempla cuatro variables que deben ser optimizadas. Tal como se muestran en la Figura 2.6, las variables de entrada ahora son: el caudal de alimentación inicial al reactor (F_1), el tiempo de cambio de caudal de alimentación (t_s), el caudal de alimentación al reactor luego del tiempo de cambio (F_2) y el tiempo total de alimentación de diqueteno (t_c). Nuevamente, el tiempo final de reacción (t_f) es considerado fijo y las respuestas del proceso son las concentraciones de las diferentes especies al final de cada experimento ya que las especificaciones de punto final son las mismas.

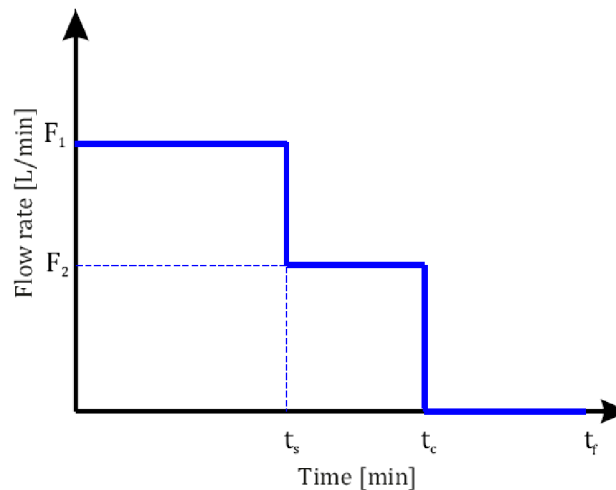


Figura 2.6: Perfil de alimentación de diqueteno definido por cuatro parámetros. El tiempo final es asumido fijo.

Para cada valor considerado del parámetro SP , se realizan 100 corridas independientes de la metodología y para cada una de ellas una política óptima de operación es determinada. En la Tabla 2.6 se muestran los resultados obtenidos para los diferentes niveles de variabilidad intrínseca de proceso simulado.

Como se puede observar, cuando la variabilidad intrínseca del proceso es baja ($SP=5\%$), o incluso significativa ($SP=10\%$), el algoritmo de la Figura 2.1 logra encontrar una región reducida de condiciones de operación dónde existe una alta probabilidad de éxito para la mayoría de las corridas. Más específicamente, todas las ejecuciones del algoritmo conducen a una zona con una probabilidad por encima del 95% de lograr las especificaciones finales. Como es lógico, cuando la variabilidad del proceso es

extremadamente elevada ($SP=20\%$), resulta más difícil hallar una región reducida con probabilidad de éxito de 100% para todas las pruebas ensayadas. Pese a esto, la metodología aún logra localizar una *ROI* reducida que brinda un perfil óptimo de alimentación exitoso en un alto porcentaje de corridas. Como resultado de este análisis, queda demostrado que el algoritmo de la Figura 2.1 puede ser utilizado para optimizar un perfil variable en el tiempo. Es importante considerar además, que cuando el número de parámetros aumenta, el esfuerzo experimental requerido aumentará también, tal como lo es en el caso del método de superficie de respuesta convencional. Sin embargo, aplicando el enfoque presentado, la magnitud del aumento en la exigencia experimental dependerá de la variabilidad intrínseca del proceso. Para altos niveles de variabilidad, se necesitarán más réplicas de la misma política de operación, por lo cual conlleva a mayores costos experimentales.

Tabla 2.6: Porcentaje de corridas de la metodología que encuentran una política de operación que cumple con las especificaciones de punto final, para diferentes niveles de éxito y diferentes valores de *SP*, utilizando el perfil de alimentación de la Figura 2.6.

Mínima probabilidad de éxito requerida	Porcentaje de ensayos que alcanzan una <i>ROI</i> con un mínimo nivel de éxito		
	<i>SP</i> = 5%	<i>SP</i> = 10%	<i>SP</i> = 20%
95%	100%	100%	87%
90%	100%	100%	90%
85%	100%	100%	91%
80%	100%	100%	91%
70%	100%	100%	95%
60%	100%	100%	96%

2.5.2 Polimerización por emulsión de estireno

Se presenta ahora un caso representativo donde cumplir con las propiedades de uso final en el producto es prioritario; tal es el caso de la polimerización por emulsión de estireno. Liotta²⁰ and Li y Brooks²¹, han discutido y desarrollado los modelos matemáticos para este proceso, los cuales luego han sido presentados y utilizados en trabajos más recientes.²²⁻²⁴ De manera similar al primer caso de estudio, para describir el efecto de variabilidad intrínseca del proceso se utiliza un modelo simulado probabilístico, con el cual se modelan las variaciones en las especificaciones de punto final. En este caso en particular, el efecto de variabilidad aleatoria se agrega al proceso dinámico utilizando $SP = 10\%$, y dicha variabilidad se incorpora a la cantidad de población inicial de partículas sembradas, como se muestra a continuación:

$$\begin{aligned}
 N_1 &= 20 \times 10^{17} \pm \frac{SP}{2 * 100} \\
 N_2 &= 80 \times 10^{17} \pm \frac{SP}{2 * 100} \\
 N_3 &= 20 \times 10^{17} \pm \frac{SP}{2 * 100}
 \end{aligned}
 \tag{16}$$

El modelo cinético y las ecuaciones de conservación para este proceso, cuentan con los siguientes balances: balance de volumen del medio de reacción, balance de volumen de partículas en cada población, balance molar del monómero, balance del número promedio de radicales por partículas en cada población, tasa de polimerización para cada población, tasa de adición del agente de transferencia de cadena (CTA, por sus siglas en inglés: chain transfer agent), balance molar del iniciador, balance molar de agente de transferencia de cadena. Las ecuaciones constitutivas y balances que componen este modelo dinámico, han sido desarrolladas en trabajos previos y aquí se presenta sólo un resumen de las mismas en el Anexo II.

Nuevamente, este modelo matemático se utiliza sólo para desarrollar un modelo *in silico*, y la variabilidad del tamaño de partículas se considera desconocido para el usuario de la metodología presentada, de modo que únicamente se utiliza el modelo simulado para generar los datos del proceso, y así poder testear el algoritmo de la Figura 2.1.

En este caso de estudio en particular, resulta de especial interés lograr un producto final que cumpla con dos propiedades: el índice de fluidez (MI) y la resistencia a la tracción (σ). Estas propiedades pueden ser estimadas mediante correlaciones, las cuales son dependientes del peso molecular promedio en peso (MW_w) y del peso molecular promedio en número (MW_n), respectivamente:²⁵

$$MI = \frac{30}{(MW_w^{3.4} \times 10^{-18} - 0.2)}
 \tag{17}$$

$$\sigma = 7390 - 4.51 \times 10^8 \left(\frac{1}{MW_n} \right)
 \tag{18}$$

dónde MW_w y MW_n pueden ser calculadas según:^{23,25,26}

$$MW_w = \frac{\sum_{i=0}^{n_p} \lambda_i^2 + \sum_{i=0}^{n_p} \mu_i^2}{\sum_{i=0}^{n_p} \lambda_i^1 + \sum_{i=0}^{n_p} \mu_i^1}
 \tag{19}$$

$$MW_n = \frac{\sum_{i=0}^{n_p} \lambda_i^1 + \sum_{i=0}^{n_p} \mu_i^1}{\sum_{i=0}^{n_p} \lambda_i^0 + \sum_{i=0}^{n_p} \mu_i^0} \quad (20)$$

dónde λ_i^j es el j^{th} momento de la cadena de polímeros *viva* de la especie i , y μ_i^j es el j^{th} momento de la cadena de polímero *muerta* de la especie i . Los balances de momentos de cadenas vivas y muertas están disponibles en el Anexo II.

Para aplicar el algoritmo de la Figura 2.1, por un lado se eligen como variables controladas: la tasa de alimentación del monómero y la tasa de alimentación del agente de transferencia de cadena al reactor de polimerización, ambas en moles por segundos. Por otro lado, las propiedades de salida (o propiedades de uso final) que se buscan cumplir en el producto, son:

$$1.25 \times 10^{-4} < MI \leq 7.5 \times 10^{-4} [g / \text{min}]$$

$$6900 < \sigma \leq 7200 [psi]$$

Los valores de los hiper-parámetros utilizados para implementar el algoritmo de optimización experimental en este caso de estudio, se pueden ver en la Tabla 2.7.

En la Figura 2.7 se presentan las curvas de nivel del modelo de superficie de respuesta para la probabilidad de éxito dentro de la *ROI* inicial elegida.

Tabla 2.7: Valores de los hiper-parámetros para la polimerización por emulsión de estireno.

Parámetro	Valor
LB	$[0.0184, 1 \times 10^{-4}]$
UB	$[0.026, 8 \times 10^{-4}]$
ep	1
r	10
il	6
el	4
ε_{in}	0.5×10^{-2}
ε_{ex}	1×10^{-3}

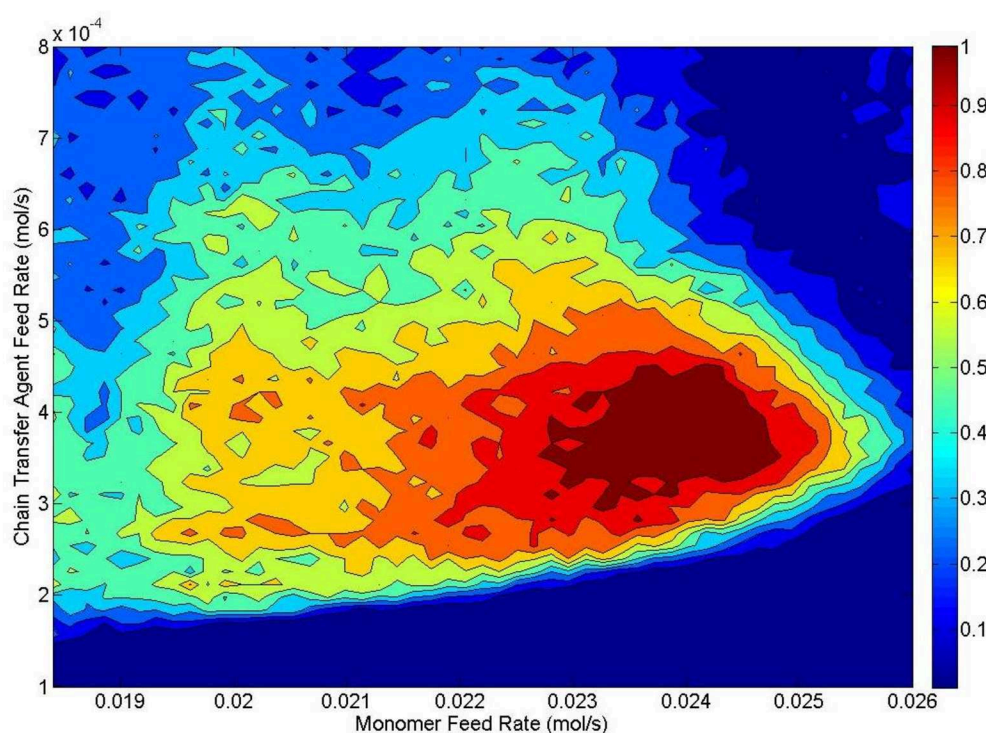


Figura 2.7: Probabilidad de éxito dentro de la ROI inicial, para el proceso de polimerización por emulsión de estireno, con $SP=10\%$

En la Figura 2.8 se muestra la sucesiva reducción de la ROI para una ejecución completa del algoritmo, según las iteraciones correspondientes del bucle externo descrito en la Figura 2.1. En la Tabla 2.8 se provee un resumen de los resultados obtenidos, que incluye los límites inferiores y superiores de las ROI obtenidas en las iteraciones del bucle externo. Como puede verse, para maximizar la probabilidad de éxito, la tasa de alimentación del monómero debe establecerse en el intervalo de $[0.0233, 0.243]$ moles/s, mientras que la tasa de alimentación de CTA debe pertenecer al rango entre 3.56×10^{-4} y 4.44×10^{-4} moles/s. la política óptima de operación corresponde a una tasa de alimentación de monómero de 0.0242 moles/s y una tasa de alimentación de CTA de 4×10^{-4} moles/s. La probabilidad de éxito para esta política óptima de operación es de 97% y la cantidad total de puntos experimentales requeridos para obtener esta política óptima es de 35.

Con base en 100 ejecuciones independientes del algoritmo propuesto, en la Tabla 2.9 se muestra la cantidad (en porcentaje) de ejecuciones que logran una probabilidad de éxito en la política óptima resultante, que alcanza diferentes niveles de éxito requeridos. Los resultados alcanzados demuestran que usando la incorporación de la probabilidad de éxito el diseño óptimo de experimentos, la política óptima de operación encontrada tiene una probabilidad de éxito de más de 90% en un 47% de corridas; además, el óptimo identificado tiene una probabilidad de éxito mayor a 80%

en 73% de las ejecuciones de prueba; y finalmente, sólo un 7% de las ejecuciones del algoritmo determinan políticas de operación con una probabilidad de éxito menor al 60%.

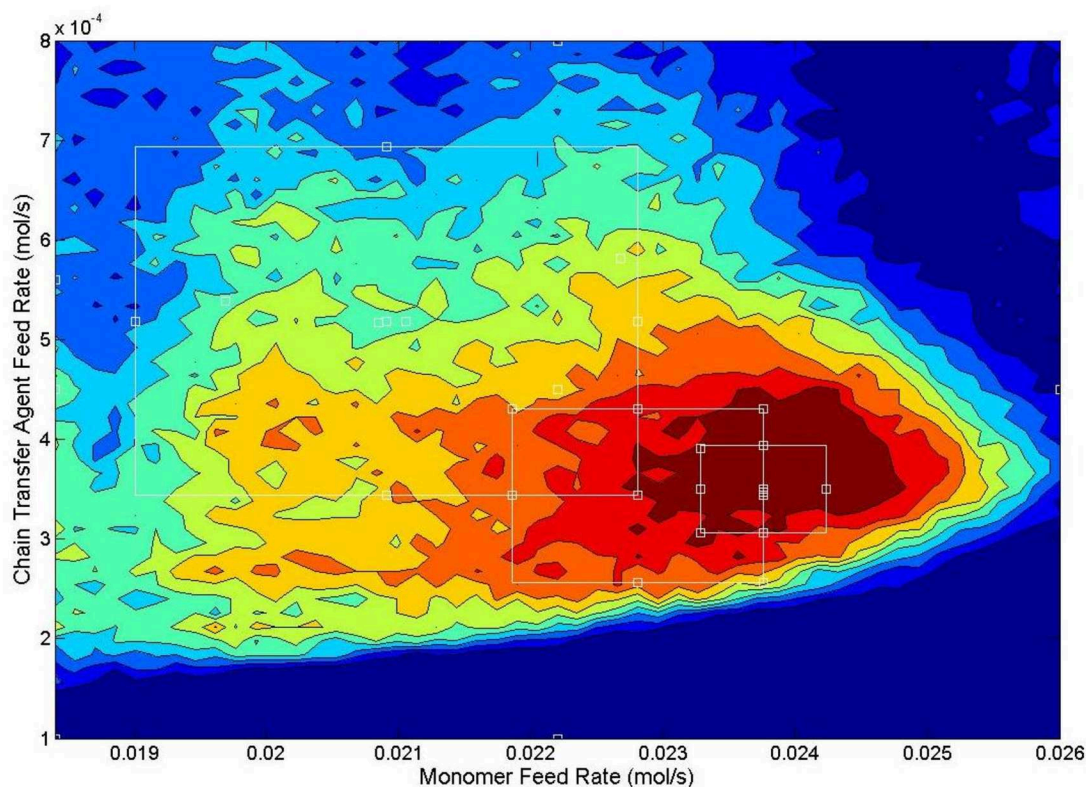


Figura 2.8: Una ejecución completa del algoritmo (hasta la convergencia de ambos bucles) de la Figura 2.1 para el proceso de polimerización por emulsión de estireno ($SP=10\%$, $\alpha=0.25$).

Tabla 2.8: Resumen de resultados para la corrida correspondiente a la Figura 2.8 ($SP=10\%$, $\alpha=0.25$).

Bucle externo	Límite inferior de tasa de alimentación del monómero (mol/s)	Límite superior de tasa de alimentación del monómero (mol/s)	Límite inferior de tasa de alimentación de CTA (mol/s)	Límite superior de tasa de alimentación de CTA (mol/s)	Óptima tasa de alimentación del monómero (mol/s)	Óptima tasa de alimentación de CTA (mol/s)	Probabilidad de éxito	Total de puntos experimentales requeridos
1	0.0184	0.0260	1×10^{-4}	8×10^{-4}	0.0209	5×10^{-4}	0.5100	10
2	0.0190	0.0228	3.25×10^{-4}	6.75×10^{-4}	0.0228	3×10^{-4}	0.8400	9
3	0.0219	0.0238	2.13×10^{-4}	3.88×10^{-4}	0.0238	4×10^{-4}	0.9300	9
4	0.0233	0.0243	3.56×10^{-4}	4.44×10^{-4}	0.0242	4×10^{-4}	0.9700	7

Tabla 2.9: Porcentaje de ejecuciones del algoritmo que encuentran una política de operación que satisfice las especificaciones del producto obtenido para diferentes niveles de éxito ($SP=10\%$, $\alpha=0.25$).

Mínima probabilidad de éxito requerida	Porcentaje de ensayos que alcanzan una ROI con un mínimo nivel de éxito
95%	15%
90%	47%
85%	61%
80%	73%
70%	86%
60%	93%

Con la implementación de este segundo caso de estudio, es posible demostrar que a partir de un modelo inductivo de la probabilidad de éxito en el algoritmo de optimización experimental propuesto, es factible hallar una zona reducida de operación dónde las propiedades de uso final puedan garantizarse con alta probabilidad. Los resultados obtenidos prueban además que para procesos complejos, para los cuales no hay disponibles modelos fundamentales que puedan ser incorporados a las políticas de optimización, la metodología propuesta es una adecuada herramienta para obtener la región de operación que garantiza las condiciones de punto final del proceso o el producto mediante la realización de sólo una pequeña cantidad de experimentos.

2.6 Conclusiones

La utilidad del diseño de experimentos basado en la probabilidad de éxito para la optimización de procesos batch con especificaciones de punto final se propone como una forma de definir una política óptima de funcionamiento con una alta probabilidad de obtener el resultado deseado. La metodología propuesta basada exclusivamente en datos, resulta muy atractiva para procesos innovadores para los cuales sus principios fundamentales y leyes constitutivas no se encuentran disponibles para el desarrollo de modelos. El algoritmo de la Figura 2.1 recurre a un criterio compuesto para el diseño experimental óptimo con el fin de equilibrar la precisión paramétrica con la probabilidad de éxito. Como resultado, el algoritmo desarrollado reduce sistemáticamente la zona de operación para garantizar altas probabilidades de éxito en el logro de las condiciones finales, a la vez que se mejora el modelo de superficie de respuesta de la probabilidad de éxito.

Se debe notar, que en el caso de que hubiera más de una región reducida de operación con alta probabilidad de éxito, el algoritmo propuesto encontrará sólo una de estas regiones. En este caso, debido a las aproximaciones realizadas a lo largo del procedimiento de optimización, no se puede garantizar que la *ROI* hallada sea precisamente la de mayor probabilidad de éxito (es decir, que sea el óptimo global).

El método propuesto ha sido testado *in silico* en dos casos de estudio muy conocidos, con el objeto de evaluar su desempeño: acetoacetilación de pirrol con diqueteno y polimerización por emulsión de estireno, han sido abordados con resultados alentadores.

Con este fin, se han añadido en ambos casos de estudio, niveles significativos de variabilidad intrínseca para simular la incertidumbre respecto al comportamiento del proceso. Vale la pena señalar que el algoritmo propuesto puede determinar una política óptima con una alta probabilidad de éxito en la mayoría de los casos. Como es de esperarse, cuando la variabilidad intrínseca del proceso es demasiado alta como consecuencia de las variables no controladas, la región óptima de operación determinada tendrá asociada una probabilidad de éxito sensiblemente menor.

Nomenclatura

Símbolos

C_{Df}	Concentración de diqueteno en la corriente de alimentación [mol/L]
C_i	Concentración de la especie i [mol/L]
D_{eff}	D-eficiencia de un diseño ξ respecto del diseño ξ_D^*
el	Número máximo de iteraciones del bucle externo
ep	Número de puntos experimentales asignados por el diseño experimental en cada bucle interno
$f(t)$	Velocidad de alimentación [L/min]
il	Número máximo de iteraciones del bucle interno
LB/UB	Vectores de límites inferiores/superiores para una dada <i>ROI</i>
LB_w/UB_w	Límites inferiores/superiores de una variable de entrada w
$M(\theta, \xi)$	Matriz de información de Fisher
MI	Índice de velocidad de fusión [g/min]

MW_n	Peso molecular promedio en número
MW_w	Peso molecular promedio en peso
n	Número de puntos experimentales en un diseño experimental
N_i	Número total de partículas de la población i en el reactor
P_{eff}	P-eficiencia de un diseño ξ respecto del diseño ξ_D^*
q	Número de parámetros en el modelo de superficie de respuesta
r	Número de réplicas a realizar en cada punto experimental
ROI	Región de interés para optimización
SP	Porcentaje de variabilidad respecto al comportamiento nominal
t	Tiempo (s)
X	Matriz de variables de entrada
x_{des}	Punto experimental diseñado por el diseño experimental
x_k^*	Política óptima de la iteración k^{th} del bucle interno
x_l^*	Política óptima de la iteración l^{th} del bucle externo

Símbolos griegos

α	Constante de mezcla
θ_k	Vector de parámetros del modelo de superficie de respuesta
λ_i^j	Momento j^{th} de la cadena de polímero viva de la especie i
μ_i^j	Momento j^{th} de la cadena de polímero muerta de la especie i
$v_r(t)$	Volumen de reactor [L]
ε_{in}	Criterio de interrupción del bucle interno
ε_{ex}	Criterio de interrupción del bucle externo
ξ	Diseño experimental
ξ_D^*	Diseño experimental D-óptimo
ξ_P^*	Diseño experimental P-óptimo
$\pi(x_i)$	Probabilidad de éxito de una dada condición de operación
$\pi(\theta; x)$	Modelo de superficie de respuesta de la probabilidad de éxito
σ	Resistencia a la tracción [psi]
$\Phi^{(DP)}$	Criterio de diseño compuesto

2.7 Bibliografía

- (1) Bernardo, F. P.; Saraiva, P. M. Modeling and Simulation of the Polymeric Nanocapsule Formation Process. *Am. Inst. Chem. Eng.* **2015**, *61* (3), 802.
- (2) Leal-Calderon, F. Emulsified Lipids: Formulation and Control of End-Use Properties. *Doss. Fonct. des Huiles* **2012**, *19* (2), 111.
- (3) Ferguson, R. M.; Minard, K. R.; Khandhar, A. P.; Krishnan, K. M. Optimizing Magnetite Nanoparticles for Mass Sensitivity in Magnetic Particle Imaging. *Med. Phys.* **2011**, *38* (3), 1619.
- (4) Kolhatkar, A. G.; Jamison, A. C.; Litvinov, D.; Willson, R. C.; Lee, T. R. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 15977.
- (5) Kong, X.; Yang, Y.; Chen, X.; Shao, Z.; Gao, F. Quality Control via Model-Free Optimization for a Type of Batch Process with a Short Cycle Time and Low Operational Cost. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, *50* (5), 2994.
- (6) Zhao, F.; Lu, N.; Lu, J. Quality Control of Batch Processes Using Natural Gradient Based Model-Free Optimization. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53*, 17419–17428.
- (7) Georgakis, C. Design of Dynamic Experiments: A Data-Driven Methodology for the Optimization of Time-Varying Processes. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, *52* (35), 12369.
- (8) Martínez, E. C.; Cristaldi, M. D.; Grau, R. J. Dynamic Optimization of Bioreactors Using Probabilistic Tendency Models and Bayesian Active Learning. *Comput. Chem. Eng.* **2013**, *49*, 37.
- (9) Luna, M.; Martínez, E. C. A Bayesian Approach to Run-to-Run Optimization of Animal Cell Bioreactors Using Probabilistic Tendency Models. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2014**, *53*, 17252.
- (10) Luna, M. F.; Martinez, E. C. Run-to-Run Optimization of Biodiesel Production Using Probabilistic Tendency Models - A Simulation Study. *Can. J. Chem. Eng.* **2015**, In press. DOI 10.1002/cjce.22249.
- (11) Anand, F. S.; Lee, J. H.; Realff, M. J. Optimal Decision-Oriented Bayesian Design of Experiments. *J. Process Control* **2010**, *20* (9), 1084.
- (12) Fiordalis, A.; Georgakis, C. Data-Driven, Using Design of Dynamic Experiments, versus Model-Driven Optimization of Batch Crystallization Processes. *J. Process Control* **2013**, *23* (2), 179.
- (13) McGree, J. M.; Eccleston, J. A.; Duffull, S. B. Compound Optimal Design Criteria for Nonlinear Models. *J. Biopharm. Stat.* **2008**, *18* (4), 646.
- (14) McGree, J. M.; Eccleston, J. A. Probability-Based Optimal Design. *Aust. N. Z. J. Stat.* **2008**, *50* (1), 13.
- (15) Woods, D. C.; Lewis, S. M.; Eccleston, J. A.; Russell, K. G. Designs for Generalized Linear Models with Several Variables and Model Uncertainty. *Southampt. Stat. Sci. Res. Inst. Methodol. Work. Pap. M06/01* **2006**.
- (16) McCullagh, P. Generalized Linear Models. *Eur. J. Oper. Res.* **1984**, *16* (3), 285.
- (17) Nelder, J. A.; Wedderburn, R. W. M.; Nelder, A. J. a; Wedderburn, R. W. M. Generalized Linear Models. *J. R. Stat. Soc. A.* **1972**, *135* (3), 370.

- (18) Montgomery, D. C.; Runger, G. C. *Applied Statistics and Probability for Engineers*, Third Edit.; John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- (19) Ruppen, D.; Bonvin, D.; Rippin, D. W. T. Implementation of Adaptive Optimal Operation for a Semi-Batch Reaction System. *Comput. Chem. Eng.* **1997**, *22* (1–2), 185.
- (20) Liotta, V.; Georgakis, C.; Sudol, E. D.; El-Aasser, M. S. Manipulation of Competitive Growth for Particle Size Control in Emulsion Polymerization. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1997**, *36* (8), 3252.
- (21) Li, B.-G.; Brooks, B. W. Prediction of the Average Number of Radicals per Particle for Emulsion Polymerization. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **1993**, *31*, 2397.
- (22) Liotta, V.; Sudol, E. D.; El-Aasser, M. S.; Georgakis, C. On-Line Monitoring, Modeling, and Model Validation of Semibatch Emulsion Polymerization in an Automated Reactor Control Facility. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **1998**, *36*, 1553.
- (23) Crowley, T. J.; Choi, K. Y. Calculation of Molecular Weight Distribution from Molecular Weight Moments in Free Radical Polymerization. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1997**, *36* (5), 1419.
- (24) Meyer, T.; Keurentjes, J. *Handbook of Polymer Reaction Engineering*; WILEY-VCH, 2005.
- (25) Valappil, J.; Georgakis, C. Nonlinear Model Predictive Control of End-Use Properties in Batch Reactors. *Am. Inst. Chem. Eng.* **2002**, *48* (9), 2006.
- (26) Katz, S.; Saldel, G. M. Moments of the Size Distribution in Radical Polymerization. *Am. Inst. Chem. Eng.* **1967**, *13* (2), 319.

3 DISEÑO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE SPIONs

En este capítulo se presenta un análisis bibliográfico resumido de los métodos disponibles de síntesis y recubrimiento de SPIONs, y en base a ello se trazan las directrices para el diseño de una nueva síntesis que pueda ser escalable y reproducible. Se diseñan, desarrollan y ensayan experimentalmente cuatro rutas alternativas de síntesis de SPIONs que logran cubrir las falencias actuales de producción en cuanto a la escalabilidad del proceso.

3.1 Modelo conceptual de diseño de producto: Planteo del Sub-problema 3

Como se ha presentado en el Capítulo 1, el diseño de productos innovadores dentro del marco del modelo conceptual propuesto por Bernardo y Saraiva¹ se desglosa en 3 sub-problemas: inversión de la función de calidad, inversión de la función de propiedad e inversión de la función de proceso. Los dos sub-problemas iniciales se han abordado en la literatura existente sobre SPIONs, y es el tercero el que interesa particularmente en esta tesis. Este sub-problema 3 implica proponer un nuevo proceso de síntesis (configuración del proceso y diseño equipos) e identificar los valores de las variables de operación que permitan la producción reproducible de SPIONs con las especificaciones para aplicaciones biomédicas. En el presente capítulo, se intenta resolver la primera cuestión en lo que respecta a este sub-problema: diseñar un nuevo proceso de producción de nanopartículas superparamagnéticas que cumpla con los requerimientos de proceso y especificaciones de producto. Más adelante se presentará el análisis de propiedades del producto obtenido (Capítulo 4) y análisis de variables en busca de una política de operación óptima (Capítulo 5), con lo que se completa el desarrollo del sub-problema 3, presentando de manera completa el proceso que da lugar al producto buscado.

3.2 Métodos de producción de nanopartículas superparamagnéticas

El uso de materiales nanométricos ofrece muchas ventajas debido a su tamaño y propiedades físicas, y teniendo en consideración la gran cantidad de aplicaciones de estas nanopartículas magnéticas (en biomedicina, ingeniería, ciencias de los

materiales, ciencias ambientales, entre otras), se debe poner especial atención al método de preparación de las partículas.² La síntesis de nanocristales de tamaño uniforme es de gran importancia debido a que muchas de las propiedades de estos nanocristales dependen fuertemente de sus dimensiones, forma y composición. La síntesis de nanopartículas superparamagnéticas es un proceso complejo debido a su naturaleza coloidal, donde las nanopartículas deben conservar sus características de forma y tamaño dispersas en una fase acuosa. El desafío consiste en definir un procedimiento de síntesis y sus respectivas condiciones de operación que conduzcan a la producción de una población monodispersa de nanopartículas magnéticas de tamaño y composición compatibles con las propiedades deseadas. A su vez, se busca que la ruta de síntesis permita obtener SPIONs con propiedades reproducibles a distintas escalas de producción. Además, es deseable que el método de producción no requiera de procedimientos complejos de purificación (tales como la ultracentrifugación, cromatografía de exclusión por tamaño, filtración magnética o gradiente de campo magnético) de modo que pueda ser escalado garantizando las propiedades de uso final del producto.^{3,4}

Diversos métodos de síntesis de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) han sido discutidos y desarrollados y se encuentran disponibles en la literatura, incluso muchos reportes describen eficientes enfoques de síntesis para la producción de forma controlada de nanopartículas estables, biocompatibles y monodispersas. Si bien se han podido sintetizar nanopartículas monodispersas con algunos de estos métodos, un control preciso del tamaño, forma y características de superficie, aún sigue siendo un desafío. El diseño de un procedimiento completo de síntesis debe contemplar parámetros de costos y eficiencias del proceso, reproducibilidad de sus propiedades, estabilidad y biocompatibilidad.^{2,5-8} Otro desafío que concierne a la producción de nanopartículas es la protección contra la corrosión, y para ello, es importante establecer las estrategias de protección adecuadas mediante diversos recubrimientos.^{9,10}

Entre los procesos de síntesis de nanopartículas, los más comunes que se pueden citar son: co-precipitación, descomposición térmica, hidrotermia, microemulsión y ultrasonido.^{7,8,10-12} Además, existen otros métodos de síntesis menos habituales, como son: vía electroquímica, técnicas de pirolisis láser, síntesis en solución plasmática, procesos sol-gel y utilización de microondas, micro- y nano-reactores, entre otros.^{7,8,11,13} Entre los métodos menos convencionales, podemos mencionar la síntesis "verde" utilizando extractos de plantas, o el uso de microorganismos (por ejemplo, bacteria Magnetotactic o bacterias reductoras de hierro).^{11,13} Entre todos estos métodos de síntesis, la co-precipitación es uno de los procesos más convencionales

para la síntesis de magnetita o maghemita, mediante la reacción de iones Fe(III) y Fe(II) en un medio alcalino.⁶

Los principales caminos de síntesis de SPIONs se pueden clasificar según:¹⁴

(1) Métodos físicos: deposición en fase gaseosa y litografía por haz de electrones. Sin embargo, estos métodos, están inhabilitados al control del tamaño de partícula para garantizar que el mismo se encuentre dentro de la nanoescala.

(2) Métodos húmedos químicos: síntesis sol-gel, métodos de oxidación, co-precipitación química, reacciones hidrotermales, síntesis por flujo de inyección, métodos electroquímicos, métodos de fase vapor/aerosol, reacciones de descomposición por ultrasonido, métodos de fluido supercrítico y síntesis con nanoreactores.

(3) Métodos microbianos: resultan en general simples, versátiles y eficientes, con apreciable control sobre la composición y geometría de partículas.

3.2.1 Co-precipitación

La precipitación de sales de hierro es probablemente la vía más utilizada de preparación de SPIONs. Típicamente, los óxidos de hierro se preparan mediante la adición de una mezcla de sales férricas y ferrosas a una solución alcalina. Generalmente, la reacción para la formación de Fe₃O₄ se puede escribir como:



Así, la co-precipitación es la vía más fácil y económica de sintetizar nanopartículas de óxidos de metálicos a partir de soluciones acuosas de sales M²⁺/Fe³⁺ (M²⁺ = Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺) añadidas a una base (NH₄OH, NaOH, Na₂CO₃) bajo atmósfera inerte, a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas. La distribución del tamaño, la forma y composición de nanopartículas magnéticas dependen del tipo de sal que se usa (por ejemplo, cloruros, sulfatos, nitratos, percloratos, etc.), del valor de pH, la temperatura de reacción, la relación M²⁺/Fe³⁺, la fuerza iónica del medio, la presencia de especies oxidantes y demás parámetros de reacción (por ejemplo: velocidad de agitación, caudal de alimentación de reactivos, etc.).^{7,15}

El proceso de co-precipitación es un método para obtención de SPIONs por cristalización, y se caracteriza por una fase inicial de nucleación, seguida de una fase de crecimiento de los cristales, siendo esta última la responsable de la forma de la partícula, el tamaño y la dispersión de tamaños. Idealmente, se pueden formar

nanopartículas monodispersas a través de una nucleación uniforme, seguida por el crecimiento de los cristales, sin la ocurrencia de nuevas nucleaciones en esta segunda etapa.^{2,10,16}

El método de co-precipitación tiene la ventaja de ser fácil de implementar y de permitir la producción de grandes cantidades de nanopartículas si se utilizan las condiciones adecuadas. Además, una vez que se establecen y mantienen las condiciones de síntesis (mezclado, pH, temperatura, concentraciones de los reactivos, etc.), las características de las nanopartículas de magnetita son totalmente reproducibles. Sin embargo, las partículas preparadas por co-precipitación son generalmente polidispersas, y esta condición no es ideal para muchas aplicaciones, por lo cual en algunos casos se requiere una selección de tamaño secundaria. Las principales desventajas de este tipo de síntesis son: el alto valor de pH del medio de reacción, el cual debe ser correctamente ajustado, tanto en la síntesis como en las etapas de purificación; y las limitaciones para lograr un producto de composición uniforme y tamaño monodisperso.^{3,11,17}

El método más común de síntesis de SPIONs fue presentado por Massart¹⁸, y consiste en la adición de una solución conteniendo iones ferrosos y férricos con estequiometría 1:2, respectivamente, a una solución básica en un medio libre de oxígeno, lo que da lugar a la formación de un precipitado negro de nanopartículas de magnetita esféricas de tamaños uniformes. Es importante llevar a cabo la síntesis en un medio libre de oxígeno, ya que de otro modo la magnetita se podría oxidar en el medio de reacción. El control de la etapa de crecimiento de los cristales en la ruta de co-precipitación es el paso clave para producir SPIONs de tamaños nanométricos.^{11,12,15,19}

Se han informado síntesis de nanopartículas de Fe₃O₄ monodispersas y uniformes por co-precipitación sin tensioactivos, considerando una relación molar de $Fe^{2+}/Fe^{3+} = 0.5$ y un pH entre 11 y 13. También, se han descrito rutas eficientes para obtener nanopartículas monodispersas en medios de síntesis con sustancias tensioactivas tales como dextran o polivinilalcohol (PVA), las cuales se pueden añadir en el medio de reacción o pueden agregarse post-síntesis para recubrir las nanopartículas en una etapa posterior. Los tensioactivos actúan como agente de protección para el control de tamaño de partícula y la estabilización de las dispersiones coloidales.⁷

El reto experimental en la síntesis de magnetita por co-precipitación se encuentra en el control del tamaño de partícula, su composición y la distribución de tamaño. Es bien sabido que una breve y rápida nucleación, seguida de un crecimiento de partícula lento y controlado es crucial para producir partículas monodispersas. El control de estos

procesos de cristalización es por lo tanto la clave en la producción de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro monodispersas. Recientemente, se han informado avances significativos en la preparación de nanopartículas de magnetita monodispersa, de diferentes tamaños, mediante el uso de aditivos orgánicos y/o agentes reductores. La selección de un tensioactivo adecuado es una cuestión importante para la estabilización de SPIONs.^{2,10,16}

3.2.2 Microemulsión

Las microemulsiones son sistemas termodinámicamente estables formados por dos líquidos inmiscibles (por lo general, agua y aceite) y un agente tensioactivo. Las gotas de agua en aceite (W/O) (micelas inversas) o de aceite en agua (O/W) (micelas) son estabilizadas por agentes tensioactivos cuando se utilizan pequeñas cantidades de agua o aceite, respectivamente. Como tensioactivos se pueden utilizar diversas sustancias, como ser: dodecilsulfato sódico, bromuro de cetiltrimetilamonio, polivinilpirrolidona, dietilsulfosuccinato, entre otros. En el caso de las microemulsiones de agua en aceite, la fase acuosa se dispersa como nanogotas rodeadas por una monocapa de moléculas de tensioactivo en la fase continua de hidrocarburo. Estas nanogotas se pueden utilizar como nanorreactores para llevar a cabo reacciones químicas. Esta técnica se reporta como un método alternativo y más controlado de producción de nanopartículas, y en la misma los iones de hierro se pueden precipitar como óxidos de hierro en la fase acuosa específicamente situada en el centro de las micelas. Los óxidos de hierro no precipitan en la fase orgánica ya que los iones no son reactivos en esta fase. Mediante la mezcla de dos microemulsiones idénticas de agua en aceite que contienen los reactivos deseados, las nanogotas chocan, se rompen, se unen y finalmente forman un precipitado en las micelas. En este sentido, se puede utilizar una microemulsión como un nanorreactor para la formación de nanopartículas.

Inicialmente se suponía que estas nanogotas podrían ser utilizadas como plantillas para controlar el tamaño final de las partículas. Sin embargo, las investigaciones realizadas en los últimos años han mostrado que, además del tamaño de la nanogota, otros parámetros juegan un papel importante en la distribución de tamaño de las SPIONs, como ser la relación molar entre agua y tensioactivo o la concentración de reactivos. En los últimos años se han realizado diversos estudios para comprender la cinética y los mecanismos de reacción en soluciones coloidales, así como la síntesis controlada de nanocristales con diferentes tamaños y forma utilizando un enfoque de micelas inversas. Aunque muchos tipos de nanopartículas magnéticas han sido sintetizadas con relativo éxito en una de forma controlada utilizando el método de

microemulsión, el tamaño y la forma de las partículas suelen variar en un intervalo considerablemente amplio y por tanto no es un método que garantice la reproducibilidad de las propiedades de uso final. Por otra parte, el rendimiento es menor que el obtenido por otras estrategias de síntesis tales como co-precipitación o descomposición térmica. Además, se requieren grandes cantidades de disolvente con el fin de obtener cantidades apreciables del producto. Estos problemas hacen que sea difícil de escalar el proceso.^{2,4,7,10,11,15-17,20-26}

3.2.3 Descomposición térmica

Nanocristales magnéticos monodispersos, de tamaños y forma controlados, pueden ser sintetizados a través de la descomposición térmica de compuestos organometálicos disueltos en solventes orgánicos de alto puntos de ebullición, conteniendo sustancias tensioactivas como estabilizantes. Los precursores organometálicos incluyen acetilacetonatos metálicos $[M(\text{acac})_n]$, ($M = \text{Fe, Mn, Co, Ni, Cr}$, $n = 2$ o 3 , $\text{acac} = \text{acetilacetonato}$), metales de N-nitrosufenilhidroxilamina $[M^x A_x]$, ($M = \text{i3n met3lico, A} = \text{N-nitrosufenilhidroxilamina}$), o carbonilos. Las mol3culas de tensioactivo tienen la funci3n de estabilizar la dispersi3n de los nanocristales y de esta forma controlar tambi3n su crecimiento. Los agentes tensioactivos com3nmente utilizados son: 3cidos grasos, 3cido oleico y hexadecilamina. En principio, las proporciones de los reactivos de partida que incluyen compuestos organomet3licos, tensioactivos y disolventes, son los par3metros decisivos para el control del tama3o y la morfolog3a de las nanop3rticulas magn3ticas. De igual modo, la temperatura de reacci3n y el tiempo de reacci3n tambi3n pueden ser cruciales para el control preciso del tama3o y la morfolog3a de las SPIONs. Aunque este m3todo tiene muchas ventajas para la producci3n de part3culas monodispersas con una distribuci3n de tama3o estrecha, el mismo presenta la gran desventaja de que los nanop3rticulas resultantes generalmente s3lo se disuelven en disolventes no polares, y adem3s, la descomposici3n t3rmica es un proceso que generalmente requiere de temperaturas relativamente altas y un proceso de producci3n complicado.^{2,7,8,10,11,15,16}

3.2.4 Hidrotermia

Los m3todos de descomposici3n t3rmica y de microemuls3n por lo general conducen a un proceso complicado o requieren temperaturas relativamente elevadas. Como alternativa, la s3ntesis por hidrotermia incluye tecnolog3as qu3micas h3medas de

cristalización de la sustancia en una solución acuosa, contenida en un recipiente cerrado, a alta temperatura (generalmente en el intervalo de 130 a 250 ° C) y a alta presión de vapor (generalmente en el intervalo de 0.3 a 4 MPa). Varios autores han descrito la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro por el método hidrotérmico y hay dos métodos principales en función de utilizar o no tensioactivos específicos. El método hidrotermal es el más antiguo para la síntesis de magnetita, donde precursores de hierro en medio acuoso se calientan a alta temperatura. Aprovecha la solubilidad de casi todas las sustancias inorgánicas en agua a temperaturas y presiones elevadas, así como la posterior cristalización del material disuelto. El agua a temperaturas elevadas juega un papel esencial en la transformación de iones precursores, debido a que la presión de vapor es mucho mayor y la estructura del agua que es diferente a temperaturas elevadas. Las propiedades de los reactivos, incluyendo su solubilidad y reactividad, también cambian a altas temperaturas. Gracias a estas peculiaridades, este método produce una amplia gama de nanocristales, que no es posible obtener a bajas temperaturas. Durante la síntesis, los parámetros tales como la presión, la temperatura y tiempo de reacción, pueden ajustarse para mantener una elevada velocidad de nucleación que proporciona una estrecha distribución de tamaño. Recientemente, este método se ha extendido al uso de microondas para la síntesis de SPIONs. También se utiliza como proceso posterior a la síntesis mediante co-precipitación, para lograr nanopartículas monodispersas de tamaño nanométrico y controlado. Este método produce SPIONs de tamaños uniformes y es escalable industrialmente, sin embargo es una técnica relativamente inexplorada para la síntesis de nanopartículas magnéticas.^{7,10,11,15}

3.2.5 Ultrasonido

Como alternativa competitiva, la síntesis por ultrasonido ha sido utilizada para generar nuevos materiales con propiedades especiales. Los efectos químicos del ultrasonido surgen de la cavitación acústica, es decir, la formación, el crecimiento y colapso de las burbujas que implosionan en el seno del líquido. El colapso de la burbuja genera un punto caliente localizado, mediante la compresión adiabática o la formación de ondas de choque dentro de la fase gaseosa de la burbuja que colapsa. Esta formación, crecimiento y colapso de las burbujas en un líquido puede favorecer a muchas reacciones químicas. Por lo tanto, este método ofrece características muy atractivas para la preparación de nanopartículas con diferentes morfologías y composiciones. Las condiciones que tienen lugar en los puntos calientes han sido determinadas experimentalmente, y se ha comprobado que las temperaturas transitoriamente pueden elevarse hasta los 5000 K, las presiones pueden localmente alcanzar las 1800

atm y las velocidades de enfriamiento pueden ser de hasta 1010 K/s. Estas condiciones extremas resultan beneficiosas para la formación de una nueva fase, y tienen un efecto del tipo cizalla que impide la aglomeración, lo cual es muy conveniente para preparar nanopartículas monodispersas y de una gran variedad de formas. Sin embargo, este método enfrenta dificultades para ser escalado industrialmente por la imposibilidad de aplicar eficazmente el ultrasonido a grandes volúmenes.^{2,7,11,20}

3.3 Métodos de recubrimientos de SPIONs

Las nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro tienen superficies hidrófobas y una alta relación superficie-volumen, por lo que en ausencia de un revestimiento superficial adecuado, las interacciones hidrófobas entre ellas hacen que se agreguen formando grandes racimos lo que disminuye su superficie específica y aumenta el tamaño efectivo. Por otro lado, en vista del interés en aplicaciones biológicas, las nanopartículas de óxidos de hierro deben recubrirse con determinadas biomoléculas con el fin de mejorar su biocompatibilidad. Los recubrimientos con polímeros orgánicos ofrecen aplicaciones de alto potencial en varias áreas, como ser la medicina humana, ya que permiten conservar las propiedades magnéticas de los óxidos de hierro a la vez que brindan una superficie biocompatible, hidrófila y biodegradable. Además, los compuestos moleculares orgánicos pueden proporcionar un grupo funcional reactivo, como por ejemplo, grupos aldehído, hidroxilo, carboxilo, amino, etc., los cuales pueden vincularse a una sustancia biológica activa tal como un anticuerpo, antibiótico, proteína, ADN, enzima, etc., que permite utilizar SPIONs como “carriers”. Generalmente, las estructuras de estos nanocompuestos, entre SPIONs y polímeros de recubrimiento incluyen, un núcleo de magnetita y una envoltura orgánica, y pueden clasificarse en: núcleo-cáscara, matriz y cáscara-núcleo-cáscara, como se muestra esquemáticamente en la Figura 3.1.⁷

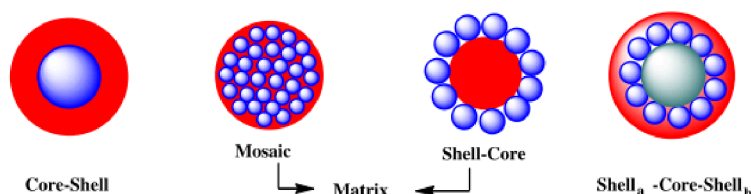


Figura 3.1: Estructuras representativas de nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro funcionalizadas con recubrimientos orgánicos.⁷

El polietilenglicol (PEG) es uno de los polímeros hidrófilos e hidrosolubles más importantes, ya que también es biocompatible y biodegradable. El empleo del PEG ha

sido aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para aplicaciones parenterales, en un rango de pesos moleculares entre 1 y 20 kDa, debido a sus características de biocompatibilidad y toxicocinética. Por su naturaleza hemocompatible, no-antigénico y no inmunogénico, es de esperar una reacción biológica pequeña o despreciable mediante la aplicación de PEG en las superficies con contacto directo con el torrente sanguíneo.¹⁶ Además, el recubrimiento de SPIONs con PEG minimiza la absorción de proteínas en la superficie de las nanopartículas magnéticas aumentando su circulación sanguínea. Las nanopartículas magnéticas recubiertas con PEG se preparan usando diferentes materiales de anclaje superficial como ser fosfolípidos, co-polímeros y sílice.^{10,17,24}

Existen en la literatura, diversos procedimientos de incorporación de PEG a la superficie de las nanopartículas de magnetita. Muchos de estos métodos implican gran cantidad de etapas o engorrosas técnicas experimentales, las cuales no resultan apropiadas para una aplicación a escala industrial del proceso de “pegilado”. Se citan a continuación algunos casos, a modo de ejemplificar y comprobar esta afirmación:

- Por ejemplo, una técnica de recubrimiento con PEG implica, una vez obtenida la nanopartícula de Fe_3O_4 : continuar con la agitación, enfriar el medio, eliminar el disolvente por decantación magnética, realizar varios lavados con agua para eliminar residuos, añadir una solución acuosa de PEG, sonicar, eliminar el sobrenadante por centrifugación, volver a lavar el producto con agua y secar a temperatura ambiente.²⁷
- Otra metodología incluye: oxidar las SPIONs con nitrato férrico, peptizar en ácido nítrico, y resuspender las nanopartículas en agua, silanizar mediante un contacto de 12 horas con (3-aminopropil)triétoxisilane (APTES), lavar, volver a peptizar en agua a pH=3, pegilar con un contacto de 24 horas con PEG activado y purificar por diálisis contra agua.²⁸
- Otro método involucra: centrifugar los precipitados de nanopartículas y lavar con agua varias veces, dispersar en agua desionizada, mezclar con PEG mediante agitación por 24 horas, recoger los precipitados mediante un imán permanente, lavar varias veces para eliminar el PEG en exceso y secar en horno.²⁹
- Otra técnica de recubrimiento incluye: tratar las superficies con iones citrato incubando durante una hora con solución de ácido cítrico a 90 °C durante 60 min con agitación continua, luego enfriar, lavar varias veces con agua desionizada, centrifugar, volver a lavar, disolver la solución obtenida en solución tamponada con fosfato a pH=8, añadir PEG, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida HCl y N-hidroxisucciniamida, agitar durante 24 horas, ultrafiltrar y lavar varias veces con agua desionizada.³⁰

- Y otra técnica muy común de recubrimiento implica un paso previo de silanización, lo cual comprende: diluir las nanopartículas con (3-aminopropil)trimetoxisilane y metanol, mezclar durante 12 horas, añadir glicerol, evaporar para eliminar el metanol y el agua, deshidratar en vacío durante 2 horas, lavar tres veces con agua/acetona, agregar agua, disminuir lentamente el pH con ácido nítrico con agitación vigorosa, incorporar PEG activado, agitar durante 24 horas, purificar por diálisis contra agua repitiendo el procedimiento cada 4 horas, un total de 5 veces.³¹

Como puede verse, las técnicas de recubrimientos disponibles están muy lejos de poder ser adaptadas a una escala industrial, ya que a su vez debe tenerse en cuenta que todas las etapas deben realizarse en atmósfera libre de oxígeno. Por ello, nos focalizamos en el diseño de una síntesis más simple y escalable para incorporar el PEG a las superficies de las nanopartículas de óxidos de hierro.

3.4 Diseño de una nueva síntesis de producción de nanopartículas

3.4.1 Análisis y selección de síntesis

Entre los métodos más tradicionales de síntesis de SPIONs, los cuales fueron descritos brevemente en este capítulo, puede afirmarse que cada uno de ellos presenta ventajas y desventajas respecto a su efectividad para producir de manera reproducible SPIONs que satisfacen las propiedades de uso final. En términos de control de tamaño y morfología de las nanopartículas producidas, la descomposición térmica y la ruta por hidrotermia demuestran ser los procedimientos más adecuados, pero ambos involucran procesos complejos de síntesis, son procedimientos poco estudiados desde el punto de vista del diseño del proceso y requieren de altas temperaturas y presiones de operación. Por su parte, la descomposición térmica y la microemulsión no permiten la síntesis de partículas solubles en agua (propiedad necesaria para la utilización de las nanopartículas para aplicaciones biomédicas). Por otro lado, la hidrotermia puede ser utilizada, en caso de requerirse, como segunda etapa de un proceso previo de síntesis por co-precipitación, para dar lugar a nanopartículas de tamaño controlado y monodispersas.

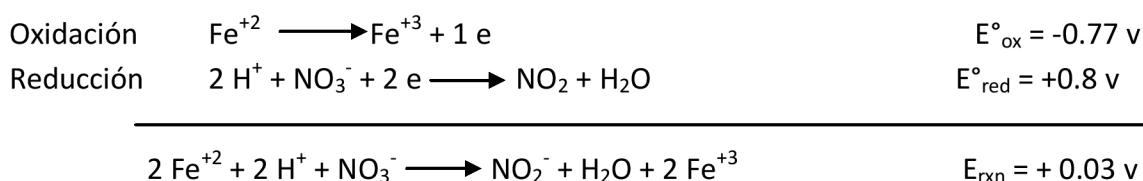
Para la obtención de nanopartículas solubles en agua y biocompatibles, la co-precipitación es la ruta de síntesis más adecuada y mayormente utilizada, si bien presenta problemas respecto al control de tamaño de partícula y formación de agregados de partículas. En este trabajo de tesis, utilizaremos la co-precipitación como

ruta de síntesis, ya que importa particularmente el hecho de obtener un producto biocompatible y apto para el uso en medicina humana, a la vez que se pretende diseñar un proceso simple de producción, que pueda ser escalado a nivel industrial. Entonces, se busca lograr una síntesis basada en la co-precipitación, pero sin utilizar sales de cloruros como reactivos, de modo de facilitar la escalabilidad del proceso. Asimismo, se pretende estudiar y evaluar la nueva estrategia productiva de modo de garantizar la reproducibilidad y ajustar los parámetros del proceso con el objetivo de lograr un producto que cumpla con los requerimientos para su uso en particular como vector de drogas oncológicas.

3.4.2 Nueva ruta de síntesis de SPIONs

Para lograr una síntesis de producción acorde con las características que se enunciaron, es necesario hallar una vía de síntesis de SPIONs que no incluya en el proceso la utilización de cloruros, debido a que los mismos implicarían un problema a la hora de escalar el proceso, por el hecho de que resultan corrosivos. Para ello se propone una nueva ruta de síntesis, incluyendo una etapa previa en la cual se produce una reacción de óxido-reducción, la cual da lugar a los iones ferrosos y férricos en la relación y cantidad correspondiente al proceso tradicional de síntesis y con una estequiometría ajustada a la reacción de formación de magnetita ($\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3} = 1/2$). En otras palabras, se plantea una forma de llegar a obtener las concentraciones de los reactivos en proporción estequiométrica (como lo requiere la síntesis de magnetita) pero por una vía redox, en reemplazo a la utilización de sales de cloruro.

La alternativa propuesta consta de una etapa redox inicial, a partir de nitrato férrico [$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$] y sulfato ferroso [FeSO_4] que dan lugar a los iones ferrosos y férricos en las concentraciones requeridas para la reacción de síntesis de magnetita. Se considera que en una solución de nitrato férrico y sulfato ferroso, la acción oxidante del nitrato oxidará a los iones ferrosos provenientes del sulfato ferroso formando más iones férricos (obteniendo entonces una cantidad de iones férricos correspondientes a los que provenían del nitrato más los provenientes de la oxidación). Se presenta a continuación la reacción redox esperada en la solución líquida:



Para evaluar la velocidad de esta reacción bajo condiciones ambientales, se analiza la constante de equilibrio:

$$E(T) = E^0 - \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln Q = E^0 - \frac{0.0592}{n} \cdot \log Q$$

Dónde: $F = 96497 \text{ C/mol}$

$$R = 8.314 \text{ J/mol.K} = 8.314 \text{ v.C/Mol.K}$$

Cuando la reacción química alcanza el equilibrio se verifica que:

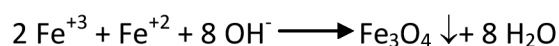
$$E = 0$$

$$Q = K$$

$$K = 10^{\frac{n \cdot E^0}{0.0591}} = 10^{\frac{2 \cdot 0.03}{0.0591}} = 10,36$$

La constante K permite evaluar la velocidad de las reacciones redox involucradas en la ruta de síntesis. Si la K es elevada (mayor que 10) indica que la reacción es rápida y se desplaza hacia los productos, tal como ocurre entonces en este caso y como se ha comprobado experimentalmente. En una condición tipo estándar podría suponerse entonces, que los iones nitratos oxidarán a los iones ferrosos a iones férricos, quedando además en solución iones sulfato sin reaccionar. La magnitud de la constante de equilibrio correspondiente habilitaría a asumir que, una vez completada la reacción de óxido-reducción, los nitratos se encontrarán mayoritariamente como nitritos no quedando en solución moles oxidantes en cantidades significativas. Se ajusta la estequiometría de la reacción redox, de modo de obtener al final de la misma, la cantidad de iones ferrosos y férricos correspondientes para la síntesis de magnetita.

La magnetita se sintetiza agregando gota a gota la solución de sales $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ a una solución fuertemente alcalina, de pH constante (pH \approx 11-13), siguiendo la siguiente reacción de formación:



En la síntesis propuesta en esta tesis, como fuente de oxhidrilos se propone el uso de hidróxido de sodio, en lugar del uso de hidróxido de amonio de las síntesis tradicionales, ya que el hidróxido de sodio es más práctico y seguro en cuanto a su manejo, más aun pensándolo para un posterior escalado a nivel industrial del proceso.

La primera parte de la síntesis (etapa redox) se lleva a cabo en recipientes de vidrio de laboratorio, en tanto que la segunda etapa (reacción de formación de magnetita: etapa

síntesis) se realiza en un biorreactor, bajo atmósfera de nitrógeno y con control estricto de pH de reacción mediante el agregado de solución alcalina a medida que el mismo va disminuyendo como consecuencia de la misma reacción de síntesis. En la Figura 3.2 y Figura 3.3 se muestran los elementos y equipos utilizados en la síntesis de magnetita a escala banco.

El procedimiento general de la nueva ruta de producción de SPIONs propuesta se resume de la siguiente manera:

Etapa Redox

- a) Se prepara el reactor redox, agregando $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (sólido), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (sólido) y agua destilada. Se logrará después de la reacción redox, una solución: Fe^{+3} 0.7 M, Fe^{+2} 0.375 M.
- b) Se agita la solución con agitación magnética mientras se produce la reacción redox.

Etapa Síntesis

- a) Se prepara el reactor de síntesis con una solución alcalina de pH=12.5. Para ello se disuelven NaOH en agua destilada, dentro del reactor.
- b) Se prepara un recipiente de alimentación de solución de NaOH concentrada (pH=14) para utilizar como solución reguladora del pH a la largo de la reacción de síntesis.
- c) Se conectan todos los recipientes, se enciende el agitador en el reactor de síntesis (200 rpm), se sellan todas las posibles entradas de aire y se comienza a burbujear nitrógeno en el sistema de modo de generar una atmósfera libre de oxígeno, que permita la síntesis de magnetita y a la vez impida la oxidación de la misma.
- d) Se comienza a alimentar, con caudal lento, la solución resultante de la etapa redox al reactor de síntesis. Se adiciona la solución concentrada de NaOH de manera automática para mantener constante el pH en el reactor.
- e) Cuando termina la alimentación de reactivos, se continúa agitando durante 15 minutos más.

Considerando este procedimiento general, se proponen cuatro alternativas de síntesis, para contemplar la posibilidad de pegilar (incorporar PEG) las superficies de las mismas o brindar mayor estabilidad a las nanopartículas en solución. Las distintas variantes se pueden enunciar según:

- **RN19:** formación de magnetita desnuda, sin adición de ningún estabilizante o tensioactivo.
- **RN20:** formación de magnetita incorporando PEG en el reactor de síntesis, con el objeto de pegilar las superficies de las nanopartículas, para hacerlas biocompatibles.

- **RN21:** formación de magnetita y pegilación post-síntesis, mediante una etapa intermedia de acidificación del medio, para facilitar la adhesión del PEG a la superficie de las nanopartículas.
- **RN22:** formación de magnetita incluyendo TMAOH como tensioactivo en el medio de síntesis, con el objeto de dar mayor estabilidad a las nanopartículas en suspensión.



Figura 3.2: Reactor redox, recipiente con NaOH concentrada y reactor de síntesis.



Figura 3.3: Reactor de síntesis.

En la Tabla 3.1 se muestran los detalles de cada síntesis, las cantidades utilizadas de cada reactivo y en qué etapa se adiciona cada uno de ellos.

Tabla 3.1: Diferentes opciones de síntesis de SPIONs propuestas y evaluadas.

		RN19	RN20	RN21	RN22
Redox	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	3.0300 g	3.0300 g	3.0300 g	3.0300 g
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	19.8082 g	19.8082 g	19.8082 g	19.8082 g
	H ₂ O destilada	70 ml	70 ml	70 ml	70 ml
Síntesis	NaOH síntesis	2.8 g	2.8 g	2.8 g	2.8 g
	PEG	-	20 g	-	-
	TMAOH	-	-	-	7 ml
	H ₂ O destilada	700 ml	700 ml	700 ml	693 ml
Recubrimiento post-síntesis	HNO ₃	-	-	7 ml	-
	PEG	-	-	20 g	-

3.5 Conclusiones

En el presente capítulo se presentó un análisis de las rutas de síntesis de producción de SPIONs existentes en la actualidad y se describieron los requerimientos buscados en un proceso productivo para cumplir con determinadas condiciones tanto de producción como del producto final obtenido, ambas descritas en detalle en el presente capítulo. Se puede ver de este modo, que no existe hasta la actualidad un proceso que logre reunir estas condiciones buscadas y por tanto se plantea, en base a un completo análisis bibliográfico, una nueva ruta de producción de nanopartículas que intente satisfacer estas necesidades productivas.

La nueva ruta de síntesis planteada propone una etapa previa de óxido-reducción para alcanzar las condiciones estequiométricas requeridas para la síntesis de magnetita, evitando el uso de sales de cloruro. A partir de allí, se procede con la síntesis habitual, reemplazando el hidróxido de amonio por hidróxido de sodio como medio alcalino. De este modo se puede lograr el mismo producto que en las síntesis tradicionales, pero con un método factible de ser escalado a nivel industrial. Se plantean además de la síntesis de magnetita desnuda, tres alternativas para recubrir (con PEG) o estabilizar en solución (con TMAOH) las nanopartículas obtenidas.

En el siguiente capítulo se analizan los productos obtenidos en cada alternativa de síntesis propuesta, mediante las técnicas de caracterización pertinentes, de modo de comparar con los productos de síntesis reportados en la literatura sobre SPIONs, y verificar además, que se cumplan las propiedades de uso requeridas e identificar la composición del producto obtenido.

3.6 Bibliografía

- (1) Bernardo, F. P.; Saraiva, P. M. A Conceptual Model for Chemical Product Design. *Am. Inst. Chem. Eng.* **2015**, *61* (3), 802.
- (2) Faraji, M.; Yamini, Y.; Rezaee, M. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications. *J. Iran. Chem. Soc.* **2010**, *7* (1), 1.
- (3) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (6), 2064.
- (4) Teja, A. S.; Koh, P.-Y. Synthesis, Properties, and Applications of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **2009**, *55* (1–2), 22.
- (5) Gao, J.; Gu, H.; Xu, B. Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (8), 1097.
- (6) Thanh, N. T. K.; Green, L. A. W. Functionalisation of Nanoparticles for Biomedical Applications. *Nano Today* **2010**, *5* (3), 213.
- (7) Wu, W.; He, Q.; Jiang, C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. *Nanoscale Res. Lett.* **2008**, *3* (11), 397.
- (8) Atta, A. H.; El-ghamry, M. A.; Hamzaoui, A.; Refat, M. S. Synthesis and Spectroscopic Investigations of Iron Oxide Nano-Particles for Biomedical Applications in the Treatment of Cancer Cells. *J. Mol. Struct.* **2015**, *1086*, 246.
- (9) Dias, A. M. G. C.; Hussain, A.; Marcos, A. S.; Roque, A. C. A. A Biotechnological Perspective on the Application of Iron Oxide Magnetic Colloids Modified with Polysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29* (1), 142.
- (10) Lu, A.-H. H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46* (8), 1222.
- (11) Mahmoudi, M.; Sant, S.; Wang, B.; Laurent, S.; Sen, T. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs): Development, Surface Modification and Applications in Chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *63* (1–2), 24.
- (12) Petcharoen, K.; Sirivat, A. Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticles via the Chemical Co-Precipitation Method. *Mater. Sci. Eng. B* **2012**, *177* (5), 421.
- (13) Kharisov, B. I.; Dias, H. V. R.; Kharissova, O. V.; Vázquez, A.; Peña, Y.; Gómez, I. Solubilization, Dispersion and Stabilization of Magnetic Nanoparticles in Water and Non-Aqueous Solvents: Recent Trends. *RSC Adv.* **2014**, *4* (85), 45354.
- (14) Reddy, L. H.; Arias, J. L.; Nicolas, J.; Couvreur, P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (11), 5818.
- (15) Altavilla, C.; Ciliberto, E.; Agarwal, A.; Bakshi, S. R.; Lahiri, D.; Altavilla, C.; Ciliberto, E.; Dong, L.; Nelson, B.; Choi, W.; et al. *Inorganic Nanoparticles. Synthesis, Applications, and Perspectives*; Press, C., Ed.; 2011.
- (16) Mahmoudi, M.; Simchi, A.; Imani, M. Recent Advances in Surface Engineering of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *J. Iran.*

- Chem. Soc.* **2010**, 7 (July), 1.
- (17) Öchsner, A.; Shokuhfar, A. *New Frontiers of Nanoparticles and Nanocomposite Materials: Novel Principles and Techniques*; Springer, Ed.; 2013; Vol. 4.
- (18) Massart, R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Trans. Magmetics* **1981**, M (2), 1980.
- (19) Mizukoshi, Y.; Shuto, T.; Masahashi, N.; Tanabe, S. Preparation of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles by Reverse Precipitation Method: Contribution of Sonochemically Generated Oxidants. *Ultrason. Sonochem.* **2009**, 16 (177), 525.
- (20) Panigrahi, S. *Studies on Growth Kinetics of Nanoparticles Formation in Bulk Solution*, 2010.
- (21) Ashtari, P.; He, X.; Wang, K.; Gong, P. An Efficient Method for Recovery of Target ssDNA Based on Amino-Modified Silica-Coated Magnetic Nanoparticles. *Talanta* **2005**, 67 (3), 548.
- (22) Gupta, A. K.; Wells, S. Surface-Modified Superparamagnetic Nanoparticles for Drug Delivery: Preparation, Characterization, and Cytotoxicity Studies. *IEEE Trans. Nanobioscience* **2004**, 3 (1), 66.
- (23) Gupta, A. K.; Gupta, M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomaterials* **2005**, 26 (18), 3995.
- (24) Vo-Dinh, T. *Nanotechnology in Biology and Medicine: Methods, Devices, and Applications*; Press, C., Ed.; 2006.
- (25) Agrawal, C. M.; Ong, J. L.; Appleford, M. R.; Mani, G. *Introduction to Biomaterials*; PRESS, C. U., Ed.; 2014.
- (26) Qi, B. *Factors of Controlling Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles and the Effect of Surface Charge on Magnetic Hyperthermia*, 2013.
- (27) Mukhopadhyay, A.; Joshi, N.; Chattopadhyay, K.; De, G. A Facile Synthesis of PEG-Coated Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles and Their Prevention of the Reduction of Cytochrome C. *Am. Chem. Soc.* **2012**, 4, 142.
- (28) Gautier, J.; Munnier, E.; Paillard, A.; Hervé, K.; Douziech-Eyrolles, L.; Soucé, M.; Dubois, P.; Chourpa, I. A Pharmaceutical Study of Doxorubicin-Loaded PEGylated Nanoparticles for Magnetic Drug Targeting. *Int. J. Pharm.* **2012**, 423 (1), 16.
- (29) Dorniani, D.; Kura, A. U.; Hussein-Al-Ali, S. H.; Bin Hussein, M. Z.; Fakurazi, S.; Shaari, A. H.; Ahmad, Z. In Vitro Sustained Release Study of Gallic Acid Coated with Magnetite-PEG and Magnetite-PVA for Drug Delivery System. *Sci. World J.* **2014**.
- (30) Cheraghipour, E.; Tamaddon, A. M.; Javadpour, S.; Bruce, I. J. PEG Conjugated Citrate-Capped Magnetite Nanoparticles for Biomedical Applications. *J. Magn. Magn. Mater.* **2013**, 328, 91.
- (31) Hervé, K.; Douziech-Eyrolles, L.; Munnier, E.; Cohen-Jonathan, S.; Soucé, M.; Marchais, H.; Limelette, P.; Warmont, F.; Saboungi, M. L.; Dubois, P.; et al. The Development of Stable Aqueous Suspensions of PEGylated SPIONs for Biomedical Applications. *Nanotechnology* **2008**, 19 (46), 465608.

4 PROPIEDADES Y CARACTERIZACIÓN DE SPIONs

En este capítulo se detallan las principales propiedades de uso final requeridas para las SPIONs para su aplicabilidad en biomedicina y se describen los principales métodos de caracterización de las mismas. Posteriormente, se exhiben los ensayos realizados a las SPIONs, y sus respectivos análisis y conclusiones.

4.1 Propiedades de uso final de SPIONs

Como se ha descrito de manera detallada en el Capítulo 1, existen ciertas propiedades de uso final que las SPIONs deben cumplir a fin de garantizar su uso en biomedicina. Por esto, es importante realizar un análisis detallado en el producto obtenido mediante la nueva síntesis propuesta, a fin de verificar que se cumplan dichas propiedades y poder validar entonces la nueva ruta de síntesis propuesta. De modo de identificar las características particulares de las nanopartículas producidas, las mismas deben ser analizadas mediante diversas técnicas de caracterización que permiten identificar tanto el compuesto como sus propiedades físicas y químicas particulares, lo cual brinda pautas de que el producto obtenido cumple con las propiedades de uso final requeridas.

Cuando las nanopartículas son utilizadas como “carriers” de fármacos se inyectan por vía sistémica en el torrente sanguíneo, el tamaño, la composición y la carga superficial son los tres parámetros importantes para su comportamiento en el flujo de sangre.¹⁻³ Entonces, se detallan brevemente a continuación las tres propiedades más importantes que debe satisfacer el producto final, que corresponden a:

- ✓ **Tamaño:** Debe estar comprendido entre los 10 y los 100 nm, de modo de evitar que las SPIONs sean atrapadas por el sistema reticuloendotelial (RES), y a fin de permitir su difusión a través de tejidos en condiciones patológicas pero no a través de tejidos sanos.¹⁻³
- ✓ **Potencial zeta:** La medición del potencial zeta es un indicador informativo del grado de estabilidad de una suspensión coloidal y resulta una herramienta eficaz ampliamente utilizada para evaluar los efectos de la presencia de agentes activos en superficie en diferentes sistemas.^{1,4-8} El potencial de superficie es considerado como uno de los parámetros más importantes que afectan el equilibrio interfacial.^{7,9-11} En general, una suspensión coloidal con repulsión electrostática se

considera estable cuando el potencial zeta es más positivo que 30 mV o más negativo que -30 mV.^{1,7,11-20} Si bien el pH se puede utilizar para mantener la estabilidad coloidal de los ferrofluidos, para aplicaciones biomédicas de nanopartículas magnéticas se requiere una estabilidad independiente del pH. Esto se puede obtener si la superficie de las partículas se modifica con moléculas neutras como PEG para proporcionar repulsión estérica.^{19,21}

- ✓ **Composición:** El compuesto magnetita o su forma oxidada maghemita, son los más adecuados debido a su biocompatibilidad y estabilidad, y son por las SPIONs más comúnmente empleadas para aplicaciones biomédicas.^{1,22}

Particularmente, para la caracterización de las nanopartículas producidas en esta tesis, se utilizan las técnicas de: DLS (tamaño y potencial zeta), Raman, FTIR, DRX, TGA y análisis cualitativos correspondientes; si bien se describen todas aquellas técnicas pertinentes y utilizadas de caracterización de las mismas. Mediante la evaluación de las propiedades con estas técnicas, resulta posible la identificación del compuesto y reconocimiento de sus características principales a modo de poder comparar con las nanopartículas producidas mediante síntesis de bibliografía.

4.2 Caracterización de SPIONs

Los estudios más importantes para caracterizar las SPIONs, incluyen:

- ✓ *Medición del tamaño:* mediante dispersión dinámica de luz (DLS, según sus siglas en inglés, dynamic light scattering) y microscopía de transmisión electrónica (TEM, según sus siglas en inglés, transmission electron microscopy);
- ✓ *Medición de potencial zeta:* también mediante DLS y análisis termogravimétrico (TGA, según sus siglas en inglés, thermogravimetric analysis);
- ✓ *Identificación del compuesto:* mediante espectroscopia Raman, espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR, según sus siglas en inglés, Fourier transform infrared spectroscopy), difracción de rayos X (DRX, o XRD, según sus siglas en inglés, X-ray diffraction) y análisis cualitativo del color;
- ✓ *Medición de propiedades magnéticas:* mediante dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID, según sus siglas en inglés, superconducting quantum interference device), magnetómetro de muestra vibrante (VSM, según sus siglas en inglés, vibrating sample magnetometer) y análisis cualitativo de superparamagnetismo.

4.2.1 Medición de tamaño

4.2.1.1 DLS

La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) es uno de los métodos más comúnmente utilizado para la determinación del tamaño de nanopartículas en fase líquida.^{5,23-26} Esta técnica permite dimensionar la nanopartícula mediante la determinación de su tamaño hidrodinámico, el cual tiene en cuenta, según el caso, la capa de polímero y/o droga en la superficie de la nanopartícula.^{4,23,24} Los valores de diámetro hidrodinámico son considerablemente mayores que los valores del diámetro observado con TEM debido a que el análisis DLS incluye las capas de solvatación (moléculas de agua e iones) de coloides.²⁷ Como ventajas de la utilización de esta técnica, se pueden mencionar el breve tiempo que se requiere para realizar la medición y el hecho de que la lectura es automatizada, por lo que el proceso de medición es rápido y no requiere de personal calificado.^{23,28} Además, es una técnica no invasiva, por lo que la muestra se puede emplear para otros fines después de la medición. El análisis de datos de una medición de tamaño en DLS implica el reconocimiento del tamaño y dispersión de la muestra, si bien no permite conocer la cantidad o concentración de nanopartículas.^{21,23,25,29,30}

En la presente tesis, las mediciones en DLS se llevaron a cabo en un equipo Zetasizer Nano series, modelo Nano – ZS90, de Malvern Instruments, Inglaterra; disponible en el grupo de Físicoquímica de la Facultad de Ingeniería Química - INCAPE. En la Figura 4.1 se muestra una imagen del equipo. Las muestras a medir, son previamente sometidas a ultrasonido durante 5 minutos, en un lavador ultrasónico marca TESTLAB, modelo tb04.

En las mediciones del equipo se entiende que un único pico indica distribución monomodal de las partículas y si el pico es angosto corresponde a una distribución de tamaño de partícula estrecha lo cual es importante para la estabilidad coloidal. Cuando se trata de una muestra con partículas de tamaños muy variados (distribuciones bi o polimodales), el cálculo del diámetro promedio de partícula resulta irrelevante.²³

Los resultados de tamaños hidrodinámicos obtenidos en las mediciones de DLS de las SPIONs producidas con las síntesis propuestas y conservadas en su solución de síntesis, se reflejan en la Tabla 4.1 y en la Figura 4.2. La ruta de síntesis RN19, en la que se producen SPIONs de magnetita desnuda (sin recubrimiento alguno) se obtienen tamaños hidrodinámicos menores, en tanto que las rutas de síntesis que producen magnetita recubiertas con PEG presentan tamaños mayores. La ruta de síntesis RN22,

que utiliza TMAOH como estabilizador de las SPIONs, proporciona nanopartículas con un tamaño mayor que las SPIONs desnudas y menor que las SPIONs recubiertas con PEG.

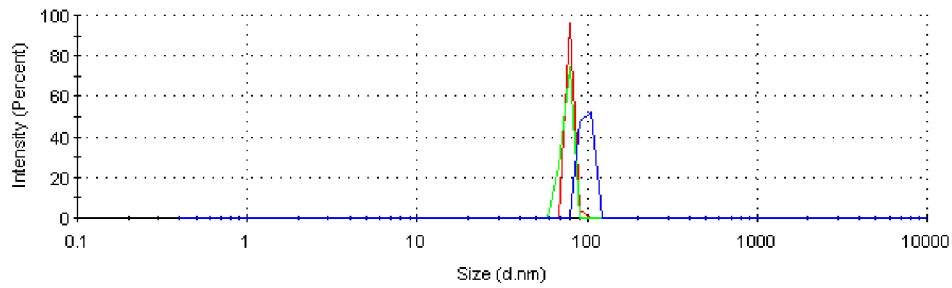


Figura 4.1: Equipo Zetasizer de Malvern Instruments.

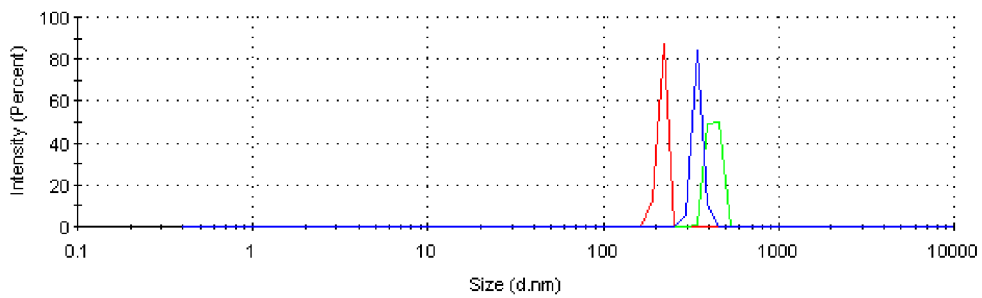
A su vez, se testean dos modos de conservación de las nanopartículas en soluciones diferentes al medio de síntesis. Una de las técnicas es la conservación en solución de TMAOH 0.01 M y la otra consiste en la conservación en solución de NaOH 0.1 M. Los resultados de estas mediciones se reflejan también en la Tabla 4.1. Como puede observarse, la conservación en solución de NaOH es muy atractiva ya que en esta solución alcalina se conservan en gran medida tamaños adecuados de las SPIONs, en tanto que la conservación en solución de TMAOH no ofrece una buena alternativa de conservación.

Tabla 4.1: Tamaños y distribuciones obtenidos para cada ruta de síntesis propuesta.

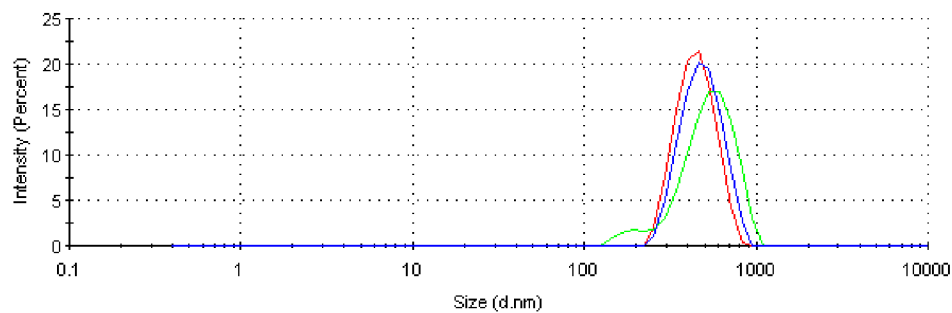
Síntesis	Diámetro hidrodinámico [nm] - Porcentaje de SPIONs con dicho tamaño [%]		
	En solución de síntesis	Conservadas en TMAOH 0.01 M	Conservadas en NaOH 0.1 M
RN19	79.29 (100 %)	222.6 (100 %)	245.3 (100 %)
RN20	216.4 (100 %)	232.5 (100 %)	209.7 (100 %)
RN21	454.7 (100 %)	798.3 (88.1 %) 107.4 (11.9 %)	202.9 (100 %)
RN22	313.8 (100 %)	286.9 (98.8 %) 5364 (1.2 %)	572.5 (100 %)



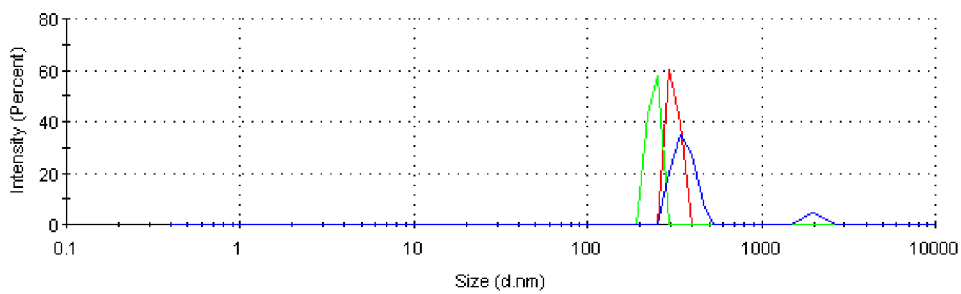
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.2: Distribución de tamaño de las rutas de síntesis propuestas conservadas en solución de síntesis: (a) RN19, (b) RN20, (c) RN21 y (d) RN22.

4.2.1.2 TEM

La microscopía por transmisión electrónica (TEM) se utiliza para observar el tamaño medio de partícula, la distribución de tamaño y la morfología de las SPIONs. El tamaño y la distribución del tamaño se determinan utilizando un software de análisis de imágenes.³¹⁻³⁷ El análisis de imágenes TEM brinda el verdadero diámetro de las partículas, a diferencia del análisis DLS que sólo proporciona el radio hidrodinámico.²³ Esta técnica es una de las herramientas analíticas más potentes para determinar tamaños de nanopartículas y su morfología, proporcionando información útil para estimar la distribución de tamaños, así como detalles de la estructura de núcleo-corteza. La desventaja de este método, es el pequeño rango de tamaños que pueden ser medidos. En la Tabla 4.2 se muestran los rangos de aplicación aproximados de los métodos de caracterización de tamaño de nanopartículas. Se menciona la técnica por ser una de las utilizadas para este tipo de análisis de SPIONs, si bien las muestras de esta tesis no se midieron mediante esta técnica, debido a que no se tuvo disponibilidad del equipo correspondiente.



Figura 4.3: Microscopio de transmisión electrónica.³⁸

Tabla 4.2: Técnicas analíticas comunes para determinación de tamaño de nanopartículas.²³

Técnica	Rango de tamaño aproximado con el cual trabaja
DLS	1 nm – 5 μ m
TEM	0.5 nm – 1 μ m
Microscopía de fuerza atómica	1 nm – 1 μ m
Microscopía de campo oscuro	5 nm – 200 nm
Medición termomagnética	10 nm – 50 nm

4.2.2 Medición de características de superficie

4.2.2.1 Potencial zeta

La aglomeración y la estabilidad de las dispersiones de partículas se determinan mediante la suma de las fuerzas atractivas y repulsivas entre las partículas individuales. La atracción entre partículas es debida a la fuerza de Van der Waals, en tanto que la repulsión es debida a fuerzas electrostáticas resultantes de la interacción de la doble capa eléctrica que rodea a cada partícula. Cuando las partículas están recubiertas por polímeros, debe ser incluida una fuerza de repulsión estérica. Las dos propiedades importantes de la doble capa eléctrica son el potencial zeta y el espesor de la misma. Un aumento en cualquiera de los dos resultará en un aumento de la interacción repulsiva electrostática. Mediante la medición del potencial zeta a distintos valores de pH, se pueden construir las curvas de potencial zeta en función del pH, que permiten visualizar las características de superficie, considerando la posible adsorción o no del recubrimiento (PEG) sobre la nanopartícula de magnetita.²⁹

Las mediciones realizadas de SPIONs en este caso se realizan en el equipo Zetasizer descrito anteriormente, y de igual forma, antes de cada medición se somete a las muestras a ultrasonido durante 5 minutos. El pH se ajusta en los diferentes valores requeridos para el armado de la curva, mediante la adición de ácido nítrico (HNO_3) para acidificar e hidróxido de potasio (KOH) para alcalinizar.^{6,28,39} Las mediciones del potencial zeta permiten identificar el punto isoeléctrico de las SPIONs, que corresponde al pH al cual el potencial zeta es igual a cero.⁹

En la Figura 4.4 se presentan las gráficas de potencial zeta en función del pH de las diferentes SPIONs obtenidas con las diferentes rutas de síntesis propuestas. Como se puede observar, para el caso de la magnetita sin recubrimiento, el punto isoeléctrico se encuentra a un pH de 5.5, y para el caso de las partículas recubiertas el punto isoeléctrico se halla a un pH diferente, lo cual demuestra indirectamente el éxito del tratamiento de recubrimiento, ya que cuando la superficie de las nanopartículas se modifica mediante, por ejemplo, la adsorción de algún polímero, el punto isoeléctrico varía. Por último, es importante notar que al pH propio del organismo (pH=7) las nanopartículas recubiertas presentan un potencial zeta cercano a los -30 mV, lo que garantiza su estabilidad en solución sin aglomeración.

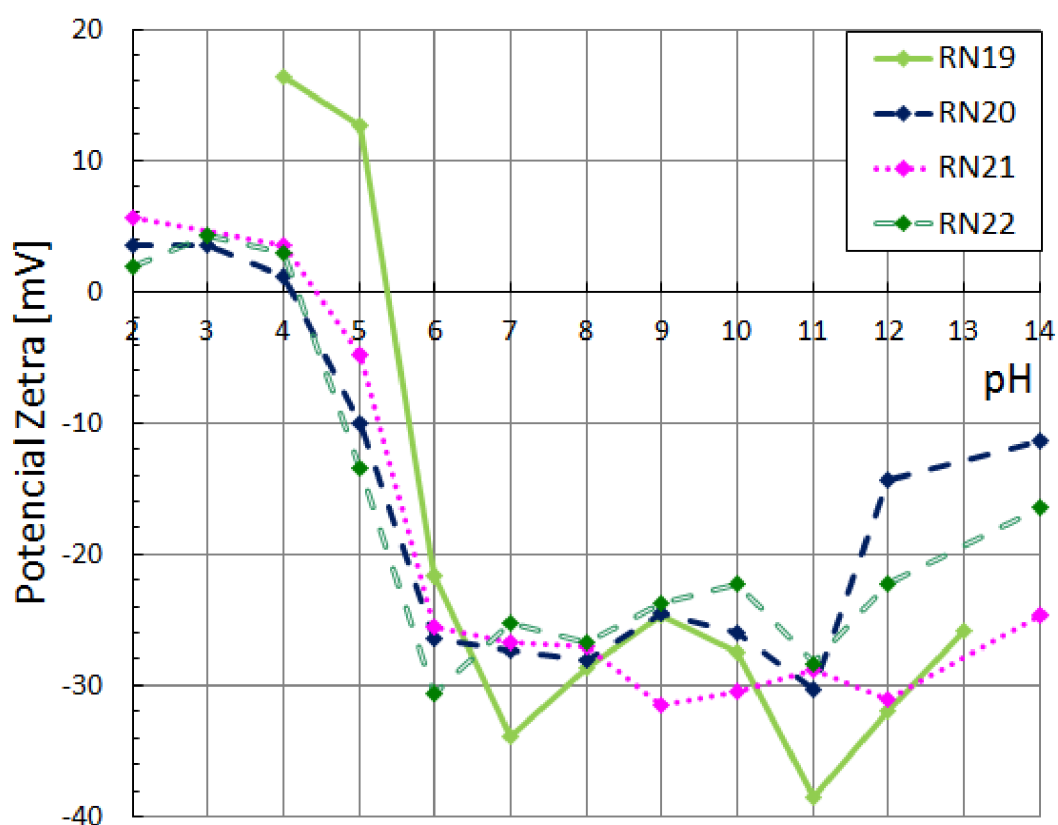


Figura 4.4: Curvas de potencial zeta en función del pH, para las SPIONs producidas con las diferentes rutas de síntesis.

4.2.2.2 TGA

El análisis termogravimétrico (TGA) es una de las técnicas más importantes que se utilizan para determinar la estabilidad térmica y propiedades fisicoquímicas de un compuesto mediante el porcentaje de pérdida de peso.⁴⁰ Se basa en la medición de la variación de la masa de una muestra cuando la misma es sometida a una determinada rampa de temperatura en una atmósfera controlada. Entre otras cosas, este estudio permite evaluar la estabilidad térmica, composición química, pureza, contenido en humedad, etc. En el análisis térmico diferencial (SDTA) se mide la diferencia de temperatura en función del tiempo o de la temperatura, cuando dicha muestra se somete a un programa de temperatura en una atmósfera controlada. Es una técnica cualitativa que indica la temperatura a la cual tiene lugar un cambio energético significativo en el compuesto bajo estudio y si el proceso físico/químico involucrado es endotérmico o exotérmico.^{10,41-43} La mayor parte de las curvas TGA para las SPIONs presentan pérdidas de peso, cuyo origen está en: reacciones químicas (descomposición y separación del agua de cristalización, combustión, reducción de óxidos metálicos) y

transformaciones físicas (evaporación, vaporización, sublimación, desorción, desecación). Excepcionalmente se producen ganancias de peso por causa de: reacciones químicas (reacción con componentes gaseosos del gas de purga, como O_2 , CO_2 con formación de compuestos no volátiles o poco volátiles) o transformaciones físicas (adsorción de productos gaseosos en las muestras).⁴¹ Para el caso de las SPIONs, este estudio ayuda a analizar la composición y las características de superficie en cuanto a que aporta información respecto a la adherencia del material de recubrimiento a la superficie.^{31,37,44-47}

Los análisis TGA se llevan a cabo en un equipo marca Mettler Toledo, modelo TGA/SDTA851e, bajo atmósfera de nitrógeno (ver Figura 4.5). Las muestras a medir son previamente centrifugadas (durante 5 minutos a 9000 rpm), luego se descarta el líquido sobrenadante y se coloca el sólido húmedo remanente en el crisol para ejecutar la correspondiente medición. El análisis se realiza en dos etapas (ambas bajo atmósfera de nitrógeno) y con rampas de temperatura de $10^\circ C$: la primera etapa consta de un calentamiento desde temperatura ambiente hasta $120^\circ C$, que se realiza con el objeto de evaporar los restos de solvente $-H_2O-$ de la muestra, y un posterior enfriamiento hasta una temperatura de aproximadamente $30-40^\circ C$; la segunda etapa consiste en el análisis termogravimétrico propiamente dicho, donde se calienta la muestra desde los $30-40^\circ C$ hasta $800^\circ C$, para analizar el comportamiento térmico del material. Además de las curvas TGA (que muestran la masa de la muestra en función de la temperatura de la misma), se presentan de manera conjunta las gráficas SDTA, las cuales permiten identificar procesos endotérmicos y exotérmicos relativos a los cambios de masa.



Figura 4.5: Equipo TGA Mettler Toledo TGA/SDTA851e.

Las gráficas correspondientes a la primera etapa del análisis muestran simplemente el proceso de pérdida de masa endotérmico, correspondiente a la evaporación del agua remanente en la muestra (se pueden ver las mismas en el Anexo III). De la Figura 4.6 a la Figura 4.10, se muestran los análisis de TGA correspondientes a la segunda etapa (con estilos de líneas sólidas), cada uno con sus respectivas curvas SDTA (en color gris y estilo de línea de guiones), para las muestras de PEG puro y de las SPIONs obtenidas con las diferentes rutas de síntesis estudiadas. En la Figura 4.11 se presentan los análisis TGA-SDTA de todas las rutas de síntesis, en base porcentual de masa, a modo de poder visualizarlos en conjunto y compararlos entre sí.

Puede observarse que en el caso del PEG puro (Figura 4.6), a los 67 °C se produce un proceso endotérmico, sin cambio de masa, correspondiente a la fusión del material.^{48,49} Luego, a los 401 °C ocurre la descomposición del PEG, perdiéndose el 100% de la masa de la muestra. Para las muestras RN19 y RN22 (Figura 4.7 y Figura 4.10, respectivamente) se observa que prácticamente no hay pérdida de masa hasta los 800°C de la medición. El pequeño porcentaje de pérdida de masa (3.65 % para RN19 y 6.22 % para RN22) puede adjudicarse a la destrucción de algún remanente de agua cristalina en la muestra.

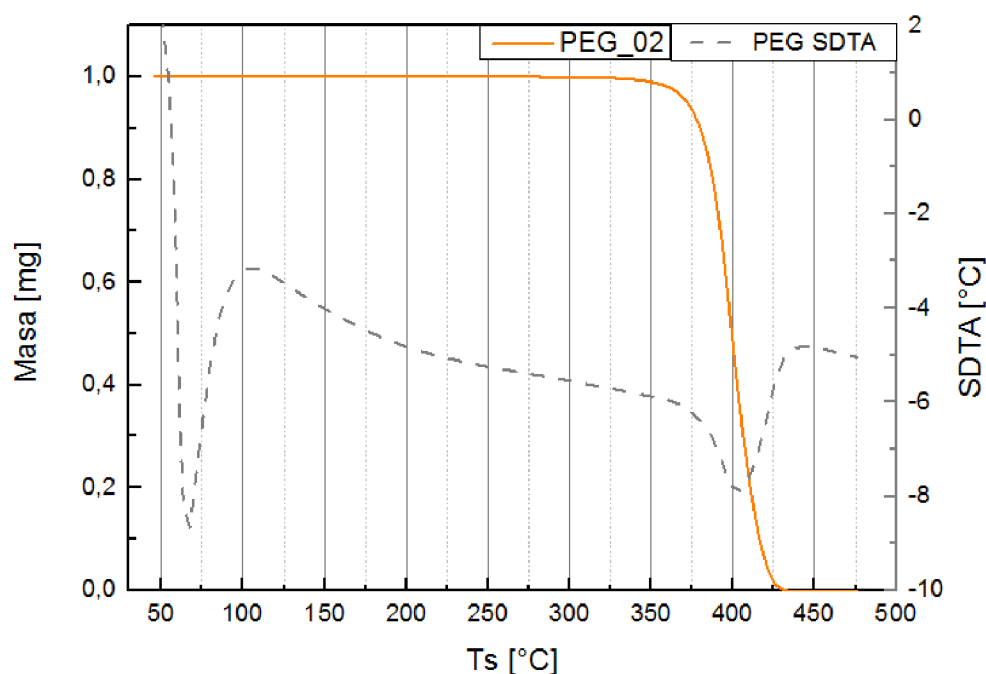


Figura 4.6: Análisis TGA para muestra de PEG puro.

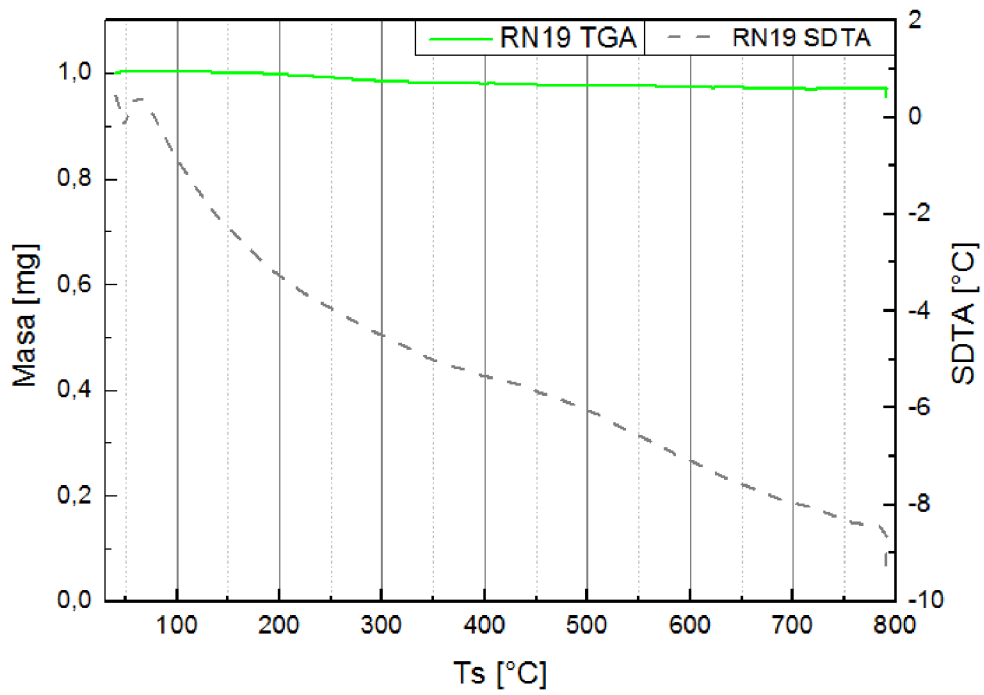


Figura 4.7: Análisis TGA para la muestra RN19.

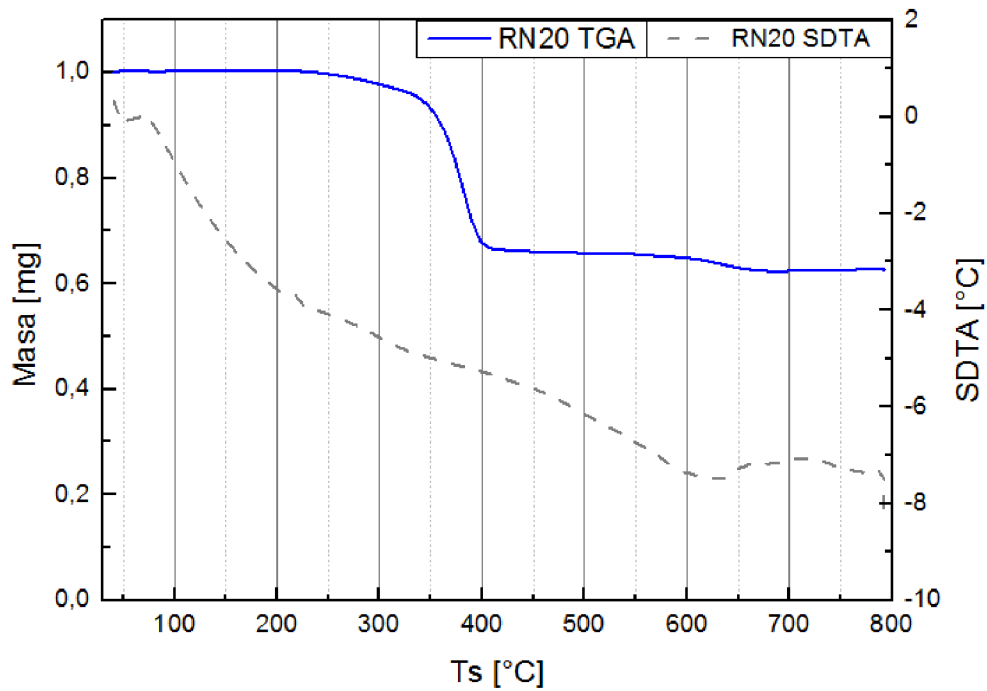


Figura 4.8: Análisis TGA para la muestra RN20.

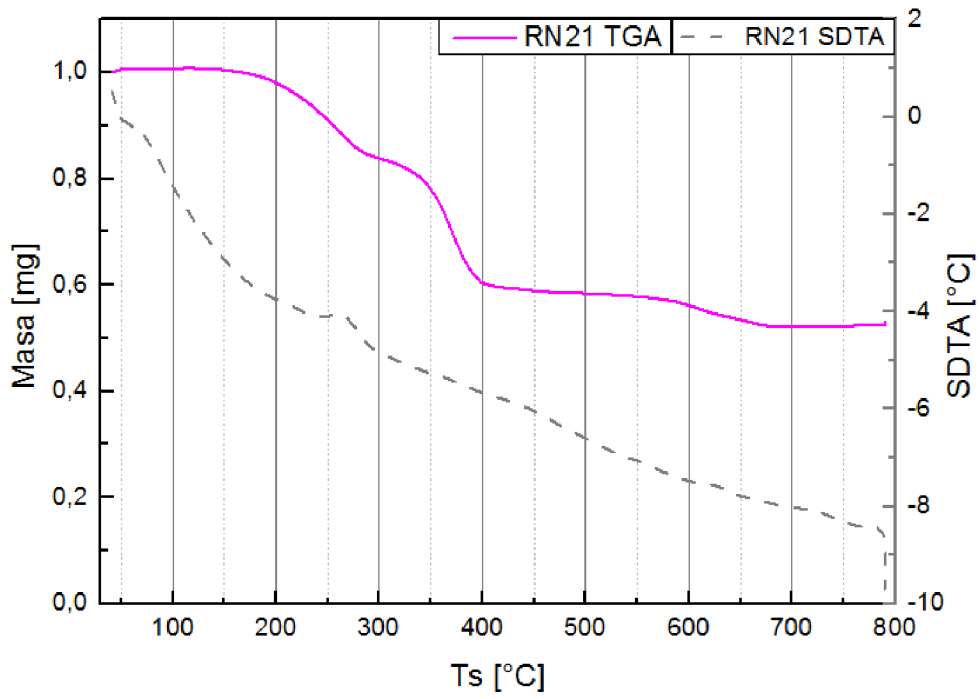


Figura 4.9: Análisis TGA para la muestra RN21.

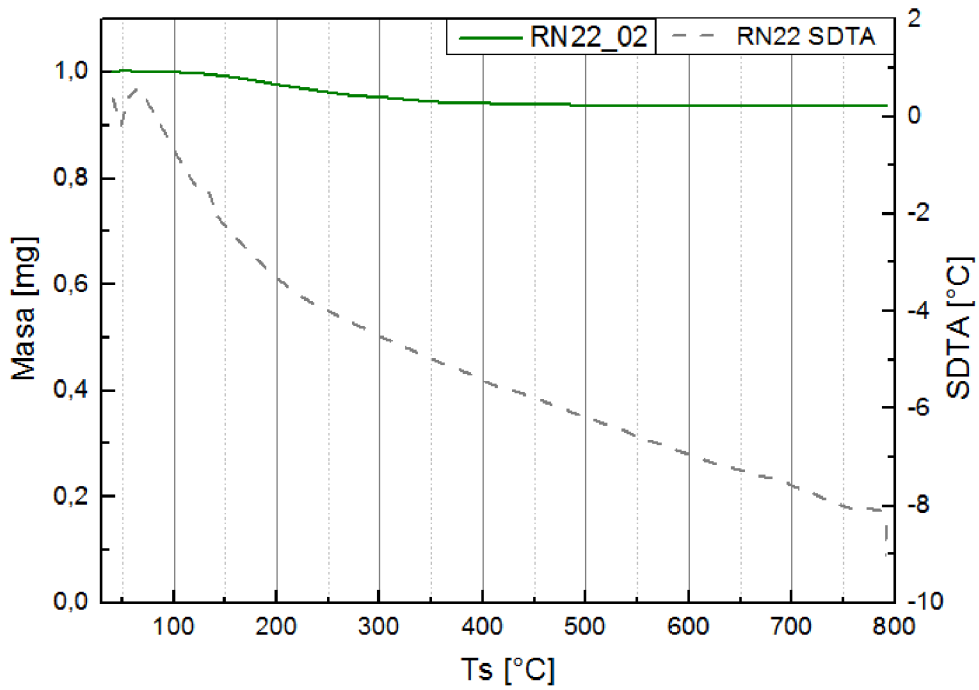


Figura 4.10: Análisis TGA para la muestra RN22.

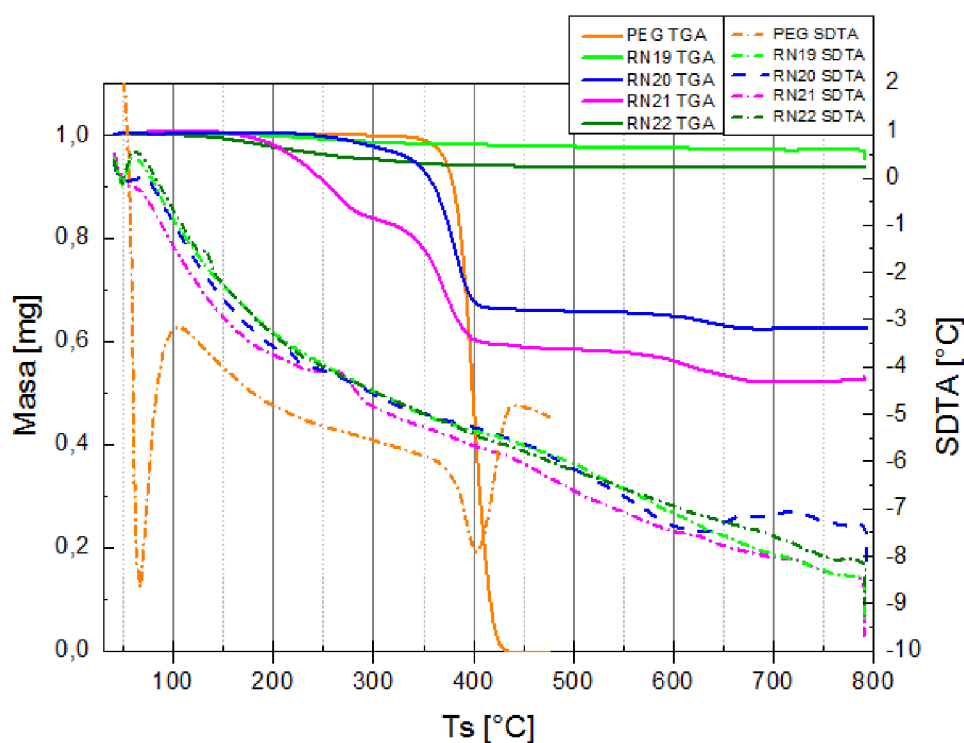


Figura 4.11: Análisis TGA para todas las muestras.

Para la ruta de síntesis RN20 (Figura 4.8) se llegan a diferenciar dos procesos de pérdida de masa. La mayor pérdida de masa de la muestra es del 33.31 % y ocurre a los 400 °C, que se puede atribuir a la descomposición del PEG adsorbido en la superficie de la nanopartícula. Otra pérdida de masa, del 4.21 %, ocurre a los a los 630 °C, y el porcentaje restante de 62.48 % corresponde a la magnetita, que como se observa en los análisis de las demás rutas de síntesis, no se destruye hasta los 800 °C de la medición.

En el caso de la muestra RN21 (Figura 4.9) se distinguen tres procesos de pérdida de masa. En el primero se pierde un 9.52 % a los 250 °C (que puede atribuirse a una degradación inicial de una capa externa del PEG que recubre la superficie de la SPION) luego se pierde un 30.46 % a los 400°C (degradación del PEG), y por último se pierde 6.19 % a los 650 °C. Lo que no se destruye (53.84 %) corresponde a la magnetita.

Según los análisis de los resultados expuestos, se puede concluir que en las rutas de síntesis RN20 y RN21, se pudo incorporar con éxito el polímero a las superficies de las SPIONs.

4.2.3 Identificación del compuesto magnetita

4.2.3.1 FTIR

La estructura química superficial de los nanocristales de magnetita se puede caracterizar mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).^{32,37,50} Las bandas de vibración características de la magnetita en el espectro infrarrojo, ocurren a 580 y 430 cm^{-1} .^{31,32,50-53} La banda correspondiente a la maghemita ocurre en la longitud de onda de 630 cm^{-1} , y muchas veces esta banda puede estar presente en las muestras de magnetita, ya que la misma puede ser oxidada durante el proceso térmico que ocurre durante la preparación de la pastilla con bromuro de potasio para la medición del espectro.^{32,50,54} Otra banda que puede estar presente es la de alrededor de 870 cm^{-1} , que puede corresponder a una fase de hidróxido de hierro.⁵⁴

Por otra parte, en los espectros suelen aparecer picos adicionales en las longitudes de onda de 1600 y 1380 cm^{-1} , que son atribuidos al bidentado asimétrico de COO^- .^{31,32} La presencia del grupo COO^- podría ser el resultado de la oxidación parcial del grupo OH terminal del PEG durante la síntesis (para el caso de partículas sintetizadas con este compuesto presente en el medio de síntesis). Del mismo modo, se puede considerar la presencia de este grupo como resultado de la absorción de CO_2 ambiental durante la medición de la muestra.^{32,54} El agua presente en las muestras se manifiesta en los espectros en las bandas a 1625 y 3300 a 3400 cm^{-1} .^{32,50,52-54} Para el caso del PEG, los picos característicos se presentan a aproximadamente 2900, 2800 y 1100 cm^{-1} , y corresponden al estiramiento asimétrico de CH_2 , al estiramiento simétrico de CH_2 y a la vibración de flexión de COC , respectivamente.^{31,32,50,53} Los picos entre 1200 a 1300 y entre 1300 a 1400 cm^{-1} pueden atribuirse a tramo COH del PEG y las absorbancias débiles entre 800 y 1050 cm^{-1} corresponden al CH fuera del plano de flexión del PEG.^{31,50,53,54}

Para realizar las mediciones de FTIR se utiliza un equipo Shimadzu IRPrestige-21, el cual se puede ver en la Figura 4.12. La preparación previa de las muestras incluye en una primera instancia una etapa de centrifugación (5 minutos, 9000 rpm) y luego una etapa de secado en estufa bajo vacío. Una vez obtenida la muestra en estado sólido, se procede a formar una pastilla con bromuro de potasio, para lo cual se muele un porcentaje arbitrario de muestra con un porcentaje mayor de bromuro de potasio en mortero, de modo de homogeneizar esta mezcla, luego se moldea la pastilla mediante prensado para dar su forma final, y se coloca la misma en el equipo para su medición. Los espectros se efectúan con los siguientes parámetros: % transmitancia, apodización de Happ-Genzel, scan: 40, resolución: 8 y rango: de 400 a 4000 cm^{-1} .

Nuevamente, se efectúan medidas de PEG puro y de cada una de las muestras de síntesis.



Figura 4.12: Equipo FTIR, Shimadzu IRPrestige-21.

En los espectros infrarrojos obtenidos de cada una de las rutas de síntesis de magnetita propuestas (RN19, Figura 4.7; RN20, Figura 4.8; RN21, Figura 4.9 y RN22, Figura 4.10) se logran apreciar las bandas de vibración características de la magnetita, que ocurren aproximadamente a los 580 y 430 cm^{-1} . En las rutas de síntesis RN19 y RN22, además de las bandas correspondientes a la magnetita, también está presente la banda de absorción correspondiente a la maghemita, en la longitud de onda de 630 cm^{-1} , por lo que se evidencia una posible oxidación de la muestra, que puede adjudicarse al proceso térmico que ocurre durante la preparación de la pastilla, debido a que las mismas presentan a la magnetita desnuda, sin recubrimiento. Al no estar presente esta banda en las rutas de síntesis RN20 y RN21, se puede inferir que las mismas se encuentran recubiertas con el polímero y protegidas de esta oxidación.

En todas las rutas de síntesis se presentan además, las bandas correspondientes al COO^- o CO_2 ambiental y al agua, en las longitudes de onda entre los 1300 y los 1600 cm^{-1} y a los 2400 cm^{-1} . Además, en el rango de 3600 a 4000 cm^{-1} se encuentran las bandas características al ruido por la presencia de agua. Y por último, en el espectro del PEG puro (Figura 4.13) se ven las bandas correspondientes a este compuesto, que reflejan las bandas de bibliografía, a los 800 , 1050 , 1250 , 1350 , 2850 cm^{-1} . En las rutas de síntesis RN20 y RN21, se pueden apreciar también estas bandas características del PEG, por lo cual se termina de evidenciar el pegilado (recubrimiento con PEG) en superficie de las nanopartículas. Así, los resultados sugieren que el PEG está químicamente adsorbido en la superficie de las nanopartículas. En la Figura 4.18 se muestran los espectros de todas las rutas de síntesis de SPIONs y PEG juntos, a modo de poder visualizarlos comparativamente.

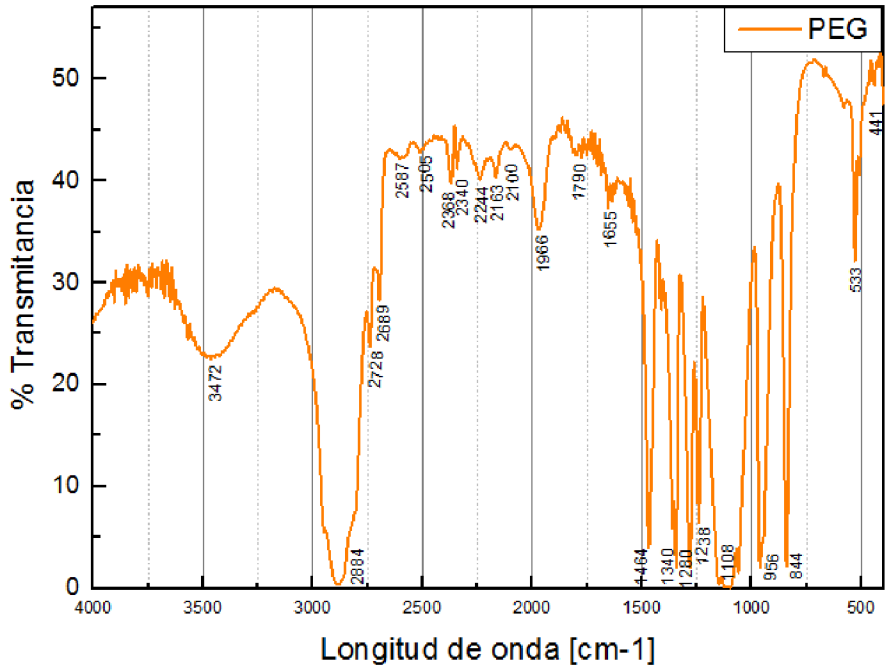


Figura 4.13: FTIR de la muestra de PEG puro.

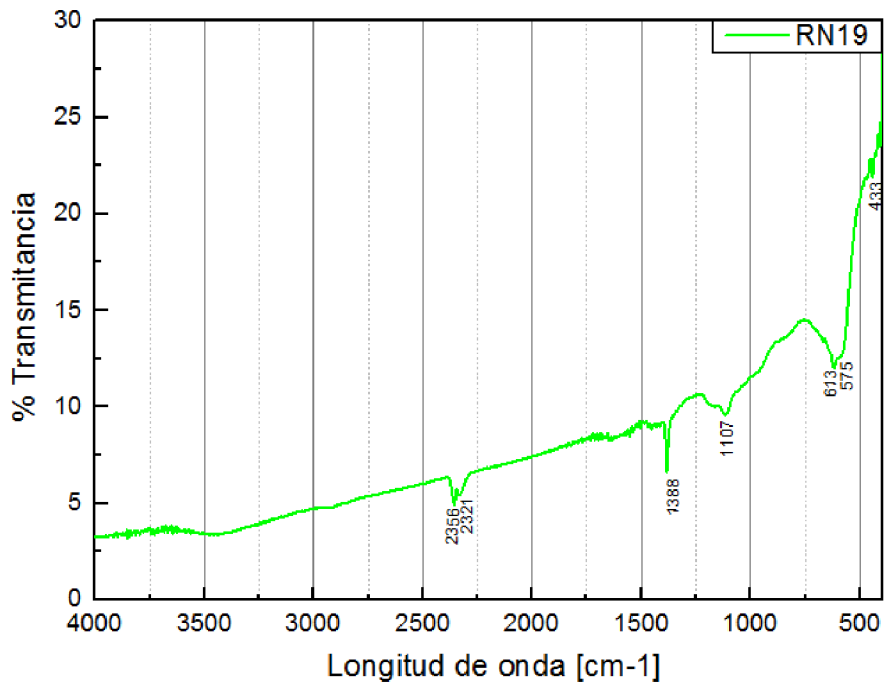


Figura 4.14: FTIR de la muestra RN19.

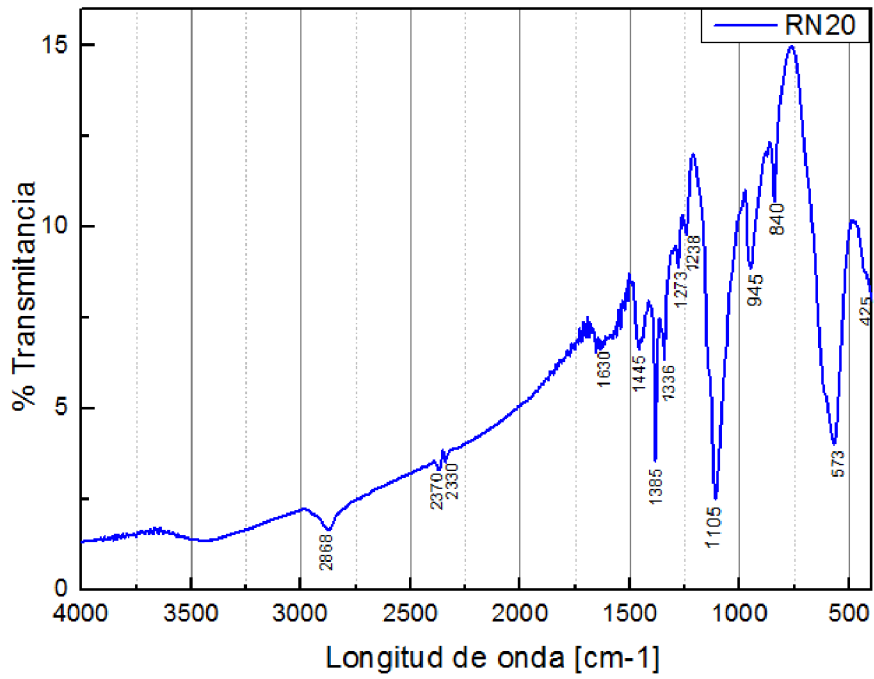


Figura 4.15: FTIR de la muestra RN20.

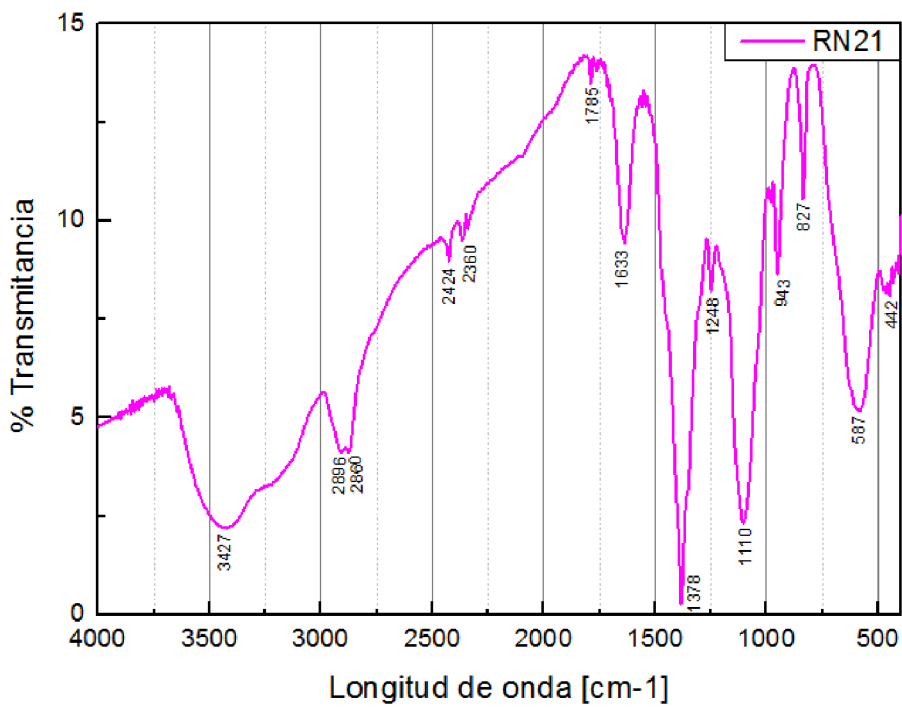


Figura 4.16: FTIR de la muestra RN21.

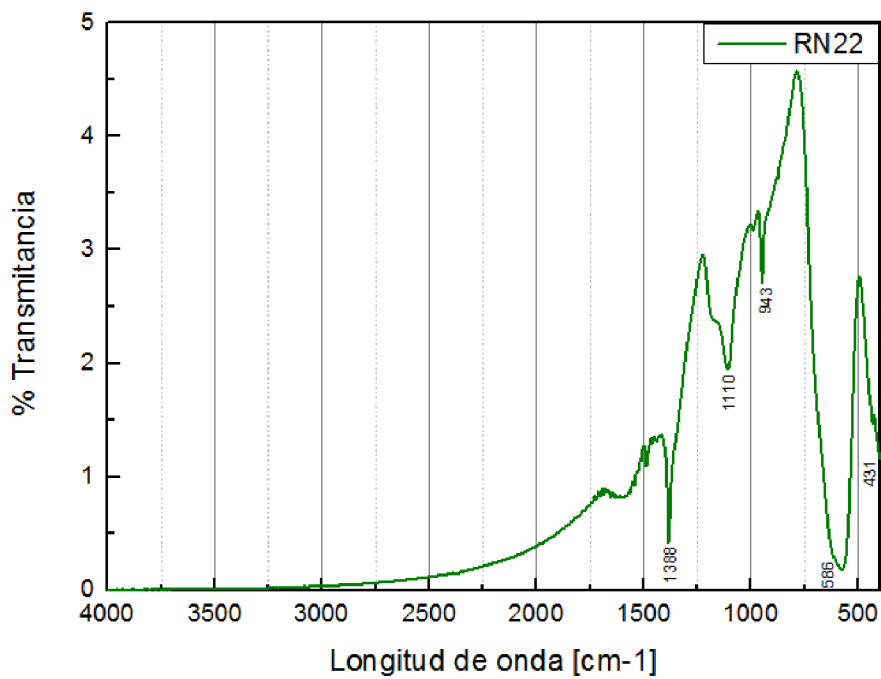


Figura 4.17: FTIR de la muestra RN22.

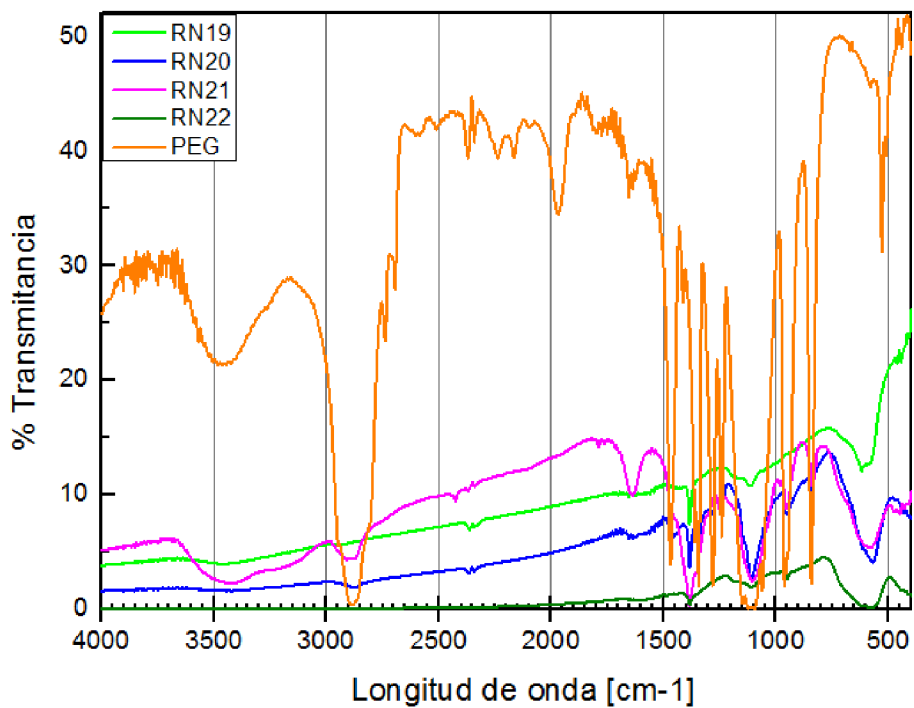


Figura 4.18: FTIR de todas las rutas de síntesis y PEG puro.

4.2.3.2 Raman

La espectroscopia Raman permite caracterizar la composición molecular o química de muchos tipos de muestras.⁵⁵ Es una poderosa técnica experimental que permite distinguir, por ejemplo, las especies de óxidos de hierro, ya que resulta difícil en algunos casos poder identificar los mismos basándose exclusivamente en los resultados de DRX, debido a que entre diferentes especies pueden presentarse algunas características similares.⁵⁶ En cuanto a la magnetita, de acuerdo con la literatura, la banda más intensa se encuentra en 670 cm^{-1} , en tanto que otras tres frecuencias predichas teóricamente dan lugar a bandas mucho más pequeñas a aproximadamente 298 , 320 y 550 cm^{-1} . Además de estas bandas, se detectaron algunas contribuciones débiles en 470 y 420 cm^{-1} .⁵⁵ Los espectros Raman pueden variar entre diferentes muestras de magnetita. Algunas diferencias en las frecuencias Raman reportadas se pueden atribuir a los efectos de la temperatura.⁵⁷ Todas las bandas Raman características de la magnetita, maghemita y hematita, se muestran resumidas en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Resumen de las bandas Raman características de los compuestos magnetita, maghemita y hematita.^{37,52,55,57-63}

Compuesto	Bandas [cm^{-1}]
Magnetita (Fe_3O_4)	670 (fuerte)
	550 (media)
	470 (débil)
	420 (débil)
	320 (débil)
	298 (débil)
Maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)	700 (fuerte)
	500 (media)
	390 (débil)
	350 (media)
Hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)	265 (débil)
	1320 (fuerte)
	615 (medio)
	500 (medio)
	415 (fuerte)
	295 (fuerte)
	245 (débil)
225 (fuerte)	

Las mediciones de espectroscopia Raman se llevan a cabo en un equipo Horiba Raman Division modelo LabRAM HR - Olympus BX41. Se muestra una fotografía del equipo utilizado en la Figura 4.19. Las muestras se preparan siguiendo el mismo procedimiento descrito para preparación de muestras para espectroscopia FTIR, que implica centrifugación (5 minutos, 9000 rpm) y secado bajo vacío. De la Figura 4.20 a la Figura 4.24, se muestran las gráficas correspondientes de espectroscopia Raman de las muestras de cada ruta de síntesis y del PEG puro.

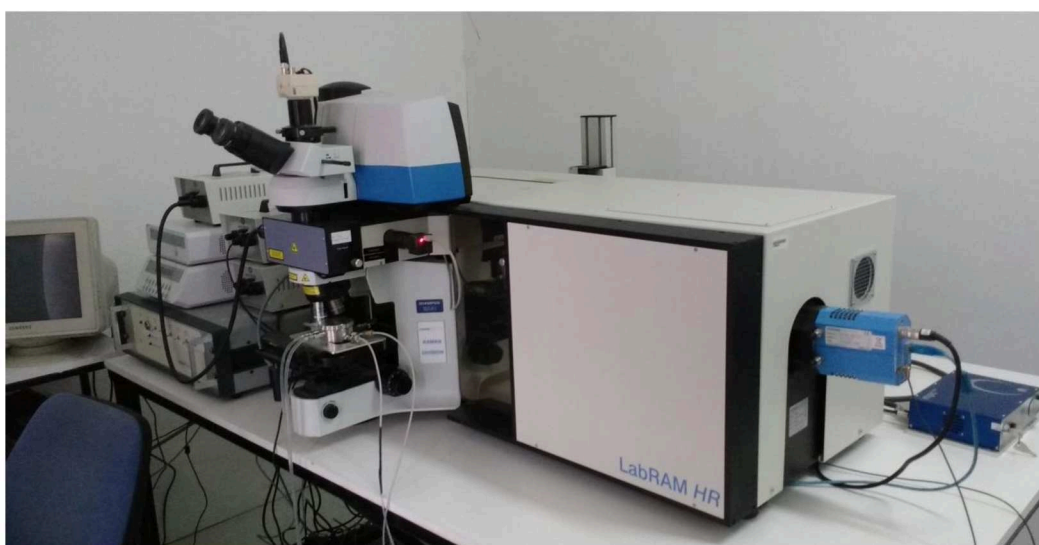


Figura 4.19: Equipo de espectroscopia Raman, Horiba Raman Division modelo LabRAM HR - Olympus BX41.

Como se puede ver, las rutas de síntesis RN19, RN20, RN21 y RN22 (Figura 4.21, Figura 4.22, Figura 4.23 y Figura 4.24, respectivamente) presentan los picos característicos de la magnetita, con bandas en los 300, 320, 420, 470, 550 y 670 cm^{-1} . En las rutas de síntesis RN20 y RN21 (Figura 4.22 y Figura 4.23), se puede observar que además de las bandas características de la magnetita, se presentan las bandas similares a las obtenidas en la muestra de PEG puro, lo cual da indicios de la incorporación del material polimérico a la superficie de las SPIONs.

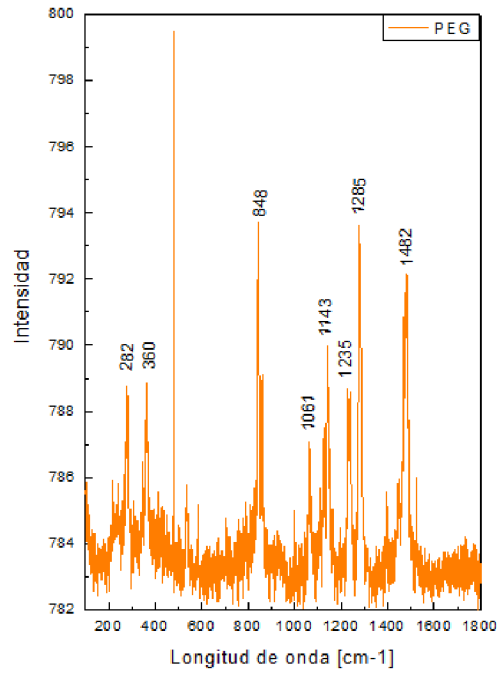


Figura 4.20: Espectroscopia Raman de la muestra de PEG puro.

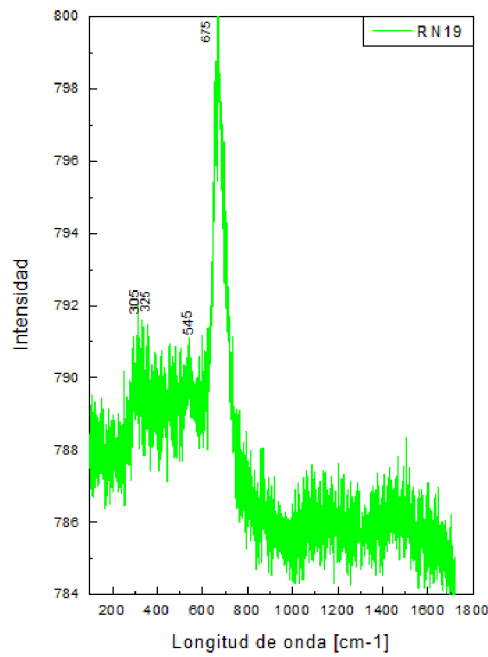


Figura 4.21: Espectroscopia Raman de la muestra RN19.

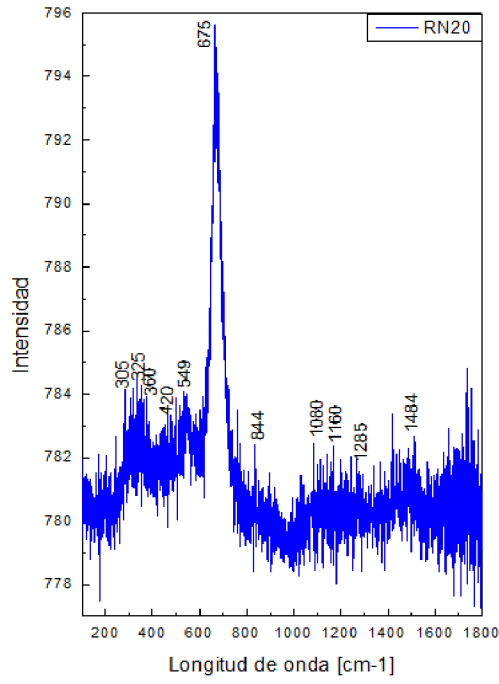


Figura 4.22: Espectroscopia Raman de la muestra RN20.

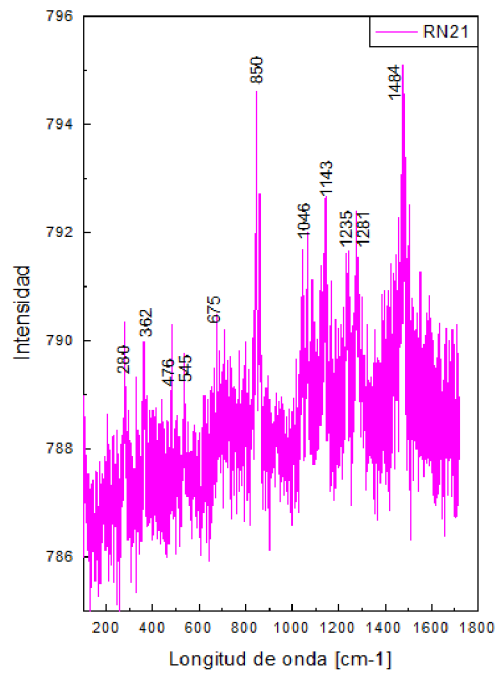


Figura 4.23: Espectroscopia Raman de la muestra RN21.

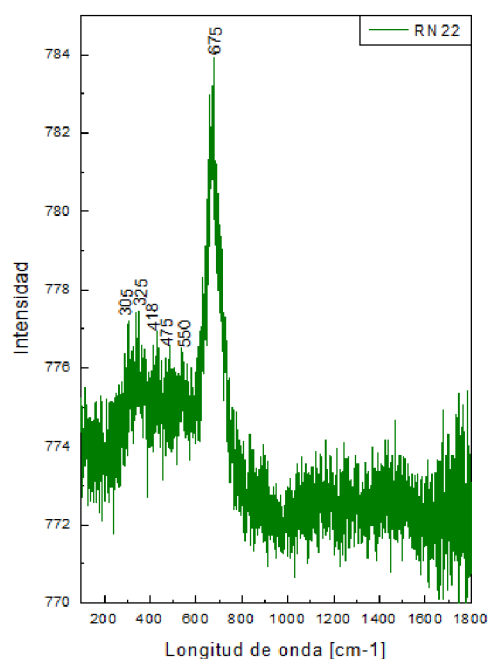


Figura 4.24: Espectroscopia Raman de la muestra RN22

4.2.3.3 DRX

Las muestras de magnetita también pueden ser caracterizadas mediante difractogramas de rayos X (DRX, o XRD según sus siglas en inglés: X-ray diffraction). Los picos con valores de 2θ de 30.09° , 35.44° , 43.07° , 53.43° , 56.96° y 62.54° corresponden a los planos cristalinos (220), (311), (400), (422), (511), (440) de la magnetita cristalina, respectivamente. La anchura de los picos está relacionada con el tamaño cristalino de la muestra, así, el ensanchamiento de los picos se atribuye al pequeño tamaño de los cristalitos, que está directamente relacionado con la disminución en el tamaño de partícula.^{31-33,35,50,53,64-67} La falta de las difracciones características en (210), (213) y (300), puede indicar que la maghemita (Fe_2O_3) no se encuentra presente (JCPDS card No.01-076-3169).^{31,65}

El análisis mediante DRX se realiza en un equipo marca Shimadzu modelo XD-D1, el cual se muestra en la Figura 4.25. La preparación de las muestras en principio es idéntica a la descrita para las mediciones de espectroscopia FTIR y Raman. Luego, teniendo la muestra ya completamente seca se procede a moler la misma en un mortero para homogeneizarla, y por último, se la coloca en un portamuestras al cual se agrega una gota de alcohol isopropílico para lograr su adhesión y poder efectuar la medición correspondiente. Las mediciones se realizan en el rango de $20^\circ < 2\theta < 80^\circ$, con ánodo giratorio y una fuente de CuK ($\lambda = 0,154056 \text{ nm}$), a una velocidad de scan de $2^\circ/\text{min}$, con modo de scan continuo, full scan: 0.5 kcos y ángulos y ejes fijos de 10000° .

Igual que en los otros casos, se realizan mediciones del PEG en estado puro y de cada ruta de síntesis de SPIONs propuesta.



Figura 4.25: Equipo DRX, Shimadzu modelo XD-D1.

Como se puede ver en los difractogramas obtenidos de cada muestra, todas las rutas de síntesis (RN19, Figura 4.27; RN20, Figura 4.28; RN21, Figura 4.29 y RN22, Figura 4.30) presentan los picos característicos estándares de la magnetita cristalina, a los valores de 2θ de 30° , 35.5° , 43° , 53.5° , 57° y 62.5° . Esto confirma la formación de este compuesto en las rutas de síntesis propuestas con las condiciones desarrolladas en esta tesis.

A su vez, se presenta el difractograma del PEG puro en la Figura 4.26, dónde se pueden ver los picos característicos en los valores de 2θ de 22° , 25° , 32° y 39° . La síntesis RN20 no presenta ninguno de estos picos, lo cual indica que el PEG no se encuentra en forma cristalina en la muestra, es decir, en caso de estar presente (como se demuestra con los demás análisis de caracterización), el mismo se encuentra adherido en la superficie de las SPIONs, recubriendo las mismas. Sin embargo, en la síntesis RN21, sí se presenta un pico a los 22° , el cual es asignable al PEG, lo cual sugiere la presencia de PEG cristalino sobre las superficies de las SPIONs. Con lo expuesto, se puede inferir la correcta adhesión superficial del polímero al núcleo de las SPIONs en el caso de la síntesis RN20. En la Figura 4.31 se muestran todos los difractogramas superpuestos a modo de compararlos entre sí.

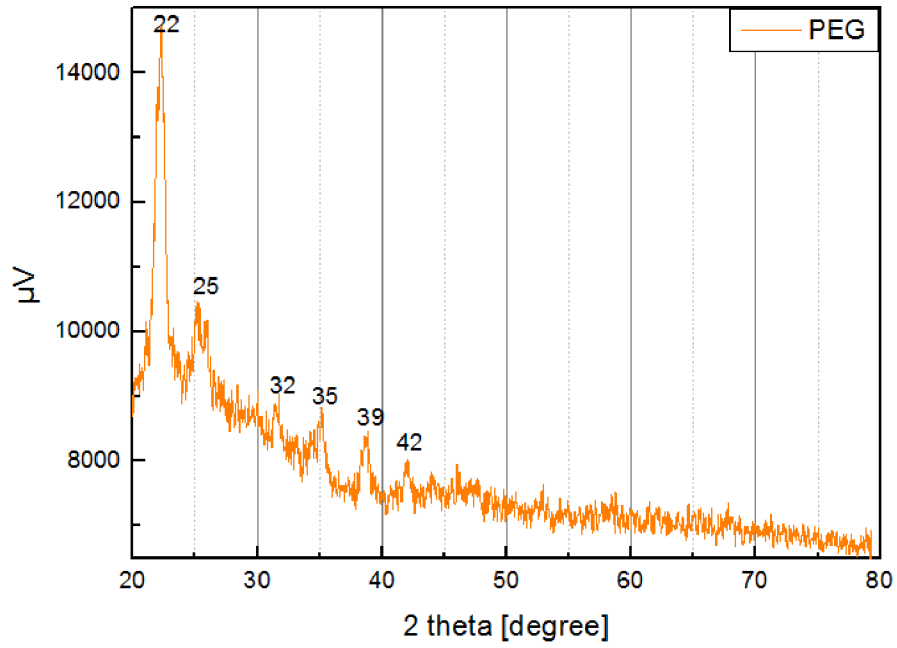


Figura 4.26: DRX de la muestra de PEG puro.

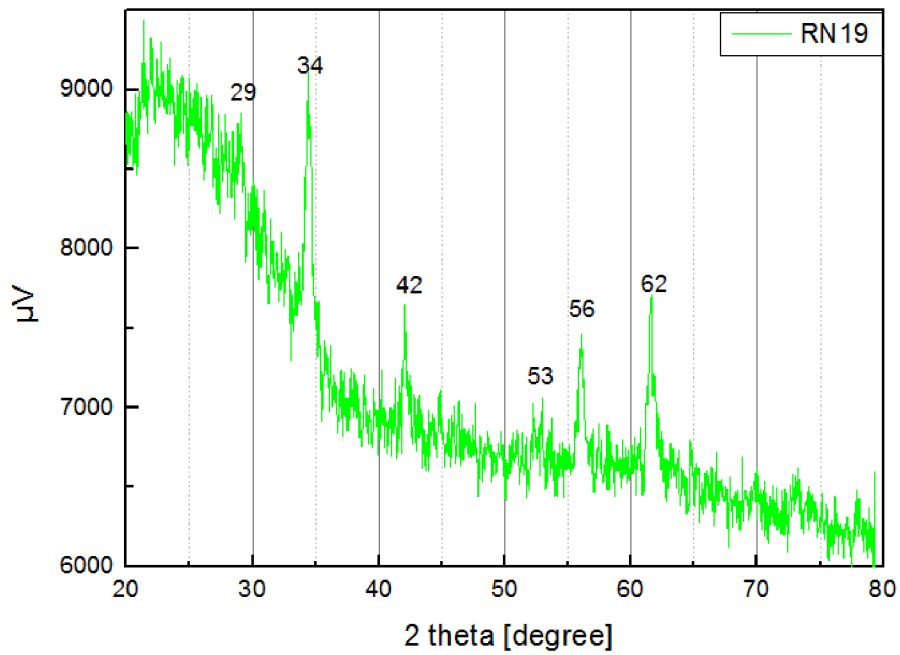


Figura 4.27: DRX de la muestra RN19.

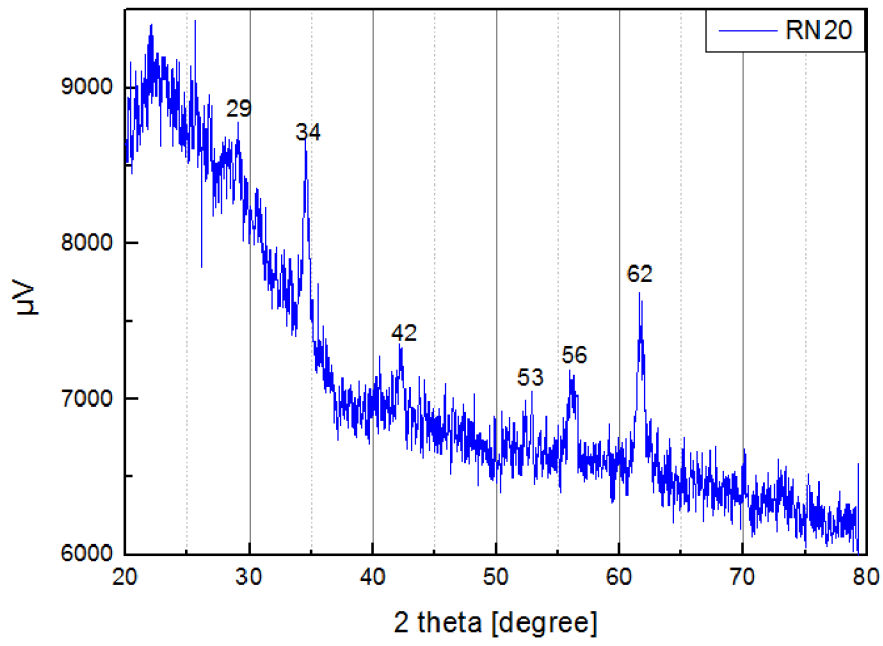


Figura 4.28: DRX de la muestra RN20.

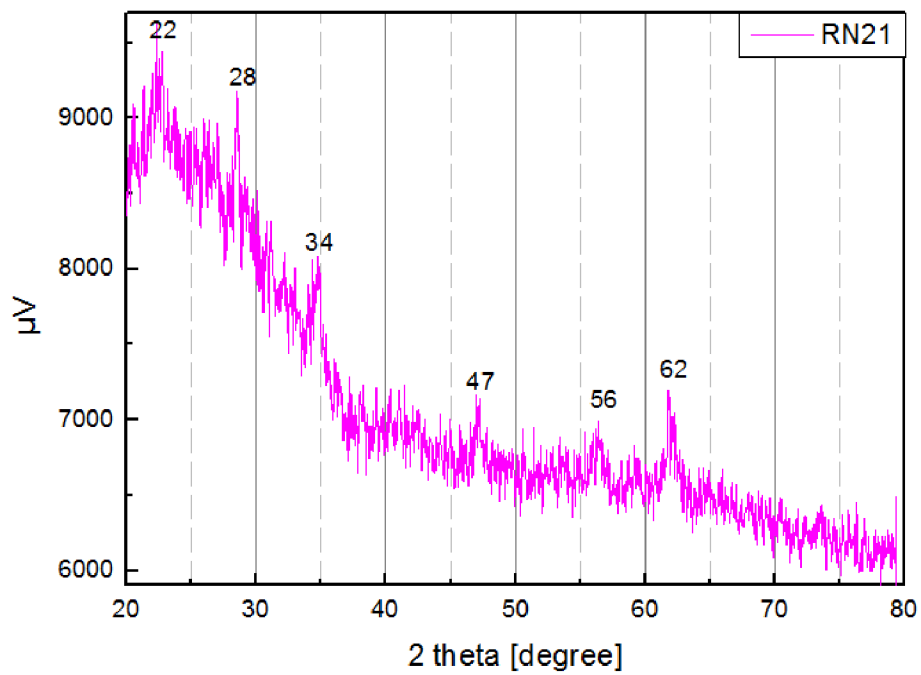


Figura 4.29: DRX de la muestra RN21.

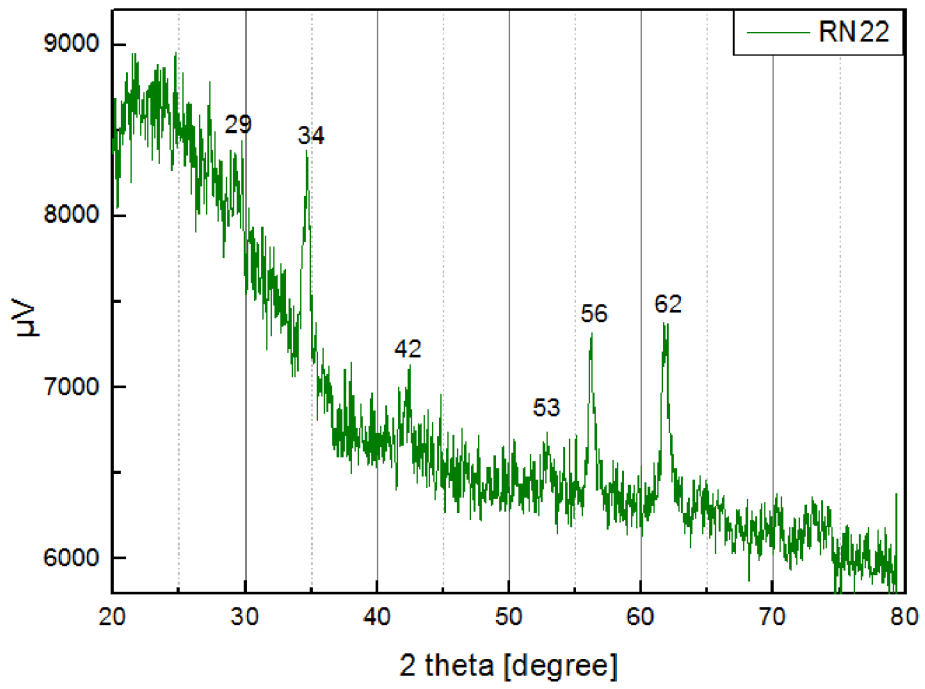


Figura 4.30: DRX de la muestra RN22.

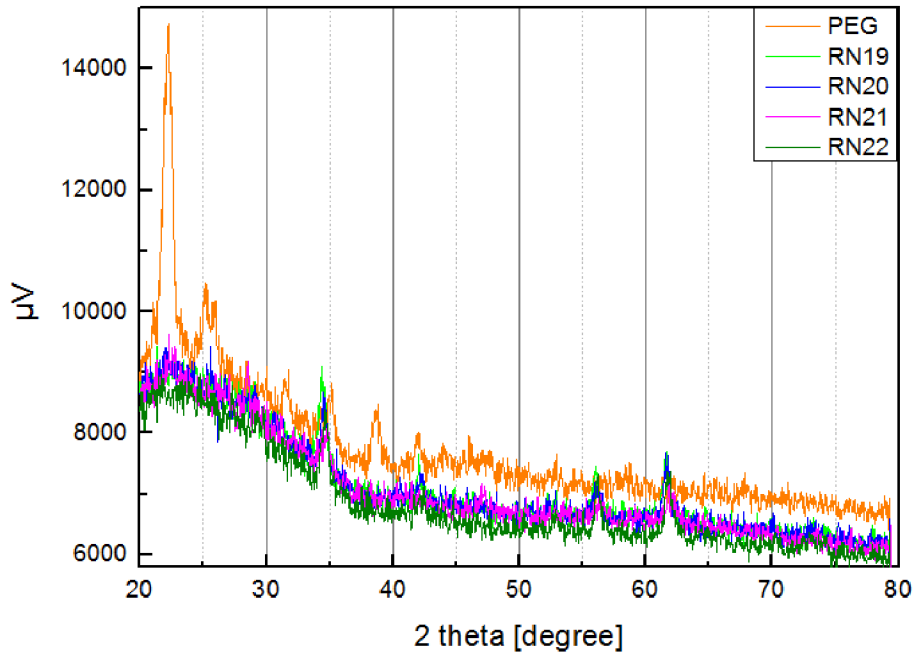


Figura 4.31: DRX de todas las rutas de síntesis y PEG puro.

4.2.3.4 Cualitativo

De manera cualitativa, se puede identificar la formación de magnetita observando el color de las partículas, ya que este compuesto es de un color negro característico, en tanto que sus formas más oxidadas presentan los siguientes colores: la hematita es color roja, la maghemita es color marrón y la goetita es color amarillo.^{6,10,12,44,54,58,68-71}

En las rutas de síntesis propuestas, se puede observar de manera cualitativa la formación de magnetita ya que la misma es nítidamente de color negro, a diferencia de sus derivados en estados más oxidados. En la Figura 4.32 se muestran imágenes de los productos obtenidos en cada ruta de producción propuesta, a modo de visualizar los colores de las soluciones y partículas.

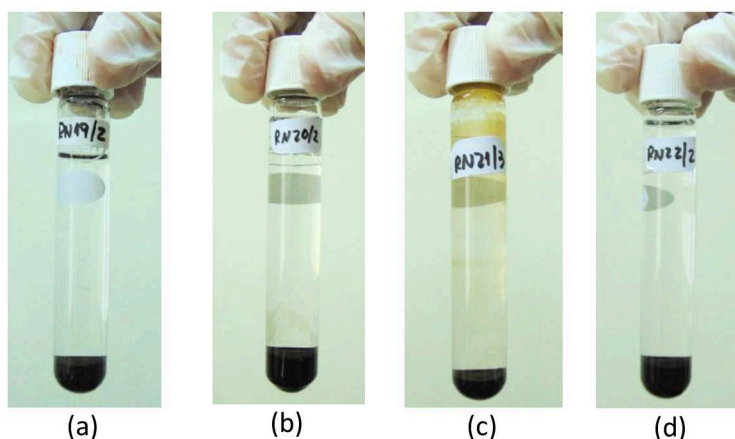


Figura 4.32: Análisis cualitativo de color de las SPIONs obtenidas en cada ruta de síntesis. (a) RN19, (b) RN20, (c) RN21 y (d) RN22.

4.2.4 Medición de propiedades magnéticas

4.2.4.1 SQUID o VSM

Las propiedades magnéticas de las nanopartículas se analizan utilizando un dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID) o un magnetómetro de muestra vibrante (VSM), mediante los cuales se puede medir la curva de histéresis. El superparamagnetismo se verifica cuando no existe histéresis en el ciclo y cuando la remanencia y coercitividad dan cero. Además, esta técnica brinda información de la magnetización de saturación, lo cual es importante de conocer ya que las

nanopartículas con alta magnetización de saturación se separan fácilmente a partir de soluciones acuosas mediante la aplicación de un campo magnético externo.^{8,24,72-76} El superparamagnetismo se evidencia cuando, a temperatura ambiente, la remanencia magnética es cero y el ciclo no presenta histéresis. Además, se puede identificar la magnetización de saturación analizando la meseta en la curva.²⁴

Esta técnica de caracterización no fue realizada en el marco de esta tesis por no tener disponibilidad de uso del equipo correspondiente. Se muestra a modo ilustrativo una imagen en la Figura 4.33 una imagen de un equipo SQUID.



Figura 4.33: Equipo SQUID, Quantum Design Inc.⁷⁷

4.2.4.2 Cualitativo

El superparamagnetismo, característica necesaria para poder administrar las SPIONs en el cuerpo humano para uso en tratamientos localizados, implica que las partículas poseen un momento magnético cuando son sometidas a un campo magnético, pero no conservan la magnetización neta cuando el campo es retirado.⁷⁸ Cualitativamente, es posible identificar el superparamagnetismo, observando el accionar de las SPIONs ante la presencia y ausencia de un campo magnético externo. Si las SPIONs se movilizan por la aplicación de un campo magnético y luego, al quitarlo, las mismas se vuelven a dispersar en solución, se verifica el superparamagnetismo, ya que se evidencia que las SPIONs solo se magnetizan cuando son expuestas a un campo magnético y que no existe magnetismo remanente luego de quitar el campo magnético externo.

De este modo, para analizar el superparamagnetismo de manera cualitativa, se agita la solución de manera de que las nanopartículas se distribuyan uniformemente en el líquido, luego se acerca un imán y se observa si las mismas se imantan mediante el campo magnético aplicado. Finalmente, se vuelve a agitar la solución y se analiza si las nanopartículas vuelven a su estado en suspensión, sin imantación remanente. Como resultado de este análisis, se observa que todas las síntesis producidas presentan superparamagnetismo, como se puede ver en las figuras correspondientes (RN19, Figura 4.33; RN20, Figura 4.34; RN21, Figura 4.35; y RN22, Figura 4.36).

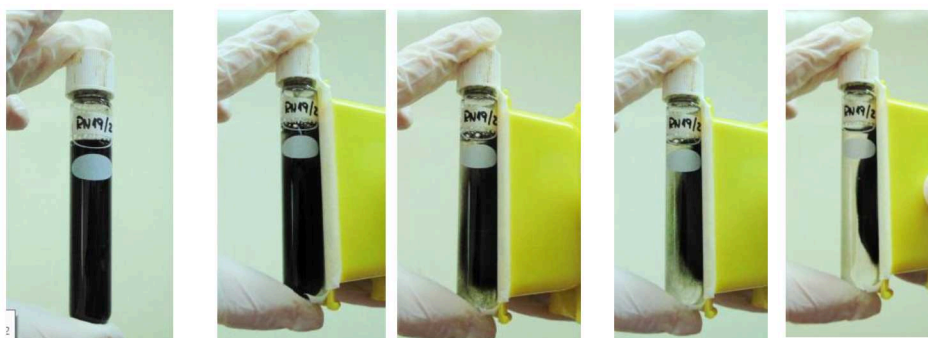


Figura 4.34: Análisis cualitativo de superparamagnetismo de RN19.

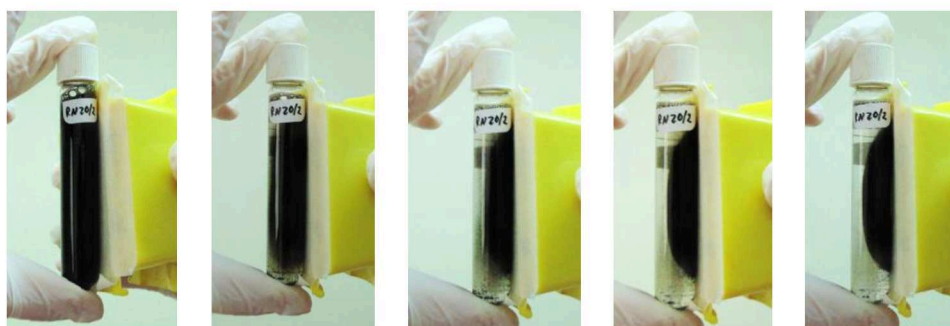


Figura 4.35: Análisis cualitativo de superparamagnetismo de RN20.

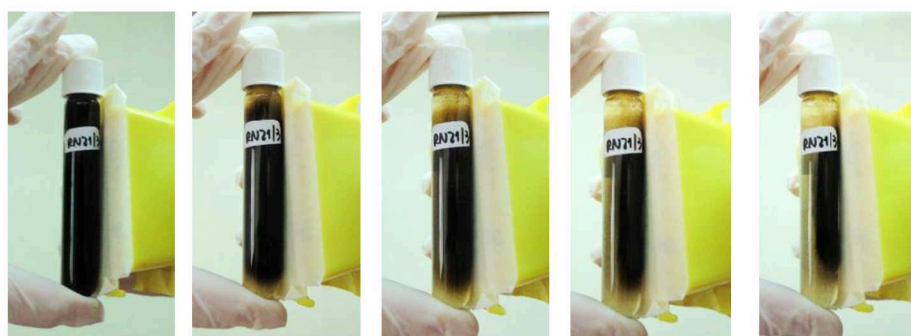


Figura 4.36: Análisis cualitativo de superparamagnetismo de RN21.

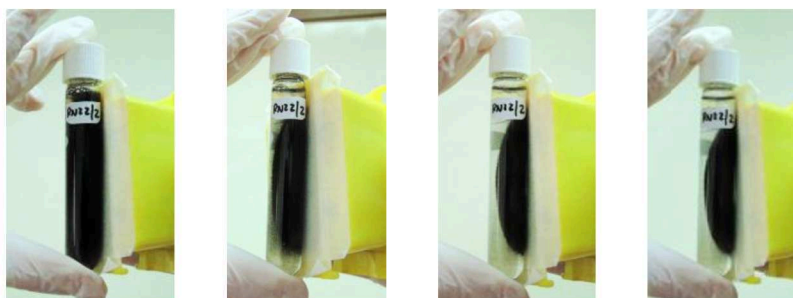


Figura 4.37: Análisis cualitativo de superparamagnetismo de RN22.

En la Tabla 4.4 se presentan las observaciones referentes a colores de las SPIONs y de la solución en la que permanecen, y el tiempo que las mismas tardan en imantarse (acercarse a un imán que se mantiene cerca de la solución).

Tabla 4.4: Características cualitativas de las nanopartículas producidas.

Síntesis	Color Partículas	Color Solución	Tiempo en imantarse [s]
RN19	Negras	Transparente	20
RN20	Negras	Transparente	30
RN21	Negras (marrón en la superficie)	Amarronada	50
RN22	Negras	Transparente	20

4.3 Conclusiones

Como conclusión global del análisis completo de características de las SPIONs producidas, se puede ver que la nueva ruta de síntesis propuesta logra producir nanopartículas de magnetita, cuya formación fue verificada mediante la identificación del compuesto con espectroscopia Raman, FTIR, DRX y análisis cualitativo. Además, adicionando una etapa en la síntesis, se logra recubrir las mismas con el polímero PEG, lo cual se refleja en los resultados de las mediciones de potencial zeta, TGA, Raman, FTIR y DRX. Así, se logra producir mediante una ruta alternativa a la bibliográfica, escalable y reproducible, SPIONs apropiadas para su uso en biomedicina.

La magnetita pura, sin recubrimiento, se oxida en presencia de oxígeno, pero las partículas recubiertas logran mayor estabilidad ante la oxidación. Las dimensiones de las SPIONs desnudas son adecuadas para el uso en nanomedicina, pero las SPIONs recubiertas presentan mayores tamaños hidrodinámicos, por lo cual resultaría necesario realizar otras mediciones (TEM) para conocer el tamaño real de las mismas y ver si son aptas para su administración como medicamento. Asimismo, todas las

partículas tienen distribuciones monomodales de tamaño, lo cual resulta adecuado para el uso en particular. Otra característica importante es la estabilidad de la suspensión al pH propio del organismo, la cual también se cumple y se verifica mediante las curvas de potencial zeta. Por último, se observó cualitativamente que las partículas son superparamagnéticas, si bien resultaría importante realizar además una medición más apropiada y cuantitativa de esta propiedad (SQUID o VSM).

De todo lo expuesto, se puede concluir que la síntesis RN19 es apropiada para la producción de nanopartículas de magnetita superparamagnéticas, y que la síntesis RN20 incluye una opción adecuada de recubrimiento de estas partículas con PEG. Por otro lado, el agregado de TMAOH a la síntesis no muestra mejoras en el producto final, por lo cual resulta innecesario este paso usando este reactivo.

4.4 Bibliografía

- (1) Mahmoudi, M.; Sant, S.; Wang, B.; Laurent, S.; Sen, T. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs): Development, Surface Modification and Applications in Chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *63* (1–2), 24.
- (2) Veisheh, O.; Gunn, J. W.; Zhang, M. Design and Fabrication of Magnetic Nanoparticles for Targeted Drug Delivery and Imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *62* (3), 284.
- (3) Issa, B.; Obaidat, I. M.; Albiss, B. a; Haik, Y. Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (11), 21266.
- (4) Gautier, J.; Munnier, E.; Paillard, A.; Hervé, K.; Douziech-Eyrolles, L.; Soucé, M.; Dubois, P.; Chourpa, I. A Pharmaceutical Study of Doxorubicin-Loaded PEGylated Nanoparticles for Magnetic Drug Targeting. *Int. J. Pharm.* **2012**, *423* (1), 16.
- (5) Theerdhala, S.; Bahadur, D.; Vitta, S.; Perkas, N.; Zhong, Z.; Gedanken, A. Sonochemical Stabilization of Ultrafine Colloidal Biocompatible Magnetite Nanoparticles Using Amino Acid, L-Arginine, for Possible Bio Applications. *Ultrason. Sonochem.* **2010**, *17* (4), 730.
- (6) Andrade, Â. L.; Fabris, J. D.; Ardisson, J. D.; Valente, M. A.; Ferreira, J. M. F. Effect of Tetramethylammonium Hydroxide on Nucleation, Surface Modification and Growth of Magnetic Nanoparticles. *J. Nanomater.* **2012**, *2012*, 1.
- (7) Kelkar, A. D.; Herr, D. J. C.; Ryan, J. G. *Nanoscience and Nanoengineering. Advances and Applications.*; CRC Press, 2014.

- (8) Hałupka-Bryl, M.; Bednarowicz, M.; Dobosz, B.; Krzyminiewski, R.; Zalewski, T.; Wereszczyńska, B.; Nowaczyk, G.; Jarek, M.; Nagasaki, Y. Doxorubicin Loaded PEG-B-poly(4-Vinylbenzylphosphonate) Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. *J. Magn. Magn. Mater.* **2015**, *384*, 320.
- (9) Pang, S. C.; Chin, S. F.; Anderson, M. A. Redox Equilibria of Iron Oxides in Aqueous-Based Magnetite Dispersions: Effect of pH and Redox Potential. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *311* (1), 94.
- (10) Durdureanu-Angheluta, A.; Dascalu, A.; Fifere, A.; Coroaba, A.; Pricop, L.; Chiriac, H.; Tura, V.; Pinteala, M.; Simionescu, B. C. Progress in the Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticles with Amino Groups on the Surface. *J. Magn. Magn. Mater.* **2012**, *324* (9), 1679.
- (11) Vo-Dinh, T. *Nanotechnology in Biology and Medicine: Methods, Devices, and Applications*; Press, C., Ed.; 2006.
- (12) Hervé, K.; Douziech-Eyrolles, L.; Munnier, E.; Cohen-Jonathan, S.; Soucé, M.; Marchais, H.; Limelette, P.; Warmont, F.; Saboungi, M. L.; Dubois, P.; et al. The Development of Stable Aqueous Suspensions of PEGylated SPIONs for Biomedical Applications. *Nanotechnology* **2008**, *19* (46), 465608.
- (13) Ujiie, K.; Kanayama, N.; Asai, K.; Kishimoto, M.; Ohara, Y.; Akashi, Y.; Yamada, K.; Hashimoto, S.; Oda, T.; Ohkohchi, N.; et al. Preparation of Highly Dispersible and Tumor-Accumulative, Iron Oxide Nanoparticles. Multi-Point Anchoring of PEG-B-poly(4-Vinylbenzylphosphonate) Improves Performance Significantly. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2011**, *88* (2), 771.
- (14) Park, J. Y.; Choi, E. S.; Baek, M. J.; Lee, G. H. Colloidal Stability of Amino Acid Coated Magnetite Nanoparticles in Physiological Fluid. *Mater. Lett.* **2009**, *63* (3–4), 379.
- (15) Shameli, K.; Ahmad, M. Bin; Jazayeri, S. D.; Sedaghat, S.; Shabanzadeh, P.; Jahangirian, H.; Mahdavi, M.; Abdollahi, Y. Synthesis and Characterization of Polyethylene Glycol Mediated Silver Nanoparticles by the Green Method. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13* (6), 6639.
- (16) Mandzy, N.; Grulke, E.; Druffel, T. Breakage of TiO₂ Agglomerates in Electrostatically Stabilized Aqueous Dispersions. *Powder Technol.* **2005**, *160* (2), 121.
- (17) Taira, S.; Kaneko, D.; Onuma, K.; Miyazato, A.; Hiroki, T.; Kawamura-Konishi, Y.; Ichiyangi, Y. Synthesis and Characterization of Functionalized Magnetic Nanoparticles for the Detection of Pesticide. *Int. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012*, 1.
- (18) Neuberger, T.; Schöpf, B.; Hofmann, H.; Hofmann, M.; von Rechenberg, B. Superparamagnetic Nanoparticles for Biomedical Applications: Possibilities and

- Limitations of a New Drug Delivery System. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293* (1), 483.
- (19) Hashim, A. A. *Smart Nanoparticles Technology*; INTECH, Ed.; 2012.
- (20) Ashtari, P.; He, X.; Wang, K.; Gong, P. An Efficient Method for Recovery of Target ssDNA Based on Amino-Modified Silica-Coated Magnetic Nanoparticles. *Talanta* **2005**, *67* (3), 548.
- (21) Jiang, J.; Oberdörster, G.; Biswas, P. Characterization of Size, Surface Charge, and Agglomeration State of Nanoparticle Dispersions for Toxicological Studies. *J. Nanoparticle Res.* **2008**, *11* (1), 77.
- (22) Shubayev, V. I.; Pisanic, T. R.; Jin, S. Magnetic Nanoparticles for Theragnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61* (6), 467.
- (23) Lim, J.; Yeap, S. P.; Che, H. X.; Low, S. C. Characterization of Magnetic Nanoparticle by Dynamic Light Scattering. *Nanoscale Res. Lett.* **2013**, *8* (1), 381.
- (24) Faraji, M.; Yamini, Y.; Rezaee, M. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications. *J. Iran. Chem. Soc.* **2010**, *7* (1), 1.
- (25) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Vander Elst, L.; Muller, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (6), 2064.
- (26) Finsky, R. Particle Sizing by Quasi-Elastic Light Scattering. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1994**, *52*, 79.
- (27) Kaaki, K.; Herve, K.; Chipper, M.; Shkilnyy, A.; Souce, M.; Benoit, R.; Paillard, A.; Dubois, P.; Saboungi, M.; Chourpa, I.; et al. Magnetic Nanocarriers of Doxorubicin Coated with Poly(ethylene Glycol) and Folic Acid: Relation between Coating Structure, Surface Properties, Colloidal Stability, and Cancer Cell Targeting. *Am. Chem. Soc.* **2012**, *28* (2), 1496.
- (28) Zhang, Y.; Chen, Y.; Westerhoff, P.; Hristovski, K.; Crittenden, J. C. Stability of Commercial Metal Oxide Nanoparticles in Water. *Water Res.* **2008**, *42* (8–9), 2204.
- (29) Dickson, D.; Liu, G.; Li, C.; Tachiev, G.; Cai, Y. Dispersion and Stability of Bare Hematite Nanoparticles: Effect of Dispersion Tools, Nanoparticle Concentration, Humic Acid and Ionic Strength. *Sci. Total Environ.* **2012**, *419*, 170.
- (30) Kobayashi, M.; Skarba, M.; Galletto, P.; Cakara, D.; Borkovec, M. Effects of Heat Treatment on the Aggregation and Charging of Stöber-Type Silica. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *292* (1), 139.

- (31) Dorniani, D.; Kura, A. U.; Hussein-Al-Ali, S. H.; Bin Hussein, M. Z.; Fakurazi, S.; Shaari, A. H.; Ahmad, Z. In Vitro Sustained Release Study of Gallic Acid Coated with Magnetite-PEG and Magnetite-PVA for Drug Delivery System. *Sci. World J.* **2014**.
- (32) Zhao, F.; Zhang, B.; Feng, L. Preparation and Magnetic Properties of Magnetite Nanoparticles. *Mater. Lett.* **2012**, *68* (1), 112.
- (33) Li, T.; Deng, Y.; Song, X.; Jin, Z.; Zhang, Y. The Formation of Magnetite Nanoparticle in Ordered System of the Soybean Lecithin. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, *24* (7), 957.
- (34) Wan, J.; Cai, W.; Meng, X.; Liu, E. Monodisperse Water-Soluble Magnetite Nanoparticles Prepared by Polyol Process for High-Performance Magnetic Resonance Imaging. *Chem. Commun.* **2007**, *4* (47), 5004.
- (35) Mizukoshi, Y.; Shuto, T.; Masahashi, N.; Tanabe, S. Preparation of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles by Reverse Precipitation Method: Contribution of Sonochemically Generated Oxidants. *Ultrason. Sonochem.* **2009**, *16* (177), 525.
- (36) Huong, N. T.; Giang, L. T. K.; Binh, N. T.; Minh, L. Q. Surface Modification of Iron Oxide Nanoparticles and Their Conjunction with Water Soluble Polymers for Biomedical Application. *J. Phys. Conf. Ser.* **2009**, *187*.
- (37) Li, Y.-S.; Church, J. S.; Woodhead, A. L. Infrared and Raman Spectroscopic Studies on Iron Oxide Magnetic Nano-Particles and Their Surface Modifications. *J. Magn. Magn. Mater.* **2012**, *324* (8), 1543.
- (38) JEOL Ltd. [Http://www.jeol.co.jp/en/products/detail/JEM-2100Plus.html](http://www.jeol.co.jp/en/products/detail/JEM-2100Plus.html).
- (39) Studart, A. R.; Amstad, E.; Gauckler, L. J. Colloidal Stabilization of Nanoparticles in Concentrated Suspensions. *Langmuir* **2007**, *23* (3), 1081.
- (40) Dorniani, D.; Hussein, M. Z. Bin; Kura, A. U.; Fakurazi, S.; Shaari, A. H.; Ahmad, Z. Preparation of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Coated with Gallic Acid for Drug Delivery. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, 5745.
- (41) Widmann, G. UserCom 13. Información TA: Interpretación de Curvas TGA. *METTER TOLEDO*. 2001, pp 1–20.
- (42) Trujillo Herrera, W. V. Preparación Y Caracterización de Nanopartículas de Magnetita Funcionalizados Con Ácido Láurico, Oleico Y Etilendiamino Tetraacético Para Aplicaciones Biomédicas Y Remediación Ambiental, 2013.
- (43) Badia Valiente, J. D. Caracterización Termogravimétrica de Las Operaciones de Reprocesado de Poli(tereftalato de Etileno) (PET), 2015, Vol. 1.
- (44) Cai, W.; Wan, J. Facile Synthesis of Superparamagnetic Nanoparticles in Liquid

- Polyols. *Colloid Interface Sci.* **2007**, *305*, 366.
- (45) Kayal, S.; Ramanujan, R. V. Doxorubicin Loaded PVA Coated Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. *Mater. Sci. Eng. C* **2010**, *30* (3), 484.
- (46) Abu Mukh-Qasem, R.; Gedanken, A. Sonochemical Synthesis of Stable Hydrosol of Fe₃O₄ Nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *284*, 489.
- (47) Rahman, M. M. *Nanomaterials*; INTECH, Ed.; Croatia, 2011.
- (48) Chen, W. L.; Peng, Y. F.; Chiang, S. K.; Huang, M. H. Thermal Properties and Physicochemical Behavior in Aqueous Solution of Pyrene-Labeled Poly(ethylene Glycol)-Polylactide Conjugate. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 2815.
- (49) Changdeo, J. S.; Vinod, M.; Shankar, K. B.; Rajaram, C. A. Physicochemical Characterization and Solubility Enhancement Studies of Allopurinol Solid Dispersions. *Brazilian J. Pharm. Sci.* **2011**, *47* (3), 513.
- (50) Akbarzadeh, A.; Mikaeili, H.; Zarghami, N.; Mohammad, R.; Barkhordari, A.; Davaran, S. Preparation and in Vitro Evaluation of Doxorubicin-Loaded Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Modified with Biocompatible Copolymers. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 511.
- (51) Nowostawska, M.; Corr, S. A.; Byrne, S. J.; Conroy, J.; Volkov, Y.; Gun'ko, Y. K. Porphyrin-Magnetite Nanoconjugates for Biological Imaging. *J. Nanobiotechnology* **2011**, *9*, 13.
- (52) Slavov, L.; Abrashev, M. V.; Merodiiska, T.; Gelev, C.; Vandenberghe, R. E.; Markova-Deneva, I.; Nedkov, I. Raman Spectroscopy Investigation of Magnetite Nanoparticles in Ferrofluids. *J. Magn. Magn. Mater.* **2010**, *322* (14), 1904.
- (53) Kazemzadeh, H.; Ataie, A.; Raschi, F. Synthesis of Magnetite Nano-Particles By Reverse Co-Precipitation. *Int. J. Mod. Phys. Conf. Ser.* **2012**, *5*, 160.
- (54) Van Berkum, S.; Dee, J. T.; Philipse, A. P.; Ern , B. H. Frequency-Dependent Magnetic Susceptibility of Magnetite and Cobalt Ferrite Nanoparticles Embedded in PAA Hydrogel. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14* (5), 10162.
- (55) Chourpa, I.; Douziech-Eyrolles, L.; Ngaboni-Okassa, L.; Fouquenot, J.-F.; Cohen-Jonathan, S.; Souc , M.; Marchais, H.; Dubois, P. Molecular Composition of Iron Oxide Nanoparticles, Precursors for Magnetic Drug Targeting, as Characterized by Confocal Raman Microspectroscopy. *Analyst* **2005**, *130* (10), 1395.
- (56) Guo, C.; Hu, Y.; Qian, H.; Ning, J.; Xu, S. Magnetite (Fe₃O₄) Tetraikaidcahedral Microcrystals: Synthesis, Characterization, and Micro-Raman Study. *Mater. Charact.* **2011**, *62* (1), 148.
- (57) Shebanova, O. N.; Lazor, P. Raman Spectroscopic Study of Magnetite (Fe₃O₄): A New Assignment for the Vibrational Spectrum. *J. Solid State Chem.* **2003**, *174*

- (2), 424.
- (58) Legodi, M. a.; de Waal, D. The Preparation of Magnetite, Goethite, Hematite and Maghemite of Pigment Quality from Mill Scale Iron Waste. *Dye. Pigment.* **2006**, *74* (1), 161.
- (59) Ivashchenko, O.; Lewandowski, M.; Pepliska, B.; Jarek, M.; Nowaczyk, G.; Wiesner, M.; Załęski, K.; Babutina, T.; Warowicka, A.; Jurga, S. Synthesis and Characterization of Magnetite/silver/antibiotic Nanocomposites for Targeted Antimicrobial Therapy. *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *55*, 343.
- (60) de Faria, D. L. A.; Venancio Silva, S.; de Oliveira, M. T. Raman Microspectroscopy of Some Iron Oxides and Oxyhydroxides. *J. Raman Spectrosc.* **1997**, *28* (February), 873.
- (61) Thierry, D.; Persson, D.; Leygraf, C.; Boucherit, N.; Hugot-le Goff, a. Raman Spectroscopy and XPS Investigations of Anodic Corrosion Films Formed on FeMo Alloys in Alkaline Solutions. *Corros. Sci.* **1991**, *32* (3), 273.
- (62) Ohtsuka, T.; Kubo, K.; Sato, N. Raman Spectroscopy of Thin Corrosion Films on Iron At 100 To 150 C in Air. *Corrosion* **1986**, *42* (8), 476.
- (63) de Faria, D. L. a; Lopes, F. N. Heated Goethite and Natural Hematite: Can Raman Spectroscopy Be Used to Differentiate Them? *Vib. Spectrosc.* **2007**, *45* (2), 117.
- (64) Ma, M.; Wu, Y.; Zhou, J.; Sun, Y.; Zhang, Y.; Gu, N. Size Dependence of Specific Power Absorption of Fe₃O₄ Particles in AC Magnetic Field. *J. Magn. Magn. Mater.* **2004**, *268* (1–2), 33.
- (65) Abbas, M.; Takahashi, M.; Kim, C. Facile Sonochemical Synthesis of High-Moment Magnetite (Fe₃O₄) Nanocube. *J. Nanoparticle Res.* **2013**, *15* (1), 1354.
- (66) Cao, X.; Zhang, B.; Zhao, F.; Feng, L. Synthesis and Properties of MPEG-Coated Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles. *J. Nanomater.* **2012**, 2012.
- (67) Dey, R.; Mukherjee, N.; Ahammed, S.; Ranu, B. C. Highly Selective Reduction of Nitroarenes by iron(0) Nanoparticles in Water. *R. Soc. Chem.* **2012**, *48* (64), 7982.
- (68) Marchegiani, G.; Imperatori, P.; Mari, A.; Pilloni, L.; Chiolerio, A.; Allia, P.; Tiberto, P.; Suber, L. Sonochemical Synthesis of Versatile Hydrophilic Magnetite Nanoparticles. *Ultrason. Sonochem.* **2012**, *19* (4), 877.
- (69) Yamaura, M.; Camilo, R. L.; Sampaio, L. C.; Macêdo, M. A.; Nakamura, M.; Toma, H. E. Preparation and Characterization of (3-Aminopropyl)triethoxysilane-Coated Magnetite Nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **2004**, *279* (2–3), 210.
- (70) Jiang, W.; Yang, H. C.; Yang, S. Y.; Horng, H. E.; Hung, J. C.; Chen, Y. C.; Hong, C.-Y. Preparation and Properties of Superparamagnetic Nanoparticles with Narrow

- Size Distribution and Biocompatible. *J. Magn. Magn. Mater.* **2004**, 283 (2–3), 210.
- (71) Fouineau, J.; Brymora, K.; Ourry, L.; Mammeri, F.; Yaacoub, N.; Calvayrac, F.; Ammar, S.; Greneche, J. Synthesis, Mössbauer Characterization, and Ab Initio Modelling of Iron Oxide Nanoparticles of Medical Interest Functionalized by Dopamine. *J. Phys. Chemistry* **2013**.
- (72) Lin, C. C.; Ho, J. M. Structural Analysis and Catalytic Activity of Fe₃O₄ Nanoparticles Prepared by a Facile Co-Precipitation Method in a Rotating Packed Bed. *Ceram. Int.* **2014**, 40 (7), 10275.
- (73) Wen, X.; Yang, J.; He, B.; Gu, Z. Preparation of Monodisperse Magnetite Nanoparticles under Mild Conditions. *Curr. Appl. Phys.* **2008**, 8 (5), 535.
- (74) Salazar, J. S.; Perez, L.; de Abril, O.; Phuoc, L. T.; Ihiwakrim, D.; Vazquez, M.; Greneche, J.-M.; Begin-Colin, S.; Pourroy, G. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in 10-40 Nm Range: Composition in Terms of Magnetite/Maghemite Ratio and Effect on the Magnetic Properties. *Am. Chem. Soc.* **2011**, 1379.
- (75) Wu, J.-H.; Ko, S. P.; Liu, H.-L.; Kim, S.; Ju, J.-S.; Kim, Y. K. Sub 5 Nm Magnetite Nanoparticles: Synthesis, Microstructure, and Magnetic Properties. *Mater. Lett.* **2007**, 61 (14–15), 3124.
- (76) Poudyal, N. Synthesis and Characterization of Magnetic Nanoparticles. *Univ. Texas Arlingt.* **2005**, No. December.
- (77) Quantum Design, I. <http://www.qdusa.com/products/mpms3.html>.
- (78) Martínez Soler, G. I. Diseño de Nanosistemas Poliméricos Sensibles a Estímulos Magnéticos Para El Tratamiento Del Cáncer. *Univ. Granada* **2011**.

5 OPTIMIZACIÓN EXPERIMENTAL DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE SPIONs

En este capítulo se estudia la reproducibilidad de la nueva ruta de síntesis propuesta en el Capítulo 3 y se busca el punto óptimo de operación del proceso para garantizar el cumplimiento de las propiedades de uso final del producto con alta probabilidad de ocurrencia. Para llevar a cabo este análisis, se aplica el algoritmo de optimización experimental desarrollado en el Capítulo 2 de la presente tesis.

5.1 Proceso de síntesis de nanopartículas de magnetita superparamagnéticas

Según se ha expuesto y discutido en los capítulos previos, en la presente tesis se ha desarrollado un nuevo método de producción de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita, orientadas a usos médicos, el cual puede ser escalable a nivel industrial. La síntesis propuesta ha sido exhaustivamente analizada y los productos obtenidos han sido adecuadamente caracterizados. Los resultados obtenidos han permitido verificar experimentalmente la eficacia de producción mediante esta nueva vía de síntesis de SPIONs, siendo las propiedades de éstas similares a las del producto obtenido en síntesis más complejas a escala laboratorio. En esta última etapa de desarrollo del producto, resulta importante evaluar la reproducibilidad del proceso propuesto, lo cual se lleva a cabo mediante la aplicación de la metodología de diseño de experimentos presentada en el Capítulo 2, que busca maximizar la probabilidad de éxito.

Para el análisis de reproducibilidad, se decide evaluar el proceso de síntesis de la magnetita pura, correspondiente a la síntesis RN19 presentada en el Capítulo 3 y cuyas propiedades fueron analizadas en el Capítulo 4. Se elige estudiar en mayor detalle esta síntesis, a modo de encontrar las condiciones óptimas para sintetizar partículas puras de magnetita que cumplan con cierto rango de tamaño, para después en un siguiente paso (a futuro) estudiar en detalle la adición de PEG a la superficie. Además, se cree que existe cierta relación entre el tamaño base de la partícula desnuda y el tamaño final de las partículas recubiertas con PEG, de modo que se considera conveniente analizar por separado ambos procesos, en vista de que garantizar, en primer lugar, nanopartículas de magnetita desnuda de cierto tamaño, para luego, con base en este proceso ya optimizado, incorporar el PEG en su superficie.

Las propiedades de uso final más importantes a cumplir para la posible utilización de este producto con fines medicinales son las siguientes: tamaño, estabilidad en solución y recubrimiento superficial. El recubrimiento con PEG se puede llevar a cabo mediante los procedimientos desarrollados y expuestos en esta tesis, lo cual a su vez, presenta valores de potencial zeta adecuados para garantizar la estabilidad en solución. Por esto, la variable más importante que se debe evaluar y controlar a modo de encontrar las condiciones óptimas de operación del proceso, es el tamaño de las nanopartículas. En este caso se mide el tamaño hidrodinámico, mediante la técnica de DLS, y como requerimiento de uso se establece que el mismo debe ser inferior a los 100 nm (requerimiento de tamaño nanométrico según bibliografía citada en el Capítulo 1).

Para aplicar la metodología de optimización experimental propuesta se elige como variable controlada la concentración inicial de reactivos, ya que según la experiencia adquirida en el desarrollo de actividades experimentales, se ha observado que es la variable más crítica del proceso, que resulta necesario evaluar para garantizar reproducibilidad en la producción de nanopartículas de magnetita. Las demás variables de operación se mantienen constantes en todos los experimentos realizados, a modo de evaluar la influencia de la concentración en las propiedades del producto obtenido, y en busca de optimizar el valor elegido para esta variable en relación con la probabilidad de éxito. Asimismo, existen otras variables importantes, que podrían ser dignas de un análisis a futuro, ya no en busca de garantizar reproducibilidad, pero si con el propósito de optimizar los tiempos de producción, el uso de reactivos, los tamaños de los equipos y el consumo de nitrógeno en el proceso. Estas variables sugeridas para optimizar la operación del proceso, serían: la relación entre los volúmenes de reactivos y el medio alcalino de síntesis, el caudal de alimentación de reactivos al medio de síntesis y el tiempo de agitación posterior a la síntesis de los cristales de magnetita.

5.2 Optimización experimental de la probabilidad de éxito

En busca de hallar un punto óptimo de operación que ajuste la variable elegida (concentración inicial de reactivos) garantizando la máxima probabilidad de cumplir con el tamaño de partícula deseado, se recurre al método de optimización experimental presentado en el Capítulo 2 de esta tesis, ya que el mismo permite evaluar la probabilidad (factor de particular interés en este caso), a diferencia del diseño experimental ortogonal clásico que evalúa el valor de salida exacto de cierta propiedad. Los métodos ortogonales de diseño experimental, si bien requieren de menor cantidad de experimentos para arribar a un resultado, permiten ajustar

variables con base en los valores exactos de las propiedades a medir, careciendo de un enfoque probabilístico que permita maximizar la probabilidad de ocurrencia de un evento dadas ciertas condiciones operativas y así facilitar el escalado a nivel industrial del proceso de síntesis.

Para aplicar la metodología de diseño de experimentos basada en la probabilidad, se deben seleccionar determinadas condiciones de trabajo de la misma. En primer lugar, se decide estudiar el comportamiento de una sola variable del proceso, correspondiente a la concentración inicial de reactivos. Más específicamente, se considera la concentración inicial de iones Fe^{+3} , ya que la relación inicial de iones férricos y ferrosos es siempre constante ($[\text{Fe}^{+2}]/[\text{Fe}^{+3}] : 1/2$), por lo cual la concentración del otro reactivo (Fe^{+2}) es la correspondiente a dicha relación. La decisión de evaluar una sola variable es debido a dos razones: por un lado, esta variable fue identificada como crítica para la producción de nanopartículas superparamagnéticas, por lo que resulta importante su análisis para encontrar un punto óptimo de operación del proceso, en tanto que las demás variables de operación demostraron no influir significativamente en la reproducibilidad del producto final. Por otro lado, el hecho de analizar una sola variable permite adecuarse a la factibilidad de realización de experiencias experimentales en el período de desarrollo de la tesis de doctorado. La curva de respuesta para la probabilidad de éxito en el método es de orden dos y, como se expuso anteriormente, se estudia un solo factor, por lo cual se requieren tres puntos iniciales para comenzar el algoritmo de optimización experimental (Figura 2.1), los cuales brindan la información experimental requerida para estimar la primera curva de respuesta, es decir, los tres parámetros correspondientes a la función cuadrática. Una vez establecidos los límites inferior y superior de la zona de operación en la que se desea maximizar la probabilidad de éxito, se plantean los puntos iniciales según el diseño CCD, que corresponden en este caso a un punto experimental en cada límite (uno en el límite superior y otro en el límite inferior) y un punto central en el intervalo que define la región inicial de operación. Los hiper-parámetros definidos para esta aplicación del método de optimización se presentan en la Tabla 5.1.

En la Tabla 5.2 se presentan los datos de las experiencias realizadas y sus respectivas mediciones de tamaño. A su vez, se identifican cuantas muestras cumplen con el criterio de propiedad final, y en base a la cantidad de réplicas que lo hacen, se calcula y muestra el valor de la probabilidad de éxito en ese punto experimental. Dicha tabla muestra todos los puntos necesarios, tanto en el diseño experimental inicial de bucle como aquellos sugeridos por el método, hasta completar el algoritmo de optimización

experimental, es decir, hasta hallar el punto óptimo de operación que garantiza la máxima probabilidad en el cumplimiento de la propiedad final requerida.

Tabla 5.1: Valores de los hiper-parámetros para la síntesis de SPIONs.

Parámetro	Valor
Límite inferior de concentración de Fe^{+3} [mol/L]	0.01
Límite superior de concentración de Fe^{+3} [mol/L]	1
Cantidad de réplicas por punto	3
Criterio de stop del bucle interno	0.5
Criterio de stop del bucle externo	0.5
Cantidad máxima de bucles internos	3
Cantidad máxima de bucles externos	3
Reducción de la ROI en cada bucle externo	$\frac{1}{2}$

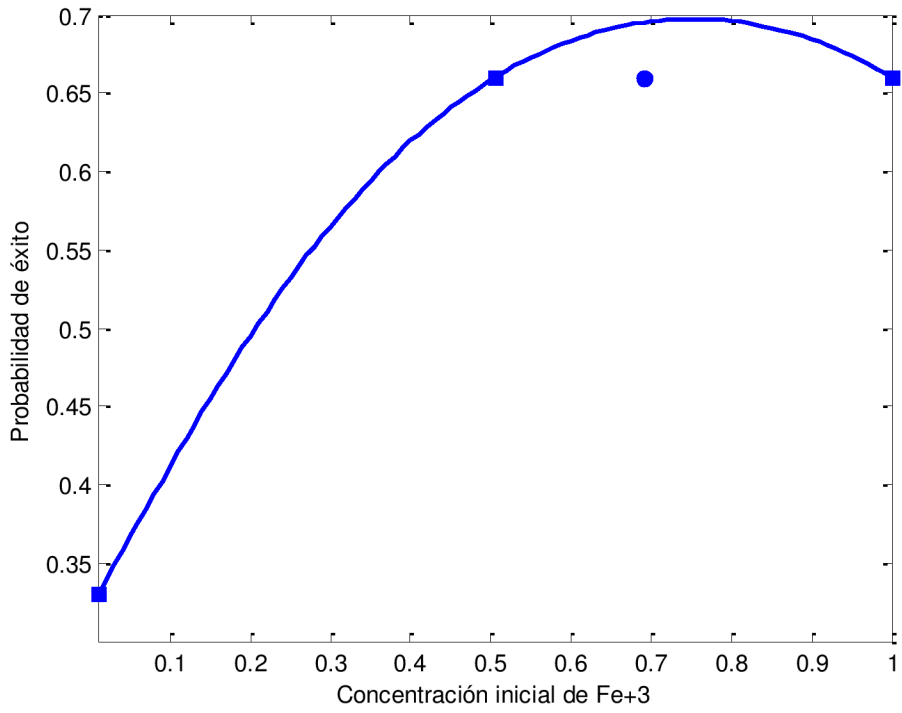
En la Figura 5.1 se muestran las curvas de respuesta sucesivas propuestas por el método, los puntos experimentales correspondientes y además se pueden apreciar las reducciones de zonas de operación que determina el algoritmo en cada iteración. En cada una de las figuras que se muestran, los puntos cuadrados corresponden a los puntos utilizados para la regresión de la curva y el punto circular es el nuevo punto experimental sugerido por el método para incorporar en la siguiente iteración. Las figuras que no presentan puntos circulares, indican que son las últimas del bucle interno en cuestión.

En la Tabla 5.3 se presenta un resumen de los resultados obtenidos, dónde se muestran los límites inferiores y superiores de cada iteración del bucle externo, los óptimos encontrados en cada bucle y la cantidad de puntos experimentales requeridos para arribar al óptimo global sugerido por el método. Como puede verse, para maximizar la probabilidad de éxito, la concentración inicial de Fe^{+3} debe estar en el intervalo de 0.6427 a 0.8902 moles/L, siendo la óptima política de operación, sugerida por el método, de 0.7664 moles/L. La probabilidad de éxito para esta política óptima es de 90 % y la cantidad total de puntos experimentales requeridos para obtener esta política óptima es de 7.

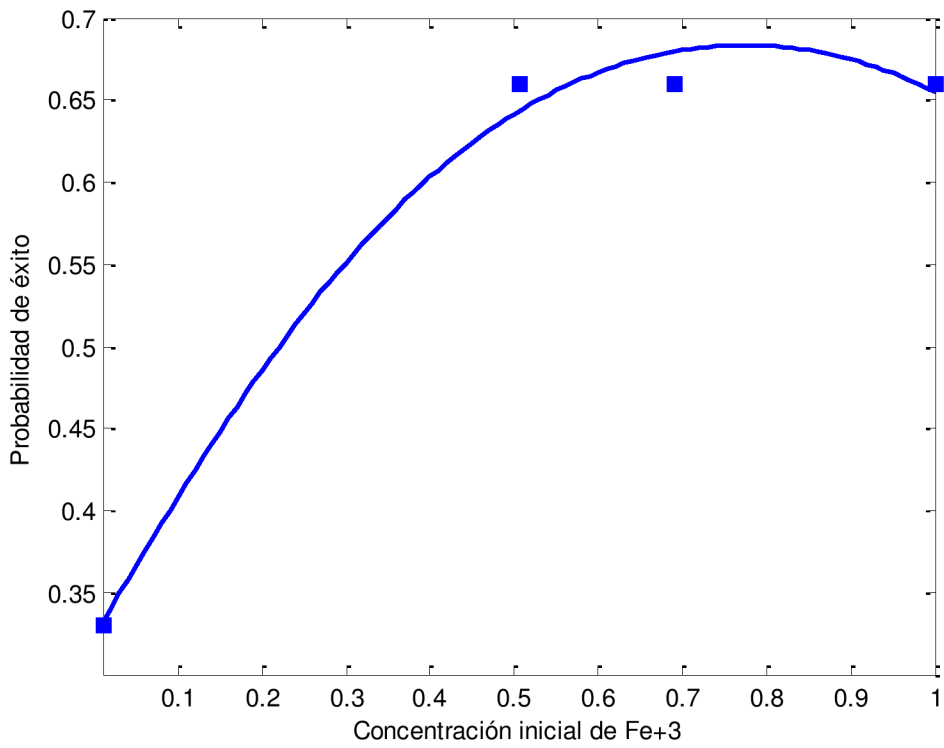
Como puede verse, la metodología propuesta es una efectiva y eficiente herramienta para obtener la región de operación deseada mediante la realización de una cantidad relativamente pequeña de experimentos.

Tabla 5.2: Resumen de datos experimentales.

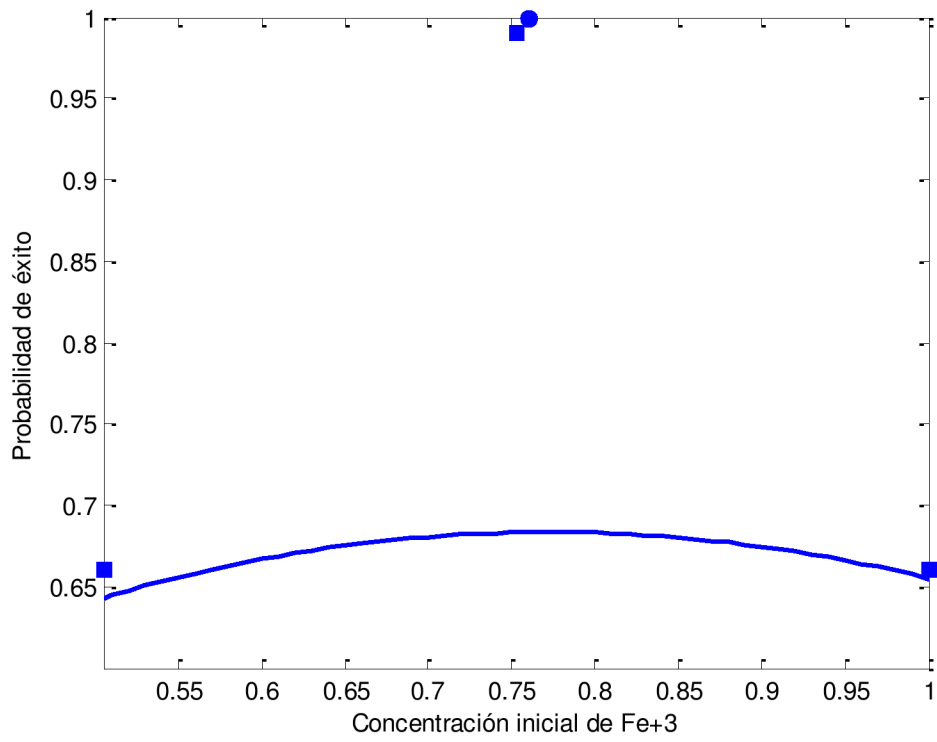
Bucles del método	Concentración inicial de Fe ⁺³ [M]	Réplica	Diámetros [nm]	¿Verifica criterio de propiedad de uso final?	Probabilidad de éxito
Externo= 1 Interno= 1 (Punto del CCD)	0.01	a	106.3 (9.9%)	-	0.33
			293.6 (90.1%)		
		b	325.6 (97.8%)	-	
			5368 (2.2%)		
		c	1.219 (21.8%) 95.37 (8.8%) 360.0 (65.6%)	Si	
Externo= 1 Interno= 1 (Punto del CCD)	0.505	a	399.6 (100%)	-	0.66
			0.9258 (20.3%) 448.0 (79.7%)	Si	
		b	1.190 (34.7%) 324.7 (65.3%)	Si	
		c			
Externo= 1 Interno= 1 (Punto del CCD)	1.0	a	423.2 (100%)	-	0.66
			1.295 (20.8%) 55.55 (16.8%) 367.4 (62.4%)	Si	
		b	0.6622 (13.3%) 290.7 (86.7%)	Si	
		c			
Externo= 1 Interno= 2 (Punto sugerido)	0.692	a	3.221 (20.8 %) 608.6 (79.2 %)	Si	0.66
			5.461 (35.7%) 884.0 (64.3%)	Si	
		b	451.1 (100%)	-	
		c			
Externo= 2 Interno= 1 (Punto del CCD)	0.7525	a	6.239 (26.3%) 498.8 (73.7%)	Si	1
			0.8481 (25.4%) 487.8 (74.6%)	Si	
		b	1.054 (27.8%) 585.7 (72.2%)	Si	
		c			
Externo= 2 Interno= 2 (Punto sugerido)	0.7598	a	0.7069 (30.7%) 203.5 (44.1%) 2702 (14.6%)	Si	1
			9.998 (22.6%) 295.4 (77.4%)	Si	
		b	0.8300 (24%) 322.2 (76%)	Si	
		c			
Externo= 2 Interno= 3 (Punto sugerido)	0.6594	a	0.9547 (30.2%) 441.4 (69.8%)	Si	0.66
			264.1 (100%)	-	
		b	0.6213 (24.1%) 586.6 (75.9%)	Si	
		c			



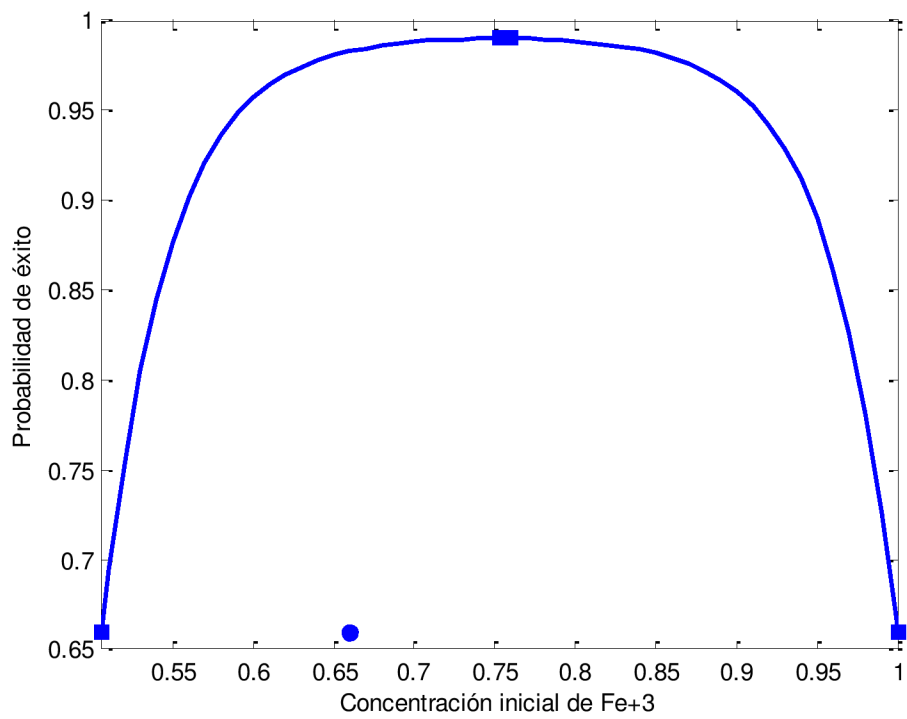
(a)



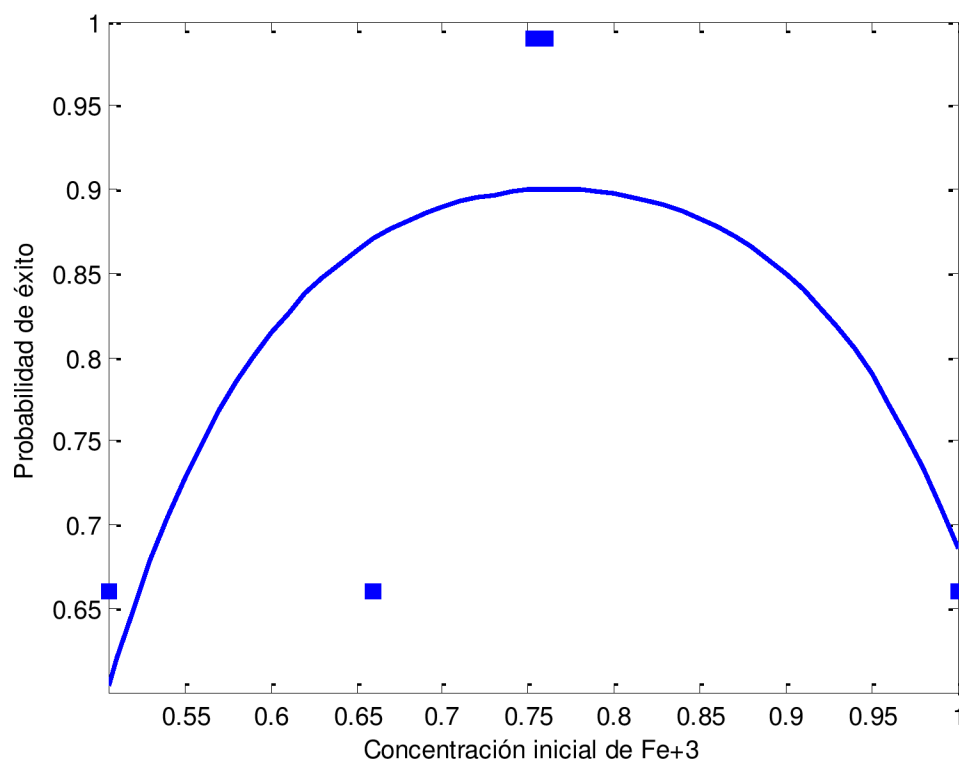
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 5.1: Curvas de respuesta sucesivas, obtenidas en cada iteración del método de diseño de experimentos basado en la probabilidad aplicado al proceso de síntesis de SPIONs. Cuadrados azules: puntos experimentales utilizados para la regresión de la curva mostrada en la imagen; Círculos azules: siguiente punto experimental, sugerido por el método. (a) Bucle externo = 1, Bucle interno = 1; (b) Bucle externo = 1, Bucle interno = 2; (c) Bucle externo = 2, Bucle interno = 1; (d) Bucle externo = 2, Bucle interno = 2; (e) Bucle externo = 2, Bucle interno = 3.

Tabla 5.3: Resumen de resultados para la aplicación de la metodología de diseño de experimentos basada en la probabilidad, al proceso de síntesis de SPIONs.

Bucle externo	Límite inferior de concentración de Fe^{+3} (mol/L)	Límite superior de concentración de Fe^{+3} (mol/L)	Óptima concentración de Fe^{+3} (mol/L)	Probabilidad de éxito	Total de puntos experimentales requeridos
1	0.010	1.000	0.7525	0.6974	4
2	0.5050	1.000	0.7734	0.6835	5 (2 repetidos)
3	0.6427	0.8902	0.7664	0.9001	0

5.3 Conclusiones

Mediante la aplicación de la metodología de diseño experimental que fue desarrollada en esta tesis con el objetivo específico de poder ser aplicada a procesos innovadores, se logra entonces evaluar experimentalmente el nuevo proceso de producción de nanopartículas magnéticas propuesto también en esta tesis, y para el cual no existen modelos fundamentales que describan adecuadamente la relación entre las variables controladas y las propiedades de uso final del producto. Se analiza la influencia de la variable crítica de operación, correspondiente a la concentración inicial de reactivos, y se consigue determinar la política óptima de trabajo del proceso de síntesis que permite garantizar, con alta probabilidad, el cumplimiento del tamaño de partícula establecido. De este modo se puede demostrar la reproducibilidad del nuevo proceso de síntesis, característica importante para la escalabilidad a nivel industrial del mismo.

6 CONCLUSIONES

6.1 Conclusiones Finales

Como punto de partida del presente trabajo, se presenta una emergente y novedosa terapia de tratamiento oncológico, que aspira a poder alcanzar un tratamiento localizado de ciertos tumores, lo cual permitirá reemplazar los tratamientos convencionales generalizados, evitando los efectos adversos que conllevan estos últimos. Para lograrlo, es imprescindible en primer lugar, brindar una solución tecnológica que permita la producción del medicamento necesario para esta nueva terapia, en cantidad y calidad adecuada. En la presente tesis, se plantea entonces la problemática de diseño y desarrollo de un nuevo proceso productivo de síntesis de SPIONs para uso en biomedicina. Este nuevo proceso, debe ser escalable y reproducible, para asegurar las propiedades de uso de un producto tan delicado, como lo es una droga para administración en el organismo.

Para el abordaje de la temática, en primer lugar se analiza el escenario actual donde el empleo de nanomateriales en diversos campos, como la medicina o medio ambiente, podría generar un salto cuantitativo en eficiencia y eficacia. Más concretamente para este caso en particular, se evalúan en detalle aquellas características que debe cumplir un proceso escalable y reproducible de síntesis a fin de alcanzar el objetivo de producir SPIONs aptas para uso médico. Se ha realizado también un análisis pormenorizado de las propiedades de uso final que deben cumplir las SPIONs para aplicaciones en medicina y para brindar las garantías y seguridades que se requieren para ser administradas en el cuerpo humano. Finalmente, se ha hecho una revisión de los procesos alternativos disponibles para la producción de SPIONs. Sobre la base de información disponible en la literatura y los experimentos realizados, se ha desarrollado y diseñado un nuevo proceso de producción que satisface los requisitos impuestos.

Se presenta entonces, una nueva ruta de síntesis de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita, con cuatro variantes de producción, a fin de brindar un recubrimiento de superficie (PEG) o estabilidad en solución (TMAOH). Los productos obtenidos en cada una de estas alternativas de síntesis se analizan convenientemente con las técnicas de caracterización pertinentes para evaluar sus propiedades de uso (DLS –tamaño y potencial zeta-, análisis termogravimétrico y propiedades magnéticas) e identificar al compuesto obtenido (difracción de rayos X, espectroscopia Raman e infrarrojo). De este modo, se está en condiciones de

afirmar que el proceso propuesto y ensayado experimentalmente permite sintetizar de manera reproducible un producto final de similares características a los productos obtenidos en ensayos de laboratorio por procesos alternativos de síntesis, que en general no son aptos para un escalado a nivel industrial y para los cuales no se dispone de estudios de reproducibilidad de las propiedades del producto final.

Disponiendo entonces de un nuevo proceso de síntesis, novedoso y del cual no se conocen sus principios fundamentales, se presenta la necesidad obligatoria de evaluar su funcionamiento a fin de garantizar la reproducibilidad del mismo. Para hacer frente a esta situación, se presenta también en este trabajo, el diseño y desarrollo de una nueva metodología de diseño experimental basada en datos de probabilidad, la cual permite evaluar la reproducibilidad y ajustar las variables operativas en un valor óptimo que garantice obtener un producto final que cumpla con alta probabilidad las condiciones de uso requeridas para el mismo. Dicha metodología es testada *in silico* a fin de verificar su correcto funcionamiento. Por último, se procede a aplicar esta metodología a la nueva síntesis de SPIONs propuesta, mediante lo cual se llega a comprobar la reproducibilidad del proceso y se ajusta la variable crítica del mismo (concentración de reactivos) en el valor adecuado.

6.1.1 Principales contribuciones e importancia de la tesis

De manera más puntual, se pueden citar las dos principales contribuciones de la presente tesis, que resultan: por un lado, el diseño de una nueva metodología de diseño experimental para análisis de reproducibilidad y búsqueda de una política óptima de operación, aplicable a procesos innovadores que carecen de principios fundamentales ya definidos; y por otro lado, el diseño de un nuevo proceso de síntesis de SPIONs para uso en biomedicina, que cumple con los requerimientos de escalabilidad y reproducibilidad. Los detalles de los aportes específicos de cada uno de estos dos aspectos, se presentan en los siguientes incisos.

La importancia del trabajo se centra en brindar una solución ingenieril en lo que respecta al diseño de proceso y producto, para una tecnología emergente que ofrece la posibilidad de un nuevo tratamiento de ciertos tumores. La originalidad radica en el desarrollo de una nueva síntesis alternativa a las clásicas de bibliografía, para conseguir un producto que cumple con los requisitos de propiedades de uso final; y en el desarrollo de una nueva herramienta para evaluar el funcionamiento de procesos sin necesidad de recurrir a ecuaciones fundamentales que los describan. Mediante una

comprobación experimental de las propuestas de síntesis utilizando la metodología de diseño experimental, se logró validar el nuevo proceso productivo de SPIONs.

6.1.1.1 Principales características de la metodología de diseño de experimentos basada en la probabilidad de éxito

La metodología de diseño experimental basada en datos de probabilidad de éxito, presenta las siguientes características:

- Es aplicable a procesos innovadores, cuyos principios de funcionamiento y ecuaciones descriptivas aún no han sido desarrolladas. Esta aplicabilidad de la metodología es debido a que la misma opera en función de datos exclusivamente experimentales, que miden el éxito o fracaso en la obtención del producto deseado en determinado punto experimental, y en base a ello, calcula la probabilidad de éxito en ese punto en particular.
- Al hacer uso exclusivo de datos experimentales, sin involucrar modelos fundamentales, el método permite incorporar en el análisis todos aquellos factores no controlables del sistema, realizándose así, un estudio holístico y completo del proceso y sus variables (tanto las controlables, como las no controlables).
- El algoritmo recurre a un criterio compuesto para el diseño experimental óptimo, con el fin de equilibrar la precisión paramétrica con la probabilidad de éxito. De este modo, en cada bucle, va buscando el óptimo en base a estos dos criterios superpuestos.
- Así, se genera una secuencia de ensayos a fin de aprovechar el conocimiento disponible para maximizar las probabilidades de éxito, y al mismo tiempo, explorar el espacio de las variables independientes para realizar una estimación eficiente de parámetros.
- Permite realizar los ajustes adecuados de las variables críticas del proceso, en busca de hallar la política óptima de funcionamiento que garantice el cumplimiento, con alta probabilidad, de las especificaciones del proceso y/o producto.
- La estrategia de optimización, va reduciendo la zona de operación orientándose hacia una región reducida de trabajo con altas probabilidades de éxito, a la vez que se va perfeccionando el modelo de superficie de respuesta.
- Cuando la variabilidad intrínseca del proceso se encuentra dentro de valores razonables, la metodología logra hallar eficientemente la zona óptima de operación que cumpla con alta probabilidad las propiedades de uso finales. De otro modo, si la variabilidad es demasiado alta, los resultados obtenidos disminuyen su efectividad en la búsqueda de la región óptima de operación.
- Tiene el objetivo de reducir los recursos experimentales a fin de conseguir la máxima información para un esfuerzo experimental dado, adecuando así los costos experimentales.

- El objetivo final del método implica sugerir, después de una cantidad relativamente pequeña de experimentos, una política de funcionamiento que maximice la probabilidad de éxito de alcanzar las especificaciones requeridas.

6.1.1.2 Principales características de la nueva ruta de síntesis de SPIONs

El proceso de síntesis de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita desarrollado en la tesis posee las siguientes ventajas:

- Es un proceso simple, de pocas etapas, que permite la posibilidad de ser escalado a nivel industrial.
- No utiliza como reactivos (ni en ninguna etapa del proceso) sales de cloruros, por lo que permite pensar una futura aplicación en equipos industriales, sin la posibilidad de llegar a corroerlos.
- Reemplaza las sales de cloruro por una reacción de óxido-reducción mediante la cual se logra obtener los reactivos de síntesis ($\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$) en las proporciones y cantidades adecuadas para la estequiometría de reacción de formación de la magnetita.
- Como medio alcalino de síntesis, reemplaza al hidróxido de amonio tradicional de bibliografía y utiliza hidróxido de sodio, siendo este último más seguro y práctico en cuanto a su uso.
- Permite obtener productos de similares características a aquellos obtenidos mediante las rutas tradicionales de bibliografía, las cuales no son escalables industrialmente.
- Es un proceso reproducible, lo cual queda demostrado mediante el análisis aplicando la metodología de diseño experimental basada en datos.

6.2 Propuestas de trabajos futuros

6.2.1 Presentación de trabajos con base en la investigación de la presente tesis

Se pretende elaborar dos artículos para publicación en revistas científicas con el material desarrollado en esta tesis doctoral. Uno de ellos, reportando el nuevo proceso de síntesis de SPIONs, reproducible y escalable a nivel industrial. El otro de ellos, detallando la aplicación de la metodología de diseño experimental aplicada al nuevo proceso de síntesis de SPIONs a modo de evaluar su reproducibilidad y hallar el óptimo de operación de la variable crítica del proceso.

6.2.2 Continuación de la línea de investigación

Para dar continuidad a la investigación en el desarrollo de procesos nanotecnológicos, se considera continuar con el objetivo general del diseño óptimo del proceso de producción de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro recubiertas con polietilenglicol y funcionalizadas con drogas oncológicas, de modo de garantizar la reproducibilidad y escalabilidad del proceso. En particular, se intentará sintetizar una cantidad de medicamento suficiente como para abastecer los requerimientos de pruebas clínicas y aplicaciones en gran escala.

Más específicamente, se desea dar continuidad al objetivo de funcionalizar las SPIONs con medicación de uso oncológico (combinando el pegilado y la adsorción de sustancias activas) y determinar la influencia de las variables de operación en las propiedades de uso final de las nanopartículas funcionalizadas, a fin de identificar las condiciones operativas óptimas para distintas etapas del proceso de funcionalización. En lo que respecta a la funcionalización de SPIONs con medicamento oncológico, se considerará particularmente la incorporación de doxorubicina (DOX), un antibiótico utilizado frecuentemente en tratamientos oncológicos. En la literatura se destaca la efectividad terapéutica de la DOX y el empleo de SPIONs con un recubrimiento superficial y funcionalizadas con DOX como sustancia activa permitiría un importante avance en la efectividad de tratamientos oncológicos con una significativa reducción de las dosis de drogas utilizadas, que redundaría en una importante disminución de los efectos secundarios típicos de la quimioterapia convencional. En base a la síntesis de producción de SPIONs ya diseñada en la tesis, se pretende continuar con los ensayos pertinentes que permitan funcionalizar las mismas incorporando DOX en su estructura.

Las tareas a desarrollar incluyen: diseño, planificación y realización de ensayos experimentales que permitan optimizar el proceso de funcionalización de SPIONs con drogas oncológicas, caracterización y análisis de las SPIONs funcionalizadas e identificación de las variables críticas del proceso de funcionalización. Finalmente, se abordará el desarrollo de modelos predictivos de las propiedades de uso final aplicando la metodología de diseño de experimentos propuesta en la tesis, a modo de evaluar la influencia de las condiciones operativas sobre las propiedades de uso de las nanopartículas funcionalizadas.

ANEXO I

Influencia del diseño experimental inicial (Capítulo 2)

Se consideran tres alternativas de diseño inicial ξ_0 para evaluar el efecto de esta elección en la tasa de convergencia de la metodología propuesta. Para ello, se muestran las evoluciones de las superficies de respuesta de la probabilidad de éxito $\pi(\theta_k, x)$. Tres alternativas de diseño inicial son consideradas: (i) diseño compuesto central fraccional, (ii) diseño factorial más un punto en el centro y un punto en el medio de uno de los límites de la inicial *ROI*, y (iii) elección al azar de seis puntos dentro de la *ROI* inicial. En las Figuras I.1, I.2 y I.3, se muestran las evoluciones de las superficies de respuesta del modelo $\pi(\theta_k, x)$ a medida que se van agregando puntos experimentales en cada iteración del bucle interno.

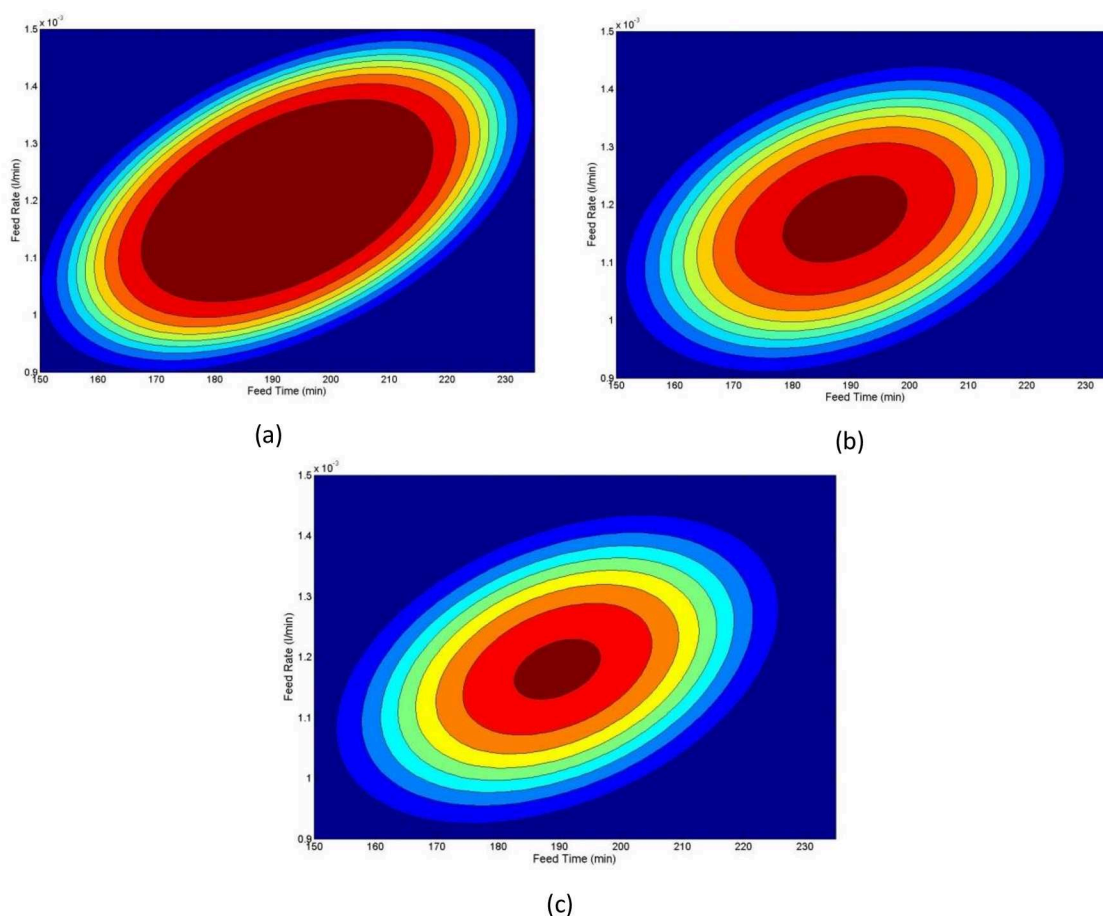
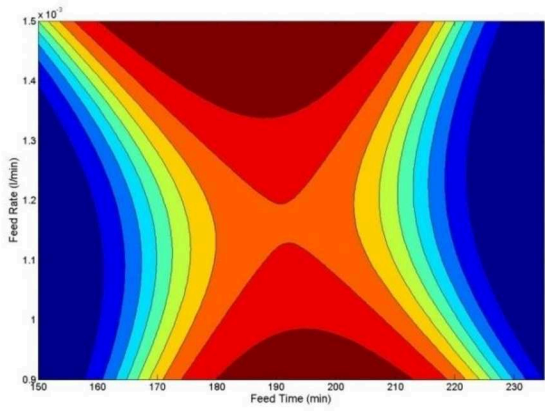
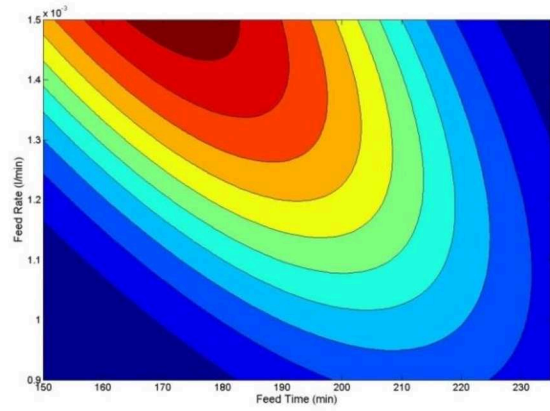


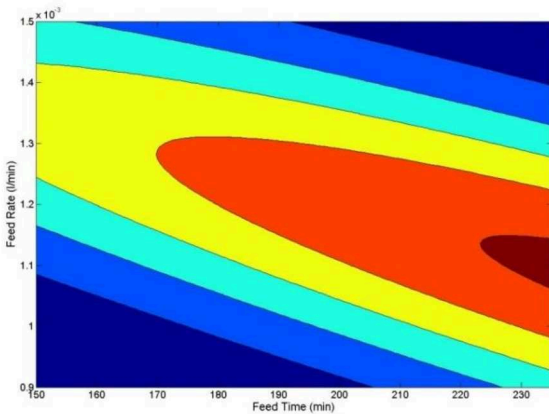
Figura I.1: Evolución de las superficies de respuesta $\pi(\theta_k, x)$ utilizando el diseño inicial ξ_0 correspondiente a la Fig. 3a. (a) iteración #1; (b) iteración #2; (c) iteración #3.



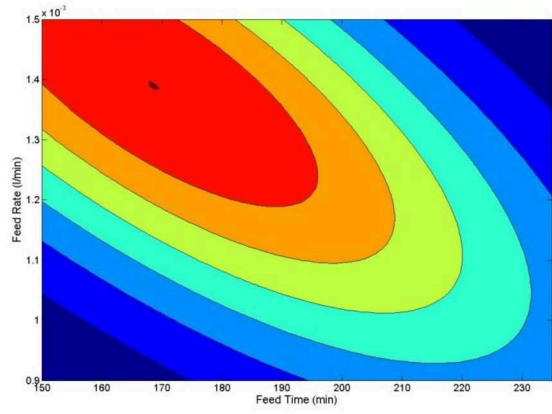
(a)



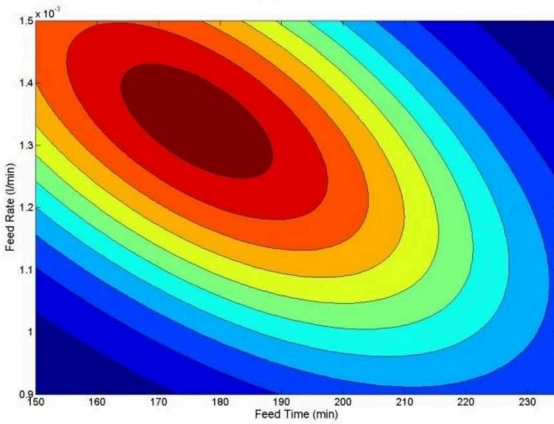
(b)



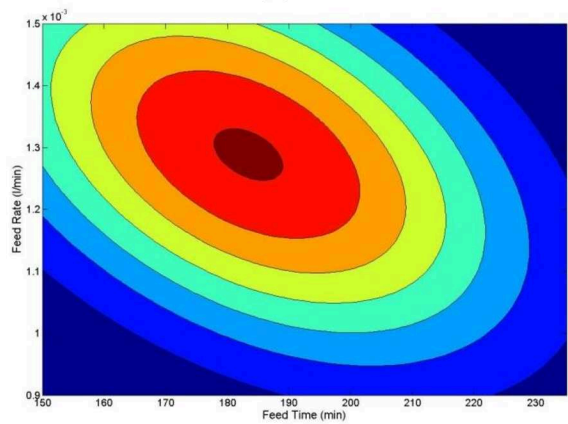
(c)



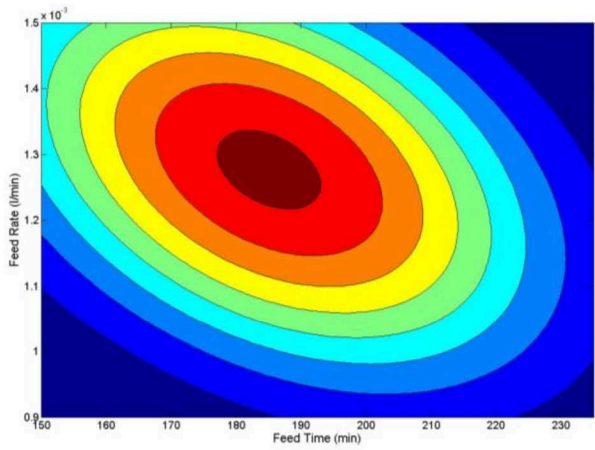
(d)



(e)

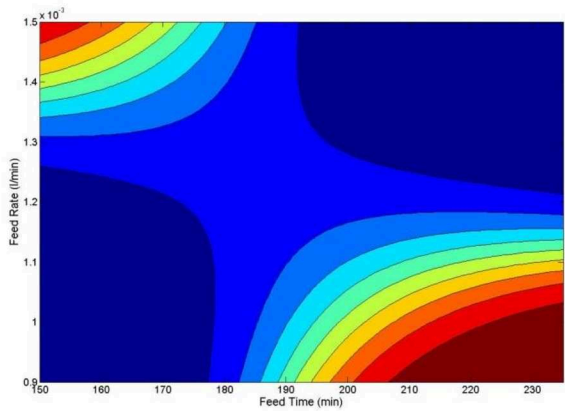


(f)

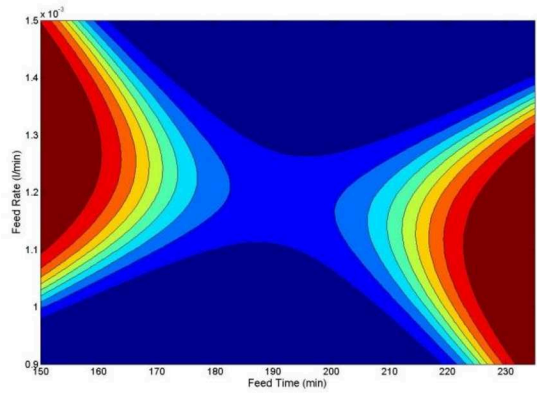


(g)

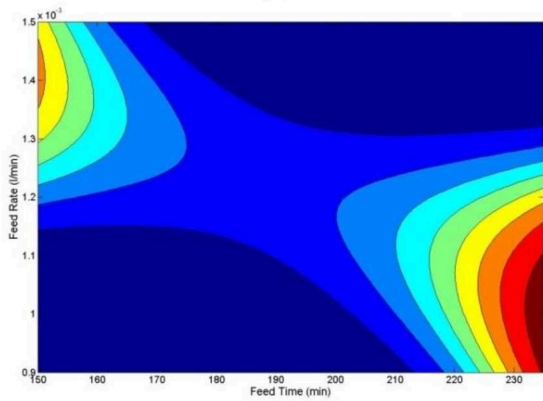
Figura 1.2: Evolución de las superficies de respuesta $\pi(\theta_k, x)$ utilizando el diseño inicial ξ_0 correspondiente a la Fig. 3b. (a) iteración #1; (b) iteración #2; (c) iteración #3; (d) iteración #4; (e) iteración #5; (f) iteración #6; (g) iteración #7.



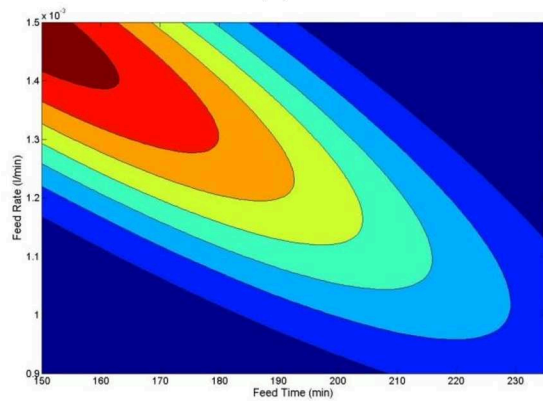
(a)



(b)



(c)



(d)

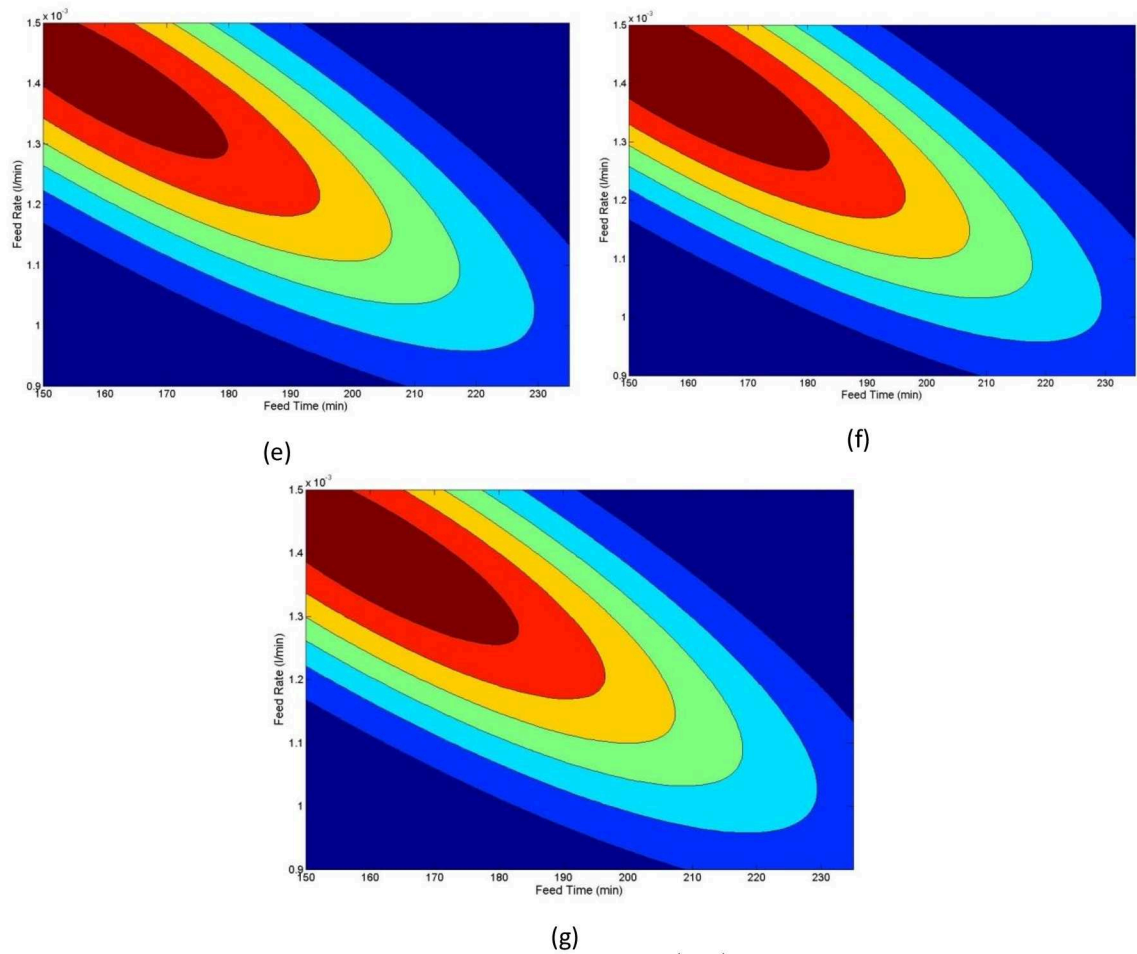


Figura I.3: Evolución de las superficies de respuesta $\pi(\theta_k, x)$ utilizando el diseño inicial ξ_0 correspondiente a la Fig. 3c. (a) iteración #1; (b) iteración #2; (c) iteración #3; (d) iteración #4; (e) iteración #5; (f) iteración #6; (g) iteración #7.

ANEXO II

Modelo matemático del proceso de polimerización por emulsión de estireno (Capítulo 2)

La polimerización por emulsión de estireno es un conocido proceso de gran interés industrial para el cual se encuentran disponibles los modelos matemáticos que ajustan sus primeros principios de su funcionamiento.¹⁻³ Los modelos cinéticos y las ecuaciones de conservación están compuestos por: balance de volumen del medio de reacción, balance de volumen de partículas de cada población, balance molar de monómero, balance del número promedio de radicales por partículas para cada población, tasa de polimerización para cada población, tasa de adición de agente de transferencia de cadena (CTA), balance molar del iniciador y balance molar del agente de transferencia de cadena. El modelo completo para un reactor de polimerización semi-batch es:¹⁻³

$$\frac{dV_r}{dt} = \frac{F_m MW_m}{\rho_m} + \sum_i R_{p_i} V_r MW_m \left(\frac{1}{\rho_p} - \frac{1}{\rho_m} \right) \quad (6A)$$

$$\frac{dV_i}{dt} = \frac{F_m MW_m}{\rho_m} + R_{p_i} V_r MW_m \left(\frac{1}{\rho_p} - \frac{1}{\rho_m} \right) \quad (7A)$$

$$\frac{dm_p}{dt} = F_m - \sum_i R_{p_i} V_r \quad (8A)$$

$$\frac{d\bar{n}_i}{dt} = \sigma_i - k_i \bar{n}_i - \frac{f_i k_t \bar{n}_i}{V_{s_i} N_a} \quad (9A)$$

$$R_{p_i} = \frac{k_p \bar{n}_i [M]_p N_i}{N_a V_r} \quad (10A)$$

$$R_{CTA_i} = \frac{k_{CTA} \bar{n}_i [M]_p N_i}{N_a V_r} \quad (11A)$$

$$\frac{dl}{dt} = -k_d l \quad (12A)$$

$$\frac{dX_p}{dt} = F_{CTA} - \sum_i R_{CTA_i} V_r \quad (13A)$$

Dónde MW_m es el peso molecular del monómero [g/mol], ρ_p y ρ_m son las densidades del polímero y monómero en [g/L], F_M y F_{CTA} son las tasas de alimentación del monómero y del agente de transferencia de cadena en [mol/s], k_i es el coeficiente de tasa de desorción [1/s], σ_i es la tasa de absorción de radicales [1/s], k_t es el coeficiente de tasa de terminación [L/(mol·S)], V_{Si} es el volumen de población de partículas mojadas i en [L], N_a es el número de Avogadro, k_p es el coeficiente de propagación [L/(mol·S)], M_p es la concentración de monómero en las partículas [mol/L], N_i es el número total de partículas de población i en el reactor, y k_d es el coeficiente de tasa de descomposición del iniciador [1/s]. Las relaciones constitutivas necesarias para calcular los valores de los parámetros de las ecuaciones de conservación enunciadas arriba son:¹⁻³

$$k_i = k_{fm} [M]_p \frac{K_{oi}}{K_{oi} \beta + k_p [M]_p} \quad (14A)$$

$$k_p = k_{p0} \exp \left(B \left(\frac{1}{\nu_{fmc}} - \frac{1}{\nu_f} \right) \right) \quad (15A)$$

$$\nu_f = \nu_{fm} \phi_m + \nu_{fp} (1 - \phi_m) \quad (16A)$$

$$\nu_{fm} = 0.112 + 6.2 \times 10^{-4} T \quad (17A)$$

$$\nu_{fp} = 0.0245 + 1.4 \times 10^{-4} (T - 82) \quad (18A)$$

$$f_i = \frac{2(2\sigma_i + k_i)}{2\sigma_i + k_i + \frac{k_t}{V_{Si} N_a}} \quad (19A)$$

$$K_{oi} = \frac{\frac{12D_w}{m_d D_{Si}^2}}{1 + \frac{2D_w}{m_d D_p}} \quad (20A)$$

$$k_t = k_{t0} \exp(-19W_p^{2.1}), \text{ for } : W_p < 0.75 \quad (21A)$$

$$\sigma_i = k_{ai} [R]_w \quad (22A)$$

$$k_t = -0.707 \times 10^{-6} W_p^3 + 1.886 \times 10^{-6} W_p^2 - 1.675 \times 10^{-6} W_p + 0.496 \times 10^{-6}, \text{ for } : W_p \quad (23A)$$

$$k_{ai} = k_{adj} D_{Si}^\alpha \quad (24A)$$

$$\frac{d[R]_w}{dt} = 2f_d k_d [I] + \sum_i k_i \frac{\bar{n}_i N_1}{V_w N_a} - \sum_i k_{ai} [R]_w \frac{N_1}{V_w N_a} - k_{tw} [R]_w^2 = 0 \quad (25A)$$

Para implementar este sistema como un caso de estudio para evaluar el diseño óptimo basado en la probabilidad, resulta de particular interés lograr dos especificaciones de punto final en el producto: índice de fluidez (MI) y resistencia a la tracción (σ). Estas propiedades pueden ser estimadas convenientemente mediante el uso de correlaciones dependientes del peso molecular promedio en peso (MW_w) y del peso molecular promedio en número (MW_n), respectivamente:⁴

$$MI = \frac{30}{(MW_w^{3.4} \times 10^{-18} - 0.2)} \quad (26A)$$

$$\sigma = 7390 - 4.51 \times 10^8 \left(\frac{1}{MW_n} \right) \quad (27A)$$

Dónde MW_w y MW_n pueden ser calculados como sigue:^{5,4 y 6}

$$MW_w = \frac{\sum_{i=0}^{n_p} \lambda_i^2 + \sum_{i=0}^{n_p} \mu_i^2}{\sum_{i=0}^{n_p} \lambda_i^1 + \sum_{i=0}^{n_p} \mu_i^1} \quad (28A)$$

$$MW_n = \frac{\sum_{i=0}^{n_p} \lambda_i^1 + \sum_{i=0}^{n_p} \mu_i^1}{\sum_{i=0}^{n_p} \lambda_i^0 + \sum_{i=0}^{n_p} \mu_i^0} \quad (29A)$$

Dónde λ_i^j es el j^{th} momento de la cadena de polímeros *viva* de la especie i y μ_i^j es el j^{th} momento de la cadena de polímero *muerta* de la especie i . Los balances correspondientes de momentos de cadenas de polímero vivas y muertas son:⁴⁻⁶

$$\lambda_i^0 = \frac{\bar{n}_i}{N_a} \quad (30A)$$

$$\frac{d\lambda_i^1}{dt} = \frac{(\sigma_i - k_i \bar{n}_i)}{N_a} + k_p [M]_p \lambda_i^0 + (k_{fm} [M]_p - k_{CTA} X_{CTA}) (\lambda_i^0 - \lambda_i^1) - \frac{f_i k_t \lambda_i^1}{V_{Si}} \quad (31A)$$

$$\frac{d\lambda_i^2}{dt} = \frac{(\sigma_i - k_i \bar{n}_i)}{N_a} + k_p [M]_p (\lambda_i^0 + 2\lambda_i^1) + (k_{fm} [M]_p - k_{CTA} X_{CTA}) (\lambda_i^0 - \lambda_i^2) - \frac{f_i k_t \lambda_i^0 \lambda_i^2}{V_{Si}} \quad (32A)$$

$$\frac{d\mu_i^0}{dt} = (k_{fm} [M]_p - k_{CTA} X_{CTA}) (\lambda_i^0) + \frac{f_i k_t (\lambda_i^0)^2}{V_{Si}} \quad (33A)$$

$$\frac{d\mu_i^1}{dt} = (k_{fm} [M]_p - k_{CTA} X_{CTA}) (\lambda_i^1) + \frac{f_i k_t (\lambda_i^0 \lambda_i^1)}{V_{Si}} \quad (34A)$$

$$\frac{d\mu_i^2}{dt} = (k_{fm} [M]_p - k_{CTA} X_{CTA}) (\lambda_i^2) + \frac{f_i k_t (\lambda_i^0 \lambda_i^2 + (\lambda_i^1)^2)}{V_{Si}} \quad (35A)$$

Bibliografía

- (1) Liotta, V.; Georgakis, C.; Sudol, E. D.; El-Aasser, M. S. Manipulation of Competitive Growth for Particle Size Control in Emulsion Polymerization. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1997**, *36* (8), 3252.
- (2) Li, B.-G.; Brooks, B. W. Prediction of the Average Number of Radicals per Particle for Emulsion Polymerization. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **1993**, *31*, 2397.
- (3) Liotta, V.; Sudol, E. D.; El-Aasser, M. S.; Georgakis, C. On-Line Monitoring, Modeling, and Model Validation of Semibatch Emulsion Polymerization in an Automated Reactor Control Facility. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **1998**, *36*, 1553.
- (4) Valappil, J.; Georgakis, C. Nonlinear Model Predictive Control of End-Use Properties in Batch Reactors. *Am. Inst. Chem. Eng.* **2002**, *48* (9), 2006.
- (5) Crowley, T. J.; Choi, K. Y. Calculation of Molecular Weight Distribution from Molecular Weight Moments in Free Radical Polymerization. *Ind. Eng. Chem. Res.* **1997**, *36* (5), 1419.
- (6) Katz, S.; Saldel, G. M. Moments of the Size Distribution in Radical Polymerization. *Am. Inst. Chem. Eng.* **1967**, *13* (2), 319.

ANEXO III

Gráficas de la primera etapa del análisis TGA (Capítulo 4)

En las Figuras III.1 a III.5 se muestran las gráficas correspondientes a la primera etapa del análisis TGA para cada una de las muestras de nanopartículas producidas y para el PEG puro. Esta primera etapa consiste en un calentamiento de la muestra desde temperatura ambiente hasta 120 °C, con el objeto de evaporar el solvente y obtener una muestra seca para realizar el posterior análisis. En dichas gráficas se puede apreciar el proceso de pérdida de masa por evaporación del agua remanente en la muestra. Para el caso del PEG se observa además una pequeña adsorción de material en un proceso endotérmico, lo cual puede atribuirse a la adsorción de algún gas sobre la muestra.

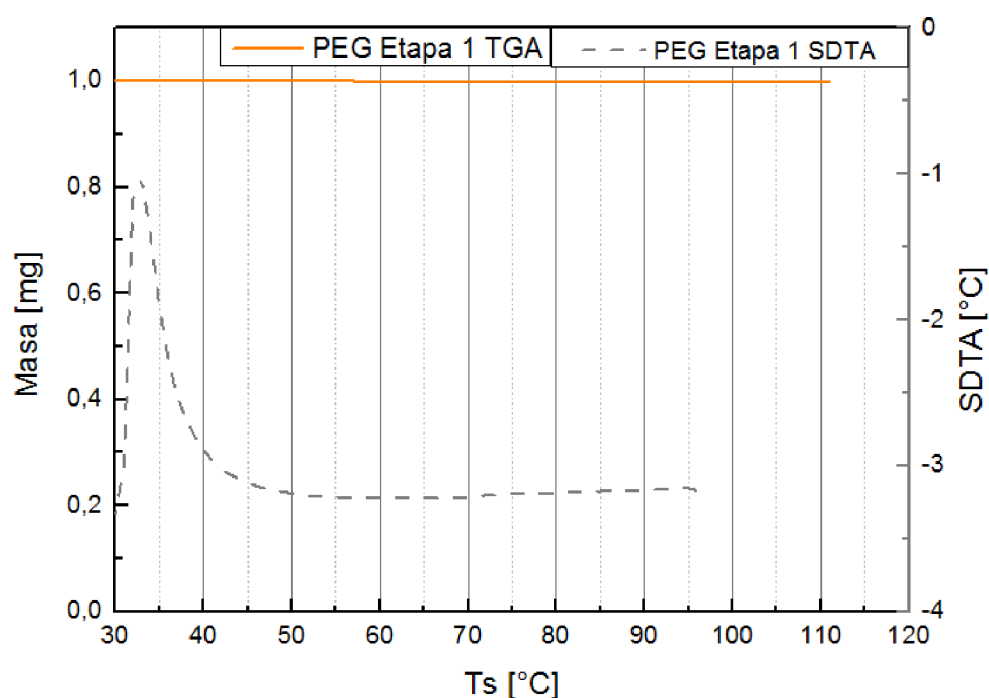


Figura III.1: Primer etapa del análisis TGA de la muestra de PEG puro.

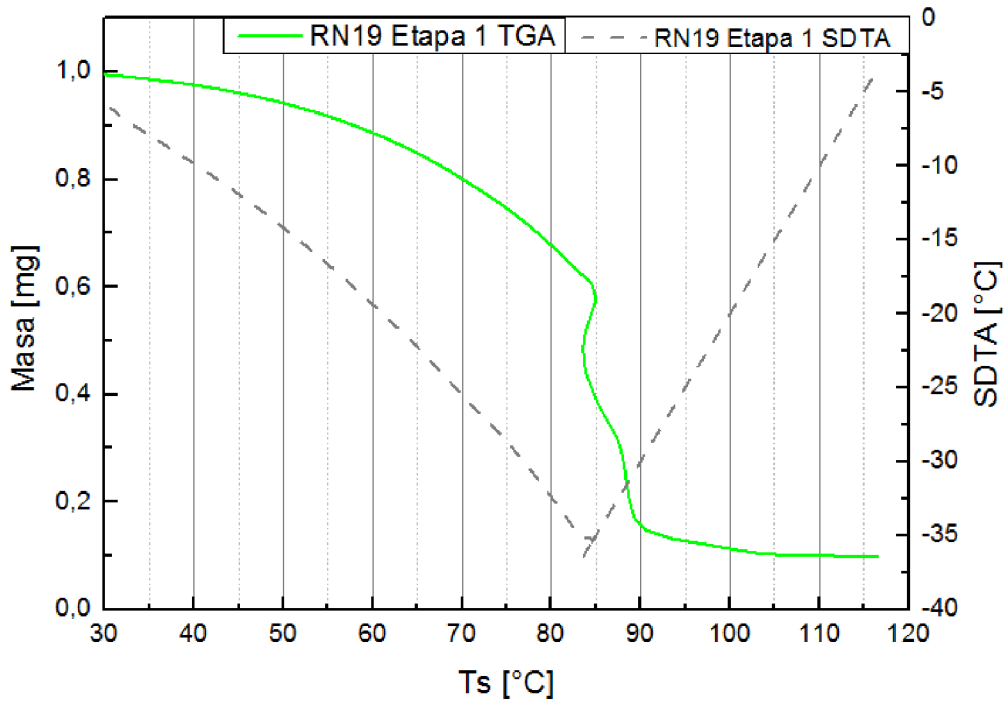


Figura III.2: Primer etapa del análisis TGA de la muestra RN19.

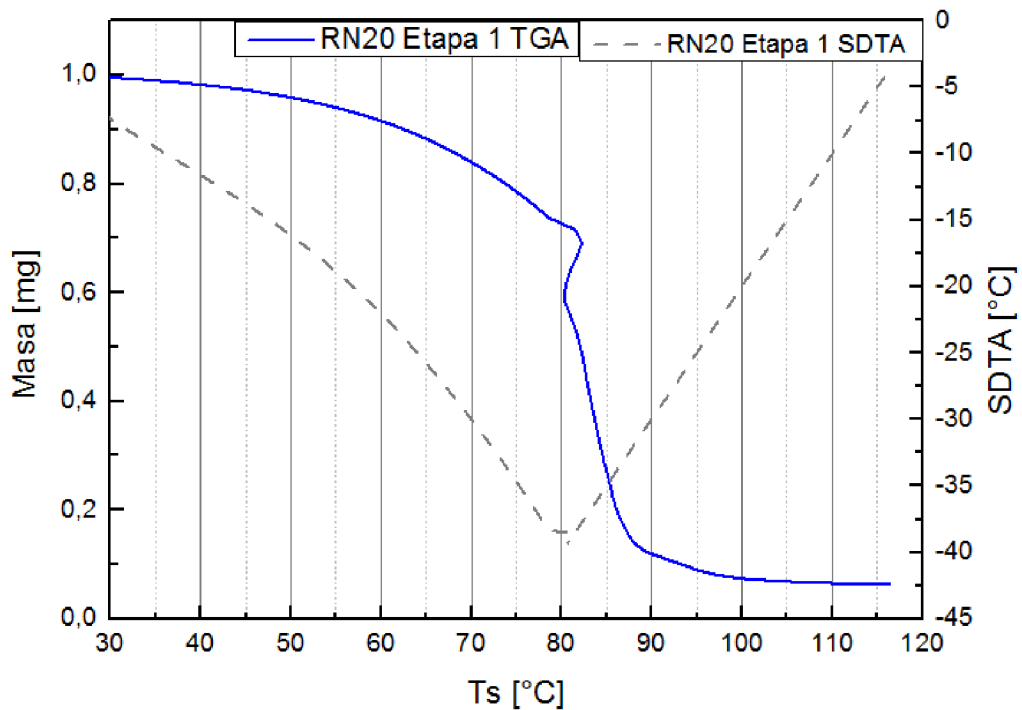


Figura III.3: Primer etapa del análisis TGA de la muestra RN20.

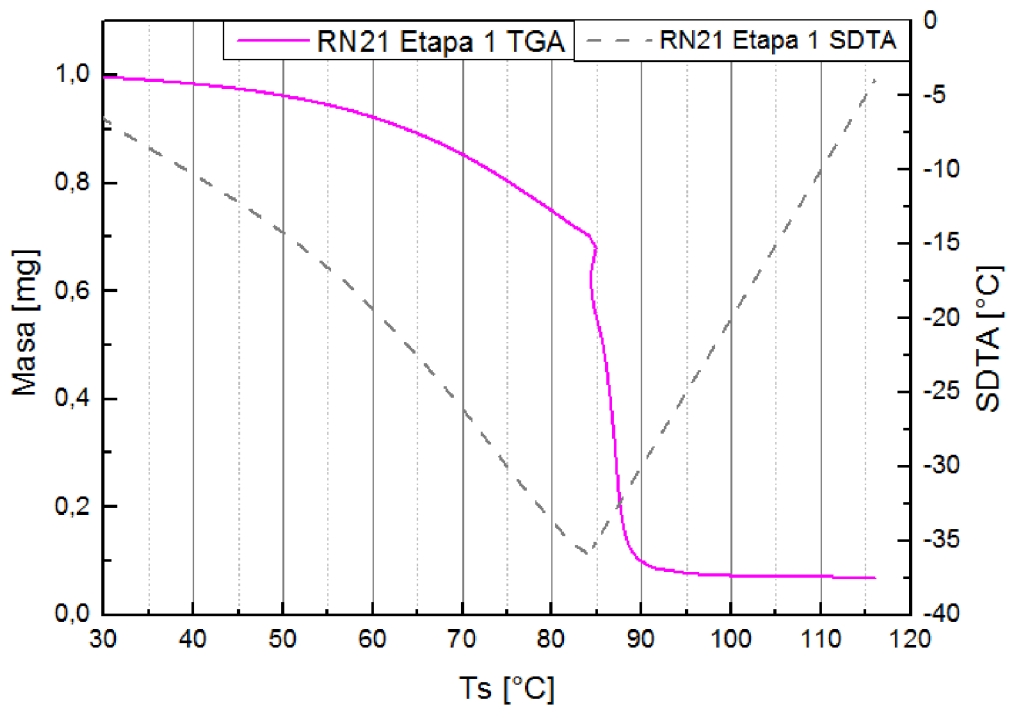


Figura III.4: Primer etapa del análisis TGA de la muestra RN21.

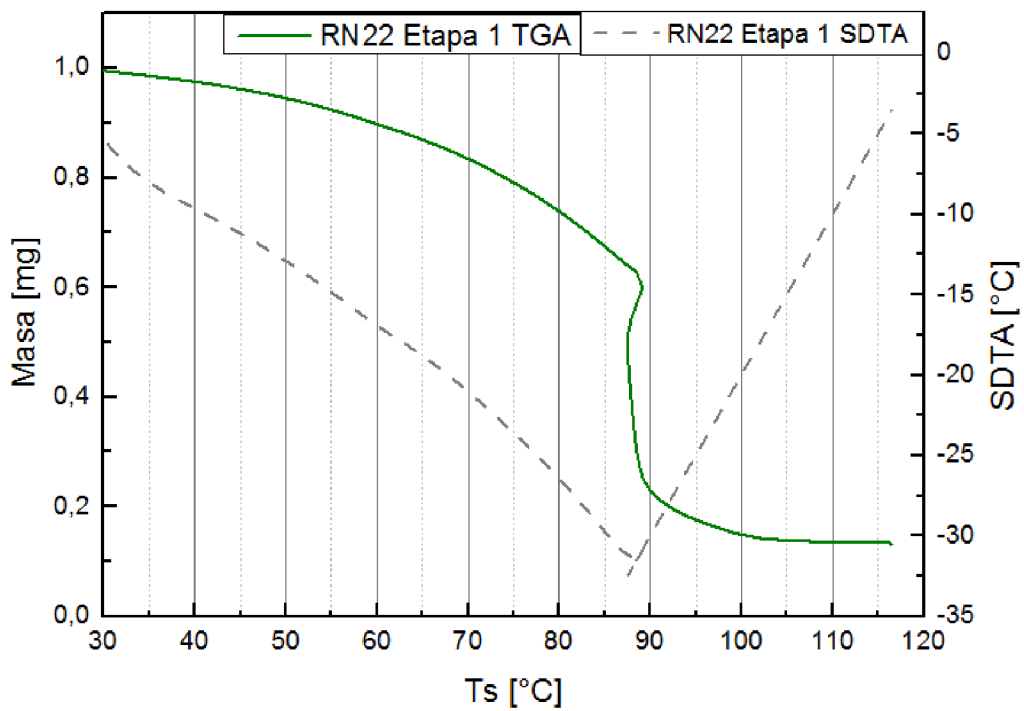


Figura III.5: Primer etapa del análisis TGA de la muestra RN22.