



Centro de Investigación en Química Aplicada

Título de Tesis:

Efecto del Flujo de Dosificación de Monómero en la Preparación de Nanopartículas de Poli (etil cianoacrilato) Mediante Polimerización en Heterofase en Semicontinuo. Cargado de las Nanopartículas con Rifampicina.

Presentado por:

Q.F.B. Cynthia Lizeth Barrera Martínez.

Para obtener el grado de:

Maestría en Tecnología de Polímeros.

Asesores:

Dr. Raúl Guillermo López Campos.

M.C. Hened Saade Caballero.

Saltillo, Coahuila

Agosto 2015

RESUMEN

Se estudió la polimerización aniónica del etil cianoacrilato en dispersión acuosa. Para ello se empleó la técnica de polimerización en heterofase en semicontinuo en la cual se buscó operar en condiciones de avidez de monómero con el propósito de obtener partículas del menor tamaño posible. Se varió el flujo de dosificación del monómero lo que permitió encontrar que había una relación inversa entre la conversión instantánea y el flujo. También se determinó que el tamaño de partícula medido por microscopía electrónica de barrido-transmisión aumentó con el incremento en el flujo de dosificación. Respecto al peso molecular se estableció que una disminución del flujo generó la formación de cadenas de mayor longitud, lo cual se atribuyó a una mayor relación partículas/iones H^+ , considerando que estos iones participan en la reacción de terminación de las cadenas poliméricas. Sin embargo, aún al flujo más bajo, los pesos moleculares fueron relativamente pequeños, del orden de $(2-3) \times 10^3$ Da en Mn. Como resultados prácticos interesantes y novedosos se puede mencionar la obtención de nanopartículas de poli (etil cianoacrilato), distribuidas en una sola población, con cerca de 30 nm de diámetro promedio y dispersas en una fase acuosa en la cual constituyen más de 10 % del peso. En la parte final del trabajo se estudió el cargado de las nanopartículas con el fármaco antituberculosis Rifampicina, tarea en la cual se obtuvieron cargas de hasta 12.7 % del fármaco con eficiencias de cargado mayores que 80 %. Las pruebas de liberación indicaron que la Rifampicina se liberaba desde las nanopartículas en un medio acuoso a pH de 7.2 más lentamente que en su estado libre, siguiendo el modelo de Higuchi.

ÍNDICE.

1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.	2
2.1. Micro y nanopartículas poliméricas para administración de fármacos.	2
2.2. Preparación de partículas de poli (alquil cianoacrilato).	4
2.3. Rifampicina.	20
2.3.1. ¿Qué es la Rifampicina?	20
2.3.2. Micro y nanopartículas poliméricas cargadas con Rifampicina.....	23
2.4. Justificación del trabajo de tesis.....	25
3. Hipótesis y Objetivo.	26
3.1. Hipótesis.....	26
3.2. Objetivo general.....	27
3.3. Objetivos específicos.	27
4. Parte Experimental.....	27
4.1. Reactivos y Materiales.....	27
4.2. Equipo.....	28
4.2.1. Polimerizaciones	28
4.2.2. Cargado de RIF	29
4.2.3. Pruebas de liberación.....	29
4.2.4. Caracterizaciones	30
4.3. Metodología	30
4.3.1. Polimerizaciones	30
4.3.2. Cargado de RIF	32
4.3.3. Pruebas de liberación.....	33
4.3.4. Caracterizaciones	34
5. Resultados y Discusión	36
5.1. Polimerización de ECA	36
5.1.1. Cinética.....	36
5.1.2. Evolución del tamaño de partícula	37
5.1.3. Evolución del peso molecular	43
5.1.4. Pruebas de cargado de RIF en nanopartículas de PECA.....	46

5.1.6. Pruebas de liberación de las nanopartículas de PECA cargadas con RIF ..	50
6. Conclusiones.....	53
7. Referencias.	55

1. INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas de los poli (alquil cianoacrilato), PACAs, son de gran interés debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad; la polimerización aniónica en emulsión es la técnica más ampliamente utilizada para su obtención [1, 2]. Los estudios sobre la preparación de este tipo de partículas [3, 4] enfatizan en la influencia del tipo y la concentración de tensoactivo, así como del pH inicial, sobre el tamaño de partícula, debido principalmente a la posible utilización de las nanopartículas de PACAs en el desarrollo de sistemas suministradores de fármacos en donde es deseable obtener nanopartículas ultrapequeñas. Tales partículas que van de 10 a 50 nm de diámetro promedio, son muy atractivas debido a que su tamaño tan pequeño dificulta su detección por el sistema inmunológico y facilita su penetración a los tejidos y células tumorales [5].

Los reportes en la literatura indican que diferentes tipos de dextranos [3] y tweens [6] son los tensoactivos más utilizados para la obtención de PACAs en polimerización en emulsión y que en general los tamaños de partícula más pequeños se han obtenido utilizando tweens. Por otra parte, los reportes sobre la influencia del pH han demostrado que las polimerizaciones llevadas a cabo a pH's menores a 1 y mayores a 3.5, no son recomendables debido a que producen partículas muy grandes y que las partículas más pequeñas son obtenidas a pH's cercanos a 2 [6, 7]. De la literatura revisada se concluyó que no existían reportes en los cuales se incluyera un análisis de los tamaños de partícula basado en mediciones por microscopía electrónica. Tampoco se encontró que se hubiera estudiado el efecto del flujo de dosificación del monómero sobre precisamente el tamaño de partícula.

En el presente trabajo de tesis se reportan los resultados del estudio del efecto del flujo de dosificación de monómero en la polimerización del etil cianoacrilato (ECA) mediante la técnica de polimerización en heterofase en semicontinuo. Las variables de respuesta consideradas fueron la conversión, el tamaño de partícula y el peso molecular. También se reportan los resultados del estudio de cargado de las nanopartículas de poli (etil cianoacrilato), PECA, con el fármaco Rifampicina (RIF) usado en el tratamiento de la tuberculosis.

2. ANTECEDENTES

2.1. Micro y nanopartículas poliméricas para administración de fármacos.

La investigación sobre la administración de medicamentos mediante su introducción al cuerpo a través de un sistema en escala micro o nano, compuesto por un material portador, normalmente inerte, y un fármaco, es un tema de actualidad mundial [9-11]. Estos sistemas ofrecen la posibilidad de maximizar la eficacia de los fármacos y de minimizar sus efectos laterales adversos en el tratamiento de enfermedades infecciosas y crónico-degenerativas [9-11]. Los primeros intentos de preparación de sistemas en escala micro como portadores de fármacos datan desde hace varias décadas [12-13]. A partir de entonces ha aparecido en la literatura especializada una gran cantidad de reportes sobre este tema [11]. A la fecha, debido a la complejidad de su desarrollo, son escasos los productos comerciales basados en esta forma de administración de medicamentos. Algunos nanosistemas comerciales para el suministro de fármacos son: Abraxane (taxano en partículas de albúmina); AmBisome (anfotericina B en liposomas) y Doxil (doxorubicina en liposomas) [11].

Algunas de las características de los nanosistemas portadores de fármacos responsables de la mejora en la eficacia del fármaco y en la reducción de sus efectos adversos son: i) capacidad de disolución de fármacos hidrófobos; ii) protección de los fármacos una vez que han ingresado al organismo, lo cual incrementa su vida media y la proporción de los mismos que llega a los sitios diana; iii) liberación controlada de los fármacos; iv) posibilidad de direccionamiento hacia los sitios diana, con lo cual se reduce el daño a las células sanas; y, v) apertura de vías alternas de ataque a las células cancerígenas o microorganismos, en el caso de infecciones, para enfrentar así los mecanismos de resistencia a los fármacos que éstos han creado.

Las nanopartículas poliméricas poseen una serie de ventajas sobre otros nanosistemas con base en liposomas, micelas, dendrímeros, etc., que las posicionan como una de las opciones más prometedoras para el desarrollo de nanosistemas portadores de

fármacos. Entre estas ventajas se cuentan mayor estabilidad al contacto con fluidos biológicos, mayor capacidad de carga de fármacos, protección del fármaco ante la degradación al estar protegido por una matriz sólida, factibilidad de modificación química de su superficie para poder dirigirlas a los sitios o células diana, y finalmente, la posibilidad de modular los pesos moleculares e incluso el grado de entrecruzamiento de los polímeros para controlar la tasa de liberación del fármaco [11].

Existen varios métodos para la preparación sistemática de nanopartículas poliméricas, tales como i) nanonización [14]; ii) nanoprecipitación [15,16]; emulsión-difusión [17,18]; ii) doble emulsificación [19]; iii) emulsión-coacervación [20]; y iv) capa por capa [21], principalmente. Estos métodos permiten obtener nanopartículas cargadas con una amplia variedad de fármacos con diámetros promedio normalmente mayores que 100 nm y excepcionalmente de entre 60 y 100 nm. Es muy difícil obtener partículas más pequeñas mediante estos métodos. No se conocen reportes en la literatura especializada donde se muestre la preparación de este tipo de nanosistemas con diámetros promedio menores que 50 nm. Esto es muy importante, si se considera que las ya mencionadas ventajas de las nanopartículas poliméricas cargadas con fármacos se potencian a medida que su tamaño es menor. Se ha reportado que las nanopartículas con diámetros promedio menores que 50 nm, introducidas al cuerpo vía parenteral, tienen mayores probabilidades de escapar a la acción inmunológica del sistema retículo-endotelial y continuar así su trayectoria hacia los sitios diana [22]. Este tamaño también facilita su difusión desde el sistema capilar hasta el espacio intercelular y de ahí, a las células dañadas [22]. Asimismo, cuando las nanopartículas son introducidas al cuerpo vía oral, la probabilidad de que atraviesen las paredes intestinales y lleguen al sistema circulatorio aumenta al disminuir el tamaño, ya que el recubrimiento de dichas paredes permite el paso de nanopartículas de hasta 50 nm de diámetro [23].

2.2. Preparación de partículas de poli (alquil cianoacrilato).

De acuerdo a la revisión de Yordanov [2], los poli (alquil cianoacrilatos), PACAs, son una familia de polímeros biodegradables sujetos de una intensa investigación sobre su preparación en forma de nanopartículas y su cargado con fármacos. Se obtienen normalmente por polimerización aniónica, efectuada en una emulsión normal [2], aunque, como se verá más adelante, se conocen reportes sobre su preparación mediante polimerización radicalica también en emulsión.

De acuerdo con la literatura, la polimerización aniónica ha resultado ser de las más utilizadas; la eficiencia de esta vía de polimerización radica en que los monómeros de alquil cianoacrilato presentan una estructura di- substituida con grupos aceptores de electrones, el grupo nitrilo (CN) y el grupo ester (COOR) unidos al mismo átomo de carbono como se muestra en la Figura 2.1. Esta combinación conduce a la polarización del doble enlace carbono-carbono, dejándolo propenso a ser atacado por aniones (I^- , CH_3COO^- , Br^- , OH^-) [2, 24]. Debido a que los reportes indican que la mayoría de estas polimerizaciones se lleva a cabo en un medio acuoso a pH ácido (lo cual ayuda a controlar la velocidad de polimerización), los iones hidróxido del agua, son el iniciador de la reacción. Luego se lleva a cabo la propagación por medio de la adición consecutiva de monómeros alquil cianoacrilatos deficientes en electrones al extremo de la cadena aniónica [25], y la eventual terminación de la cadena en crecimiento por la absorción de un protón [26]. Este mecanismo se muestra en la Figura 2.2.

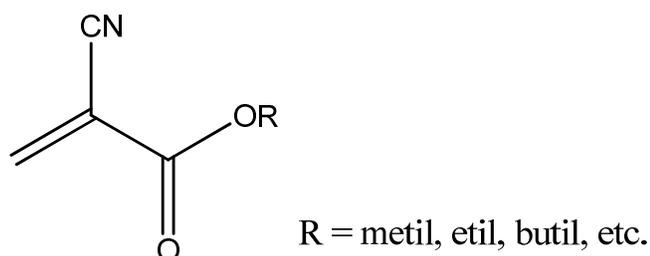


Figura 2.1. Estructura de los monómeros alquil cianoacrilatos.

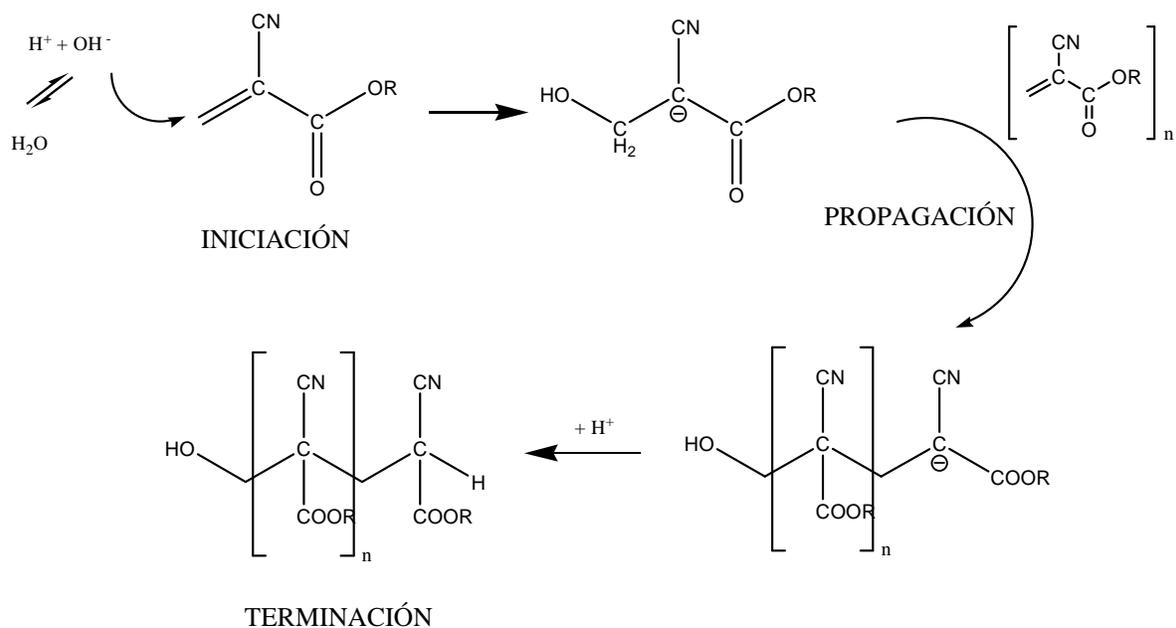


Figura 2.2. Mecanismo de polimerización aniónica de los alquil cianoacrilatos.

La vía de degradación de los PACAs consiste en la hidrólisis del enlace éster de la cadena lateral alquilo. Los productos de degradación son el alcohol alquílico y poli (ácido cianoacrílico) (Figura 2.3), que son solubles en agua y pueden ser eliminados a través de riñón, usualmente en un par de horas, dependiendo del grupo alquil que posean, ya que a mayor longitud de la cadena del grupo sustituyente alquil, mayor será el tiempo que tarde en degradarse. [24]

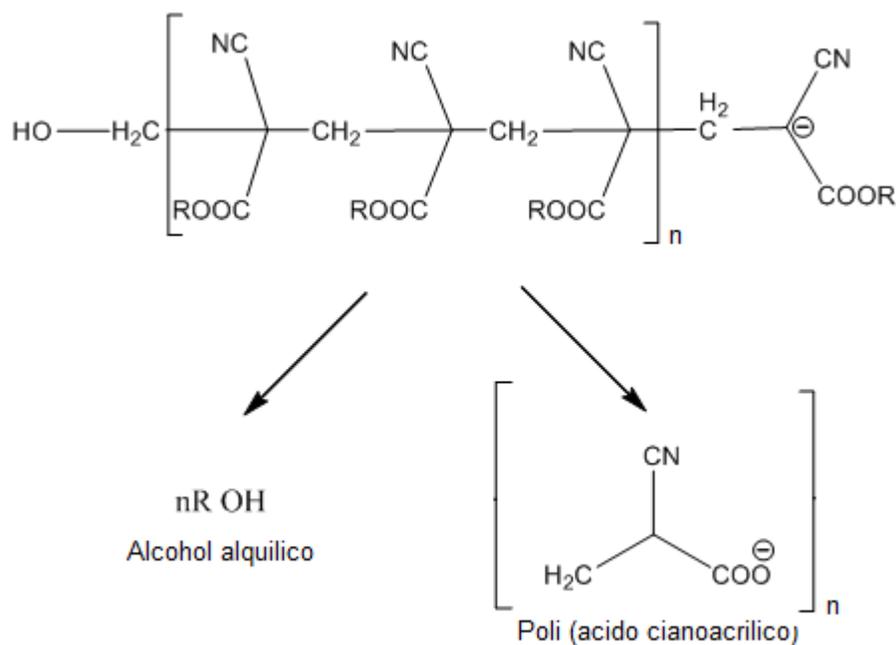


Figura 2.3. Productos de degradación de alquil cianoacrilatos.

A continuación se presentan los resultados de la revisión de la literatura sobre la preparación de nanopartículas de PACAs mediante polimerización en medios acuosos en presencia de compuestos anfífilos.

En 1979, Couvreur et al. [27] fueron los primeros en reportar sobre la preparación de nanopartículas de PACAs en dispersión acuosa. Prepararon nanopartículas de poli (metil cianoacrilato) (PMCA) y poli (etil cianoacrilato) (PECA) en una emulsión estabilizada con 0.5 % de surfactante Tween 20 y a un pH de 1. Polimerizaron por lotes, con un tiempo total de reacción de 30 min, pero sin indicar la temperatura de operación. De acuerdo con la formulación, obtuvieron un látex con cerca de 1 % de polímero ya que no mencionan la conversión final. El diámetro promedio en número (Dn) de partícula determinado por microscopía electrónica de transmisión (TEM) fue de ≈ 200 nm. Inmediatamente después de su preparación, las partículas se cargaron con dos fármacos: fluoresceína (F) y daunorubicina (D). No indican el procedimiento de cargado, aunque es de destacar que en el caso

del fármaco F se logró un cargado de hasta cerca de 60 %. A este primer trabajo le siguió un número apreciable de reportes en los años subsiguientes sobre diferentes aspectos del tema en cuestión. Enseguida se destaca lo más relevante de los resultados de estas investigaciones.

Douglas et al. [6] prepararon nanopartículas de poli (2-butil cianoacrilato) (PB2CA). Polimerizaron en emulsión en una solución acuosa de Dextrano 70 al 0.5 %. Dosificaron el monómero, sin indicar flujo, aunque el tiempo total de reacción fue de 2 h. Obtuvieron un látex con cerca de 1 % de polímero. Estudiaron el efecto de la temperatura de polimerización, pH y concentración de monómero. Probaron diferentes concentraciones de monómero (desde < 1 % hasta 10 %). Por debajo de 1 %, Dz determinado por dispersión cuasielástica de luz (QLS) presentó valores cercanos a 140 nm; los valores más pequeños se obtuvieron cerca de 2.5 %; luego, a partir de ahí, Dz aumentó sensiblemente. Es un comportamiento complejo, no lineal, que los autores no explican. El pH y la concentración de monómero fueron las variables con mayor efecto sobre Dz. Los valores más pequeños (125 nm) se obtuvieron a pH de 2. Valores de pH por debajo (hasta 1) y por arriba (hasta 3.5) de este valor dan Dz's mayores. Los autores señalan que pH's muy altos (> 3.5) conducen a una polimerización muy rápida, en la cual las partículas no alcanzan a estabilizarse y dan lugar a una masa amorfa de polímero. En cambio, a pH's muy bajos (<1), la polimerización es muy lenta, las partículas se hinchan con monómero y son más propensas a coagular, dando lugar a partículas de mayor tamaño. En el intervalo estudiado (4 a 80 °C) prácticamente no hay efecto de la temperatura sobre Dz.

Posteriormente, el mismo grupo de Douglas [3] hizo un reporte adicional sobre la polimerización del PB2CA en emulsión. Para esto prepararon soluciones micelares con varios surfactantes y a un pH de 2.25. No indicaron temperatura de reacción, ni el modo de operación, pero dado su trabajo previo [6] es factible que hayan dosificado el monómero. El tiempo total de reacción fueron 2 h. Probaron varios tipo de surfactantes (dextranos, β -ciclodextrina, poloxámeros, polisorbatos y Brij 96). Encontraron que al usar dextranos (10,

40 y 70) en concentraciones de 0.05 a 2.5 % w/v obtuvieron Dz de 109 nm como tamaño más pequeño con el Dextrano 10, esto es, el de menor peso molecular. Dan los autores una explicación de cómo funcionan los surfactantes que actúan por repulsión estérica. Dicen que la parte hidrófoba del surfactante debe estar muy bien unida al polímero en la superficie y que su poder estabilizante es función del espesor de la capa del surfactante sobre la superficie de las partículas. De este modo, a mayor peso molecular de la cadena hidrófoba del surfactante, mayor estabilización de las partículas. También señalan que hay una relación directa entre el peso molecular de la parte hidrófila del surfactante y la repulsión estérica que genera, lo cual se traduce en poder de estabilización. Los dextranos, concluyen, no son buenos agentes de estabilización del PB2CA, ya que son fundamentalmente hidrófilos. La β -ciclodextrina, también hidrófila, resultó ser también un pobre estabilizador del polímero, ya que dio valores de Dz de 2 a 3 μm . Ya más interesante resultó ser el uso de los surfactantes poloxámeros, también conocidos como pluronics. Éstos son copolímeros de bloque, poli (oxietileno) poli (oxipropileno). Se probaron varios tipos de poloxámeros (338, 238, 237, 188 y 184). Según la nomenclatura de los poloxámeros, los dos primeros dígitos, multiplicados por 100, representan el peso molecular aproximado de la fracción de poli (oxipropileno), mientras que el último, multiplicado por 10, representa aproximadamente el porcentaje peso de la fracción de poli (oxietileno). Los Dz's más pequeños (≈ 70 nm) se obtuvieron con los poloxámeros de mayor peso molecular del bloque poli (oxipropileno) y con una proporción cercana al 80 % de la parte de poli (oxietileno). También es de destacar que los valores de HLB de los poloxámeros con mejor comportamiento fueron altos, 27 y 28, correspondientes a los Poloxámeros 338 y 238, respectivamente. Aunque debe considerarse que uno de los que mostró un comportamiento pobre tenía un HLB alto (29), pero bajo peso molecular del bloque de poli (oxipropileno). Parece ser que la mejor estabilidad se alcanza con altos pesos moleculares del bloque de poli (oxipropileno) y altas proporciones de poli (oxietileno). El poli (oxipropileno) es responsable de la unión del surfactante con el polímero, mientras que el poli (oxietileno) lo es de la parte soluble en la fase continua.

En cuanto a los polisorbatos, también conocidos como tweens, se encontró lo siguiente. Estos surfactantes son monoésteres de sorbitán polioxietilenados. Pueden ser monolaurato (TW20), monopalmitato (TW40), monoestearato (TW60) y monooleato

(TW80), aunque este último no lo probaron. Todos contienen 20 unidades de oxietileno en su estructura, la diferencia es el peso molecular de la cadena hidrocarbonada, el cual aumenta en el sentido laurato-palmitato-estearato-oleato. En este artículo [3], se reportó el estudio del efecto de los tres primeros surfactantes. Se encontró que a 0.5 % de surfactante Dz disminuía al aumentar la longitud (y el peso molecular, consecuentemente) de la cadena hidrocarbonada. El Dz más pequeño obtenido fue de 52 nm con TW 60. La explicación de los autores es que dado que el peso molecular de la parte hidrófila es el mismo para todos los surfactantes, la estabilidad es función directa de la capa hidrófoba del surfactante sobre la partícula, la cual es más grande a medida que el peso molecular de la cadena lineal es mayor. El surfactante Brij 96 dio valores de Dz cercanos a 30 nm, pero el problema es su toxicidad. Los valores de Dz reportados en este estudio son bastante pequeños, pero hay que tomar en cuenta que el contenido de polímero es también muy pequeño, cercano a 1 %, en el caso de que hubieran logrado conversión total en las polimerizaciones, lo cual no indican.

En 1990, el grupo de Couvreur [28] publicó un reporte documentando la preparación de nanopartículas de poli (isobutil cianoacrilato), PIBCA y poli (isohexil cianoacrilato), PIHCA. Prepararon una solución micelar con el surfactante Pluronic F68, equivalente al Poloxámero 188 [1,740 Da de peso molecular del bloque de poli (oxipropileno) y cerca de 80 % peso de la fracción de poli (oxietileno)]. Probaron 2 pH's (1 y 3), concentraciones del surfactante desde 0.2 a 10 % en la solución micelar y concentraciones de monómero desde 0.1 hasta 2 %, también en la solución micelar. No indicaron temperatura de polimerización, forma de operación (lotes o semicontinuo) ni tiempo de reacción. El tamaño de partícula lo determinaron por QLS. Obtuvieron unas gráficas de distribución en peso de tamaño de partícula obtenidas del aparato de QLS al medir tamaño de partícula de muestras de la polimerización a pH de 1.7. Según estas figuras, las distribuciones presentan picos cercanos a los 50 o 60 nm con los tamaños más pequeños para el poli (cianoacrilato de isohexilo) (PIHCA). Los valores de Dz que reportan son pequeños: 26 y 31 nm, para el PIHCA y el PIBCA, respectivamente. En estos casos el contenido de polímero (teórico, ya que no reportan conversiones) es muy bajo: 0.1 % y el de surfactante, de 2 %. Se puede ver de aquí que la relación surfactante polímero es muy grande, de 20/1. Desde el punto de vista práctico estos resultados no tienen sentido. Al usar

un contenido de monómero mayor (2 %), el valor de Dz se incrementó hasta 40 y 56 nm para el PIHCA y el PIBCA, respectivamente. En este caso la relación surfactante/polímero se redujo a 1. Desde el punto de vista práctico, esta relación sigue siendo muy alta. Implica que al cargar el fármaco en las partículas habría una gran cantidad de surfactante libre (micelas) en las cuales el fármaco también se ubicaría. Esto significa que el látex estaría constituido por una mezcla de partículas y micelas cargadas con fármaco, lo cual es impráctico. El efecto de pH sobre Dz que reportan no está claro. Dicen que hay un efecto inverso, pero los Dz más bajos que obtuvieron fueron a un pH de 1.7, no de 3, que fue el pH más alto probado. También midieron peso molecular. Encontraron valores de Mn de entre 2,500 y 3,000 Da con respecto al PS.

Das et al. [29] polimerizaron isobutil cianoacrilato (IBCA) en emulsión. Prepararon la solución micelar a un pH determinado, para la cual usaron Dextrano (40 o 70), siempre a 0.5 % w/v, combinado con un surfactante no-iónico (Pluronic F68 o TW20) a 0.2 o 2 % w/v. Trabajaron a temperatura ambiente. A la solución micelar primero agregaron 1 g del fármaco maleato de timolol. Después, dosificaron (no dicen en cuanto tiempo) 1 mL del monómero. Dejaron que procediera la reacción por 4 h. Al finalizar ajustaron el pH a 5.5 y filtraron con un filtro de 1.2 μm y centrifugaron a 40,000 rpm para recuperar las partículas cargadas, las cuales fueron liofilizadas. Al parecer, con la filtración eliminaron las partículas muy grandes y/o aglomerados. Este estudio tenía como propósito conocer el efecto de las variables: pH de la solución micelar (2, 4 y 7) y concentración de los surfactantes Pluronic y Tween a una concentración fija de Dextrano (40 o 70). Observaron un efecto directo del pH sobre Dv (determinado por QLS). El valor más bajo de Dv (111 nm) se obtuvo a un pH de 2 con Dextrano 70 y el Pluronic F68 al 2 %. En general el Dextrano 70 funcionó mejor que el Dextrano 40 y el Pluronic F68 mejor que el Tween 20. Los autores atribuyen esto a que el peso molecular del Dextrano 70 es mayor que el del Dextrano 40 y esto da origen a una capa hidrófoba más gruesa sobre la superficie de la partícula. El mejor funcionamiento del pluronic lo atribuyen a que los bloques de polioxietileno (hidrófilos) forman puentes de hidrógeno con el agua de la fase continua para formar una cubierta hidratada, lo que le da más espesor a la capa de Stern y, en

consecuencia, mejora la estabilidad. Hay también un efecto directo del pH sobre Mn (medido con respecto a poliestireno). A pH de 2 los valores van de poco menos de 1,000 Da a más de 13,000. A pH de 7 van desde 26,000 a 600,000 g/mol. Los autores dicen que a bajos valores de pH el período de crecimiento de las cadenas es muy corto, y por lo tanto se forman oligómeros o cadenas poliméricas de bajo peso molecular, debido a la alta concentración de H⁺, los cuales son los responsables de la terminación de las cadenas. Los autores completan la discusión diciendo que a altos valores de pH el período de crecimiento de las cadenas es más prolongado y, el peso molecular mayor, debido a que la concentración de H⁺ es más baja. Este trabajo es interesante por el uso combinado de un estabilizador de partículas poliméricas, que es el dextrano, y un surfactante no-iónico, el Pluronic F68 o el Tween 20. En trabajos previos se había visto que los tweens estabilizan mejor que el dextrano y que el pluronic [6]. Aquí se puede ver que al combinarse con el dextrano, un pluronic estabiliza mejor que un tween, también combinado con el dextrano. Sin embargo, esta combinación no conduce a tamaños menores que los obtenidos al usar sólo un tween, el Tween 60 [3]. También es de comentar la explicación de que la estabilización del pluronic se debe a la formación de puentes de hidrógeno entre los bloques de poli (óxido de etileno) y el agua. Parecería que esta explicación aplica para la parte hidrófila de todos los surfactantes no-iónicos. La diferencia podría estar en que unos forman más puentes que otros y por lo tanto la capa hidratada es de mayor espesor.

En 2000 Yang et al. [30] prepararon poli (butil cianoacrilato), PBCA, mediante polimerización en emulsión. Estudiaron el efecto del quitosán como estabilizador de nanopartículas de PBCA cargadas positivamente, precisamente a causa del quitosán. Dicen los autores que normalmente las partículas de PACAs obtenidas por polimerización en emulsión presentan cargas negativas en su superficie, debido a la adsorción de aniones de la fase acuosa. In vivo, esto promueve la adsorción de sustancias cargadas positivamente presentes en los fluidos biológicos tales como proteínas e iones de sodio y calcio. Así, según los autores, la búsqueda de nanopartículas cargadas positivamente está ganando importancia, ya que al no adsorber iones positivos, las partículas serían más estables. Sobre una solución acuosa de quitosán al 0.5 % p/v dosificaron el monómero. No señalan

temperatura de polimerización, ni flujo. Sólo dicen que operaron a 1000 rpm durante 6 h. Supuestamente obtuvieron un látex con cerca de 5 % de polímero. También obtuvieron nanopartículas cargadas con el fármaco nimodipina, para lo cual disolvieron 50 mg de este compuesto en la carga de monómero. En teoría deberían haber obtenido nanopartículas con cerca de 8 % de fármaco. Estudiaron el efecto del pH (de 1 a 4.5). A pH de 1 obtuvieron 2 poblaciones de partículas: una de 10 a 30 nm y la otra de 50 a 1500 nm. Reportan un diámetro promedio D_z (determinado por QLS) de más de 80 nm y un látex turbio. A pH de 1.5 obtuvieron D_z de 51 nm. Dicen que el látex, por su baja turbidez, contiene nanopartículas bien dispersas, lo cual, por supuesto, carece de fundamento. Además, basados en una micrografía que presentan dicen que la distribución de tamaños de partícula es estrecha. Obviamente, esto tampoco está fundamentado. Al menos deberían presentar un histograma y valores de D_n y D_w . A pH's de entre 2 y 4.5, D_z se mantuvo cerca de 25 nm. Señalan los autores que las partículas presentan distribuciones de tamaño estrechas, pero no incluyen ninguna evidencia. También dicen que los látex son turbios, lo cual atribuyen a la presencia de agregados de partículas. Da la impresión que los autores, aunque reconocen la presencia de agregados de partículas más grandes que el tamaño promedio que reportan, le restan importancia y resaltan los valores de D_z . Hay que recordar que cuando el tamaño de las partículas es muy pequeño (diámetros < 50 nm) el valor de D_z es muy sensible a la dilución. Definitivamente no es creíble que los látex obtenidos a pH's de 2 a 4.5 contengan nanopartículas con diámetros promedio de 25 nm. Las micrografías que presentan los autores muestran únicamente la población de partículas pequeñas, por razones obvia no incluyen micrografías donde aparecerían las partículas grandes. Los autores concluyen su discusión sobre el efecto del pH sobre el tamaño de partícula diciendo que a muy bajos pH's la polimerización es lenta, las partículas son semifluidas (pegajosas) lo cual conduce a coagulación. A pH's muy altos, la polimerización sería muy rápida, lo cual rendiría agregados de partículas de gran tamaño e incluso geles. Dicen que el pH óptimo para obtener partículas pequeñas sería 1.5. Encontraron que para un concentración de 5 % de monómero, concentraciones de quitosán > 1 % conduce a agregados de partículas de gran tamaño debido a que los grupos OH y NH_2 del quitosán estarían actuando como iniciadores de la polimerización, lo que aunado a los iones OH del medio acuoso, promovería elevadas velocidades de polimerización. También mencionan que la estabilidad de las partículas

aumenta (y su tamaño disminuye) al aumentar el peso molecular del quitosán. Los autores vieron también el efecto de la concentración de monómero. Como era de esperar encontraron el valor de D_z más pequeño, ≈ 25 nm, al trabajar con cerca de 1 % de polímero. Hay un efecto directo muy ligero de la temperatura sobre el tamaño de partícula en el intervalo estudiado (10-50 °C). No dan una explicación al respecto. Respecto al cargado del fármaco en las partículas, la evidencia de que esto realmente ocurre es realmente muy pobre. Muestran una micrografía donde sólo aparecen las nanopartículas de PBCA y al no aparecer los cristales del fármaco, los autores concluyen que todo el fármaco se cargó en las partículas. Obviamente esto no puede considerarse como una prueba de su afirmación.

Behan et al. [7] señalan que en la literatura hay resultados contradictorios en la polimerización de un mismo alquil cianoacrilato. Este hecho lo adjudican a las variaciones en el tipo y la cantidad de subproductos de la reacción de síntesis del monómero (ácido cianoacrílico, por ejemplo) así como a la proporción de agente acidificante (SO_2 , por ejemplo) añadido para inhibir la polimerización del monómero durante el almacenamiento. Mencionan los autores que primero midieron la reactividad de tres lotes diferentes de *n*-BCA. Encontraron que no había diferencia estadística entre las reactividades, así que pudieron trabajar indistintamente con el monómero de cualquiera de los 3 lotes. Prepararon una solución micelar de Dextrano 70 (≈ 70 kDa) al 0.1 % y agregaron 1 % de BCA por lotes (2 h de tiempo de reacción). Probaron 3 temperaturas (10, 25 y 65 °C) y 3 pH's (2, 2.5 y 3.5). El peso molecular más bajo (500-2,500 Da) lo obtuvieron a pH de 2. A pH de 5, la distribución del MW fue bimodal con una población de cerca de 10,000 Da y otra de 300,000-400,000. A pH bajo el peso molecular va creciendo con el avance de la polimerización. Los pesos moleculares son con respecto al PS. Esto se atribuyó a que a bajas conversiones la concentración del agente acidificante inhibidor es alta, lo cual hace que las cadenas terminen más rápidamente. Con el avance de la reacción la población de alto peso molecular se hace importante hasta predominar completamente. Los autores señalan que esto podría atribuirse a un mecanismo de re-iniciación de la polimerización mediante la abstracción del protón terminal de la cadena durmiente, lo cual generaría un

anión para re-iniciar la polimerización. También hablan de 2 posibles mecanismos de terminación de crecimiento de las cadenas: por efecto del agente ácido presente o por transferencia de cadena al protón terminal de una cadena durmiente. El aumento en peso molecular con el pH se atribuyó a un aumento en el número de oligómeros primarios (por el aumento en la concentración de OH^-), lo cual hace que se consuma más rápidamente el agente acidificante, permitiendo un mayor crecimiento de las cadenas. Es interesante el comportamiento de la distribución del tamaño de partícula determinado por QLS. A pH de 2 al inicio de la polimerización (5 min) hay una población cercana a 400 nm en diámetro y otra de 20-30 μm . La población de tamaño pequeño, dicen los autores, corresponde a las partículas, mientras que la grande está compuesta por las gotas de monómero. Con el avance de la polimerización esta última va decreciendo en proporción hasta desaparecer. Este mismo comportamiento se repite a los pH's de 2.5 y 3. El valor del diámetro de la población de tamaño pequeño se mantiene en cerca de los 400 nm, pero la población de tamaño grande, desaparece más rápidamente al aumentar el pH. A pH 5 no hay formación de partículas ya que la polimerización es muy rápida y no alcanzan a formarse.

Siguiendo con el trabajo de Behan et al. [7] los resultados del estudio del efecto de la temperatura sobre el tamaño de partícula y la interpretación de los autores son realmente de comentar. Muestran unas gráficas de concentración en número de partículas vs tiempo de reacción a pH's de 2, 2.5 y 3 y para 10, 25 y 65 °C. Aparentemente el mayor no. de partículas se obtiene al pH de 3 a las 3 temperaturas, lo cual implica que el menor tamaño de partícula se obtiene también a esas condiciones. El problema es que con el no. de partículas que muestran ($2.5 \times 10^{19} / \text{L}$) a, por ejemplo 65 °C y pH de 3, y la formulación empleada, se estima que las partículas tendrían un diámetro promedio cercano 10 nm. Esto, por supuesto, no corresponde a los diámetros de partícula obtenidos en el estudio, del orden de los cientos de nanómetros. Tampoco es posible identificar una tendencia en el número de partículas y, por lo tanto en el tamaño de partícula, con la temperatura. No se puede concluir sobre el efecto del pH y de la temperatura sobre el tamaño de partícula. Lo más que se puede decir es que a pH's de entre 2 y 3 se obtienen partículas con diámetros promedio cercanos a 400 nm y que a pH de 5 no se forman partículas sino sólo

macroagregados de polímero. Con base en las evidencias obtenidas en su investigación, los autores propusieron un mecanismo a través del cual ocurre la polimerización de los alquil cianoacrilatos en un medio acuoso en presencia de surfactantes. De acuerdo a ellos, la polimerización es iniciada por los OH^- disueltos en el medio acuoso al reaccionar con el monómero para formar un anión, el cual se propaga en la fase acuosa hasta formar una partícula, donde continúa el crecimiento de la cadena hasta terminar al unirse a un protón proveniente del agente acidificante normalmente contenido en el monómero. Después, las cadenas pueden experimentar la abstracción del protón del carbono terminal y reiniciar la polimerización, hasta alcanzar un peso molecular de equilibrio.

Limouizin et al. [31] reportaron la preparación de nanopartículas de PBCA. Polimerizaron en emulsión y miniemulsión a un pH de 2. No indican temperatura. Emplearon como surfactante el ácido dodecil bencensulfónico con el fin de reducir la velocidad de polimerización, lo cual condujo a pesos moleculares muy bajos (1,200 g/mol con respecto al PS). En emulsión lograron contenidos de polímero de más de 25 %, pero con Dz de más de 300 nm. Sin embargo, el contenido de polímero en la polimerización en miniemulsión fue muy bajo (2 %) y el valor de Dz no fue mucho menor, cerca de 270 nm. En la miniemulsión tuvieron que agregar un agente de presión osmótica para disminuir la degradación de Ostwald. Señalan que mientras en la polimerización aniónica en emulsión la propagación se efectúa en la interfase de la partícula, en la radicalica en emulsión se lleva a cabo en el bulk de la partícula.

En 2003 el grupo de Chauvierre et al. [32] reportó por primera vez la polimerización radicalica de los alquil cianoacrilatos en un medio acuoso usando como iniciador un sistema redox y con un polisacárido (dextrano) como tensoactivo. Según los autores, esto permitiría obtener nanopartículas biodegradables con una mayor permanencia en el sistema circulatorio que la mostrada por sus contrapartes preparadas mediante polimerización aniónica. El origen de este comportamiento estaría en el arreglo espacial de las cadenas del polisacárido sobre la superficie de las partículas. Mientras que en las partículas obtenidas

por polimerización aniónica las cadenas están en forma de bucles, en las obtenidas por polimerización radicalica las cadenas forman una especie de cepillo. Parece ser que esta última forma desfavorece la interacción con las proteínas del plasma sanguíneo. Usaron dextrano de dos pesos moleculares: 71,000 y 15,000-20,000 Da. El sistema redox estuvo compuesto por el nitrato amoniacal de cerio (IV) como agente oxidante y el propio dextrano como reductor. En el estudio usaron principalmente el IBCA, pero efectuaron también algunos experimentos con otros alquil cianoacrilatos como isohexil cianoacrilato (IHCA), n-butil cianoacrilato (NBCA), n-propil cianoacrilato (NPCA), etil cianoacrilato (ECA) y 2 metoxi etil cianoacrilato (2MECA). El dextrano se usó al 1.4 % y el monómero al 5 %. No indican la forma en que se agregó el monómero, pero aparentemente se operó por lotes. La temperatura de polimerización fue de 40°C, con un tiempo de reacción de 40 min. Trabajaron a 3 pH's: 1, 2 y 3. Cuando no usaron dextrano, si no únicamente el compuesto de cerio a pH de 1, no hubo polimerización. En general, a igualdad de pH, las polimerizaciones redox fueron más rápidas que las aniónicas. Obtuvieron Dz (por QLS) de entre 227 y 443 nm. Muestran una sola micrografía en la cual se ven partículas con cerca de 300 nm de diámetro con aparentemente baja dispersión. Al parecer hay una relación inversa entre el tamaño de partícula y la longitud de la cadena alquílica del monómero.

En 2005 el grupo de Vauthier [33] documentó la polimerización del IBCA en emulsión. Lo hacen de dos maneras. En una polimerizan por radicales libres con un iniciador redox, donde usan el nitrato amoniacal de cerio (IV) como agente oxidante. La otra, como comparación, es una polimerización aniónica. Ambas las efectúan a pH de 1 y en ambas prueban 3 surfactantes: dextrano, sulfato de dextrano y quitosán con varios pesos moleculares. En la polimerización radicalica trabajaron a 40 °C, con cerca de 5 % de monómero; en la otra polimerización operaron a temperatura ambiente. Hubo una gran diferencia en los tiempos de reacción: 1 h para la polimerización radicalica y 24 h para la aniónica. Reportan rendimientos de reacción cercanos a 90 %, pero no para todas las polimerizaciones. En la polimerización radicalica, al estudiar el efecto de la concentración de dextrano obtuvieron un Dz (por QLS) mínimo cercano a 260 nm. Hay que destacar que no hicieron mediciones por microscopía electrónica. En el estudio del efecto del agente

oxidante, el Dz mínimo fue cercano a los 220 nm. También estudiaron el efecto de la concentración de monómero y encontraron que en el intervalo de 2 a 6.3 %, el Dz era prácticamente constante y aproximadamente de 260 nm. Cuando variaron el MW de los surfactantes observaron una relación directa entre Dz y MW. Los autores lo atribuyen a que las moléculas del sulfato de dextrano y de quitosán están unidas por uno de sus extremos a la superficie de la partícula. En cambio, la molécula del dextrano se une a la partícula en forma lateral, es decir, en un punto intermedio de la cadena, lo cual atenúa el efecto del cambio en el peso molecular. Tal como ya ha sido reportado, las partículas recubiertas con quitosán presentaron carga positiva en su superficie, las recubiertas con sulfato de dextrano, carga negativa, y las que tenían sólo dextrano, una carga ligeramente negativa.

Bootz et al. [26] prepararon PBCA por polimerización aniónica en emulsión, a pH's de 1, 2 y 3. Usaron 1 % de monómero y 1 % del surfactante poloxámero 188. No indican modo de agregado del monómero. El objetivo de su trabajo fue investigar el efecto del pH sobre MW, tamaño de partícula y rendimiento de la reacción. No encontraron una tendencia en Dz con el pH: 182, 212 y 174 nm, para pH's de 1, 2 y 3, respectivamente. En el peso molecular (Mn), por su parte, si hubo una cierta disminución con el pH: 2,500 g/mol a pH de 1 y 2,100 a pH de 3. Los pesos moleculares son relativos al PMMA. Llamaron la atención los rendimientos de reacción tan bajos: 56, 46 y 25 % para pH's de 1, 2 y 3, respectivamente.

Más recientemente, el grupo de K. Landfester [4] reportaron la polimerización de BCA en miniemulsión. Usaron dodecil sulfato de sodio como surfactante (0.1 a 2.2 % en la mezcla). Obtuvieron Dz de 300 y 100 nm para el valor más bajo y más alto de surfactante, respectivamente. Resulta interesante ver que también probaron otros dos surfactantes: el Tween 20 y el Lutensol AT50. Aún con concentraciones de más del 10 % con respecto al monómero (< 1.1 % en la mezcla) los valores de Dz fueron de varios cientos de nanómetros. En todas las polimerizaciones los autores señalan que usaron más del 10 % de monómero, lo cual debería haber conducido a látex con más del 10 % de polímero en caso de conversión total. Sin embargo, no dan resultados de conversión final. Para iniciar la polimerización (no indican temperatura de trabajo), la microemulsión preparada a un pH de

1, se vertió sobre una solución de un agente de iniciación, tal como hidróxido de sodio, de amonio, y varios tipos de aminoácidos. El propósito adicional de usar estos últimos fue el de dotar a la superficie de las partículas con grupos funcionales. El pH resultante fue siempre mayor que 1, alcanzando valores superiores a 7 cuando se usaron mayores cantidades de solución del agente de iniciación. Llama la atención como no hay un efecto importante del pH inicial de polimerización sobre Dz. A pH de 1.22 se obtuvo un valor de 186 nm mientras que a pH de 12.5 el valor de Dz fue de 175 nm. En cambio, si se observó una clara relación directa entre el pH inicial y el peso molecular (determinado con respecto al PS). Mw del PBCA obtenido fue cercano a los 5,000 Da, con una distribución monomodal poco después de la polimerización. Con el paso de los días el valor de Mw fue creciendo hasta alcanzar los 80,000 Da a los 7 días con PDI cercana a 28. Además, se observó una distribución bimodal. Una de las aportaciones más interesantes de este trabajo fue el empleo del SDS como surfactante y su mejor funcionamiento que los surfactantes no iónicos usados.

En 2011 el grupo de Vauthier [34] reportó la polimerización del IBCA en emulsión redox a 40 °C. Usaron el nitrato amoniacal de cerio como agente oxidante. Agregaron 0.5 mL de IBCA a 10 mL de solución acuosa 0.2 M de ácido nítrico, la cual contenía también 0.137 g de Dextrano 70, el cual actúa como agente reductor. No indican cómo se agregó el monómero, pero sí que dieron 1 hora de tiempo de reacción. No dan datos cinéticos para ver si la polimerización procedió completamente. Basados en la formulación que reportan y conversión total del monómero, se esperaría un látex final con aproximadamente 6 % de sólidos. Intentaron el cargado del fármaco doxorubicina (Dox) de dos formas: durante la polimerización y posterior a la polimerización, al agregar una solución acuosa de Dox al látex. La primera no funcionó por qué el fármaco se degrada. Mediante la segunda forma obtuvieron nanopartículas con poco menos que 4 % de Dox y altas eficiencias de cargado. El tamaño de las partículas fue relativamente grande: 300 nm de diámetro determinado por QLS. Además, presentaron una ligera carga positiva, la cual se atribuyó al Dox, ya que las partículas antes de cargarse con Dox mostraban una carga negativa, atribuible al dextrano.

De acuerdo con la información presentada el butil cianoacrilato y su isómero son los monómeros cuya polimerización en fase acuosa ha sido más estudiada [26-34]. Entre las variables independientes consideradas en los estudios destacan el tipo y concentración de surfactante [3, 30, 33, 34], pH al inicio de la polimerización [4, 6, 7, 26, 28, 32], concentración total de monómero [6, 28, 30] y temperatura de polimerización [6, 7, 30]. Dada la importancia que el tamaño de partícula representa para la tesis que se propone llevar a cabo, las conclusiones sobre los resultados de las investigaciones reseñadas líneas atrás se centrarán precisamente sobre esta variable de respuesta. Algo que vale la pena aclarar es que en la literatura revisada sólo hay algunos reportes que incluyen micrografías y no hay uno solo que presente distribuciones elaboradas a partir de la medición del tamaño de las partículas por microscopía. Prácticamente todos los resultados de tamaño de partícula provienen de mediciones por QLS.

En cuanto al tipo y concentración de surfactante, el dextrano, de diferentes pesos moleculares, es el más usado, seguido de los tweens, llamados también polisorbatos. En el estudio más detallado sobre el efecto del surfactante [3], se encontró que el Tween 60, el tween de mayor peso molecular de los estudiados, fue el que condujo a menor tamaño de partícula, en este caso, 52 nm de diámetro promedio. El comportamiento del dextrano en sus diferentes pesos moleculares no fue tan satisfactorio, ya que se obtuvieron partículas con diámetros promedio mayores que 100 nm. En estas pruebas el contenido de polímero fue cercano al 1 %. No obstante saber que los tweens son más efectivos que los dextranos en la polimerización de los alquil cianoacrilatos, llama la atención que en gran parte de las investigaciones subsiguientes sobre este tema, aún en las más recientes, los dextranos sigan siendo más usados que los tweens de alto peso molecular. La razón probablemente esté en que los primeros proporcionan una superficie más hidrófila a las partículas que la proporcionada por los segundos, lo cual reduciría en cierta medida su tasa de opsonización en la eventualidad de su ingreso al torrente sanguíneo.

El pH al inicio de la polimerización es, junto con el tipo y concentración de surfactante, la variable de mayor efecto sobre el tamaño final de las partículas. En general hay una coincidencia acerca de que las polimerizaciones efectuadas a pH's menores que 1 y mayores que 3.5 producen partículas muy grandes. De hecho, en este último caso es común

obtener masas amorfas de polímero. En un valor de pH cercano a 2 se obtienen los menores tamaños de partícula. En menor medida, pero también la concentración total de monómero tiene un efecto directo sobre el tamaño de las partículas. A concentraciones muy bajas de monómero, entre 0.1 y 0.5 % se han obtenido diámetros promedio de partícula menores que 50 nm, determinados por QLS. Sin embargo, estos resultados son imprácticos por dos razones: el bajo contenido de polímero y el surfactante residual en el látex final. Esto último implica que en la dispersión coexisten nanopartículas de polímero con micelas, por lo que al momento del cargado con un fármaco una fracción de éste terminará en las micelas. Por otra parte, si bien hay reportes de la preparación de látexes con contenidos teóricos de polímero de hasta 5 -6 %, los diámetros promedio son mayores que 100 nm. Aclarando algo, se mencionan contenidos teóricos de polímero, ya que prácticamente nadie reporta cinética ni conversión final en las polimerizaciones efectuadas. Asimismo, tampoco se trata de manera sistemática el tema de la formación y crecimiento de las partículas. Por último, es también de mencionar que en la mayor parte de los reportes revisados se indica que las polimerizaciones se llevaron a cabo por lotes. Si bien, en unos pocos de ellos se dice que el monómero se dosificó, no indican el flujo empleado, lo cual sugiere que el flujo de dosificación de monómero no es una variable importante en sus estudios.

2.3. Rifampicina.

2.3.1. ¿Qué es la Rifampicina?

Existe una gran variedad de enfermedades infecciosas que pueden llegar a presentar consecuencias fatales; una de las más comunes es la tuberculosis, la cual se contrae por medio de *Mycobacterium tuberculosis*, bacteria aerobia estricta que se transmite a través del aire, de una persona a otra cuando el individuo afectado tose, estornuda, grita, etc. Esta enfermedad, generalmente ataca a los pulmones [35] pero la bacteria se puede esparcir por cualquier parte del cuerpo como riñones, columna vertebral, cerebro, entre otros.

La tuberculosis anualmente infecta a más de 8 millones de personas alrededor del mundo causando la muerte de aproximadamente 2 millones de ellas [36], el 98% de estas

muerres ocurren principalmente en países en vías de desarrollo como lo es México. Si un individuo se encuentra inmunosuprimido existe mayor probabilidad de que contraiga esta bacteria, por esta razón, la tuberculosis es una de las primeras causas de muerte para la población contagiada con VIH, pacientes con diabetes y personas con alcoholismo o con algún tipo de drogadicción [37].

Con el fin de proporcionar un tratamiento efectivo a esta y muchas otras enfermedades infecciosas producidas por bacterias, se han utilizado diversos fármacos bactericidas y bacteriostáticos como lo son la isoniacida, pirazinamida, etambutol y rifampicina, siendo este último el que ejerce mayor eficacia terapéutica [38].

La rifampicina (RIF) ($C_{43}H_{58}N_4O_{12}$) (Figura 2.4) es un bactericida que se introdujo en 1967 como tratamiento contra la tuberculosis; adicionalmente puede ser utilizado para inhibir el crecimiento de otras bacterias gram-potitivas y negativas que provocan enfermedades como la meningitis, infecciones nosocomiales, osteomielitis y neumonía, entre otras [38].

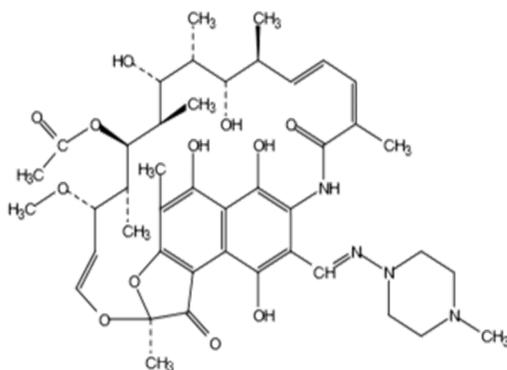


Figura 2.4. Estructura de la Rifampicina.

La RIF tiene una consistencia sólida y una apariencia de color rojo intenso, que posee alta eficacia y buena tolerancia. Una de sus características principales es su baja solubilidad en agua (a 25°C con pH 7.3 es de 2.5 mg/mL, con pH 4.3 es de 1.3 mg/mL) [39]. Su administración se hace principalmente por vía oral y su vida media dentro del

organismo es relativamente corta (1.5 a 5 h) [38], por lo tanto su consumo debe ser en grandes dosis (450 a 600 mg diarios) y por un periodo prolongado no menor a cuatro meses [40]. A pesar de su disponibilidad en el mercado, existe a menudo un fracaso en el tratamiento debido a que, de ser interrumpido existe un alto riesgo de resistencia a el fármaco, además con frecuencia es administrado como mezcla con otros fármacos lo cual conlleva una elevada toxicidad y resistencia a largo plazo [41].

La RIF se absorbe en el tracto gastrointestinal, es metabolizada en el hígado y eliminada principalmente a través de los riñones [38]. Estos factores provocan efectos secundarios como fiebre, trastornos gastrointestinales, cambios en el ciclo menstrual, vómitos, mareos, entre otros efectos colaterales.

Con la finalidad de superar las limitaciones de baja biodisponibilidad, además de mantener su acción terapéutica por mayor tiempo en el organismo, así como eliminar o al menos disminuir los múltiples efectos secundarios [40], desde hace ya varias décadas se ha iniciado una búsqueda de métodos alternativos de administración de fármacos que proporcionen ventajas sobre los métodos ya existentes. Para esto, muchos investigadores han concentrado su atención en el desarrollo de sistemas suministradores de fármacos, en donde uno de los de mayor importancia, es la utilización de micro y nanopartículas poliméricas cargadas con fármacos, como la Rifampicina.

Las nanopartículas poliméricas se definen como partículas coloidales compuestas de polímeros naturales o sintéticos. En general se consideran como aquellas partículas con al menos una de sus dimensiones o el diámetro, en el caso de las nanopartículas esféricas, con un tamaño que oscila entre 10 y 100 nm. Sin embargo, es también común incluir en esta clasificación a partículas con el tamaño señalado menor que una micra, esto es, 1000 nm [42].

El interés de la utilización de partículas poliméricas a esta escala radica en su capacidad para escapar del sistema inmunológico en donde debido a su pequeño tamaño,

las nanopartículas no son captadas por los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear, lo cual permite que el fármaco sea llevado al sitio de acción sin ser reconocido como extraño, además de reducir la frecuencia de dosificación ya que su efecto terapéutico será más prolongado, mientras minimiza los efectos secundarios [43]. De acuerdo con la literatura, los polímeros con propiedades de biocompatibilidad y/o biodegradabilidad más comúnmente utilizados en investigaciones sobre el desarrollo de micro y nanosistemas para la administración de fármacos son: i) Poliésteres: como el copolímero de ácido láctico y ácido glicólico (PLGA), copolímeros de policaprolactonas, ii) Poliamidas. Incluyen los polímeros naturales como colágeno, gelatina, albumina, quitosan, etc. iii) Poliuretanos, iv) Polifosfocenos, v) Polioctoésteres, vi) Polianhídridos y vii) Poli (alquil cianoacrilatos).

A continuación se presentan algunos trabajos relevantes reportados en la literatura acerca de micro y nanopartículas cargadas con Rifampicina.

2.3.2. Micro y nanopartículas poliméricas cargadas con Rifampicina.

Pandey *et al.* [44] cargaron RIF en nanopartículas de poli (láctido-co-glicólido) (PLG) para administración vía oral. En pruebas con ratones, encontraron concentraciones importantes del fármaco en el plasma hasta 4 días después de su ingestión, mientras que en las pruebas con fármaco libre, éste era indetectable en el plasma después de 12-24 horas. Esto condujo a una sensible disminución en las dosis totales de RIF requeridas para erradicar completamente el microbio. Estudios comparativos con RIF cargado en micropartículas demostraron una mejor eficacia de las nanopartículas [45, 46]. Posteriormente, el grupo de Pandey publicó los resultados de pruebas donde se administraron las nanopartículas RIF-PLG por inhalación a ratones infectados. Estos resultados mostraron que prácticamente no había diferencia entre esta forma de administración y la vía oral. Las dos eran igual de eficaces. Sin embargo, la administración de las nanopartículas RIF-PLG vía subcutánea fue mejor aún. El mencionado grupo encontró que esta forma de administración a ratones enfermos permitía mantener la RIF en el plasma por hasta 36 días, con lo cual una sola dosis era capaz de erradicar

completamente el microbio [47]. Es conveniente mencionar que los resultados acabados de presentar se obtuvieron con nanopartículas con diámetros promedio mayores que 100 nm.

En 2007, Fernaz et al. [43], realizaron la preparación de nanopartículas de PLGA-RIF por medio del método de miniemulsificación o/w y posteriormente difusión del disolvente para la encapsulación del fármaco. Al realizar las pruebas de actividad antimicrobiana para evaluar la efectividad de las nanopartículas en comparación con el fármaco libre, los autores obtuvieron que la concentración mínima para inhibir el desarrollo bacteriano fue de 0.002 y 0.008 $\mu\text{m/mL}$ respectivamente, demostrando así, que debido a las características nanométricas que poseen estas partículas presentan mayor eficacia al penetrar en la célula bacteriana en comparación con el fármaco libre. Cabe mencionar que el objetivo era preparar por medio del método antes mencionado, nanopartículas menores a los 100 nm, lo cual no les fue posible ya que el diámetro promedio obtenido fue de 200 a 260 nm.

Siguiendo con esta línea de investigación y utilizando el método de miniemulsión/evaporación de disolvente, en 2007, Tomoda et al. [48] reportaron el diseño y preparación de microesferas monodispersas de PLGA-RIF con la finalidad de evaluar la velocidad de liberación del fármaco utilizando un surfactante pulmonar al ser administradas por inhalación, siendo el tamaño de partícula un factor importante ya que partículas entre 2 a 5 μm son capaces de penetrar profundamente en los pulmones, ser captadas por los macrófagos y liberar el fármaco. Los autores obtuvieron como resultados una distribución de tamaño de partícula estrecha con un diámetro promedio de 2.84 μm . Luego realizaron pruebas de liberación en donde se agregaron las microesferas de PLGA-RIF a tres fluidos diferentes los cuales simulaban el ambiente fisiológico de los pulmones. En primer lugar se utilizó una mezcla de solución salina y surfactante pulmonar que imita el ambiente de los alveolos pulmonares, posteriormente se utilizó una solución con surfactante pulmonar a un pH de 4.0 para simular las esferas tomadas por los macrófagos y por último una solución con un pH de 7.4 para simular el caso de las esferas después de la fagocitosis. Los resultados obtenidos mostraron que en las primeras dos soluciones la liberación se lleva a cabo en los primeros 10 días, mientras que en pH de 7.4 fue en los primeros 5 días. Por lo tanto la velocidad de liberación de la RIF en aquellas microesferas que no son captadas por

los macrófagos y permanecen en los alvéolos es más prolongada que en aquellas que son captadas por los macrófagos.

En 2010, Tripathi et al. [49], al igual que los autores mencionados anteriormente utilizaron PLGA como matriz polimérica para la preparación de nanopartículas cargadas con Rifampicina, utilizando el método de emulsión y evaporación del disolvente. Se evaluó principalmente el tamaño de partícula y la liberación del fármaco. En general, el tamaño de partícula se ve afectado por la composición del sistema de emulsión, así como por los parámetros experimentales. Los autores obtuvieron como resultado un tamaño de partícula promedio de 360 nm. Se realizaron pruebas de liberación en una solución con pH de 7.4, en donde los resultados muestran en el primer día una rápida liberación del 11.26 % atribuido a las moléculas del fármaco absorbidas en la superficie de la partícula, ya que estas moléculas se desorben rápidamente al entrar en contacto con el medio de disolución. Seguido a esto, existe una fase de liberación más lenta que se atribuye al fármaco atrapado, el cual se difunde hacia el medio de liberación. Aproximadamente el 75.49% de fármaco fue liberado después de 30 días.

De acuerdo con la información presentada, se observa que ha habido una notable labor de investigación en la preparación de micro y nanopartículas poliméricas cargadas con Rifampicina. Lo más notable de estos reportes es que el diámetro promedio de las partículas es superior a los 100 nm y que, definitivamente, la biodisponibilidad y la eficacia de la RIF se ve incrementada al ser administrada por esta vía.

2.4. Justificación del trabajo de tesis

El trabajo presentado en esta tesis pretende contribuir al llenado de algunos huecos en el estado actual del estudio de la polimerización aniónica de los PACAs en dispersiones acuosas estabilizadas con surfactantes. Específicamente se consideró la determinación del efecto del flujo de dosificación del monómero ECA sobre la solución micelar en lo relativo a la cinética, el peso molecular y el tamaño de partícula. Se hizo énfasis en el empleo de la técnica de microscopía electrónica para la determinación de la distribución de tamaños y de

los diámetros promedio de partícula. La técnica de polimerización empleada fue la llamada *polimerización en heterofase en semicontinuo*, la cual ha sido usada por el grupo de trabajo de los asesores de la tesis para obtener nanopartículas poliméricas con diámetros promedio sustancialmente menores que 50 nm [50, 53, 54]. No obstante que las polimerizaciones reportadas en estas referencias procedieron por el mecanismo de radicales libres, se esperaba que en este caso esta técnica también condujera a partículas muy pequeñas, tomando en cuenta que la polimerización aniónica del ECA tiene también lugar en compartimientos estabilizados con surfactantes. Adicionalmente, se consideró que una vez obtenidas, por su tamaño estas partículas serían un excelente candidato para cargarlas con un fármaco, tal como la RIF, esperando que pudieran ser el punto de partida para el desarrollo posterior de nanosistemas para la administración más efectiva y eficiente del fármaco.

La selección del monómero, ECA, obedeció a que es uno de los alquil cianoacrilatos más comunes, así como a su disponibilidad. El surfactante, Tween 80, fue seleccionado debido a que hasta adonde se conoce no ha sido empleado en la polimerización aniónica de los alquil cianoacrilatos y se consideró novedoso indagar sobre su comportamiento. El pH y la temperatura de polimerización fueron elegidos con base en el análisis de los reportes en la literatura especializada. La concentración de ECA en la formulación fue seleccionada con el propósito de obtener látexes con contenidos finales de sólidos mayores que los reportados en la literatura.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis.

Se espera que la polimerización en heterofase en semicontinuo del ECA conduzca a la obtención de nanopartículas con diámetros promedio menores que 50 nm dispersas en látexes con contenidos de sólidos cercanos a 10 %. Asimismo, se espera una relación inversa entre conversión instantánea y flujo de dosificación de monómero y una directa entre tamaño de partícula y flujo.

Es factible cargar RIF en nanopartículas de PECA, si a una dispersión de éstas en una fase acuosa continua se le agrega una solución del fármaco en un solvente orgánico tal como el DCM.

3.2. Objetivo general.

Determinar el efecto del flujo de dosificación de monómero en la preparación de nanopartículas de PECA mediante polimerización en heterofase en semicontinuo y la factibilidad del cargado de las nanopartículas con Rifampicina.

3.3 Objetivos específicos.

OE1. Conocer la respuesta de la cinética, tamaño de partícula y peso molecular a la variación del flujo de dosificación de monómero en la polimerización.

OE2. Determinar si es factible realizar el cargado de las nanopartículas de PECA con Rifampicina.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reactivos y Materiales

El etil cianoacrilato (ECA) (99 %) fue adquirido de Sigma-Aldrich (Toluca, México) y se mantuvo a 4 °C durante su almacenamiento. El TW80 se obtuvo de Oxiteno (Guadalajara, México). El agua utilizada para todas las pruebas de polimerización fue desionizada grado tridestilada, a la cual se le ajustó el pH a 1.75 con ácido clorhídrico (HCl) al 37% (Sigma-Aldrich). Para el cargado del fármaco se utilizó diclorometano (DCM) (99.5 %) como disolvente, fue adquirido de Sigma-Aldrich y la rifampicina fue proporcionada por Lupin Tarapur (India). En relación a las pruebas de liberación se

utilizaron bolsas de celulosa para diálisis adquiridas en Sigma-Aldrich y para la preparación de la solución buffer se utilizó fosfato de sodio dibásico dodeca hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) y fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ambos adquiridos de J.T. Baker. En cuanto a la caracterización, los solventes utilizados fueron cloroformo grado espectrofotométrico y tetrahidrofurano (THF) grado HPLC obtenidos de MACRON FINE CHEMICALS y MTEDIA, respectivamente.

4.2. Equipo

4.2.1. Polimerizaciones

Para llevar a cabo las reacciones de polimerización se utilizó un reactor enchaquetado de vidrio de 25 mL con tapa de 3 bocas (SEV), un sistema de agitación mecánica (Caframo BDC250) con propela de acero inoxidable, una jeringa de plástico (Sensi-Medical) y una bomba de dosificación (Kd Scientific 100). La temperatura de la reacción se estabilizó mediante un baño de recirculación (PolyScience 8002). En la Figura 4.1 se muestra el sistema utilizado en las pruebas de polimerización.



Figura 4.1. Sistema de reacción en el cual se prepararon las nanopartículas de PECA.

4.2.2. Cargado de RIF

Las pruebas de cargado de RIF en las nanopartículas de PECA, se llevaron a cabo, en el mismo sistema utilizado para las polimerizaciones. En la Figura 4.2. se muestra el sistema en el cual se realizaron las pruebas de cargado de RIF.



Figura 4.2. Sistema en el cual se realizaron las pruebas de cargado de RIF en nanopartículas de PECA.

4.2.3. Pruebas de liberación

Para llevar a cabo las pruebas de liberación de RIF se utilizaron 3 reactores enchaquetados de vidrio que contenían 500 mL de la solución buffer a un pH de 7.2; dentro de estos reactores se colocaron las nanopartículas o la RIF en una bolsa de celulosa para diálisis. El sistema se mantuvo en agitación magnética y se mantuvo la temperatura adecuada debido a la utilización de un baño de recirculación.

4.2.4. Caracterizaciones

Para las caracterizaciones se usaron los siguientes equipos:

Espectrómetro infrarrojo de reflectancia total atenuada-Transformada de Fourier Nicolet Magna IR 550.

Microscopio electrónico de barrido-transmisión JEOL JSM-7401F.

Espectrofotómetro UV/visible- Shimadzu modelo UV-2401PC.

Cromatógrafo de permeación en gel (GPC) Agilent Technologies modelo PL-GPC 50.

Liofilizador LABCONCO Corporation Freeze Dry System.

4.3. Metodología

4.3.1. Polimerizaciones

Para la determinación de la cinética de polimerización se realizó el cargado del reactor inicialmente con las cantidades de agua y TW80 las cuales se muestran en la Tabla 4.1. Posteriormente se selló el sistema, después se conectó el baño de recirculación al reactor para estabilizar la temperatura a 35°C manteniendo la mezcla a una velocidad de agitación de 450 rpm. La polimerización inició con la dosificación del monómero, el cual se agregó a periodos de tiempo diferentes, esto es a 2, 4 y 6 h, lo cual equivale a flujos de dosificación de monómero de 0.017, 0.0083 y 0.0055 g/min respectivamente. La cantidad de monómero agregada se indica en la Tabla 4.1. La adición del monómero se realizó manualmente por goteo con jeringa sobre la solución micelar cada 5 minutos hasta completar el tiempo de reacción.

Con el fin de contar con material suficiente para las caracterizaciones requeridas, cada polimerización se efectuó siguiendo un procedimiento por etapas. Esto significa que para un dado flujo se iniciaba la reacción y se llevaba hasta un tiempo previamente

determinado. Luego se suspendía y se colectaba todo el látex. Después se iniciaba otra prueba en la cual la suspensión se efectuaba a un tiempo mayor y así sucesivamente hasta terminar con una prueba en la cual se completaba el tiempo total de reacción.

En cuanto a la preparación del látex para emplearse en las pruebas de cargado de RIF, se agregaron los componentes iniciales en el reactor, pero esta vez para la adición del monómero se usó una jeringa de insulina de 1 mL (NORM-JECT Tuberkulin) ajustada a una bomba de dosificación (Kd Scientific modelo 100). Las formulaciones de estas pruebas se muestran en la tabla 4.2.

Las muestras tomadas para la determinación de la conversión fueron vertidas en un vial, luego se llevaron a congelación para posteriormente colocarlas en un liofilizador hasta llegar a peso constante. La conversión se obtuvo por gravimetría; otras de las muestras tomadas fueron utilizadas para determinar tamaño de partícula por microscopía electrónica de barrido-transmisión (STEM) y peso molecular por cromatografía de permeación en gel (GPC).

Tabla 4.1. Formulaciones empleadas en las polimerizaciones en heterofase en semicontinuo de ECA para la determinación de la cinética.

Flujo (g/min)	Tiempo adición (min)	Componente (g)		
		Agua	TW80	ECA
0.017	25	20.7312	0.3538	0.4143
	50	20.5541	0.3564	0.8281
	75	20.0964	0.3512	1.2548
	100	20.0023	0.3585	1.6711
	120	20.0638	0.3568	2.0158
0.0083	50	20.5200	0.3536	0.4200
	100	20.4166	0.3516	0.8359
	150	20.9139	0.3520	1.2694
	200	20.9934	0.3540	1.6728
	240	20.1066	0.3532	2.0104

0.0055	72	20.5630	0.3536	0.4106
	144	20.8004	0.3583	0.8160
	223	20.3668	0.3542	1.2449
	299	20.0560	0.3561	1.6622
	360	20.1448	0.3560	2.0556

Tabla 4.2. Formulaciones empleadas en las polimerizaciones en heterofase en semicontinuo de ECA para las pruebas de cargado de RIF.

Prueba	Tiempo adición (min)	Flujo (g/min)	Componente (g)		
			Agua	TW80	ECA
C-52	180	0.0115	20.0365	0.3538	2.0765
C-53	180	0.0115	20.0109	0.3513	2.0641

4.3.2. Cargado de RIF

Al látex obtenido en la polimerización al cual, se le determinó conversión, fue dividido en dos partes iguales. A una de las partes se le denominó con el número de identificación de la reacción agregando la terminación C1 para referirse a la prueba de cargado número 1 y a la otra parte de la misma manera pero con la terminación C2 para referirse a la prueba de cargado número 2. Cada una de las partes se diluyó con agua al 50 %; cada una de estas diluciones fue utilizada para realizar pruebas de cargado de RIF.

Para realizar el cargado de RIF en las nanopartículas de PECA se preparó una solución de RIF en DCM al 15 %. Por otra parte, el látex con las nanopartículas de PECA fue agregado al mismo sistema utilizado para polimerizar; esta mezcla fue sometida a agitación mecánica de 450 rpm y su temperatura se llevó a 25°C. Posteriormente se inició el agregado de la solución de RIF-DCM mediante la dosificación de cargas pequeñas,

dando un tiempo de espera hasta que la apariencia de la mezcla fuera homogénea entre carga y carga. Los agregados para cada una de las pruebas fueron realizados de manera manual con jeringa.

Una vez terminado el proceso de cargado se tomó una muestra del látex para determinar contenido de sólidos y otra para filtrarla a través de un filtro de 0.2 μm . En la operación de filtrado se tomaron los pesos antes y después de filtrar y se determinó el tamaño de partícula por STEM. Una muestra del material seco obtenido fue utilizada para cuantificar el contenido de RIF en las nanopartículas mediante espectrofotometría UV-Vis.

Las formulaciones utilizadas para las pruebas de cargado, así como los tiempos totales del proceso de cargado se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Formulaciones empleadas en las pruebas de cargado de RIF.

Prueba de cargado	Compuestos (g)		Solución RIF-DCM		Tiempo total del proceso (min)
	Látex	Agua	Contenido de RIF (%)	Agregado (g)	
C52C1	8.0188	8.0468	15.0200	0.6085	263
C52C2	8.0503	8.0353	15.0200	0.5895	250
C53C1	8.0168	8.0327	15.0026	0.6345	293

4.3.3. Pruebas de liberación

Una vez obtenido el material seco de las nanopartículas cargadas con RIF, se llevó a cabo el estudio de liberación por triplicado para cada una de las pruebas realizadas. El estudio de liberación se realizó mediante la técnica de difusión por diálisis. El proceso se describe a continuación.

Dentro de una bolsa de celulosa para diálisis se colocó un peso conocido de nanopartículas cargadas con RIF, a cada bolsa se le agregaron 2 mL de una solución buffer

fosfato a pH de 7.2, valor cercano al pH de la sangre, los cuales fueron preparados previamente. Para obtener este valor de pH se adicionaron 140 mL de solución de fosfato de sodio monobásico (28% p) y 360 mL de solución de fosfato de sodio dibásico (72% p) aforados a 1L. En la Tabla 4.4 se muestra el peso utilizado de nanopartículas cargadas con RIF para cada una de las pruebas de liberación.

Luego, se colocó en un reactor enchaquetado de vidrio 500 mL la solución buffer, la cual se mantuvo con agitación magnética; la temperatura dentro del reactor fue estabilizada en 37°C mediante la utilización de un baño de recirculación. Una vez teniendo preparada la bolsa de celulosa cargada con la muestra, esta se introdujo al reactor y se dio inicio a la prueba de liberación. Cabe mencionar que el sistema fue completamente sellado para evitar la evaporación.

Se colectaron muestras a determinados intervalos de tiempo para calcular el porcentaje de RIF que fue liberada; esta cuantificación se realizó por medio de espectrofotometría UV-Vis.

Tabla 4.4. Peso de nanopartículas cargadas con RIF para las pruebas de liberación.

Prueba de liberación	Nanopartículas cargadas con RIF (mg)	ppm (mg/L)
C52C1	26	6.61
C52C2	40	8.85
C53C1	88.7	16

4.3.4. Caracterizaciones

Determinación de tamaño por microscopía electrónica.

La microscopía electrónica ha permitido la caracterización estructural y morfológica de las nanopartículas poliméricas a partir de imágenes, por medio de las cuales se ha podido medir su tamaño, forma y distribución. De cada una de las muestras de látex se prepararon diluciones de 0.1 g de látex en 20 g de agua. Se tomó una gota de la muestra y

se colocó en una rejilla de cobre recubierta con Lacey Carbon. La rejilla se dejó secar y posteriormente fue teñida con ácido fosfotúngstico. Las mediciones se efectuaron en el microscopio electrónico de barrido-transmisión JEOL JSM-7401F. Una vez obtenidos los resultados se utilizó el programa ImageJ para realizar la medición de tamaño de partícula y a partir de ahí, Dn, Dw e PDI.

Medición de peso molecular.

Esta determinación se efectuó en mediante la dilución de 5 mg del polímero seco en 5 mL de THF (tetrahidrofurano). El peso molecular obtenido fue relativo al poliestireno.

Determinación del contenido de RIF en las partículas.

Para la cuantificación de RIF en las partículas secas se preparó primero una curva de calibración de 6 puntos: 10, 20, 40, 60 y 100 ppm de RIF en cloroformo grado espectrofotométrico en el espectrofotómetro UV-Visible. Después, de cada muestra a analizar se tomaban 2 mg y se disolvían en 10 mL de cloroformo. A partir de los resultados de las mediciones en el equipo y la curva de calibración se determinó el contenido de RIF en las partículas. En cuanto a las pruebas de liberación, para determinar el % de RIF liberado durante el proceso, se preparó una curva de calibración de 7 puntos: 1, 2, 3, 5, 10, 15 y 20 ppm de RIF en solución buffer fosfato a pH de 7.2. Las muestras colectadas durante la prueba fueron analizadas en el espectrofotómetro UV-Visible.

Análisis de espectrometría infrarroja.

Muestras de RIF, así como de las nanopartículas cargadas (C52C1, C52C2 y C53C1) fueron analizadas por espectrometría infrarroja de reflectancia total atenuada.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Polimerización de ECA

5.1.1. Cinética

La Figura 5.1 muestra el comportamiento cinético de las polimerizaciones realizadas a diferentes flujos, en donde se puede observar la variación de la conversión instantánea (X_i) y la conversión global (X) en función del tiempo relativo de reacción (t_r). X_i se define como la proporción de monómero del total agregado hasta un tiempo dado que se ha convertido a polímero; X es la fracción del monómero total en la formulación que ha pasado a polímero en un tiempo dado y, t_r es el tiempo de reacción dividido entre el tiempo total de reacción. De los resultados obtenidos se puede ver que existe una relación inversamente proporcional entre el flujo de dosificación de monómero y X_i , debido a que se operó en condiciones ávidas de monómero. De acuerdo con la literatura es un hecho reconocido la relación inversa entre X_i y el flujo de dosificación de monómero, mientras el resto de las variables se mantenga sin cambio [51-53]. Cabe aclarar que el efecto del flujo de dosificación de monómero ha sido estudiado ampliamente en el caso de polimerización por radicales libres; sin embargo no se conocen reportes en la literatura especializada sobre el estudio de este efecto en el caso de la polimerización aniónica de los alquil cianoacrilatos en dispersiones acuosas estabilizadas con surfactantes. De hecho, este sería el primer reporte sobre el tema. En condiciones de avidez de monómero, al ser más lenta la dosificación, la concentración de monómero dentro de las partículas disminuye, lo cual hace que la velocidad de crecimiento volumétrico de las mismas disminuya. Esto trae como consecuencia la formación de un mayor número de partículas, lo que finalmente conduce a un mayor consumo de la fracción del monómero agregado. Es de notar la disminución de X_i , a partir de poco más de la mitad del tiempo relativo de reacción (0.6) en los flujos más bajos (sobre todo en el más bajo), así como su incremento en el caso del flujo alto. Para proponer una explicación a estos efectos se deberá conocer antes el efecto del flujo de dosificación sobre el tamaño de partícula.

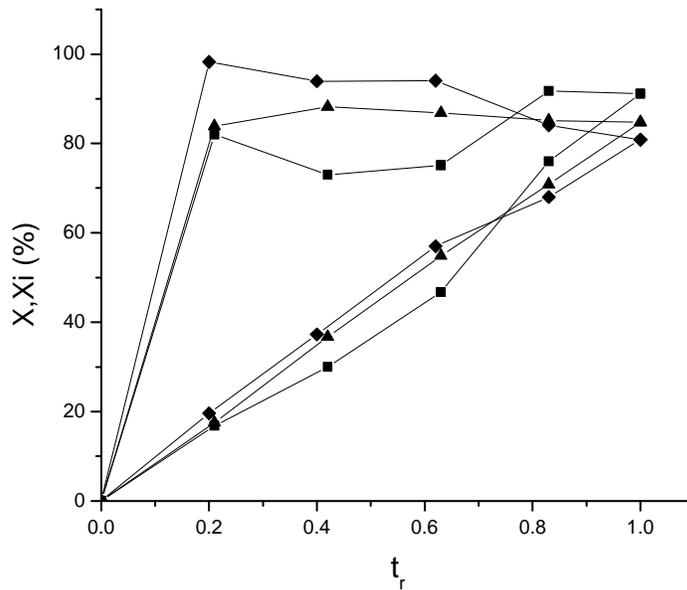


Figura 5.1. Comportamiento cinético de las polimerizaciones para flujos de 0.0055 (◆), 0.0083 (▲) y 0.017 (■) g/min.

5.1.2. Evolución del tamaño de partícula

La polimerización efectuada al flujo de 0.017 g/min dio una sola población de partículas con D_n de 42.33 nm y una dispersidad muy amplia, con un PDI de 1.4. Al disminuir el flujo a 0.0055 g/min se obtuvieron dos poblaciones de partículas: una de partículas pequeñas con D_n de 15.56 nm y PDI de 1.11 y otra de grandes con D_n de 36.21 y PDI de 1.13. En las Figuras 5.2 y 5.3 se muestran micrografías representativas y los correspondientes histogramas de diámetros de partícula obtenidos a los flujos de 0.017 y 0.0055 g/min, respectivamente.

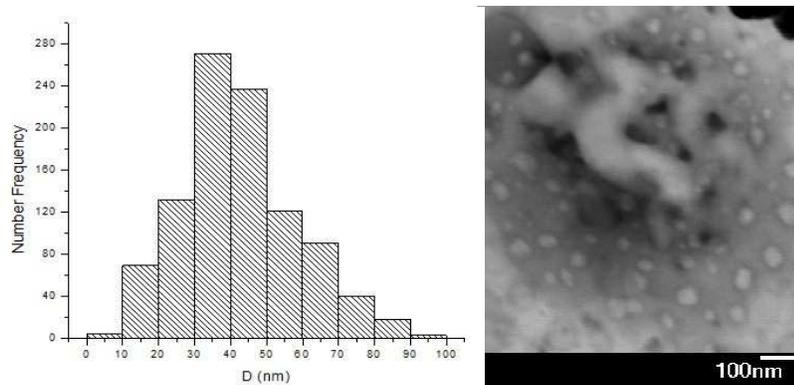


Figura 5.2. Histograma y micrografía de diámetros de partícula para flujo de 0.017 g/min.

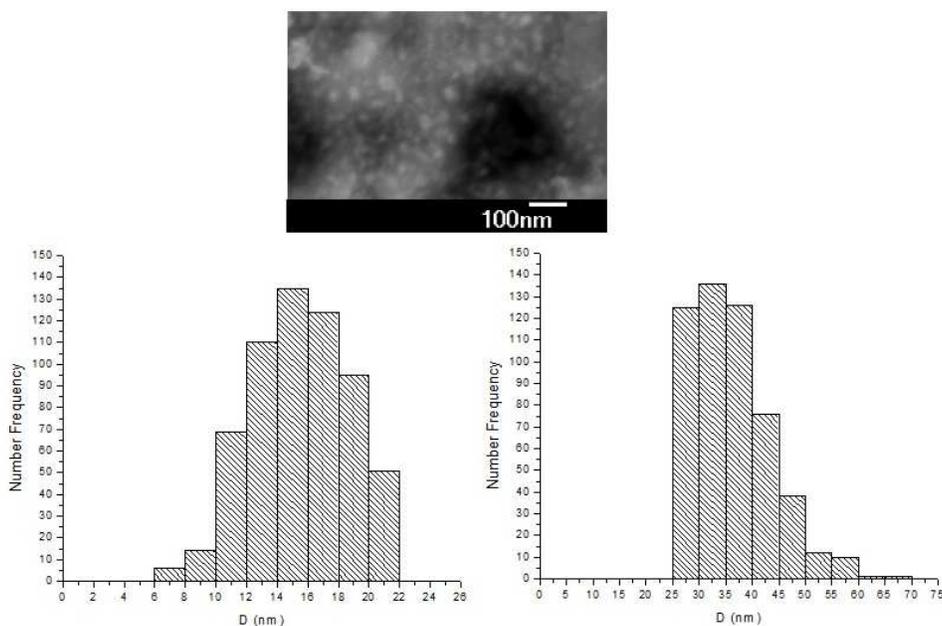


Figura 5.3. Histogramas y micrografía de la población de partículas pequeñas y grandes para flujo de 0.0055 g/min.

De las micrografías en las figuras correspondientes al flujo de 0.0055 g/min es evidente que las partículas grandes están formadas por agregados de una fracción de las más pequeñas y que la individualidad de estas últimas es preservada, esto quiere decir, que no coalescen. Las preguntas que surgen ahora, son ¿por qué sólo al flujo más bajo se

forman dos poblaciones de partículas? ¿Por qué, una fracción de las partículas pequeñas se agrega para dar lugar a partículas más grandes?

Respecto a la causa de la pequeñez de la población de las partículas pequeñas de PECA obtenidas al flujo más bajo en este estudio, se cree que la lentitud con la cual se agregó el monómero a la solución micelar, es la razón por la cual se obtuvo este resultado. Esto surge de la operación de polimerización en heterofase en semicontinuo [53-55] que permite obtener nanopartículas poliméricas con diámetros menores a 50 nm, contenido de sólidos de hasta 25-30% y todo el surfactante en el látex estabilizando las partículas. Sin embargo, para operar, esta técnica requiere de aplicar las llamadas condiciones de avidez de monómero durante el período de la adición [53]. Krackeler y Naidus [53] acuñaron este término cuando explicaron el menor tamaño de las partículas obtenidas en la polimerización en emulsión de estireno en modo semicontinuo comparada con el proceso por lotes. Estos autores recurrieron a la correlación desarrollada para polimerización en emulsión por Smith y Ewart [56] para predecir el número de partículas (N_p), en el cual N_p es inversamente proporcional a la tasa de crecimiento volumétrico de las partículas poliméricas durante el período de nucleación. Cuando las partículas están saturadas con monómero, crecen a su máxima velocidad, como consecuencia, la nucleación de partículas es mínima. En la polimerización en emulsión en semicontinuo, la saturación de partículas con monómero es alcanzada por la operación bajo condiciones de inundación de monómero. En contraste, la operación bajo condiciones de avidez de monómero, es decir, cuando el monómero en las partículas está por debajo de su concentración de saturación, disminuye la tasa de crecimiento de la partícula, lo que resulta en un mayor número de partículas pequeñas. Estas condiciones se logran mediante la adición del monómero a flujos de dosificación muy bajos.

Para explicar por qué se obtuvieron dos poblaciones de partículas al flujo más bajo habría que calcular el área cubierta por una molécula de surfactante para una partícula pequeña promedio. Se estimó primeramente calculando N_p en el látex, mediante la siguiente ecuación:

$$N_p = 6C_p / \pi \rho_p D_n^3 \quad (5.1)$$

donde C_p es la contenido de polímero en el látex en g y, ρ_p , la densidad del polímero en g/mL tomando 1.1 g/mL para PECA. En este cálculo se tomó el valor de D_n de la población de partículas pequeñas, independientemente de si están aisladas o agregadas formando las partículas más grandes. El área total de las partículas se obtuvo calculando el área de una partícula promedio y multiplicándola por el número total de partículas en el látex. El número de moléculas de surfactante fue calculado del peso molecular del surfactante (1310 g/mol), su cantidad en la formulación y suponiendo que todo el surfactante está en las partículas. De esta manera, se obtuvo un valor del área superficial de partícula cubierta por una molécula de surfactante de 3.56 nm². Este valor es muy alto comparado con un valor típico en partículas poliméricas estables en dispersiones acuosas, como es el valor de 0.5 del surfactante iónico dodecil sulfato de sodio (SDS) [57], lo cual sugiere que las moléculas de TW80 proveen solo estabilidad parcial a las partículas de PECA. Un cálculo similar se efectuó para el flujo de 0.017 g/min. En este caso se obtuvo que una molécula de surfactante cubría 1.44 nm² de superficie de partícula, es decir, un valor apreciablemente menor que el correspondiente al flujo más bajo. El mayor valor de área cubierta por molécula de surfactante a este flujo indica que las partículas estarían menos protegidas ante una posible agregación, es decir, que serían menos estables. Como resultado, una fracción de las partículas se tuvieron que agregar para reducir el área interfacial total buscando su estabilidad, de modo que al final quedó una población formada por las partículas grandes resultantes de la agregación, coexistiendo con las partículas pequeñas que no se agregaron. Al aumentar el flujo y alejarse de las condiciones de avidez total de monómero, se obtuvieron partículas más grandes y más estables, dado el menor valor de área cubierta por una molécula de surfactante. De este modo, al ser suficientemente estables, las partículas no tuvieron que agregarse para incrementar su estabilidad.

De acuerdo a lo anterior, se puede decir que en el sistema en estudio en las polimerizaciones efectuadas a flujos suficientemente bajos se obtendrían partículas muy pequeñas e inestables, una parte de las cuales se agregarían para formar partículas más grandes y más estables, dando como resultado un látex con dos poblaciones de partículas. En contraste, a flujos suficientemente altos las partículas formadas ya no serían tan

pequeñas, aumentando así su estabilidad. No habría agregación y, por lo tanto, se tendría una sola población de partículas.

Con el propósito de obtener partículas un poco más grandes que las pequeñas obtenidas al flujo más bajo, pero en una sola población, se efectuó una polimerización (con su réplica) a un flujo intermedio entre 0.017 y 0.0055 g/min, esto es, a 0.011 g/min. Dado que se desconoce el flujo límite a partir del cual un incremento en su valor resulta en una sola población de partículas, no se sabía si el flujo intermedio seleccionado permitiría obtener el resultado buscado. Sin embargo, la medición del tamaño de cerca de 1000 partículas mostró que la polimerización al flujo indicado, así como su réplica, habían dado una sola población, con valores de D_n de 27.31 y 30.43 nm, respectivamente y con 1.3 y 1.2 como valores correspondientes de PDI. En la Figura 5.4 se muestra una micrografía representativa y el histograma de diámetros de partícula a partir del cual se calcularon los diámetros promedio para estas polimerizaciones. Siguiendo el procedimiento de cálculo ya descrito se obtuvieron valores de área de superficie de partícula cubierta por molécula de surfactante de 2.84 y 2.07 para la polimerización al flujo de 0.011 g/min y su réplica, respectivamente. Como se puede apreciar, estos valores ocupan un lugar intermedio entre los obtenidos al operar a los flujos extremos e indicarían que a las condiciones estudiadas una molécula de surfactante puede estabilizar a una partícula de PECA lo suficiente como para evitar su agregación.

Lo acabado de exponer respalda la explicación dada previamente para la relación inversa entre X_i y flujo. A flujos bajos se obtienen partículas más pequeñas y en mayor número, lo cual da un mayor número de sitios de reacción. También permitiría proponer una causa de la disminución de X_i en la segunda mitad de la polimerización, la cual se pondría en los siguientes términos. Al inicio de la polimerización se forma un gran número de partículas pequeñas, una fracción de las cuales se agrega para formar partículas más grandes. Aunque conservan su individualidad, las partículas pequeñas que se agregaron ya no son sitio de reacción, puesto que están en el interior de las grandes y no pueden tener acceso a más monómero. Se piensa que durante la primera parte de la polimerización el número de partículas pequeñas en donde ocurren las reacciones es suficientemente grande

para conducir a altos valores de Ξ . Sin embargo, en la segunda parte, la pérdida de partículas pequeñas por agregación disminuiría sustancialmente el número de sitios de reacción, lo cual incidiría adversamente en Ξ .

Por otro lado, el incremento en Ξ después de $t_r = 0.6$ en la polimerización al flujo más alto podría estar relacionado con un aumento en los sitios de reacción, es decir, en el número de partículas. Es conocido que en polimerización en semicontinuo en presencia de surfactantes en concentraciones relativamente grandes, es común la formación de partículas aún en las etapas finales del proceso [8, 51, 52]. Además, a diferencia de las polimerizaciones a flujos bajos, en este caso no habría pérdidas de sitios de reacción al no haber agregación de partículas para aumentar su estabilidad.

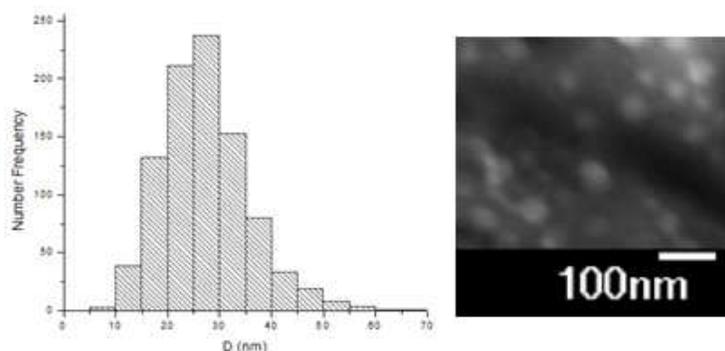


Figura 5.4. Histograma y micrografía de diámetros de partícula para el flujo de 0.011 g/min.

5.1.3. Evolución del peso molecular

Se ha reportado en la literatura especializada sobre polimerización de alquil cianoacrilatos en fase acuosa dispersa que los pesos moleculares son en general muy bajos. El-Egakey et al. [58] polimerizaron varios alquil cianoacrilatos y determinaron un efecto directo de la concentración de surfactante sobre el peso molecular. Encontraron que los valores fluctuaban entre 1,000 y 2,900 g/mol. Por su parte, Seijo et al. [28] polimerizaron cianoacrilato de isobutilo y cianoacrilato de isohexilo, en donde encontraron valores de Mn de entre 2,500 y 3,000 Da. En el presente trabajo se obtuvieron también pesos moleculares bajos como se observa en la Tabla 5.1 y la Figura 5.5 El peso molecular (Mn) para los flujos de 0.017 y 0.0083 g/min muestra en general valores del orden de los 2,200-2,400 g/mol a lo largo de la polimerización, pero al disminuir el flujo a 0.0055 g/min el peso molecular muestra un incremento al alcanzar valores de 2,600-2,700 g/mol, hasta conversiones cercanas a 50 %. Sin embargo, a conversiones mayores a este flujo, Mn disminuye hasta llegar a cerca de 2,500 g/mol. De hecho esta tendencia de disminución se ve también en Mw. En general, se puede decir que los pesos moleculares son muy similares en los flujos intermedio y alto y que no registran gran variación durante el progreso de la polimerización. Por su parte, en el flujo más bajo se aprecia que los pesos moleculares son un poco mayores y una ligera tendencia a disminuir después de aproximadamente 50 % de conversión.

Tabla 5.1. Pesos moleculares promedio obtenidos en las polimerizaciones a diferentes flujos.

Flujo 0.017 g/min				
Reacción	Conv. Global (%)	Mw	Mn	PDI
C-07	16.86	2365	2072	1.14
C-03	29.97	2536	2395	1.06
C-04	46.75	2537	2310	1.1
C-05	76.05	2538	2337	1.09
C-06	91.14	2591	2396	1.08

Flujo 0.0083 g/min				
Reacción	Conv. Global (%)	Mw	Mn	PDI
C-08	17.52	2508	2225	1.13
C-09	36.68	2509	2342	1.07
C-10	54.85	2559	2274	1.13
C-11	70.88	2567	2141	1.2
C-12	84.7	2517	2089	1.2
Flujo 0.0055 g/min				
Reacción	Conv. Global (%)	Mw	Mn	PDI
C-13	19.63	3232	2712	1.19
C-14	37.3	3238	2703	1.2
C-15	56.98	2889	2674	1.08
C-18	68.02	2745	2487	1.1
C-23	80.85	2799	2517	1.11

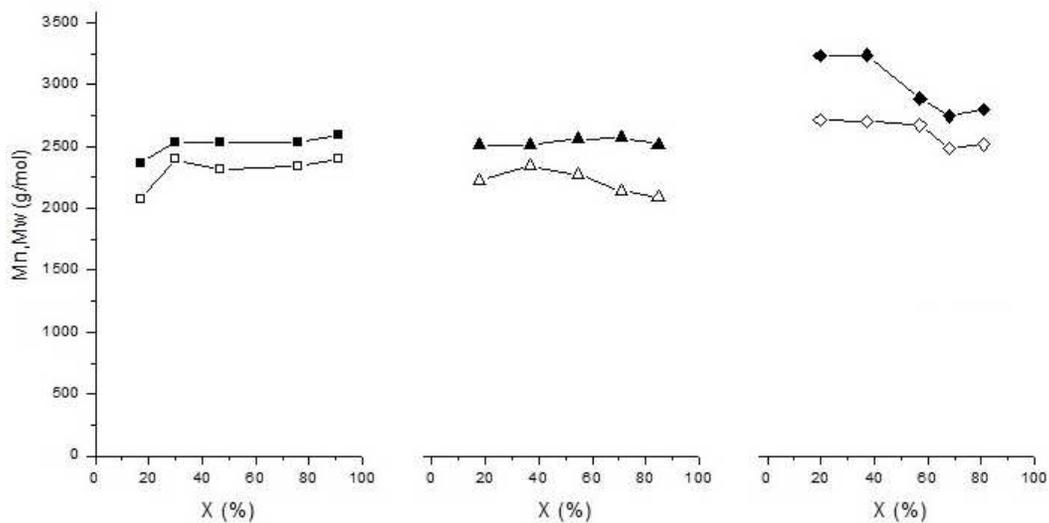


Figura 5.5. Evolución de pesos moleculares promedio con la conversión en las polimerizaciones efectuadas a los flujos de 0.017 (■), 0.0083 (▲) y 0.0055 (◆) g/min.

En la Figura 5.6 se muestran las distribuciones de pesos moleculares obtenidas a conversiones bajas, medias y finales en las polimerizaciones efectuadas a los diferentes flujos estudiados.

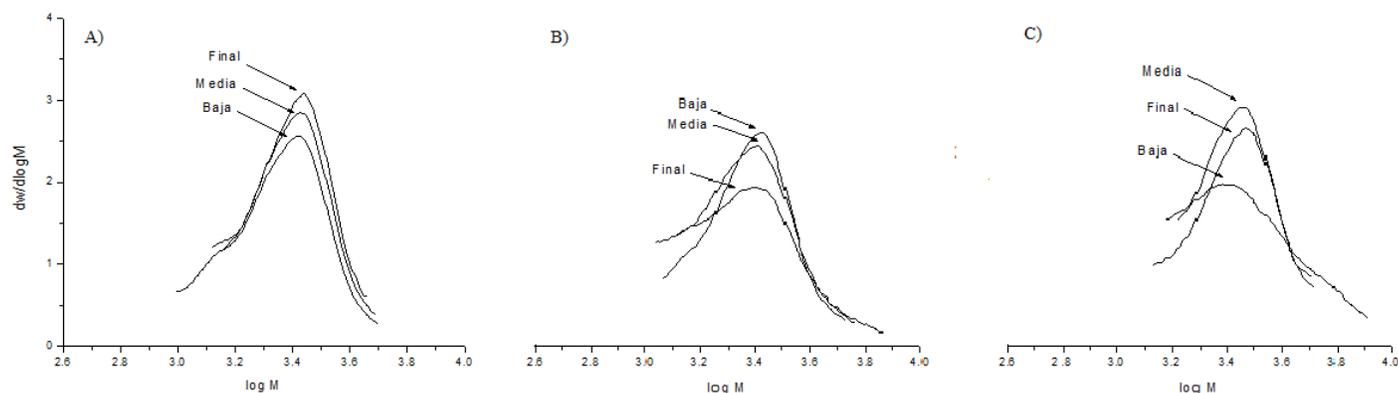


Figura 5.6. Distribución de pesos moleculares para los flujos de 0.017 (A), 0.0083 (B) y 0.0055 (C) g/min. A conversiones baja, media y final.

En la polimerización en emulsión de los alquil cianoacrilatos se acepta que dentro de las partículas el crecimiento de las cadenas poliméricas termina con su protonación al entrar en contacto con un protón proveniente del medio acuoso [7]. No obstante, no está claro como un protón de la fase acuosa entraría a la partícula o tal vez es que el extremo activo de la cadena en propagación y el protón se encuentran cerca de la superficie de la partícula. El mayor peso molecular obtenido al flujo más bajo en la primera parte de la polimerización podría tener su origen en el gran número de partículas pequeñas en ese período. Comparativamente, la relación partículas a protones en la fase acuosa al flujo más bajo sería mayor que a los flujos más altos, lo cual conduciría a una disminución en la frecuencia en que los protones penetran a las partículas, disminuyendo, consecuentemente la frecuencia de terminación. Sin embargo, en la segunda parte de la polimerización y como ya se había señalado antes, se piensa que el número de partículas pequeñas aisladas disminuiría sustancialmente, con lo cual la relación de partículas a protones también disminuiría. Esto traería como consecuencia un incremento en la frecuencia de penetración

de protones a las partículas, una mayor frecuencia de terminación de crecimiento de las cadenas y, por lo tanto, una disminución en el peso molecular promedio.

Por otra parte, como ya se señaló líneas atrás, es común la obtención de bajos pesos moleculares en la polimerización de alquil cianoacrilatos en dispersiones acuosas estabilizadas con surfactante. Pensamos que esto podría ser causado por un bajo valor de la constante cinética de propagación del monómero o uno alto de la constante de terminación de crecimiento de las cadenas o una combinación de ambos. También pudiera tener su origen en una alta velocidad de terminación a causa de la gran disponibilidad de iones H^+ al operar a pH's bajos. Un argumento a favor de esta última hipótesis se tendría en lo reportado por Das *et al.* [29]. Estos autores polimerizaron isobutil cianoacrilato en dispersiones acuosas estabilizadas con surfactante y a pH's de entre 2 y 7. A pH de 2 los valores de M_n fueron de entre 1,000 y 13,000 g/mol, aproximadamente. En cambio a pH de 7, se obtuvieron valores de M_n de entre 26,000 y 600,000 g/mol. Los autores dicen que a bajos valores de pH el período de crecimiento de las cadenas es muy corto, y por lo tanto se forman oligómeros o cadenas poliméricas de bajo peso molecular, debido a la alta concentración de H^+ . Luego, completan la discusión diciendo que a altos valores de pH el período de crecimiento de las cadenas es más prolongado y, el peso molecular mayor, debido a que la concentración de H^+ es más baja.

5.1.4. Pruebas de cargado de RIF en nanopartículas de PECA

Se llevaron a cabo 3 pruebas de cargado de RIF en las nanopartículas de PECA. Para esto se efectuaron dos polimerizaciones (C-52 y C-53), en las cuales los contenidos de sólidos obtenidos fueron de 7.92 y 9.34 %, respectivamente. Luego, estos látex previamente diluidos fueron sometidos al procedimiento de cargado, mediante el agregado de una solución de RIF en diclorometano al 15 %. Después del añadido la mezcla inmediatamente pasó del color blanco original del látex a un color anaranjado debido al color del RIF y con partículas dispersas de este mismo color pero más intenso. El sistema se mantuvo con

agitación hasta que ya no se observaban las partículas dispersas. En ese momento se dio por terminada el proceso de cargado.

En la Tabla 5.2 se muestran los contenidos teóricos y experimentales de RIF en las partículas cargadas. El contenido teórico para cada caso se determinó a partir de la concentración de partículas en el látex preparado para cargar y la cantidad de fármaco agregada. El contenido experimental se determinó a partir de mediciones por espectrofotometría UV-vis. En la misma Tabla 5.2, se incluye la eficiencia de cargado para cada prueba; los valores obtenidos, entre 80 y 100 %, indican altas eficiencias de cargado y, por lo tanto, buena compatibilidad entre las cadenas de PECA y la molécula de RIF.

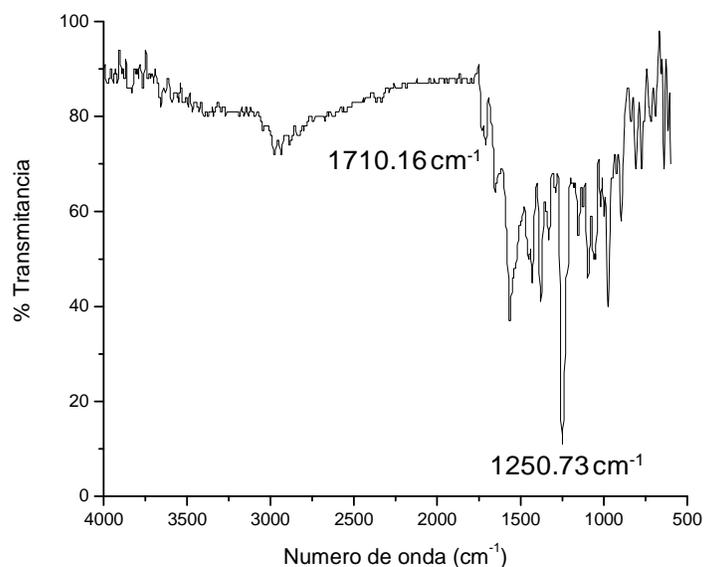
Tabla 5.2. Contenidos teóricos, experimentales y eficiencia de cargado de RIF.

Prueba de cargado	% RIF teórico	% RIF experimental	Eficiencia de cargado (%)
C52C1	12.58	12.71	100
C52C2	12.19	11.06	90.73
C53C1	11.27	9.02	80.03

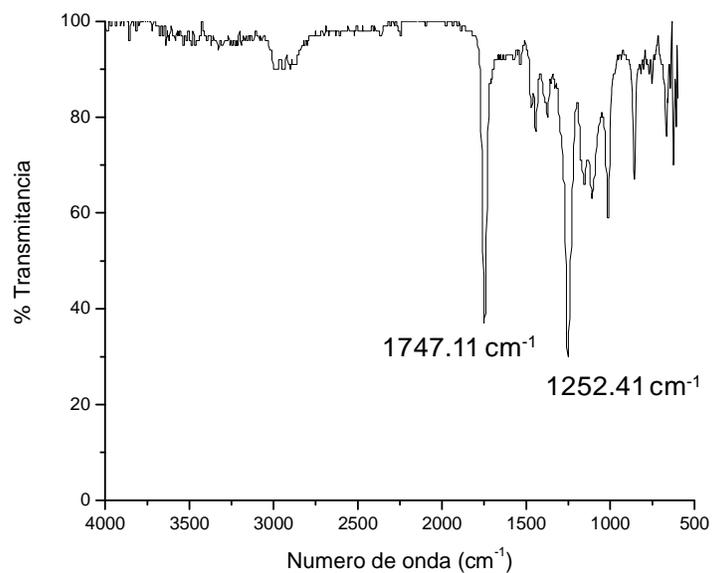
5.1.5. Identificación de RIF por IR en las nanopartículas cargadas

Las Figuras 5.7 a 5.10 muestran los espectros IR de la RIF así como los de las partículas cargadas C52C1, C52C2 Y C53C1. En el espectro de la RIF (Figura 5.7) se muestran las señales características de la estructura química del fármaco que son 2934.94 cm^{-1} (-NH), 1710.16 cm^{-1} (-C=O), 1651.96 cm^{-1} (-CONH₂), 1564.42 cm^{-1} (C=C), 1250.73 cm^{-1} (-C-O-C-). En la Figura 5.8 correspondiente a las partículas cargadas C52C1 se observan las señales de 1252.41 cm^{-1} y 1747.11 cm^{-1} , las cuales son de las más importantes en la molécula de RIF. Estas señales también se presentan en la Figura 5.9 (1250.35 cm^{-1} y 1746.31 cm^{-1}) y 5.10 (1251.71 cm^{-1} y 1746.66 cm^{-1}) correspondientes a las partículas cargadas C52C2 y C53C1 respectivamente.

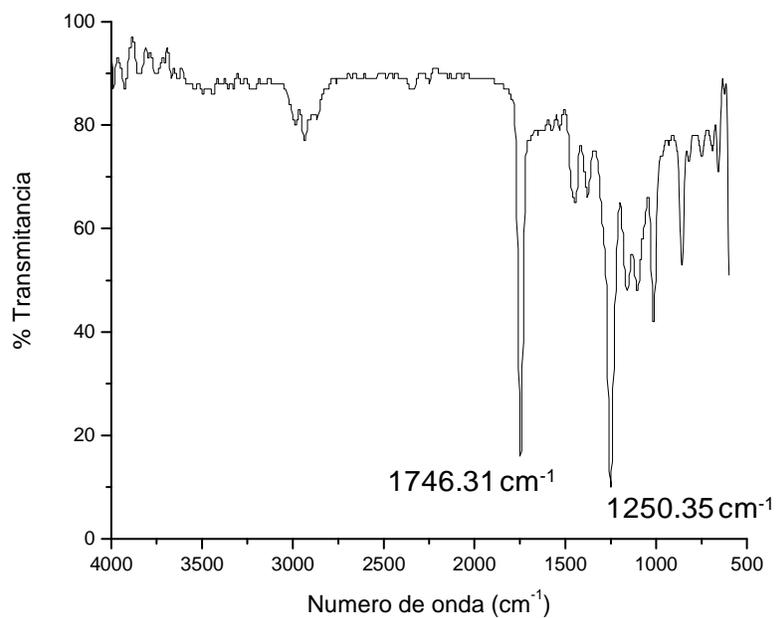
Los resultados anteriores sugieren que no hubo modificación de la estructura química de la RIF durante el procedimiento de cargado.



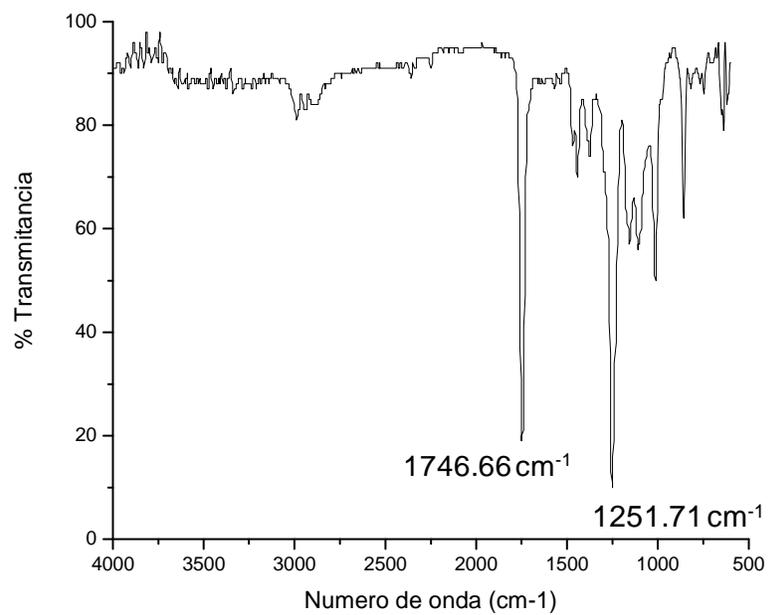
5.7. Espectro FTIR de RIF.



5.8. Espectro FTIR de nanopartículas cargadas con RIF (C52C1).



5.9. Espectro FTIR de las nanopartículas cargadas con RIF (C52C2).



5.10. Espectro FTIR de las nanopartículas cargadas con RIF (C53C1).

5.1.6. Pruebas de liberación de las nanopartículas de PECA cargadas con RIF

En la Figura 5.11 se aprecia que la RIF libre en la bolsa de diálisis se libera más rápidamente que en los casos de la nanopartículas cargadas con el fármaco. La RIF libre muestra una liberación cercana al 50 % a las 7 h y un 100 % a las 26 h. Por su parte, en dos de las partículas cargadas (C52C1 y C53C1) el 50 % de liberación se alcanza en 10 a 12 h, mientras que en la C52C2 ese porcentaje se logra a las 32 h, aproximadamente. En ninguna de las pruebas con partículas cargadas se logró el 100 % de liberación en el tiempo de duración de las mismas. De acuerdo con los contenidos de RIF en las partículas, estas diferencias en las tasas de liberación no pueden ser atribuidas a las diferencias en las cargas, ya que la liberación más lenta se observó en la prueba C52C2, que contiene 11.06 % de RIF, en tanto que las otras dos, que mostraron una liberación más rápida, presentan contenidos del fármaco una por encima (12.71 %) y otra por debajo (9.02 %) de ese valor. Tampoco se podrían adscribir a diferencias en los tiempos de cargado, ya que son muy similares. Más bien, se podría pensar que las diferencias en las tasas de liberación serían originadas por diferencias en el acomodo de las moléculas de RIF dentro de las partículas. Aún más, en el caso de la liberación más lenta se podrían haber formado cristales, lo cual habría disminuido la difusión del fármaco.

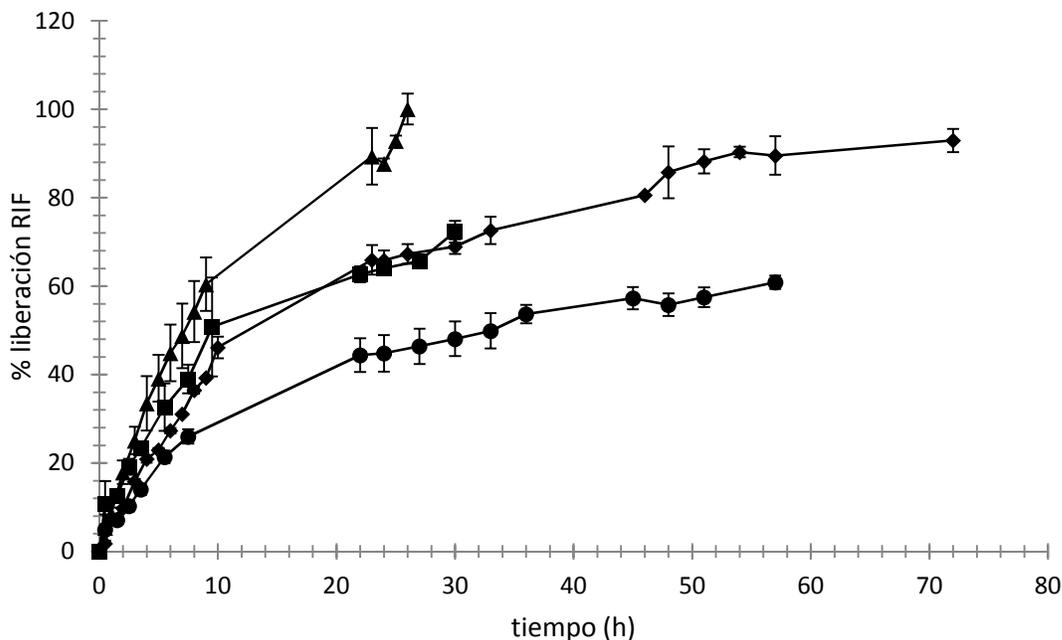
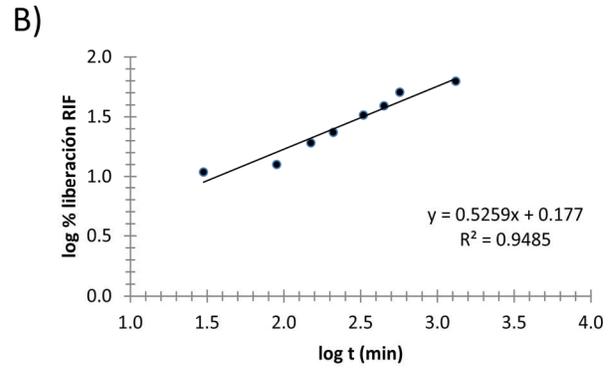
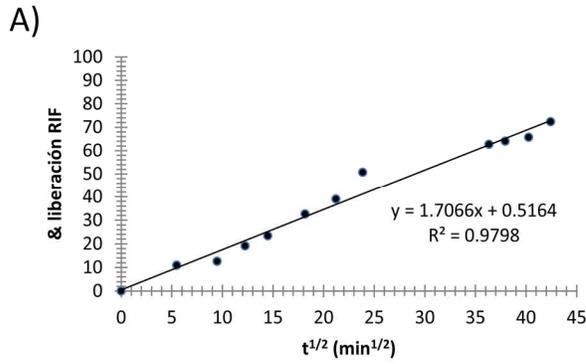
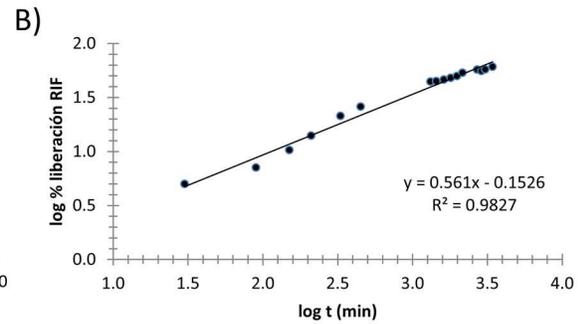
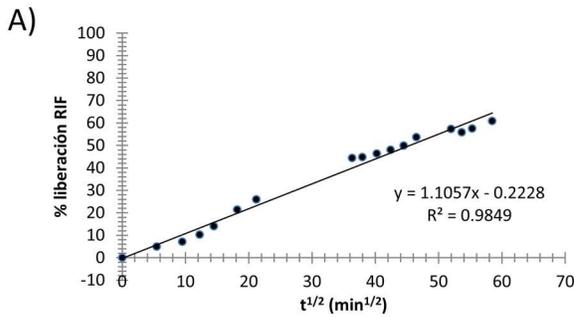


Figura 5.11. Tasas de liberación: Nanopartículas cargadas con RIF pruebas C52C1 (■), C52C2 (●), C53C1 (◆) y RIF libre (▲).

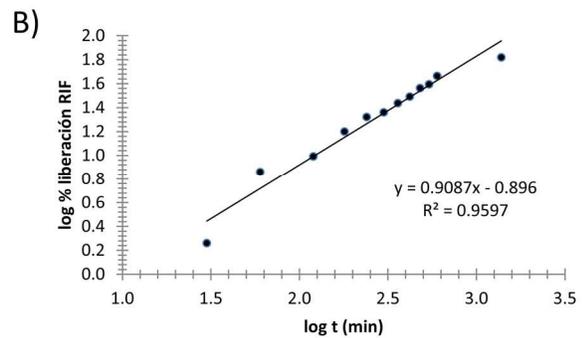
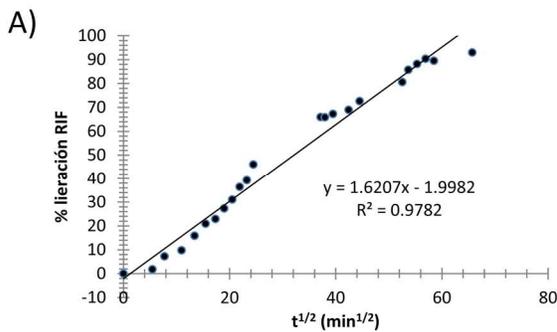
Para analizar los datos de liberación in vitro, fueron utilizados dos modelos cinéticos, para describir la liberación. En las figuras 5.12 a 5.14 se muestran las gráficas que representan estos modelos; el porcentaje de liberación del fármaco en función de la raíz cuadrada del tiempo (modelo de Higuchi) y log del porcentaje de liberación acumulada hasta el 60% en función del tiempo (modelos de Korsmeyer-Peppas). En todos los casos se observa un coeficiente de correlación mayor en el modelo de Higuchi por lo tanto este modelo fue el que mejor se ajustó a los datos obtenidos, lo cual indica que la liberación del fármaco sigue un mecanismo de difusión fickiano, esto implica que la RIF sale de la matriz polimérica mediante difusión a causa del gradiente de concentraciones [59].



5.12. Graficas representativas: A) modelos de Higuchi, B) modelo de Korsmeyer-Peppas para la prueba C52C1.



15.3. Graficas representativas: A) modelos de Higuchi, B) modelo de Korsmeyer-Peppas para la prueba C52C2.



15.4. Graficas representativas: A) modelos de Higuchi, B) modelo de Korsmeyer-Peppas para la prueba C53C1.

De acuerdo con la literatura, los materiales adecuados para ser utilizados como sistemas suministradores de fármacos, deben ser biocompatibles y si es posible biodegradables o al menos ser capaces de ser excretados por el organismo. Como se mencionó anteriormente, los PACA's son materiales biodegradables, aunque inicialmente se pensaba que esta degradación ocurría vía una reacción inversa de Knoevenagel, la cual genera formaldehído y el monómero de origen [60]. Sin embargo, este mecanismo de degradación ya ha sido descartado y en su lugar es ahora aceptado que lo que en realidad ocurre es una hidrólisis de los enlaces esteres de los polímeros para generar el alcohol correspondiente y el poli (ácido acrílico) [61]. Estos productos son solubles en agua y por lo tanto eliminados vía renal, en el caso de que los PACA's hayan sido usados como vehículos para administración de fármacos. Es conocido también que hay una relación inversa entre la velocidad de degradación del PACA y la longitud de la cadena, por lo cual se esperaría que los fármacos se liberen más rápidamente a medida que el peso molecular del alquil cianoacrilato con el que se elaboraron las partículas sea menor.

6. CONCLUSIONES

El empleo de la técnica de polimerización en heterofase en semicontinuo condujo a la obtención de nanopartículas de PECA con diámetros promedio de hasta 30 nm, determinados por STEM, dispersas en un fase acuosa en la cual representan cerca del 10 % del peso.

La variación en el flujo de dosificación del ECA sobre la solución micelar demostró que la conversión instantánea es función inversa del flujo. Asimismo, se encontró que al flujo más bajo se obtienen partículas muy pequeñas (15.6 nm en D_n), pero inestables, razón por la cual una fracción de ellas se agregan para formar una población adicional de partículas un poco más grandes. En cambio, al flujo más alto, se obtiene una sola población de partículas de mayor tamaño (D_n de 42.3 nm) pero estables ya que no hay evidencias de agregación. Estos resultados permitieron inferir que existe una relación directa entre el tamaño de partícula y el flujo de dosificación. Una polimerización efectuada a un flujo

intermedio entre el valor más alto y el más bajo de los previamente estudiados permitió obtener un látex con una sola población de partículas con diámetro promedio cercano a 30 nm.

En general, los pesos moleculares obtenidos fueron muy bajos. Esto se atribuyó a la alta concentración de iones H^+ , los cuales actúan como agentes de terminación del crecimiento de las cadenas poliméricas. Los mayores pesos moleculares se obtuvieron al flujo más bajo, probablemente debido a la alta relación partículas a iones H^+ , lo cual disminuyó la tasa de terminación de las cadenas.

Las partículas de PECA preparadas al flujo intermedio fueron cargadas con hasta 12.7 % de RIF, determinado por espectrofotometría IR. Las pruebas de liberación por el método de diálisis indican que el fármaco es liberado más lentamente desde las partículas cargadas al compararse con la liberación del RIF libre en las bolsas de diálisis. El análisis matemático de los datos indica que la liberación de la RIF desde las partículas de PECA sigue el modelo de Higuchi.

Este reporte es el primero en la literatura especializada en el que se documenta: i) el estudio sistemático del efecto del flujo de dosificación de monómero sobre una solución micelar; y ii) la obtención de partículas tan pequeñas de algún PACA, basado en mediciones por microscopía electrónica, distribuidas en una sola población y dispersas en un látex en una concentración mayor que cualquiera reportada previamente.

7. REFERENCIAS

1. Graft A., McDowell A., Rades T. Poly (alkyl cyanoacrylate) nanoparticles for enhanced delivery of therapeutics - is there real potential? *Drug. Deliv.* 2009, 6, 371-387.
2. Yordanov G. Poly (alkil cyanoacrylate) nanoparticles as drug carriers: 33 years later. *Bulg. J. Chem.* 2012, 1, 61-72.
3. Douglas SJ., Illum L., Davis SS. Particle size and size distribution of poly (butyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles. II. Influence of stabilizers. *J. Colloid Interface Sci.* 1985, 103, 154-163.
4. Weiss CK., Ziener U., Landfester K. A Route to nonfunctionalized and functionalized poly (n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles: preparation in miniemulsion. *Macromolecules.* 2007, 40, 928-938.
5. Elsabahy M., Wooley KL. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 2545-2561.
6. Douglas SJ., Illum L., Davis SS., Kreuter J. Particle size and size distribution of poly (butyl- 2-cyanoacrylate) nanoparticles. *J. Colloid Interf. Sci.* 1984, 101, 149-158.
7. Behan N., Birkinshaw C., Clarke N. Poly n-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polimerisation and particle formation. *Biomaterials.* 2001, 22, 1335-1344.
8. Ledezma R., Treviño ME., Elizalde LE., Pérez-Carrillo LA., Mendizábal E., Puig, JE., López RG. Semicontinuous heterophase polymerization under monomer starved conditions to prepare nanoparticles with narrow size distributions. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 2007, 45, 1463-1473.
9. Thassu D., Deleers M., Pathak Y. In: Nanoparticulate Drug Delivery System. *Informa Healthcare USA.* 2007, 1-31.
10. Jain KK. In: *Drug Delivery Systems;* 2008, 1-50.

11. Otto DP., de Villiers MM. 1. Physicochemical Principles of Nanosized Drug Delivery Systems. *Nanotechnology in Drug Delivery*. Ed. Springer. 2009, 3-33.
12. Khanna SC., Speiser P. Epoxy resin beads as pharmaceutical dosage form I: methods of preparation. *J. Pharm. Sci.* 1969, 58, 1114–1117.
13. Brasseur F., Couvreur P., Kante B., Deckers-Passau L., Roland M., Deckers C., Speisers P. Actinomycin D adsorbed on poly methylcyanoacrylate nanoparticles: increased efficiency against an experimental tumor. *Eur. J. Cancer.* 1980, 16, 1441–1445.
14. Kraehenbuhl JP., Neutra MR. Epithelial M cells: Differentiation and Function. *Annual Review of Cell. Dev. Biol.* 2000, 16, 301-332.
15. Stella B., Arpicco S., Rocco F., Marsaud V., Renoir JM., Cattel L., Couvreur P. Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. *I. J. Pharmaceut.* 2007, 344, 71–77.
16. Alves Pereira M., Furtado Mosqueira VC., Carneiro Vilela JM., Spangler Andrade M., Andrade Ramaldes G., Nascimento Cardoso V. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with ^{99m}Techneium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008, 33, 42–51.
17. Hyang H. J., Hyeon YL., You SG., Jin-Chul K. Colloidal stability and in vitro permeation study of poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules containing hinokitiol. *J. Ind. Eng. Chem.* 2008, 14, 608–613.
18. Mi-Jung Ch., Apinan S., Onanong N., Sang-Gi M., Uracha R. Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion–diffusion method. *Food Res. Int.*, 2009, 42, 148–156.
19. Young-II J., Hee-Sam N., Dong-Hyuk S., Dong-Gon K., Hyun-Chul L., Mi-Kyeong J., Sang-Kwon N., Sung-Hee R., Sun-II K., Jae-Woon N. Ciprofloxacin-encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity. *Int. J. Pharmaceut.* 2008, 352, 317–323.

20. Lertsutthiwong P., Rojsitthisak P., Nimmannit U. Preparation of turmeric oil-loaded chitosan-alginate biopolymeric nanocapsules. *Mat. Sci. Eng.* 2009, 29, 856–860.
21. Chen Y., Lin X., Park H., Greever R. Study of artemisinin nanocapsules as anticancer drug delivery systems. *Nanomedicine: NBM.* 2009, 5, 316–322.
22. Tartaj MP., Veintemillas-Verdaguer S., González-Carreño T., Serna CJ. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D Appl. Phys.* 2003, 36, 182.
23. Des Rieux A., Fievez V., Garinot M., Schneider YJ., Pr at V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J. Cont. Rel.* 2006, 116, 1–27.
24. Vauthier C., Dubernet C., Fattal E., Pinto-Alphandary H., Couvreur P. Poly (alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 2003, 55, 519–548.
25. Gyu Han M., Kim S., X Liu S. Synthesis and degradation behavior of poly (ethyl cyanoacrylate). *Polym. Degrad. Stabil.* 2005, 93, 1243-1251.
26. Bootz A., Russ T., Gores F., Karas M., Kreuter J. Molecular weights of poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles determined by mass spectrometry and size exclusion chromatography. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005, 60, 391–399.
27. Couvreur P., Kante B., Roland M., Guior P., Bauduin P., Spezsur P. Poly cyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. *J. Pharm. Pharmacol.* 1979, 31, 331.
28. Seijo B., Fattal E., Roblot-Treupel L., Couvreur P. Design of nanoparticles of less than 50 nm diameter: preparation, characterization and drug loading. *Int. J. Pharm.* 1990, 62, 1-7.
29. Sudip K D., G Tucker I., J.T. Hill D., Ganguly N. Evaluation of Poly (isobutylcyanoacrylate) Nanoparticles for Mucoadhesive Ocular Drug Delivery. I. Effect of

Formulation Variables on Physicochemical Characteristics of Nanoparticles. *Pharm. Res.* 1995, 12, 4.

30. Yang SC., Ge HX., Hu Y., Jiang XQ., Yang CZ. Formation of positively charged poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles stabilized with chitosan. *Colloid Polym Sci.* 2002, 227, 228-292.

31. Limouzin A., Caviggia A., Ganachaud F., Hemery F. Anionic Polymerization of n-Butyl Cyanoacrylate in Emulsion and Miniemulsion. *Macromolecules.* 2003, 36, 667-674.

32. Chauvierre C., Labarre D., Couvreur P., Vauthier C. Radical Emulsion Polymerization of Alkylcyanoacrylates Initiated by the Redox System Dextran-Cerium (IV) under Acidic Aqueous Conditions. *Macromolecules* 2003, 36, 6018-6027.

33. Bertholon-Rajot I., Labarre D., Vauthier C. Influence of the initiator system, cerium-polysaccharide, on the surface properties of poly (isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *Polymer.* 2005, 46, 1407–1415.

34. Alhareth K., Vauthier C., Gueutin C., Ponchel G., Moussa F. Doxorubicin Loading and In Vitro Release from Poly (alkylcyanoacrylate) Nanoparticles Produced by Redox Radical Emulsion Polymerization. *J. Appl. Polym. Sci.* 2011, 119, 816–822.

35. Rajan M., Raj V. Encapsulation, characterization and in-vitro release of anti-tuberculosis drug using chitosan-polyethylene glycol nanoparticles. *Int. J. Pharm. Pharmac. Sci.* 2012, 4.

36. Kumar Behera A., Barik BB., Joshi S., Shah S. Formulation and evaluation of Rifampicin loaded poly – ε- caprolactone nanoparticles using 3² factorial design. *Int. J.Res. Pharm. Sci.* 2012, 3(2), 340-347.

37. Center of disease control and Prevention, 2013.

38. Rana F. Rifampicin- an overview. *Int. J. Res. Pharm. Chem.* 2013, 3(1), 2231-2781.

39. Sigma Product Information. No. R3501.

40. Lacerda L., Parize LA., Fávère V., Laranjeira MCM., Stulzer KH. Development and evaluation of pH-sensitive sodium alginate/chitosan microparticles containing the antituberculosis drug rifampicin. *Mater. Sci. Eng. C*. 2014, 39, 161-167.
41. Sigh C., Bhatt DT., Gill SS., Suresh S. Novel rifampicin-phospholipid complex for tubercular therapy: Synthesis, physicochemical characterization and in vitro evaluation. *Int. J. Pharm.* 2014, 460, 220-227.
42. D'Mello SR., Das SK., Das NG. In: Drug Delivery Nanoparticles. *Informa Healthcare USA*. 2009.
43. Esmaili F., Hosseini-Nasr H., Rad-Malekshahi M., Samadi N., Atayani F., Dinarvard R. Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles. *Nanomedicine*. 2007, 3, 161-167.
44. Pandey R., Sharma A., Zahoor A., Sharma S., Khuller GK., Prasad B. Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2003, 52, 981-986.
45. Ain Q., Sharma S., Garg SK., Khuller GK. Role of poly [DL-lactide-co-glycolide] in development of a sustained oral delivery system for antitubercular drug(s). *Int. J. Pharm.* 2002, 239, 37-46.
46. Dutt M., Khuller GK. Chemotherapy of Mycobacterium tuberculosis infections in mice with a combination of isoniazid and rifampicin entrapped in Poly (DL-lactide-co-glycolide) microparticles. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001, 47, 829-835.
47. Pandey R., Khuller GK. Subcutaneous nanoparticle-based antitubercular chemotherapy in an experimental model. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004, 54, 266-268.
48. Tomada K., Makino K. Effect of lung surfactants on rifampicin release rate from monodisperse rifampicin-loaded PLGA microspheres. *Colloids and Surfaces B*. 2007, 55, 115-124.

49. Tripathi A., Gupta R., Saraf SA. Nanoparticles of Anti Tubercular Drug: Drug Loading and Release Studies of a Water In-Soluble Drug. *Int. J. PharmTech. Res.* 2010, 2(3), 2116-2123.
50. Ledezma R., Treviño ME., Elizalde E. et al. "Semicontinuous heterophase polymerization under monomer starved conditions to prepare nanoparticles with narrow size distribution," *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 2007, 45, (8), 1463–1473.
51. Wu X., Li H., Xu Y., Xu B., Tong H., Wang L. Thin film fabricated from solution-dispersable porous hyperbranched conjugated polymer nanoparticles without surfactants. *Nanoscale.* 2014, 6, 2375–2380.
52. Thassu D., Deleers M., Pathak Y. Nanoparticulate Drug Delivery System; *Informa Healthcare.* 2007, 1–31.
53. Krackeler JJ., Naidus H. Particle size and molecular weight distributions of various polystyrene emulsions. *J. Polym. Sci. Part. C.* 1969, 27, 207–235.
54. Pérez-García MG., Rabelero M., Nuño-Donlucas SM., Mendizábal E., Martínez Richa A., López RG., Arellano M., Puig JE. "Semicontinuous heterophase polymerization of n-butyl methacrylate: Effect of monomer feeding rate". *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* 2012, 49, 539-546.
55. Pérez-García MG., Alvarado AG., Rabelero M., Arellano M., Pérez-Carrilo LA., López-Serrano F., López RG., Mendizábal E., Puig JE. "Semicontinuous heterophase polymerization of methyl and hexyl methacrylates to produce latexes with high nanoparticles content". *J. Macromol. Sci. Pure App. Chem.* 2014, 51, 144-155.
56. Smith WV., Ewart RH. "Kinetics of Emulsion Polymerization" *J. Chem.Phys.* 1948, 16, 592-599.
57. Ramírez AG., López RG., Tauer K. "Studies on semibatch microemulsion polymerization of butylacrylate influence of the potassium peroxodisulfate concentration". *Macromolecules.* 2004, 37, 2738-2747.

58. El-Egakey MA., Verena B., Kreuter J. & G. Molecular weights of polycyanoacrylate nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 1983, 13, 349-352.
59. Shoaib M.H., Tazeen J., Merchant A.H., Yousuf R.I. Evaluation of drug release kinetics from ibuprofen matrix tablets using HPMC. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2006, 19 (2), 119-124.
60. Leonard F., Kulkarni P.K., Arandes G., Nelson J., Mamemn J.J. Synthesis and degradation of poly-(alkylecyanoacrylates). *J. Applied Polym. Sci.* 1966, 10, 259-272.
61. C. Lherm, R. Muller, F. Puisieux, P. Couvreur, *Int. J. Pharm.* 1992, 84, 13-22.