



**Universidad Nacional Autónoma  
de México**

---

---

**Facultad de Estudios Superiores  
Cuautitlán**

**SISTEMAS NANOPARTICULADOS DE  
APLICACIONES FARMACÉUTICAS  
(REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA)**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

**ANTONIO MARTÍNEZ PÉREZ**

ASESORA:

**M. en C. ELVIA ADRIANA MORALES  
HIPÓLITO**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO, 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

C. M. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE



ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Sistemas nanoparticulados de aplicaciones farmacéuticas  
(revisión bibliográfica)

que presenta el pasante: Martínez Pérez Antonio  
con número de cuenta: 09951243-5 para obtener el título de :  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de octubre de 2009

PRESIDENTE	<u>DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	
VOCAL	<u>Dra. Flora Adriana Ganem Rondero</u>	
SECRETARIO	<u>MC. Elvia Adriana Morales Hipólito</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dra. Elizabeth Piñon Segundo</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Dr. Roberto Díaz Torres</u>	

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS**

A mis padres: Francisca y Félix por su apoyo, comprensión y cariño.

A mis hermanos: Beatriz, Juana, Ma. Luisa, Isaías, Rogelio, Pablo y Gerardo quienes me apoyaron durante mis estudios y me dieron fortaleza para concluir la licenciatura.

A la Dra. Elizabeth García García quien me asesoró y apoyó al inicio de esta tesis.

A la M. en C. Elvia Adriana Morales Hipólito por sus consejos, enseñanzas y comprensión.

Al LEDEFAR (Laboratorio de Desarrollo Farmacéutico) por darme la ayuda teórica y práctica durante el desarrollo de esta tesis.

A la Profa. Dra. Raquel López y Al Prof. D.A.R. Juan José Díaz por su ayuda y motivación.

A la FESC y a la UNAM por mi formación profesional.

## **ÍNDICE GENERAL**

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	I
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	VI
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	X
<b>ABREVIATURAS</b>	XI
<b>RESUMEN</b>	XIII
<b>INTRODUCCIÓN</b>	XV
<b>OBJETIVOS</b>	XVII
<b>CAPÍTULO 1: HISTORIA DE LAS NANOPARTÍCULAS</b>	
1.1 Definición.	1
1.2 Historia.	2
1.3 Clasificación.	4
<b>CAPÍTULO 2: MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS</b>	
2.1 Métodos de preparación de nanopartículas por polimerización.	8
2.1.1 Nanoesferas de poliacrilamida y polimetilmetacrilato.	8
2.1.2 Nanoesferas de policianoacrilatos de alquilo.	11
2.2 Métodos de preparación de nanocápsulas por polimerización.	15
2.2.1 Nanocápsulas de policianoacrilatos de alquilo.	15
2.3 Métodos de preparación de nanoesferas a partir de un polímero preformado.	19
2.3.1 Preparación de nanoesferas a partir de polímeros sintéticos por la técnica de emulsión.	19
2.3.2 Preparación de nanoesferas a partir de polímeros	21

sintéticos por la técnica de salting out.

2.3.3 Preparación de nanoesferas a partir de polímeros sintéticos por la técnica de desolvatación o nanoprecipitación. 23

2.3.4 Preparación de nanoesferas a partir de polímeros naturales por la técnica de emulsificación. 24

2.3.5 Preparación de nanoesferas a partir de polímeros naturales por la técnica de desolvatación. 27

2.3.6 Preparación de nanoesferas a partir de polímeros por la técnica de fluidos supercríticos. 28

2.4 Métodos de preparación de nanocápsulas a partir de un polímero preformado. 30

2.4.1 Preparación de nanocápsulas a partir de un polímero por la técnica de emulsificación espontánea (emulsión doble). 30

2.5 Preparación de nanocápsulas a partir de un polímero por la técnica de policondensación interfacial por medio de la electroforesis capilar. 32

### **CAPÍTULO 3: CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS**

3.1 Caracterización del tamaño de las nanopartículas. 37

3.2 Caracterización de la forma de las nanopartículas. 43

3.3 Caracterización de la carga superficial de las nanopartículas. 43

3.4 Caracterización del peso molecular de las nanopartículas. 45

3.5 Caracterización de la cristalinidad de las nanopartículas. 47

3.6 Caracterización de la hidrofobicidad de las nanopartículas. 49

3.7 Caracterización de las propiedades de superficie de las nanopartículas. 50

## **CAPÍTULO 4: APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS**

4.1 Tratamiento del cáncer con nanopartículas.	54
4.1.1 Nanopartículas de doxorubicina.	54
4.1.2 Nanopartículas de 5-fluorouracilo.	61
4.1.3 Nanopartículas de paclitaxel.	62
4.1.4 Nanopartículas de metotrexato.	64
4.1.5 Nanopartículas de mitoxantrona.	64
4.1.6 Nanopartículas de dactinomicina.	65
4.1.7 Nanopartículas de vindesina.	66
4.1.8 Nanopartículas de tamoxifeno.	67
4.1.9 Nanopartículas de cistatinas.	70
4.1.10 Nanopartículas de oligonucleotidos antisentido.	73
4.2 Tratamiento de infecciones intracelulares con nanopartículas.	75
4.2.1 Nanopartículas de ampicilina.	75
4.3 Tratamiento de enfermedades neurodegenerativas con nanopartículas.	76
4.3.1 Alzheimer.	79
4.3.2 Principales fármacos utilizados para el paso de la barrera hematoencefálica.	81
4.4 Tratamiento de enfermedades respiratorias.	81
4.4.1 Tuberculosis.	82
4.4.2 Liberación aerosólica en pulmones de nanopartículas.	83
4.5 Utilización de la vía nasal para la administración de nanopartículas.	85
4.5.1 Nanopartículas de polietilenglicol-ácido poliláctico	87

conjugadas con lectina para su administración intranasal.	
4.5.2 Nanopartículas recubiertas con quitosán para mejorar la mucoadhesión.	88
4.6 Administración oral de nanopartículas.	89
4.6.1 Descripción básica del intestino delgado.	90
4.6.1.2 Mecanismos por medio de los cuales las nanopartículas atraviesan la mucosa intestinal.	91
4.6.1.3 Transporte paracelular de nanopartículas.	92
4.6.1.4 Transporte transcelular de nanopartículas	93
4.6.2 Administración de vacunas y proteínas por vía oral.	96
4.7 Administración ocular de nanopartículas.	100
4.7.1 Anatomía del ojo humano.	100
4.7.2 Liberación de fármacos por medio de nanopartículas a través de la vía ocular.	101
4.8 Diagnóstico y visualización mediante nanopartículas.	102
4.8.1 Diagnóstico In Vitro.	102
4.8.2 Diagnóstico In Vivo.	103
4.8.3 Imágenes de resonancia magnética.	103
<b>CAPÍTULO 5: NANOPARTÍCULAS DE LA TERCERA GENERACIÓN</b>	
5.1 Nanopartículas con anticuerpos monoclonales.	106
5.1.1 Métodos de acoplación de los anticuerpos monoclonales a las nanopartículas.	112
5.1.2 Nanopartículas acopladas al anticuerpo monoclonal trastuzumab.	114
5.2 El receptor folato y su utilidad como blanco para las nanopartículas de la tercera generación.	116
5.2 Nanopartículas de albúmina acopladas con ácido fólico.	117



<b>CONCLUSIONES</b>	120
<b>COMENTARIOS FINALES</b>	121
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Nanoesfera.	1
Figura 2	Nanocápsula.	2
Figura 3	Nanoesfera y nanocápsula.	5
Figura 4	Nanopartícula de la segunda generación.	6
Figura 5	Efecto de la densidad del polietilenglicol.	6
Figura 6	Nanopartícula de la tercera generación.	7
Figura 7	Formación de nanoesferas de polimetilmetacrilato.	9
Figura 8	Formación de nanoesferas de poliacrilamida.	10
Figura 9	Mecanismo de formación de NP de PACA.	12
Figura 10	Formación de NP de PACA.	13
Figura 11	Mecanismo de reacción de PACA.	14
Figura 12	Mecanismo de formación de nanocápsulas.	18
Figura 13	Formación de nanocápsulas de PACA.	18
Figura 14	Molécula de ácido poliláctico.	20
Figura 15	Formación de nanoesferas de ácido poliláctico.	21
Figura 16	Formación de nanoesferas por Salting Out.	22
Figura 17	Formación de nanoesferas por nanoprecipitación.	24
Figura 18	Estructura tridimensional de la albúmina.	25
Figura 19	Formación de nanoesferas por emulsificación.	26
Figura 20	Formación de nanoesferas por desolvatación.	28
Figura 21	Formación de nanoesferas por fluidos supercríticos.	29
Figura 22	Formación de nanocápsulas por doble emulsión.	31

## *Índice de figuras*

---

---

Figura 23	Formación de nanocápsulas por policondensación interfacial.	33
Figura 24	Movimiento Browniano.	38
Figura 25	Instrumento para determinación de tamaño.	38
Figura 26	Funcionamiento de instrumento para determinación de tamaño.	39
Figura 27	Funcionamiento de microscopio electrónico.	40
Figura 28	Microscopio de fuerza atómica.	41
Figura 29	Microscopio de barrido de efecto túnel.	42
Figura 30	Átomos de cristal de germanio.	42
Figura 31	Medidor de potencial zeta.	44
Figura 32	Cromatógrafo de permeación en gel.	46
Figura 33	Difractómetro de rayos x.	48
Figura 34	Calorimetría diferencial de barrido.	48
Figura 35	Termograma.	49
Figura 36	Columna cromatográfica.	50
Figura 37	Electroforesis en gel.	51
Figura 38	Espectroscopia fotoelectrónica de rayos x.	53
Figura 39	Espectro de cobre tricloroetano.	53
Figura 40	Molécula de doxorubicina.	55
Figura 41	Tiempo de supervivencia de ratón tratado con nanoesferas de PIHCA.	57
Figura 42	Penetración intracelular de NP con DXR.	58
Figura 43	Mecanismo de acción de resistencia a los fármacos.	58
Figura 44	Mecanismo de penetración MTP y MDP.	59

Figura 45	Molécula de uracilo y 5-fluorouracilo.	61
Figura 46	Molécula de paclitaxel.	62
Figura 47	Medicamento Abraxane <sup>®</sup> .	63
Figura 48	Molécula de metotrexato.	64
Figura 49	Molécula de mitoxantrona.	65
Figura 50	Molécula de dactinomicina.	66
Figura 51	Molécula de vindesina.	67
Figura 52	Molécula de tamoxifeno.	68
Figura 53	Concentraciones tumorales de tamoxifeno.	69
Figura 54	Estructura tridimensional de la cistatina.	70
Figura 55	Paso de la cistatina hacia adentro de las células tumorales.	72
Figura 56	Actividad de la catepsina B en células.	73
Figura 57	Molécula de ampicilina.	75
Figura 58	Barrera hematoencefálica.	77
Figura 59	Mecanismos por medio de los cuales se atraviesa la barrera hematoencefálica.	79
Figura 60	Acumulación de placa amiloide en el cerebro.	80
Figura 61	Vía pulmonar.	82
Figura 62	Micropartículas aerosolicas.	84
Figura 63	Nariz humana.	86
Figura 64	Molécula de quitosán.	89
Figura 65	Células enterocitos.	91
Figura 66	Transporte paracelular de nanopartículas.	92

Figura 67	Transcitosis.	93
Figura 68	Ojo humano.	100
Figura 69	Nanopartículas Fluospheres <sup>®</sup> .	103
Figura 70	Nanopartícula de la tercera generación.	106
Figura 71	Esquema de anticuerpo.	107
Figura 72	Obtención de anticuerpos monoclonales.	110
Figura 73	Anticuerpo quimérico.	111
Figura 74	Anticuerpo humanizado.	111
Figura 75	Reacción de conversión de un alcohol a un grupo amino.	112
Figura 76	Reacción de conversión de un grupo amino a un grupo sulfhidrilo.	113
Figura 77	Reacción para la unión de anticuerpos a la NP.	113
Figura 78	Esterificación para unir anticuerpos a la NP.	113
Figura 79	Nanopartícula acoplada a un anticuerpo monoclonal.	115
Figura 80	Molécula de ácido fólico.	116
Figura 81	Nanopartículas absorbidas por las células SKVO3.	118
Figura 82	Internalización de las NP hacia las células SKVO3.	119

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Efecto de los tensoactivos y el medio ácido en el tamaño de las nanopartículas.	12-13
Tabla 2	Diferentes métodos de preparación de NP.	34-36
Tabla 3	Propiedades biofarmacéuticas de la DXR.	55
Tabla 4	Efectividad de los oligonucleotidos antisentido.	74
Tabla 5	Fármacos utilizados para el paso de la barrera hematoencefálica.	81
Tabla 6	Estrategias para optimizar la absorción por vía oral de las NP.	95
Tabla 7	Administración oral de péptidos y proteínas encapsulados en NP.	98
Tabla 8	Respuestas inmunes después de la administración oral de vacunas.	99

**ABREVIATURAS**

ADN	Ácido desoxirribunucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AZT	Del inglés: Azidothymidine
DMAB	Del inglés: Didodecyldimethyl Ammonium Bromide
DXR	Doxorrubicina
FDA	Del inglés: Food and Drug Administration
Fig.	Figura
IBCA	Del inglés: IsobutylCyanoAcrylate
MDP	Muramil Dipéptido
MTP	Muramil Tripéptido
NP	Nanopartículas
PACA	Del inglés: Poly (AlkylCyanoAcrylate)
PBCA	Del inglés: Poly (ButylCyanoAcrylate)
PEG	Polietilenglicol
PEG-APL	Polietilenglicol-Ácido Poliláctico
PHCA	Del inglés: Poly (HexylCyanoAcrylate)
PIBCA	Del inglés: Poly (IsoButylCyanoAcrylate)
PIHCA	Del inglés: Poly (IsoHexylCyanoAcrylate)
PLA	Del inglés: Poly (Lactid Acid)
PLGA	Del inglés: Poly (Lactide-co-Glycolide Acid)
PMMA	Del inglés: Poly (Methyl Methacrylate)
PVA	Del inglés: Poly (Vinyl Alcohol)
RESS	Del inglés: Rapid Expansion of Supercritical Solution

## **Abreviaturas**

---

---

SAS	Del inglés: Supercritical Anti-Solvent
TGSP	Del inglés: Triglycine Sulpho Phosphate
UEA-1	Del inglés: <i>Ulex europaeus</i> Agglutinin 1
WGA	Del inglés: Wheat Germ Agglutinin



## **RESUMEN**

En la presente revisión bibliográfica se ha desarrollado una investigación documental sobre las nanopartículas dentro del área farmacéutica, lo cual es un tema de vanguardia, por lo que aun muchos de estos trabajos se encuentran en fase experimental. La tesis consta de 5 capítulos, a continuación se da una breve reseña de su contenido:

**Capítulo 1.-** Historia de las nanopartículas: se da una definición de los términos de nanoesfera y nanocápsula, como se clasifican y el desarrollo histórico de las nanopartículas dentro de la tecnología farmacéutica.

**Capítulo 2.-** Métodos de elaboración de las nanopartículas: hay diferentes técnicas para la preparación tanto de las nanoesferas como de las nanocápsulas, se mencionan las ventajas y desventajas de cada técnica.

**Capítulo 3.-** Caracterización de las nanopartículas: la medición de las propiedades de las nanopartículas es un aspecto importante en el desarrollo de las mismas, por lo que necesitamos conocer el tamaño, forma, potencial zeta, peso molecular, cristalinidad, hidrofobicidad y propiedades de superficie.

**Capítulo 4.-** Aplicaciones de las nanopartículas: el tratamiento de enfermedades mortales y crónicas se ven beneficiadas mediante el uso de las nanopartículas al lograrse una mayor efectividad de los fármacos. Se utilizan en: cáncer, alzheimer, infecciones intracelulares, enfermedades neurodegenerativas, tuberculosis, utilización en vías de administración: nasal, intraocular, oral; así como en el diagnóstico mediante la visualización.

**Capítulo 5.-** Nanopartículas de la tercera generación: lo que se desea es una selectividad de las nanopartículas hacia las células que únicamente se encuentren en estado patológico, al lograr esto se reducirán los efectos secundarios de muchos fármacos de manera significativa.

## **INTRODUCCIÓN**

La nanotecnología se ha convertido en una opción real para la solución de problemas en las áreas de: ciencias de los materiales, electrónica, ambiental, salud, etc.

La nanotecnología es la ciencia que controla los materiales a escala nanométrica ( $1 \times 10^{-9}$  m). Tiene sus orígenes en los años 1950's por parte del físico Richard Feynman ganador de un premio Nobel, él postula en una conferencia que es posible la manipulación de la materia en el tamaño nanométrico.

Por su parte la utilización de las nanopartículas dentro de las ciencias farmacéuticas se remonta a los años 1970's y el primero en proponer su uso fue Speiser, el utilizó nanopartículas elaboradas con polímeros sintéticos, sin embargo estas tiene la desventaja de no ser biodegradables, por lo que se pueden acumular en el cuerpo y llegar a ser altamente tóxicas. Posteriormente se hicieron nanopartículas con materiales sintéticos biodegradables tales como los cianoacrilatos de alquilo, ácido poliláctico, etc. En la actualidad para la realización de nanopartículas se utilizan tanto materiales poliméricos sintéticos biodegradables como materiales de origen natural como la albúmina y el quitosán.

A las nanopartículas las podemos dividir en dos tipos: nanoesferas y nanocápsulas.

Los sistemas nanoparticulares poliméricos han sufrido transformaciones para hacerlos más específicos. Actualmente se tienen tres generaciones de estos sistemas:

- a) Primera generación: son las primeras nanopartículas elaboradas, y se caracterizan por no tener un recubrimiento.
- b) Segunda generación: estas nanopartículas si tienen un recubrimiento polimérico a diferencia de las anteriores.
- c) Tercera generación: son las nanopartículas que utilizan los desarrollos de las dos generaciones anteriores, pero además tienen una alta especificidad hacia las células blanco.

La gran importancia del estudio y desarrollo de las nanopartículas en el área farmacéutica es que ofrecen la oportunidad del tratamiento de enfermedades como el cáncer, diabetes, alzheimer, etc., para las cuales sus tratamientos tienen demasiados efectos secundarios lo que los hace dolorosos y en ocasiones ineficaces, en cambio los tratamientos con base en las nanopartículas eliminan gran parte de los efectos secundarios y aumentan su eficacia de manera significativa.

El mérito de la presente revisión bibliográfica consiste en reunir la información que se encuentra dispersa en revistas, libros, páginas de internet, etc., con el fin de que este accesible a los estudiantes y profesionistas de las ciencias farmacéuticas.

**OBJETIVO GENERAL:**

Realizar una recopilación, clasificación y análisis de información sobre el tema de nanopartículas como una estrategia para la liberación específica de fármacos en órganos, tejidos o células, así como para la visualización y el diagnóstico.

**OBJETIVOS PARTICULARES:**

- A) Describir los principales métodos para la elaboración y caracterización de las nanopartículas.
  
- B) Enumerar las aplicaciones más importantes de las nanopartículas en el área terapéutica y de diagnóstico.
  
- C) Proporcionar un instrumento de consulta sobre sistemas nanoparticulados.

## CAPÍTULO 1

### HISTORIA DE LAS NANOPARTÍCULAS

#### 1.1 DEFINICIÓN

Las nanopartículas son sistemas coloidales los cuales están hechos de polímeros biodegradables o no biodegradables. Su tamaño varía entre 1 a 1000 nm, con un diámetro promedio de 200 nm (Fattal *et al*, 2002).

Existen 2 tipos de nanopartículas: nanoesferas y nanocápsulas.

*Nanoesferas*: son sistemas matriciales<sup>1</sup> en los cuales el fármaco se encuentra disperso en el polímero del cual esta hecha la nanopartícula, o también el fármaco se pueden encontrar adsorbido en la superficie de la nanoesfera (Fig. 1).

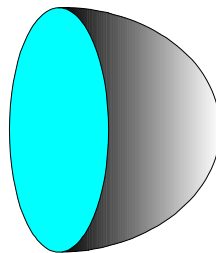


Figura 1: Se muestra una nanoesfera la cual es un sistema matricial.

*Nanocápsulas*: son sistemas con un reservorio, las cuales están compuestas de una membrana polimérica que rodea un núcleo oleoso o acuoso, en este núcleo se encuentra generalmente el fármaco; aunque también se puede encontrar el fármaco adsorbido en la superficie de la nanocápsula (Fig. 2).

---

<sup>1</sup> “Los sistemas matriciales son aquellos en los que el principio activo está uniformemente distribuido en el seno de un polímero” (Vila, 2001).

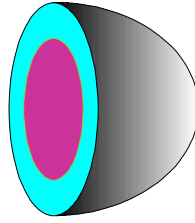


Figura 2: Se muestra una nanocápsula donde se observa como lleva una capa externa y una cavidad interior donde se puede encontrar el fármaco.

## 1.2 HISTORIA

Las primeras nanopartículas transportadoras de fármacos estaban constituidas de gelatina y albúmina, sin embargo el uso de proteínas puede estimular el sistema inmune y presentarse problemas de antigenicidad y toxicidad (Fattal *et al*, 2002). Para disminuir los efectos de antigenicidad y toxicidad se desarrollaron las nanopartículas de polímeros<sup>2</sup> sintéticos. Los primeros polímeros utilizados, propuestos por Speiser y Birrenbach en 1976, fueron los de poliacrilamida y estos se elaboraron a partir de monómeros de acrilamida y de metilmetacrilato por el método de polimerización en emulsión (Couvreur *et al*, 1996). Sin embargo estos polímeros no son biodegradables, por lo que Couvreur *et al*, propusieron polímeros biodegradables a partir de monómeros de cianoacrilatos de alquilo, estos se habían estado utilizando como pegamentos en cirugías. El método utilizado para la preparación de los policianoacrilatos de alquilo es el de polimerización en emulsión en medio ácido (Fattal *et al*, 2002). Gurny *et al*, propusieron otro método de preparación de

---

<sup>2</sup> Polímero se deriva de la palabra griega *poly*, muchos; y de *menos*, parte; esto es muchas partes. Por lo tanto un polímero es una molécula compuesta de unidades repetidas denominadas monómeros (Wingrove *et al*, 1984).

nanopartículas a partir de ácido láctico, formando el polímero de ácido poliláctico el cual es utilizado para realizar suturas en las cirugías, en este método las nanopartículas son formadas directamente a partir del polímero preformado (Fattal *et al*, 2002).

A partir de 1986 se empezaron a desarrollar métodos para la fabricación de nanocápsulas, este fue propuesto por Al Khoury, et al, El método de preparación es el de polimerización interfacial en emulsión a partir de monómeros de cianoacrilato de alquilo. En el mismo año se propone la técnica de nanoprecipitación como el primer método de polimerización interfacial en microemulsión<sup>3</sup> inversa (Fattal *et al*, 2002).

En los últimos años se han desarrollado métodos como: emulsión-difusión, doble emulsión, salting out (salado), fluido supercrítico<sup>4</sup>, evaporación del solvente, etc.

En la actualidad se están desarrollando métodos para la elaboración de nanopartículas recubiertas con agentes tensoactivos para reducir su hidrofobicidad y que de esta manera permanezcan más tiempo en el torrente sanguíneo, evitando su captura por parte de los macrófagos. La siguiente meta es el desarrollo de nanopartículas que tengan una especificidad hacia un tipo particular de células blanco.

---

<sup>3</sup> Las microemulsiones son sistemas homogéneos transparentes dispersos en aceite o agua. Son termodinámicamente estables. Tienen un tamaño de gota de 10-150nm (Vila, 2001).

<sup>4</sup> Los fluidos supercríticos se producen por el calentamiento de un gas por encima de su temperatura crítica o compresión de un líquido por encima de su presión crítica. (Williams *et al*, 2000).



Esto se puede lograr poniendo en la superficie de la nanopartícula anticuerpos monoclonales y proteínas.

### 1.3 CLASIFICACIÓN

Las nanopartículas: nanoesferas y nanocápsulas, las podemos clasificar dentro de tres generaciones:

**Primera generación:** estas fueron las primeras nanoesferas y nanocápsulas elaboradas, y se caracterizan por no tener un recubrimiento (Fig. 3). Este tipo de nanopartículas interactúan fuertemente con las proteínas plasmáticas debido a su gran área superficial, esto favorece la creación de interacciones hidrófobas fuertes<sup>5</sup> entre la superficie de la nanopartícula y las opsoninas, ocasionando que sean reconocidas por los macrófagos y especialmente por las células de Kupffer y por las células del sistema reticuloendotelial. Las nanopartículas penetran dentro de los macrófagos por endocitosis y a su vez son degradadas por las enzimas lisosomales liberando el principio activo en el interior de la célula. Sus principales aplicaciones son el tratamiento de tumores hepáticos, enfermedades hepáticas o del sistema reticuloendotelial

---

<sup>5</sup> “En los medios acuosos, el enlace de Van der Waals viene reforzado por la variación entropica del sistema resultante de la desolvatación que tiene lugar al acercarse dos moléculas orgánicas por su parte lipofila, con el consiguiente aumento de la entropía del sistema; aunque las porciones hidrocarbonadas se ordenan, un numero considerable mayor de moléculas de agua se desordena, haciendo positivo el valor de  $\Delta S$  y negativo el de  $\Delta G$ . Este refuerzo del enlace de Van der Waals, constituye el denominado enlace hidrófobo, de gran importancia en los medios biológicos.”(Delgado *et al*, 2003).

(Couvreur, 2001). La distribución de las nanopartículas de primera generación en animales se ha observado que es de la siguiente manera: hígado 40-80 % de la dosis administrada, pulmones 0.7-3 % y el bazo 0.6-2 % (Vila, 2001).

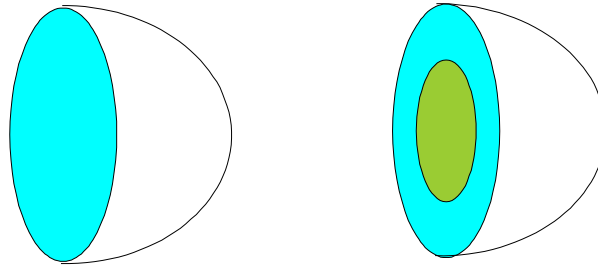


Figura 3: Se observan una nanoesfera (izquierda) y una nanocápsula (derecha) de la primera generación donde se notan sus diferencias.

**Segunda generación:** estas surgen de la necesidad de que las nanopartículas tengan una permanencia más prolongada dentro de la circulación sanguínea, por lo tanto estas tienen un recubrimiento polimérico tal como el polietilenglicol, polisorbato 80, óxido de polietileno, Poloxamer 188, etc. El mecanismo de operación del recubrimiento es que el polímero hidrofílico repele (repulsión estérica<sup>6</sup>) a las opsoninas<sup>7</sup> en esta forma ya no se adhieren a la nanopartícula (Fig. 4). De esta manera las nanopartículas de la segunda generación no son reconocidas por los macrófagos, en consecuencia teniendo un tiempo de permanencia mayor en la circulación sanguínea.

<sup>6</sup> La tensión estérica es la interacción de repulsión que se desarrolla cuando los átomos son forzados a acercarse más de lo que permiten sus radios atómicos. Es el resultado de tratar de obligarlos a ocupar el mismo espacio (McMurry, 2001).

<sup>7</sup> Las opsoninas son sustancias, por ejemplo un anticuerpo (IgG) o un C3b, que favorece la fagocitosis al facilitar la adhesión del antígeno al fagocito (Roitt, 2003).

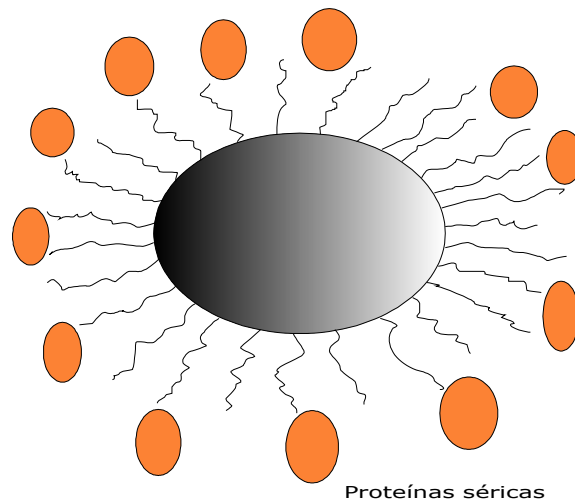


Figura 4: Las nanoesferas y las nanocápsulas de la segunda generación tienen un recubrimiento de un polímero como polietilenglicol, lo que impide la opsonización.

Por lo que las nanopartículas de segunda generación han resultado eficaces para el tratamiento de tumores cancerígenos de manera experimental (Couvreur, 2001).

Para lograr una baja adsorción de opsoninas es necesario que las NP tengan en su superficie una densidad alta y una cadena de longitud larga de polietilenglicol (Fig.5) (Soppimath *et al*, 2001).

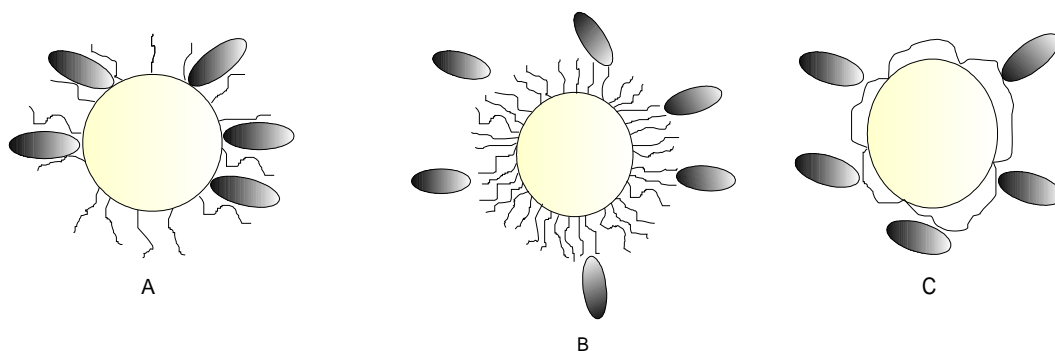


Figura 5: Efecto de la densidad de polietilenglicol sobre la superficie de las nanopartículas en el proceso de opsonización: A) se presenta la opsonización cuando la densidad es baja, B) la opsonización no se presenta cuando la densidad en la superficie es alta, C) los grupos finales de las cadenas de polietilenglicol participan en la repulsión estérica (Soppimath *et al*, 2001).

**Tercera generación:** estas son las nanopartículas que se están actualmente desarrollando debido a el deseo de tener una alta especificidad hacia las células blanco. Para lograr esto son necesarias tres características: a) de la nanopartícula construida de un material biodegradable, b) de una capa de polímeros hidrofílicos (polietilenglicol) que recubran a la nanopartícula para evitar la opsonización, c) en el extremo de las cadenas de polietilenglicol de un ligando (anticuerpos monoclonales o proteínas) que sea reconocido por los receptores específicos en las membranas de las células (Fig. 6) (Couvreur, 2001).

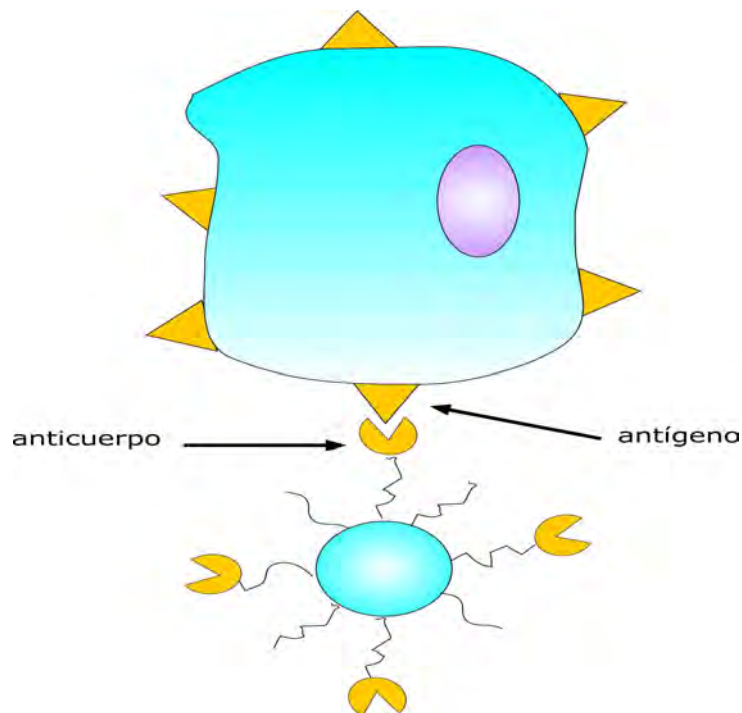


Figura 6: Las nanopartículas de la tercera generación tienen en su superficie cadenas de polietilenglicol y anticuerpos monoclonales para hacerlas más específicas hacia las células blanco.

## CAPÍTULO 2

### 2.0 MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

Los métodos de elaboración de nanopartículas se clasifican en dos grupos:

- a) Métodos de preparación de nanopartículas a partir de monómeros formando polímeros.
- b) Métodos de preparación de nanopartículas a partir del polímero preformado.

### 2.1 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE NANOESFERAS POR POLIMERIZACIÓN

#### 2.1.1 NANOESFERAS DE POLIACRILAMIDA Y POLIMETILMETACRILATO

Para la preparación de nanoesferas de polimetilmetacrilato el monómero metilmetacrilato es disuelto en una fase acuosa, la polimerización es iniciada por una irradiación de rayos  $\gamma$  o mediante el uso de un iniciador químico como el peroxodisulfato de potasio. Los oligómeros<sup>7</sup> formados precipitan formando agregados los cuales son estabilizados mediante el uso de tensoactivos. El polímero final es obtenido por la unión de los agregados (Fig. 7). El peso molecular y

---

<sup>7</sup> Polímero de muy bajo peso molecular en el que el número de unidades de repetición(n) se encuentra entre 2 y 10 (la palabra griega oligos significa pocos). (Seymour, 1998).

el tamaño de la nanoesfera se incrementan con un aumento de la concentración inicial del monómero, disminuyendo la concentración del iniciador químico, y disminuyendo la temperatura (Couvreur *et al*, 1996).

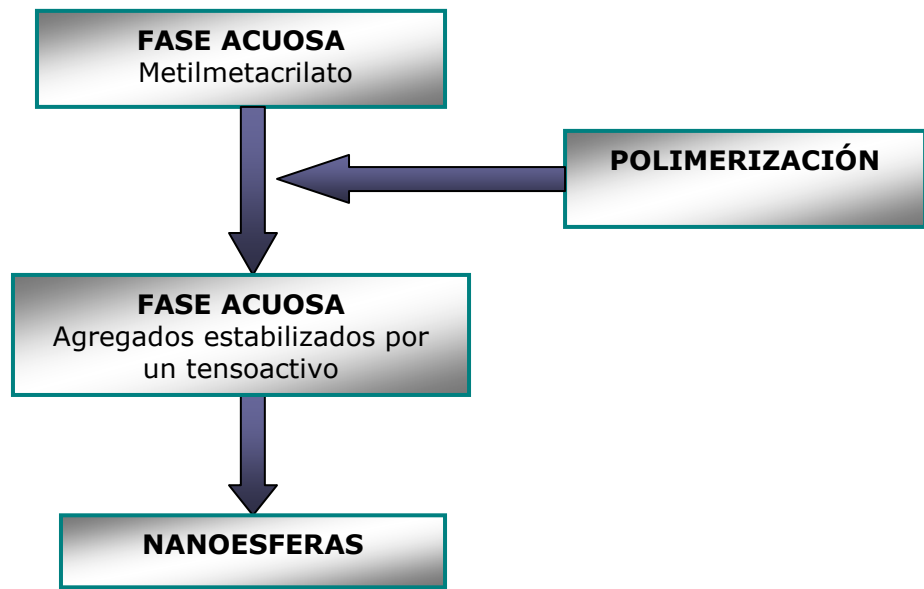


Figura 7: Diagrama donde se esquematiza la formación de nanoesferas de polimetilmetacrilato.

Las nanoesferas de poliacrilamida son preparadas a partir del monómero de acrilamida el cual es disuelto en una fase acuosa estabilizado por un tensoactivo y dispersas en una fase orgánica, la reacción de polimerización es iniciada por una irradiación de rayos  $\gamma$ , la polimerización ocurre por la unión de las micelas que colisionan (Fig. 8). El tamaño de las nanoesferas permanece constante a lo largo del proceso, únicamente se incrementa el número de nanoesferas formadas (Couvreur *et al*, 1996).

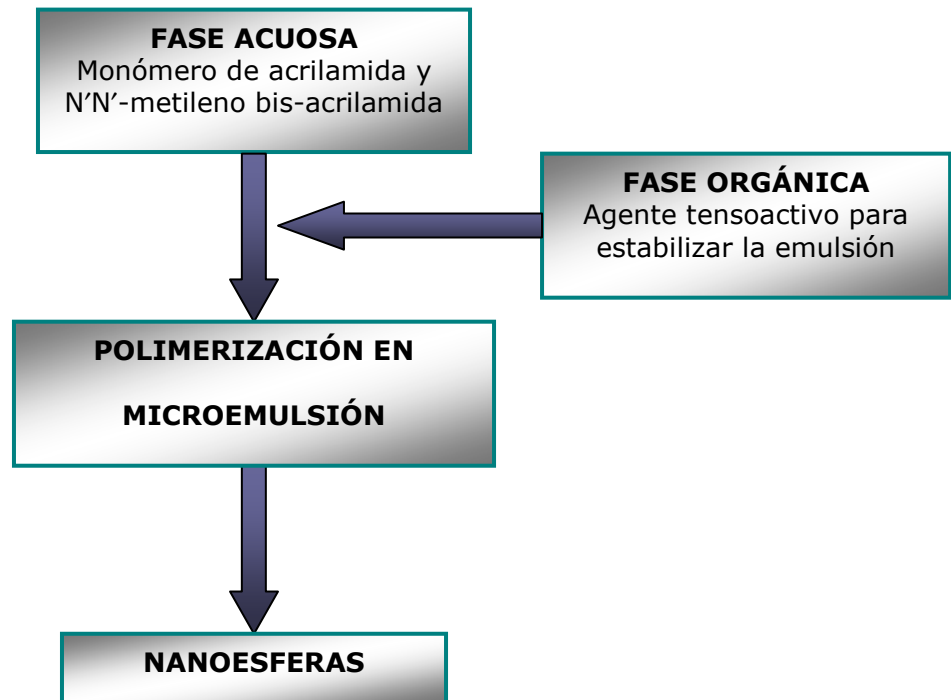


Figura 8: Se muestra la formación de nanoesferas de poliacrilamida.

### 2.1.1.2 VENTAJAS DEL MÉTODO DE POLIMERIZACIÓN DE POLIACRILAMIDA Y POLIMETILMETACRILATO

- a) Proceso fácilmente escalable.
- b) Se puede controlar el tamaño y el peso de la nanopartícula.

### 2.1.1.3 DESVENTAJAS DEL MÉTODO DE POLIMERIZACIÓN DE POLIACRILAMIDA Y POLIMETILMETACRILATO

- a) Utilización de polímeros no biodegradables.
- b) Utilización de solventes orgánicos y tensoactivos.
- c) Uso de polímeros tóxicos y por lo tanto no es posible su uso por la vía intravenosa.

### 2.1.2 NANOESFERAS DE POLICIANOACRILATOS DE ALQUILO

En este método el monómero hidrofóbico (isobutilcianoacrilato, isohehexilcianoacrilato, n-butilcianoacrilato) es emulsificado en la fase acuosa con un pH ácido ( $\approx 2.5$ ). La polimerización aniónica<sup>8</sup> es iniciada por los iones  $\text{OH}^-$ , la polimerización ocurre a temperatura ambiente, también a la emulsión se le agrega dextran 70 para estabilizar las nanoesferas formadas (Fig. 9). El medio ácido es necesario para que no se produzca una polimerización demasiado rápida y por lo tanto evitar la formación de aglomerados. El tamaño de las nanoesferas puede ser controlado regulando la concentración de 3 a 1 % de Pluronic<sup>®</sup> F68 que se va agregando teniendo un diámetro de 40-250 nm (Fig. 10) (Fattal *et al*, 2002).

---

<sup>8</sup> Polimerización iniciada por un anión.



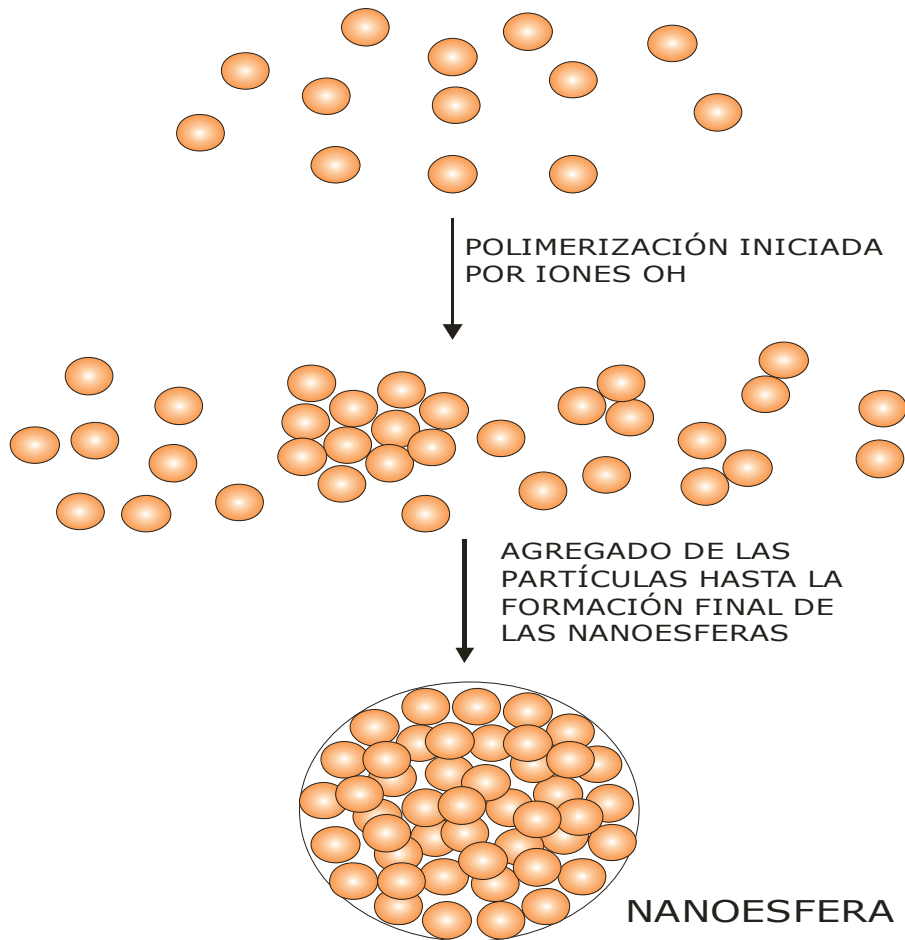


Figura 9: Mecanismo de formación de las nanoesferas de policianoacrilatos de alquilo. Todo el proceso ocurre en la fase acuosa, las nanoesferas finales son estabilizadas con un tensoactivo.

Tabla 1: Efecto de los tensoactivos y el medio ácido en el tamaño de partícula de las nanoesferas de polibutilcianoacrilatos (Kreuter, 1994).

Tensoactivo	Concentración (% p/v)	Ácido (0.01 N, pH 2.25)	Tamaño de partícula (nm)
Dextran 70	0.05	HCl	212
	0.5		148
	1.0		138
	2.5		126
Dextran 40	0.05	HCl	243
	0.5		145
	1.0		134
	2.5		131
Dextran 10	0.05	HCl	770
	0.5		168

Tensoactivo	Concentración (% p/v)	Ácido (0.01 N, pH 2.25)	Tamaño de partícula (nm)
	1.0		139
	2.5		109
β-Ciclodextrina	0.75	HCl	3450
	1.0		3000
	1.75		2700
Polisorbato 20	0.5	HCl	51.58
Polisorbato 40	0.5	HCl	46
Polisorbato 60	0.5	HCl	38
Poloxamer 184	0.5	HCl	254
Poloxamer 188	0.5	HCl	160
Poloxamer 237	0.5	HCl	118
Poloxamer 238	0.5	HCl	71
Poloxamer 338	0.5	HCl	73
Dextran 70	0.5	Citrico	131
Dextran 70	0.5	Sulfúrico	176
Dextran 70	0.5	Nítrico	158
Dextran 70	0.5	Acético	811
Dextran 70	0.5	Fosforico	219

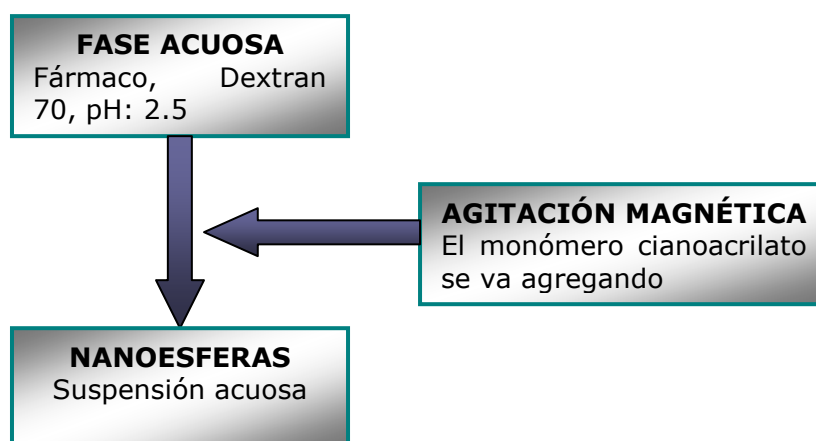


Figura 10: Se muestra la formación de nanoesferas de policianoacrilatos de alquilo.

El fármaco se puede incorporar a las nanoesferas durante el proceso de fabricación de las mismas o el fármaco también puede ser adsorbido en la superficie de la nanoesfera. La adición de ciclo-

dextrinas favorece la unión de fármacos poco solubles con el polímero y por lo tanto obtener una mejor absorción del principio activo (Vauthier *et al*, 2003).

Existen otros tipos de polimerización, tales como polimerización por radicales libres y polimerización zwiterionica; siendo las más utilizadas la aniónica y la zwiterionica por que estas ocurren a temperatura ambiente (Fig. 11) (Vauthier *et al*, 2003).

Es importante mencionar que algunos principios activos pierden su efecto terapéutico durante la preparación de las nanoesferas. Las moléculas de los principios activos reaccionan covalentemente con el polímero del que están formadas las nanoesferas. Algunos de los principios activos que pierden su actividad biológica son la fenilbutazona y la vidarabina (Fattal *et al*, 2002).

La velocidad de degradación de las nanoesferas de cianoacrilatos de alquilo depende de la longitud de su cadena de alquilo y el mecanismo de degradación es a través de un proceso de erosión en la superficie (Couvreur *et al*, 1996).

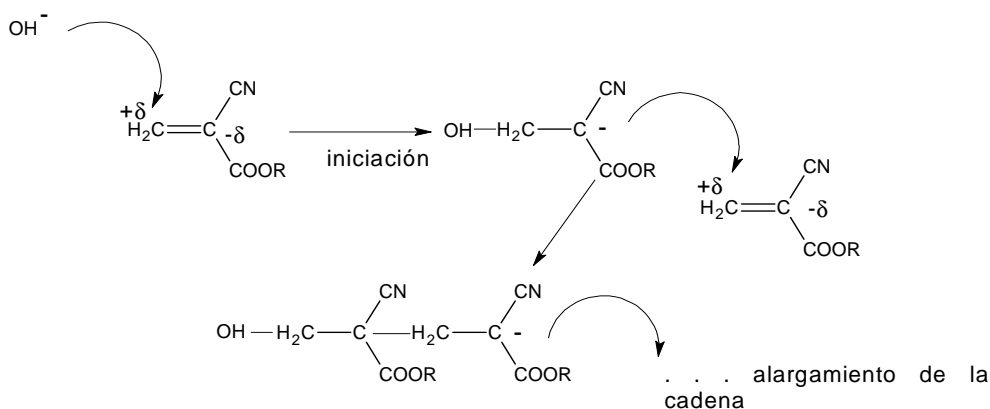


Figura 11: Se muestra el mecanismo de reacción de la polimerización aniónica del policianoacrilato de alquilo.

### **2.1.2.1 VENTAJAS DE LOS POLÍMEROS DE POLICIANOACRILATOS DE ALQUILO**

- a) Utilización de polímeros biodegradables.
- b) Fácil escalabilidad.
- c) Hay un control del tamaño de la nanopartícula.
- d) Rápida polimerización.

### **2.1.2.2 DESVENTAJAS DE LOS POLÍMEROS DE POLICIANOACRILATOS DE ALQUILO**

- a) Algunos fármacos pierden actividad biológica.
- b) Cierta grado de toxicidad.

## **2.2 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE NANOCÁPSULAS POR POLIMERIZACIÓN**

### **2.2.1 NANOCÁPSULAS DE POLICIANOACRILATOS DE ALQUILO**

Las nanocápsulas son obtenidas por una polimerización interfacial, las reacciones de polimerización se realizan en una emulsión agua en aceite o aceite en agua.

Para fabricar las nanocápsulas que contienen aceite en su interior (núcleo oleoso) se preparan a partir de una emulsión aceite en agua. La fase orgánica contiene: 1 ml de aceite, 0.125 ml de isobutil-2-cianoacrilato, fármaco disuelto en 25 ml de etanol o acetona. La fase acuosa consta de un tensoactivo hidrofílico, por ejemplo, Pluronic® F68. La fase orgánica es inyectada a la fase acuosa, la cual está bajo agitación magnética. De esta manera las nanocápsulas se van formando de manera instantánea y al finalizar la reacción alrededor

de los 15-30 minutos el etanol es removido mediante evaporización bajo presión reducida (Fig. 13). El tamaño de estas nanocápsulas tiene un diámetro de alrededor de 200-300 nm. Para favorecer la formación de nanocápsulas en vez de nanoesferas se propone que el aceite se encuentre en una proporción del 2 % respecto del solvente orgánico, y otro factor es el uso de solventes apróticos tales como la acetona y el acetonitrilo.

Estas nanocápsulas son ideales para encapsular fármacos liposolubles.

Las nanocápsulas que contienen agua en su interior (núcleo acuoso) son preparadas a partir de una microemulsión de agua en aceite. Las micelas de tensoactivo con agua son dispersadas en la fase orgánica, después el monómero es adicionado a la microemulsión, formándose el polímero en la superficie de las micelas y de esta manera formándose la cápsula. Los fármacos que contienen estas nanocápsulas pueden ser péptidos, ácidos nucleicos y oligonucleótidos. Estas nanocápsulas son para utilizarse por la vía oral, para la vía intravenosa es necesario transferir las nanocápsulas a una fase acuosa continua por medio de una ultracentrifugación de una suspensión oleosa sobre una capa de agua pura conteniendo polisorbato 80, este método elimina el exceso de tensoactivo y el exceso de fase orgánica, también evitando la agregación de las nanocápsulas.

Un ejemplo de una formulación para las nanocápsulas de núcleo acuoso es la siguiente: a 200 ml de etanol se le agregan 800  $\mu$ L de agua desmineralizada que contienen oligonucleótidos antisentido (molécula con efecto terapéutico), a esta mezcla se le ajusta el pH a 7.4, después esta solución se va agregando a una fase orgánica que contiene 8g de Miglyol<sup>®</sup> 812 y 1.5g de polisorbato 80, la emulsión durante el proceso se va homogeneizando a 24000 rpm por 1 minuto. El paso final es agregarle a la emulsión 100 $\mu$ g del monómero IBCA y mantener una agitación a 500 rpm. A las 4 horas la polimerización se completa (Lambert, 2001).

**Mecanismo de formación de las nanocápsulas:** las nanocápsulas se forman en la interfase, sin embargo el proceso es complicado debido a la afinidad de los cianoacrilatos por la fase oleosa, una polimerización gruesa o la formación de nanoesferas se pueden favorecer. Por lo tanto para que se formen las nanocápsulas se debe crear un proceso dinámico, es decir el monómero de cianoacrilatos se debe transferir a la interfase por medio de un cosolvente, que solubilice la fase oleosa y el monómero, y sea miscible con la fase acuosa (Fig. 12); el etanol como cosolvente cumple estas características (Couvreur *et al*, 1996).

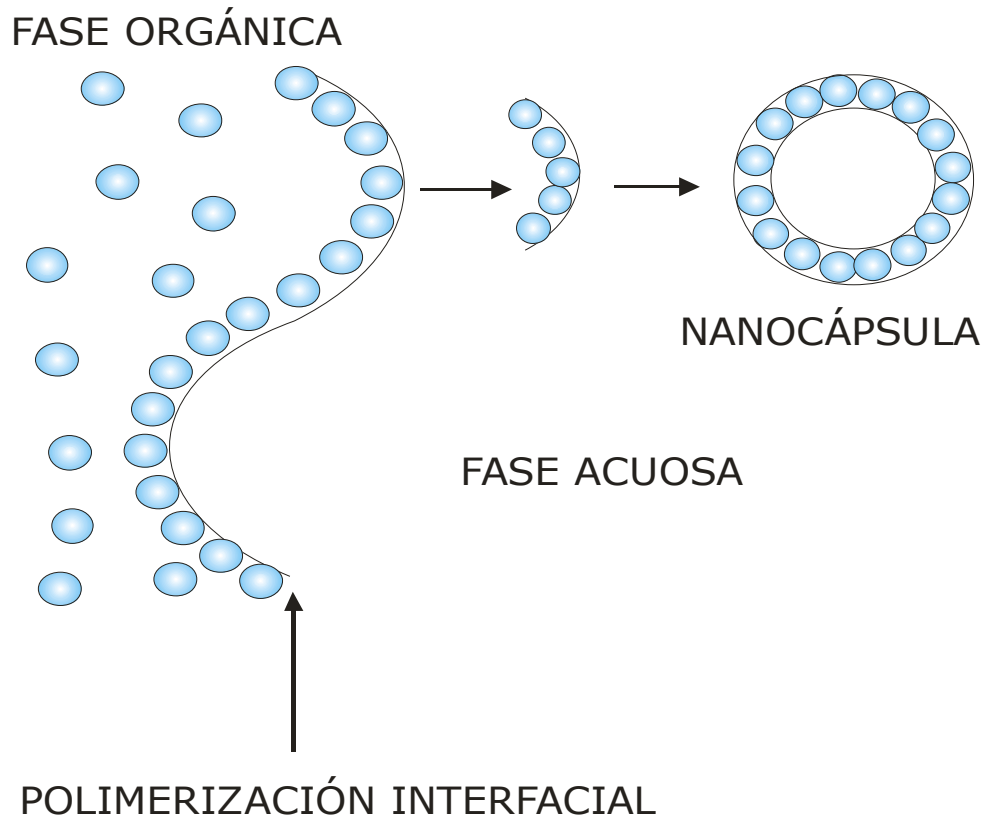


Figura 12: Mecanismo de formación de las nanocápsulas por medio de la polimerización interfacial.

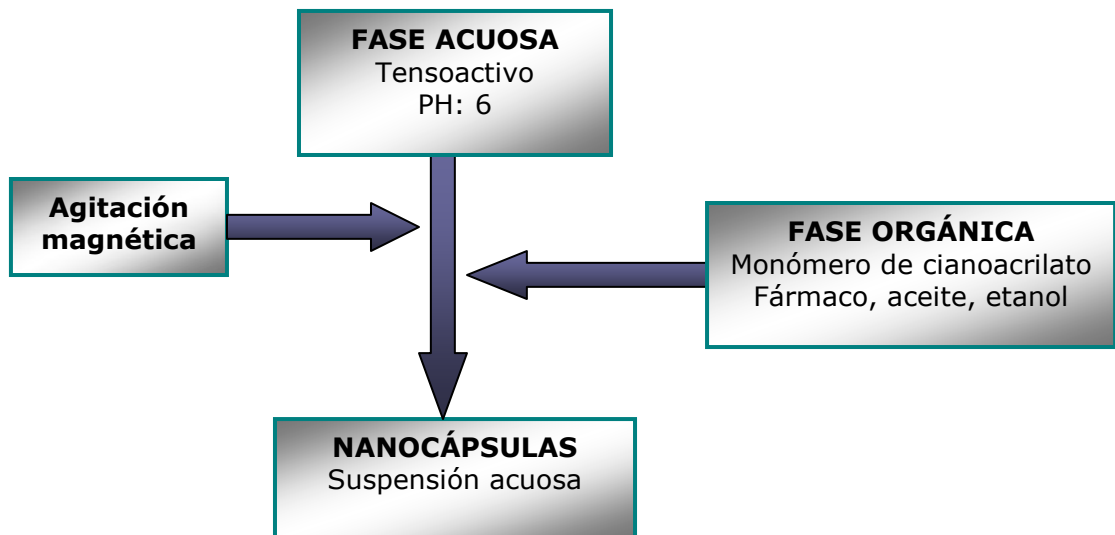


Figura 13: Se muestra la formación de nanocápsulas de policianoacrilatos de alquilo.

### **2.2.1.1 VENTAJAS DE LAS NANOCÁPSULAS DE POLICIANOACRILATOS DE ALQUILO**

- a) Son termodinámicamente estables por varios años.
- b) Pueden ser fácilmente esterilizadas a 120°C-20min.
- c) El polímero utilizado es biodegradable.

### **2.2.1.2 DESVENTAJAS DE LAS NANOCÁPSULAS DE POLICIANOACRILATOS DE ALQUILO**

- a) No son fácilmente liofilizadas, debido a que tienden a colapsarse.
- b) Debido a que la formación de nanocápsulas es similar a la de nanoesferas, es necesario verificar que la suspensión no consista de una mezcla de ambas.
- c) Son un poco tóxicas.

## **2.3 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE NANOESFERAS A PARTIR DE UN POLÍMERO PREFORMADO**

### **2.3.1 PREPARACIÓN DE NANOESFERAS A PARTIR DE POLÍMEROS SINTÉTICOS POR LA TÉCNICA DE EMULSIÓN**

Estas nanoesferas son preparadas, por ejemplo, a partir del ácido poliláctico (Fig. 14), el cual es un polímero biodegradable, insoluble en agua, utilizado en la industria farmacéutica (Frisbee *et al*, 1994). El ácido poliláctico se disuelve en un solvente orgánico volátil



inmiscible con agua, por ejemplo cloroformo, entonces la solución orgánica se dispersa en una fase acuosa para formar una emulsión aceite/agua. La emulsión es mantenida bajo agitación para evitar la coalescencia, el solvente orgánico se evapora de manera espontánea a temperatura ambiente, de esta manera se van formando las nanopartículas. El solvente residual se remueve bajo presión reducida (Fig. 15). Los emulsificantes son removidos por medio de una diálisis o por medio de un lavado y la separación de las nanopartículas es mediante ultracentrifugación (Couvreur *et al*, 1996).

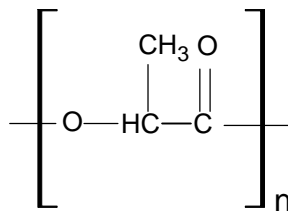


Figura 14: Molécula de ácido poliláctico

### 2.3.1.1 VENTAJAS DEL MÉTODO DE EMULSIÓN DE POLÍMEROS SINTÉTICOS

- a) El ácido poliláctico es un polímero biodegradable.
- b) El ácido poliláctico es un polímero no tóxico.

### 2.3.1.2 DESVENTAJAS DEL MÉTODO DE EMULSIÓN POLÍMEROS SINTÉTICOS

- a) Uso de solventes orgánicos.
- b) El proceso para hacer el escalamieno es difícil.

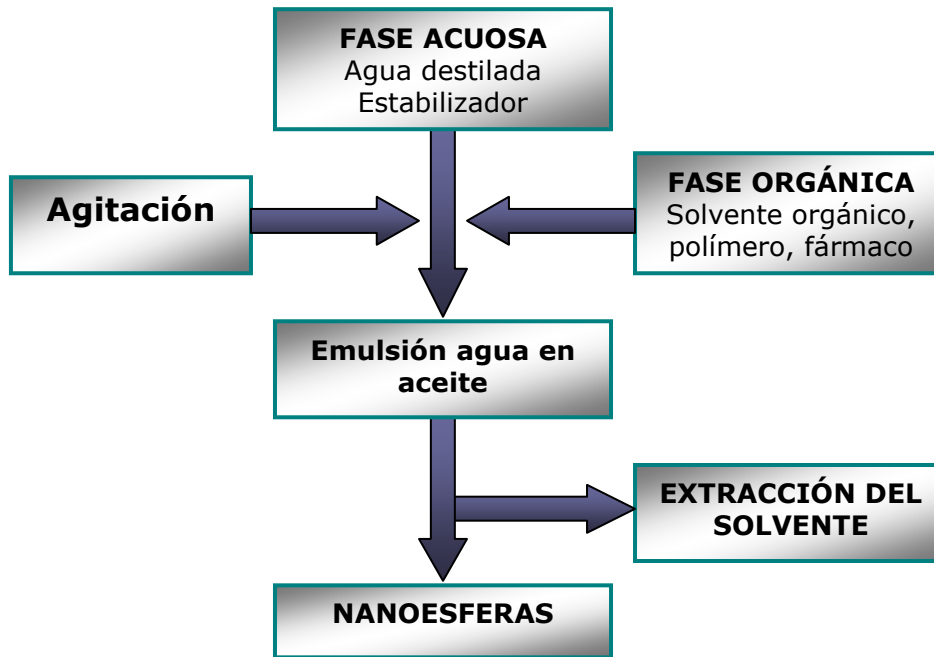


Figura 15: Se muestra la formación de nanoesferas de ácido poliláctico.

### 2.3.2 PREPARACIÓN DE NANOESFERAS A PARTIR DE POLÍMEROS SINTÉTICOS POR LA TÉCNICA DE SALTING OUT

Esta técnica propuesta por Ibrahim *et al*, y Allegan *et al*, consiste en reemplazar el cloroformo por la acetona, la cual es miscible con el agua y es más fácil de remover por evaporación. La técnica consiste en que a una solución de acetona y el ácido poliláctico bajo agitación, se le va agregando una solución acuosa saturada de un electrolito o un no electrolito, esta solución también debe tener alcohol polivinílico como agente viscosante y estabilizador. La solución saturada evita la unión de la acetona con el agua y mediante un proceso de Salting-

Out<sup>9</sup> se obtiene una emulsión agua/aceite, la adición de agua a esta emulsión da por resultado la formación de nanoesferas (Fig. 16). Por último las nanoesferas son lavadas por medio de una ultracentrifugación y por diálisis se elimina el electrolito (Couvreur *et al*, 1996).

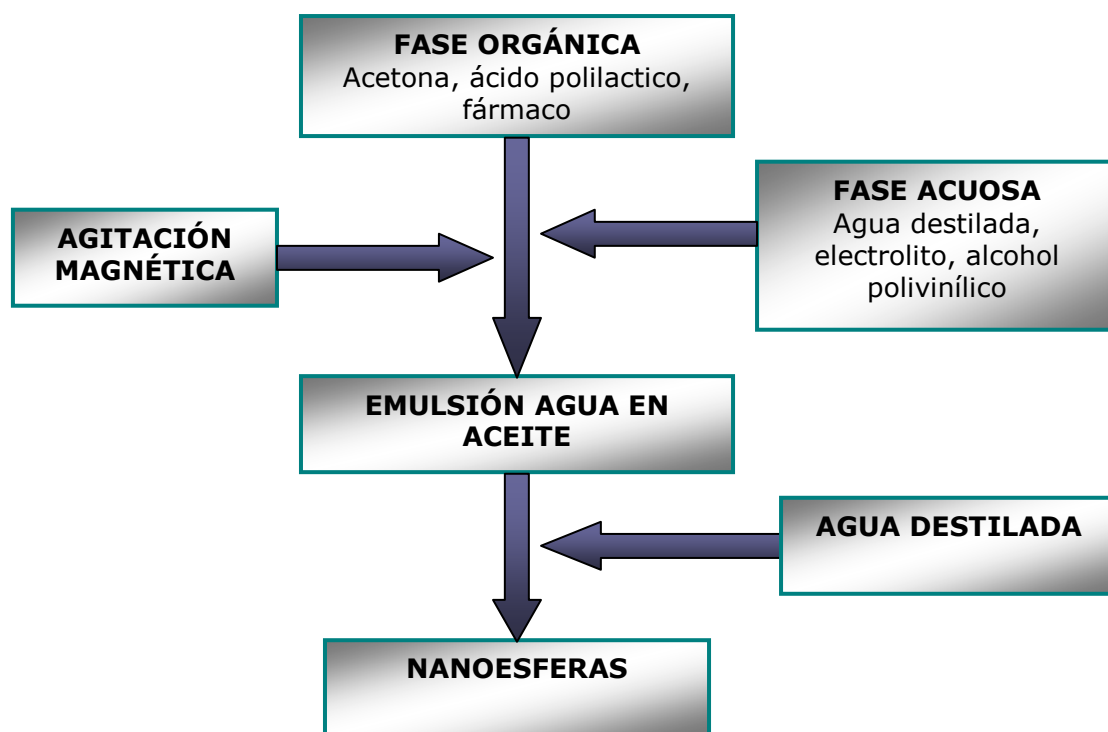


Figura 16: Se muestra la formación de nanoesferas por la técnica de Salting Out.

### 2.3.2.1 VENTAJAS DEL MÉTODO DE SALTING OUT

- Hay una menor interacción entre el fármaco utilizado y el polímero.
- Se puede reducir la toxicidad al utilizar solventes menos dañinos.

<sup>9</sup> Salting Out: efecto en el cual la solubilidad de una sustancia en cierto solvente es reducido por la presencia de un segundo soluto disuelto en el solvente. Por ejemplo, ciertas sustancias disueltas en agua pueden precipitar por la adición de una sal iónica. (Oxford Dictionary of Chemistry, 2000).

### 2.3.2.2 DESVENTAJAS DEL MÉTODO DE SALTING OUT

a) La utilización de solventes orgánicos los cuales son tóxicos.

### 2.3.3 PREPARACIÓN DE NANOESFERAS A PARTIR DE POLÍMEROS SINTÉTICOS POR LA TÉCNICA DE DESOLVATACIÓN O NANOPRECIPITACIÓN

La técnica de desolvatación consiste en precipitar el polímero disuelto en un solvente orgánico mediante la adición de un solvente (agua) miscible con el primer disolvente. Los polímeros utilizados en esta técnica pueden ser el ácido poliláctico, poliglicólico, poliláctico-co-glicólico, poli- $\epsilon$ -caprolactona, cianoacrilatos de alquilo, los polímeros no biodegradables como poliacrílico, etilcelulosa, poliestireno, etc.

El polímero se disuelve en un solvente orgánico (acetona) manteniendo una agitación moderada, a esta solución se le agrega un solvente líquido (agua). El solvente orgánico y el agua deben de tener una baja viscosidad y se deben de mezclar bien, también se puede utilizar un agente tensoactivo para estabilizar la mezcla (Fig. 17). El solvente orgánico es removido por evaporación bajo presión reducida. El tamaño promedio de las nanoesferas es de 200 nm, y depende del polímero usado (Couvreur *et al*, 1996).

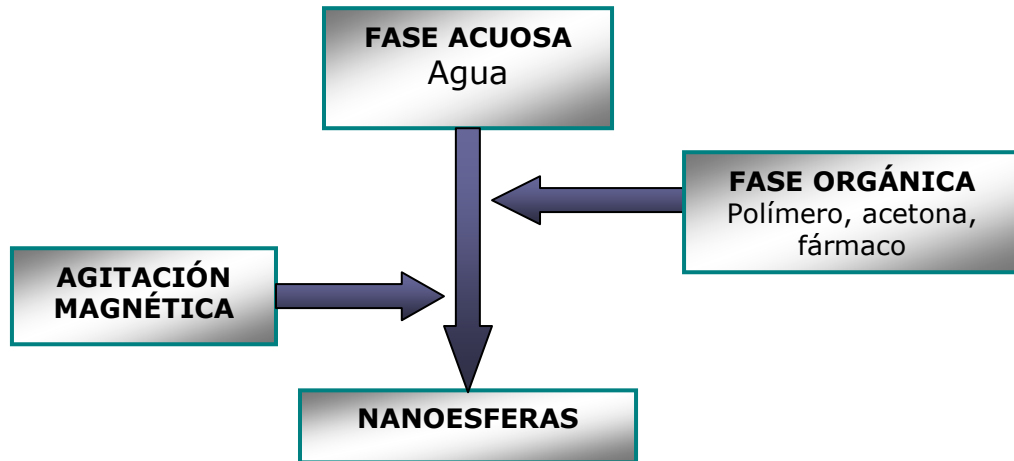


Figura 17: Se muestra la formación de nanoesferas por la técnica de nanoprecipitación.

### 2.3.3.1 VENTAJAS DEL MÉTODO DE NANOPRECIPITACIÓN

- Fácil escalamiento para su utilización en la industria.
- No se requiere una purificación posterior debido al uso de tensoactivos no tóxicos.

### 2.3.3.2 DESVENTAJAS DEL MÉTODO DE NANOPRECIPITACIÓN

- Es difícil controlar el tamaño de las nanopartículas y se pueden formar agregados.
- Generalmente solo se pueden usar fármacos altamente solubles en solventes orgánicos polares y poco solubles en agua.

### 2.3.4 PREPARACIÓN DE NANOESFERAS A PARTIR DE POLÍMEROS NATURALES POR LA TÉCNICA DE EMULSIFICACIÓN

Las nanoesferas son preparadas a partir de la albúmina (Fig. 18). La albúmina se disuelve en agua, después se dispersa en aceite de algodón para formar una emulsión agua/aceite. La emulsión

preparada anteriormente se pone dentro de aceite a más de 100°C, después la albúmina se desnaturaliza, de manera simultánea la fase acuosa se evapora (Fig. 19). Las nanoesferas formadas se lavan y purifican, después se endurecen mediante el entrecruzamiento<sup>10</sup> con aldehídos (Couvreur *et al*, 1996).



Figura 18: Estructura tridimensional de la albúmina humana (es.wikipedia.org).

Otro método consiste en la formación de nanoesferas a temperatura ambiente mediante la unión de gelatina por un aldehído adicionado a una emulsión agua/aceite (Yoshioka *et al*, 1981).

<sup>10</sup> Entrecruzamiento: es la unión de dos cadenas largas de un polímero con una cadena corta de átomos. (Oxford Dictionary of Chemistry, 2000).

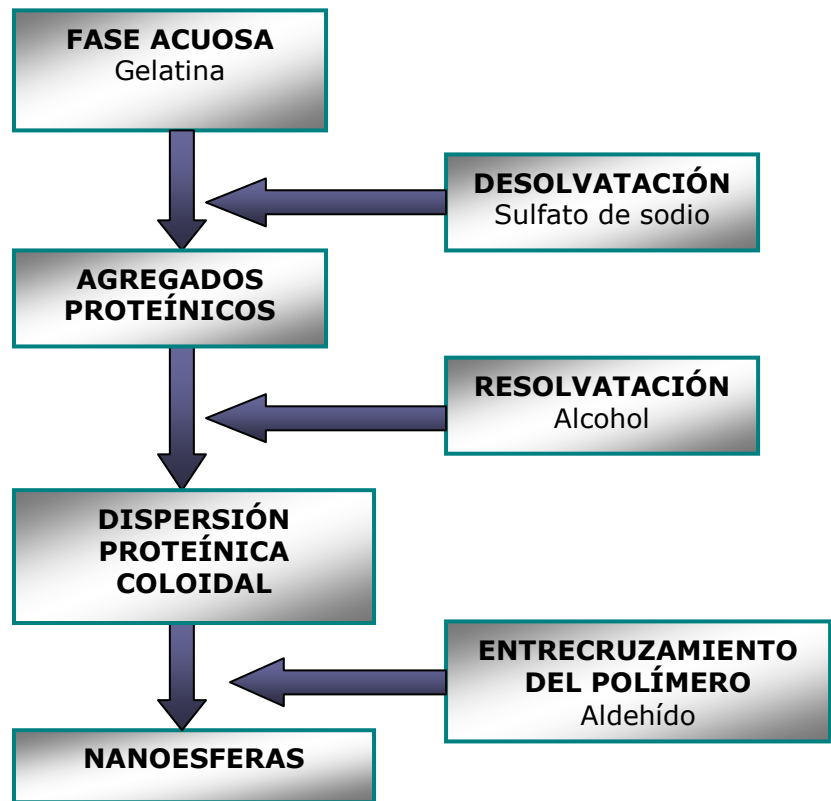


Figura 19: Se muestra la formación de nanoesferas por la técnica de emulsificación.

#### 2.3.4.1 VENTAJAS DEL MÉTODO DE EMULSIFICACIÓN

- a) Uso por la vía parenteral.
- b) Poco uso de solventes orgánicos.

#### 2.3.4.2 DESVENTAJAS DEL MÉTODO DE EMULSIFICACIÓN

- a) Los polímeros naturales producen reacciones antigénicas.
- b) No se pueden utilizar por la vía intravenosa.

### **2.3.5 PREPARACIÓN DE NANOESFERAS A PARTIR DE POLÍMEROS NATURALES POR LA TÉCNICA DE DESOLVATACIÓN**

En este método el polímero utilizado es la gelatina en solución junto con un tensoactivo a la cual se le va agregando lentamente un agente desolvatante (una sal neutra o alcohol) esta acción modifica la estructura terciaria de la gelatina para dar un material hidrofóbico. La solución clara en un principio se va tornando opaca conforme transcurre el tiempo, esto indica que se van formando las nanoesferas. Las nanoesferas se entrecruzan con aldehído, el exceso de aldehído es neutralizado con un sulfito (Fig. 20). Si la sal o el alcohol son agregados en exceso se produce una precipitación gruesa. Por este motivo se recomienda seguir el proceso por medio de un nefelómetro para controlar el tamaño de las nanoesferas. Al final las nanoesferas se lavan con una ultracentrifugación y se purifican por medio de una diálisis (Couvreur *et al*, 1996).

#### **2.3.5.1 VENTAJAS DEL MÉTODO DE DESOLVATACIÓN DE POLÍMEROS NATURALES**

- a) No se utilizan solventes orgánicos
- b) Fácil escalamiento para producción industrial.

#### **2.3.5.2 DESVENTAJAS DEL MÉTODO DE DESOLVATACIÓN DE POLÍMEROS NATURALES**

- a) Los polímeros naturales producen reacciones antigénicas.



b) Se pueden producir precipitados si agrega en exceso la sal o el alcohol.

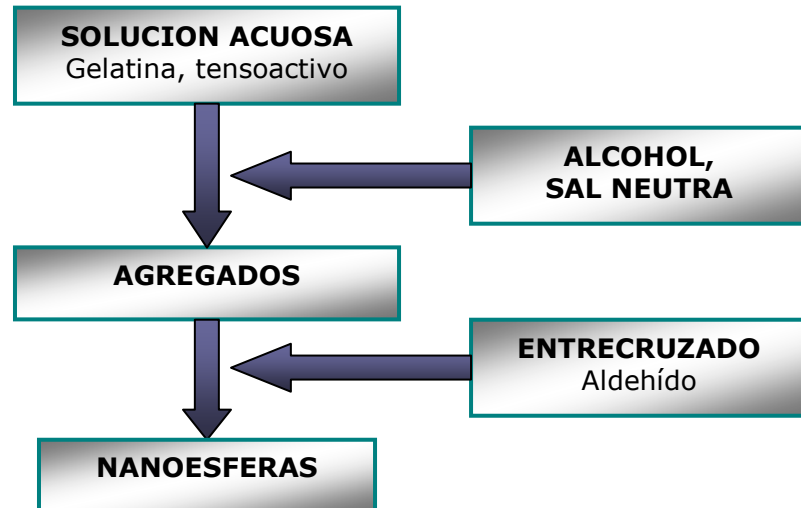


Figura 20: Se muestra la formación de nanoesferas por la técnica desolvatación.

### 2.3.6 PREPARACIÓN DE NANOESFERAS A PARTIR DE POLÍMEROS POR LA TÉCNICA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Este método surge a partir de que las técnicas anteriores utilizan solventes orgánicos tóxicos. La técnica de fluidos supercríticos utilizan solventes menos tóxicos y por este método se obtienen nanoesferas con una pureza mayor. Existen dos métodos que son RESS y SAS:

“En la rápida expansión de la solución supercrítica (RESS) el polímero de interés es disuelto en un fluido supercrítico y la solución es expandida a través de una boquilla. Por lo tanto el poder solvente del fluido supercrítico dramáticamente disminuye y el polímero eventualmente precipita. La técnica es limpia por que el polímero

precipitado está libre de solvente. Desafortunadamente muchos polímeros tienen poca o nula solubilidad en los fluidos supercríticos.”

“En el método de anti-solvente supercrítico (SAS) la solución es cargada con el fluido supercrítico en el vaso de precipitación conteniendo un solvente orgánico y el polímero. A altas presiones el antisolvente entra dentro de la fase líquida así que el poder del solvente baja y el polímero precipita (Fig. 21). Al final cuando el solvente ha sido reducido a un nivel deseado, el vaso es despresurizado y las nanopartículas son colectadas.” (Soppimath *et al*, 2001).

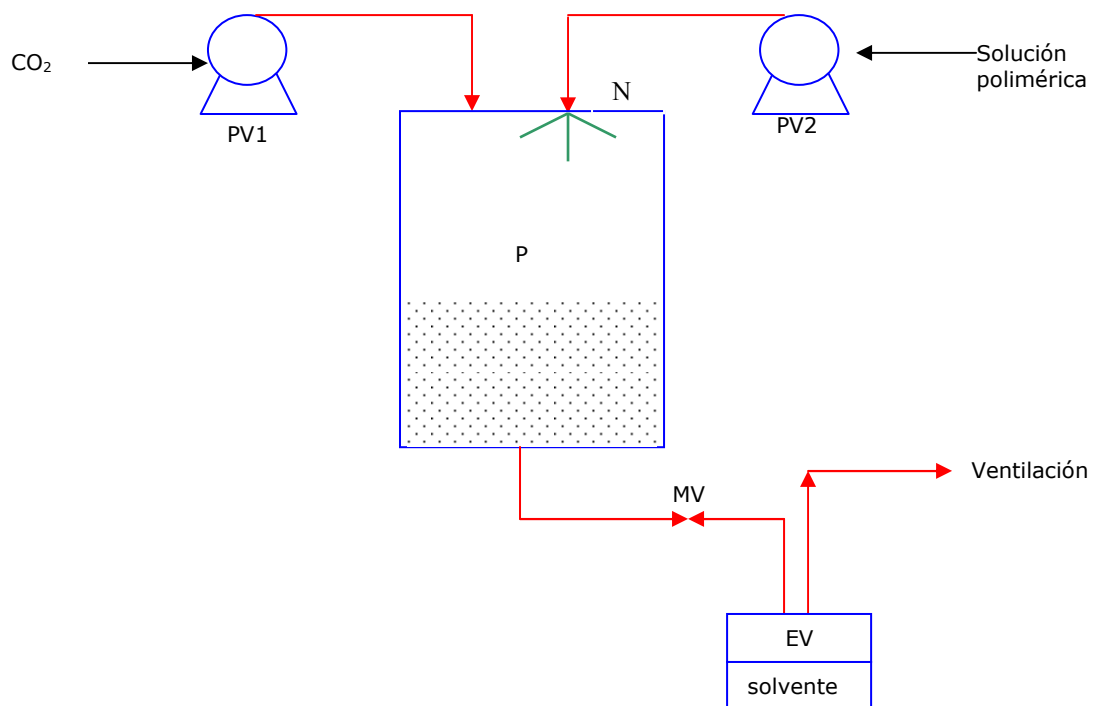


Figura 21: Se muestra la formación de nanoesferas por la técnica de fluidos supercríticos (método SAS). PV1 y PV2 son dos bombas volumétricas, N es una boquilla, P es un contenedor de precipitación, MV es una válvula micrométrica, EV es un contenedor de expansión (Soppimath *et al*, 2001).

### **2.3.6.1 VENTAJAS DEL MÉTODO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS**

- a) Uso de solventes no contaminantes para el medio ambiente.
- b) No es necesario purificar las nanopartículas obtenidas.

### **2.3.6.2 DESVENTAJAS DEL MÉTODO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS**

- a) Algunos polímeros son poco solubles o insolubles en los fluidos supercríticos.

## **2.4 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE NANOCÁPSULAS A PARTIR DE UN POLÍMERO PREFORMADO**

### **2.4.1 PREPARACIÓN DE NANOCÁPSULAS A PARTIR DE POLÍMEROS POR LA TÉCNICA DE EMULSIFICACIÓN ESPONTÁNEA (EMULSIÓN DOBLE)**

“La emulsificación espontánea ocurre cuando una solución de un líquido L1 en un líquido L2 es adicionado precavidamente en la superficie de un tercer líquido L3, L2 comienza a solubilizarse simultáneamente en L1 y L3, donde L1 es insoluble en L3. Moléculas de L1 son transferidas de manera progresiva hacia L3, mientras tanto ocurre una difusión recíproca entre L2 y L3 (Fig. 22). Este proceso

llamado difusión y retroceso, permite la formación de gotas de L1 en L3 dando una emulsión ultrafina." (Couvreur *et al*, 1996).

Para la obtención de nanocápsulas el polímero y el principio activo son disueltos en un solvente volátil miscible con un no solvente. La solución con el polímero se agrega al no solvente, la mezcla se va cambiando a un color lechoso lo que muestra que se van formando las nanocápsulas. El solvente es removido por evaporación a temperatura ambiente bajo presión reducida. El tamaño de las nanocápsulas es de aproximadamente 200 nm.

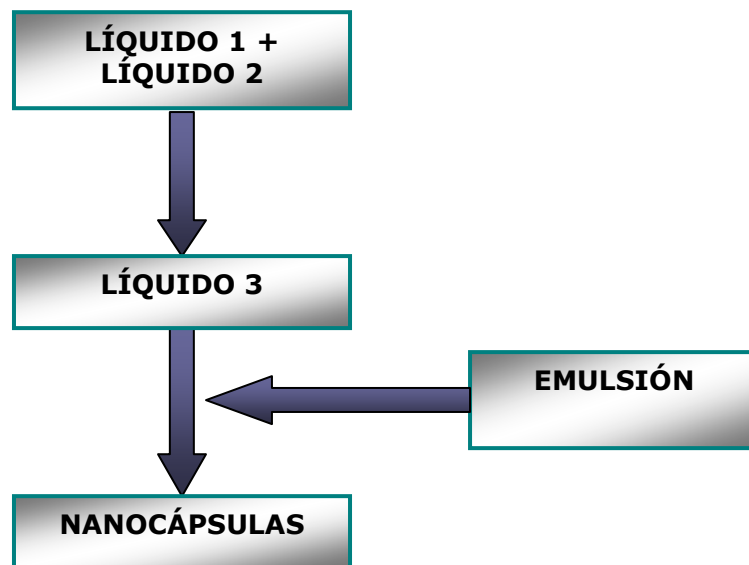


Figura 22: Se muestran la formación de nanocápsulas por la técnica de doble emulsión.

#### 2.4.1.1 VENTAJAS DEL MÉTODO DE EMULSIÓN ESPONTANEA

a) Uso de polímeros biodegradables.

b) Fácil escalamiento.

#### **2.4.1.2 DESVENTAJAS DEL MÉTODO DE EMULSIÓN ESPONTANEA**

a) Uso de solventes orgánicos.

### **2.5 MÉTODO DE PREPARACIÓN DE NANOCÁPSULAS POR LA TÉCNICA DE POLICONDENSACIÓN INTERFACIAL POR MEDIO DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR**

La tensión interfacial entre dos líquidos puede ser reducida cuando aplicamos un voltaje entre las dos fases. Si este voltaje se aplica en la interfase entre estas dos fases la emulsificación espontánea ocurre.

La técnica para la fabricación de nanocápsulas consiste en inyectar en una jeringa la fase acuosa que contiene el principio activo y el monómero hidrosoluble (L-lisina), la fase orgánica está constituida de un solvente orgánico (ciclohexano-cloroformo, en una relación de 3:1) y de un monómero liposoluble (cloruro de tereftaloide). Se aplica un voltaje de 850 V entre la aguja de la jeringa y un alambre de platino sumergido dentro de la fase orgánica. La policondensación se produce por una agitación magnética entre la L-lisina y el cloruro de tereftaloil, las nanocápsulas se forman en la interfase (Fig. 23). Las nanocápsulas son purificadas por medio de una ultracentrifugación (Montasser *et al*, 2000).

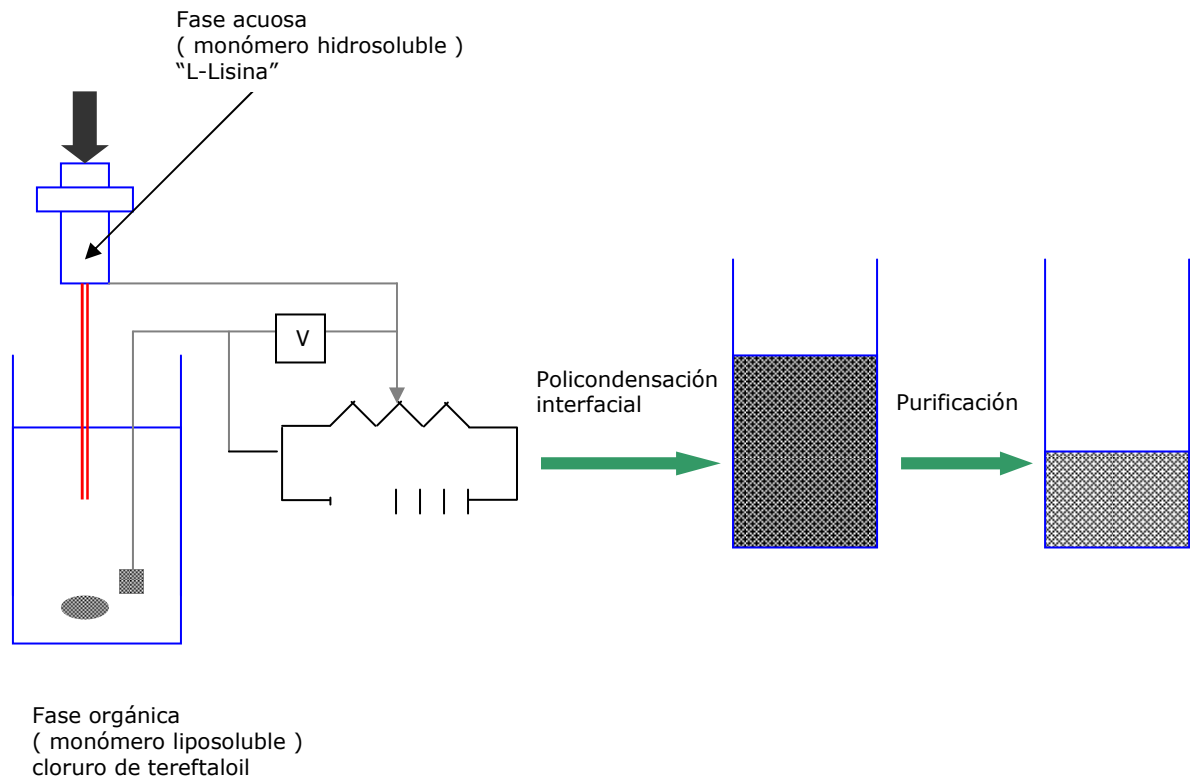


Figura 23: Se muestra la formación de nanocápsulas por la técnica de policondensación interfacial mediante electroforesis capilar (Montasser *et al*, 2000).

### 2.5.1 VENTAJAS DEL MÉTODO DE ELECTROFORESIS CAPILAR

a) Producción de nanocápsulas estables.

### 2.5.2 DESVENTAJAS DEL MÉTODO DE ELECTROFORESIS CAPILAR

a) Difícil escalamiento.

b) Uso de solventes orgánicos.

Tabla 2: Diferentes métodos de preparación de nanopartículas (Kreuter, 1994).

Método y polímero empleado	Fármaco incorporado o adsorbido	Tamaño de nanopartícula(nm)
<b>Emulsión-polimerización en una fase acuosa continua</b>		
Metacrilato de polimetilo	Virus de la influenza	130
	Antígeno de la influenza	130
	Suero de albúmina bovina	60-300
	Antígenos HIV	130
	5-Fluoracil	130
	Indometacina	60-1200
Copolímeros de metacrilato de polimetilo	Doxorubicina	300
Cianoacrilato de polimetilo	Actinomicina D	200
	Metotrexato	200
	Vinblastina	200-300
Cianoacrilato de polibutilo	5-fluoracil	50-100
	Progesterona	250
	Pilocarpina	100
	Doxorubicina	70-130
	Rosa de bengala	70-205
	Amikacina	60-265
	ADN	100-300
Cianoacrilato de poliisobutilo	Doxorubicina	200
	Amfotericina B	200-300
	5-Fluorocitosina	200-300
	Miconazol	200-300
	Betaxolol	220-280
	Ampicilina	40-80
		130-200
	Gentamicina	280
	Anticuerpos	120
	Factor liberador de la hormona del crecimiento	140-170
Cianoacrilato de polihexilo	Vincamicina	200
Cianoacrilato de poliisohexilo	Ampicilina	30-80

Método y polímero empleado	Fármaco incorporado o adsorbido	Tamaño de nanopartícula(nm)
		150-250
	Dehidroemetina	100-250
	Vidarabina	170-360
	Adenina	170-360
	Amfotericina B	210-280
	Anticuerpos	170
	Factor liberador de la hormona del crecimiento	
<b>Polimerización en emulsión en una fase continua orgánica</b>		
Poliacrilamida	Inmunoglobulina G	80
	Toxina del tétanos	80
	Norefedrina	100
	Enzimas	1000
		250-300
Cianoacrilato de polimetilo	Triamcinolon	500
	Fluoresceína	800-1000
Cianoacrilato de polietilo	Doxorubicina	
Cianoacrilato de polibutilo	Doxorubicina	
Cianoacrilato de polimetilo	Azul de metileno	80-120
Cianoacrilato de polimetilo	Pilocarpina	300-600
Cianoacrilato de polietilo	Timolol	80-300
Cianoacrilato de polibutilo	Timolol	80-300
Polimerización interfacial		
Poli(N $\alpha$ ,N $\epsilon$ -L-lisinediltereftalamida	Hemosilato	380
Cianoacrilato de poliisobutilo	Lipiodol	200-300
	Indometacina	220-240
	Daropidina	150
	Insulina	150-300
<b>Deposición interfacial</b>		
Poli-D-L-Láctido	Indometacina	230
<b>Desnaturalización de macromoléculas</b>		



Método y polímero empleado	Fármaco incorporado o adsorbido	Tamaño de nanopartícula(nm)	
Albúmina del suero	Mercaptopurina	200-1200	
	Doxorubicina	200-1500	
		250-1500	
		750-1000	
	5-Fluororacil	650	
	Primaquina	500-1200	
	Mitronidazol	500-1200	
Gelatina	Mitomicina C	280	
	Primaquina	100-800	
	Metronidazol	100-800	
	Dipéptido de muramil	400-2000	
	Interferón	400-2000	
<b>Nanopartículas de carbohidratos</b>			
Dextrano de poliácido	Proteínas	500	
Almidón de poliácido	Primaquina	500-2500	
	Trimetoprim	500-2500	
	Proteínas	500-2200	
<b>Formación de NP por desolvatación</b>			
Gelatina	Tecnecio 99m	400	
	Mitomicina C	280	
	Doxorubicina	180-300	
	Dactinomicina	180-300	
	Triamcinolona	140-500	
	Primaquina	50-500	
	Metronidazol	50-500	
	Albúmina	Flukícida 10645	50-500
		Insulina	200
		5-fluororacil	200-400
	Doxorubicina	50-700	
<b>Evaporación del solvente</b>			
Ácido poliláctico	Triamcinolona	500-700	
Copolímero Ácido poliláctico-Ácido poliglicólico	Dipéptido de Muramil MDP-B30	200-2000	
Poli(β-hidroxibutirato)		170	
Etil celulosa	Indometacina	120-220	
Eugragit RL	Indometacina	120-220	
Eudragit RS	Indometacina	90-280	

## CAPÍTULO 3

### 3.0 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas son caracterizadas a través de diferentes técnicas fisicoquímicas. La finalidad de la caracterización es dar una descripción química y física completa de las nanopartículas. Los principales parámetros que se evalúan son: el tamaño, la forma, carga superficial, peso molecular, cristalinidad, hidrofobicidad y area superficial.

#### 3.1 CARACTERIZACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS

La técnica más rápida y común para determinar el tamaño de las nanopartículas es la espectroscopia de correlación de fotones (Fig. 25) (Kreuter, 1994). Esta técnica determina el diámetro por medio del movimiento browniano de las nanopartículas (Fig. 24), se evalúa el coeficiente de difusión,  $D$ , entonces el diámetro es calculado a partir de la ecuación de Stokes-Einstein (Fig.26) (Fattal *et al*, 2002).

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

donde:  $R_H$ = radio de la partícula,  $k$ = constante de Boltzmann,  $T$ = temperatura,  $\eta$ = viscosidad del solvente,  $D$ = coeficiente de difusión.

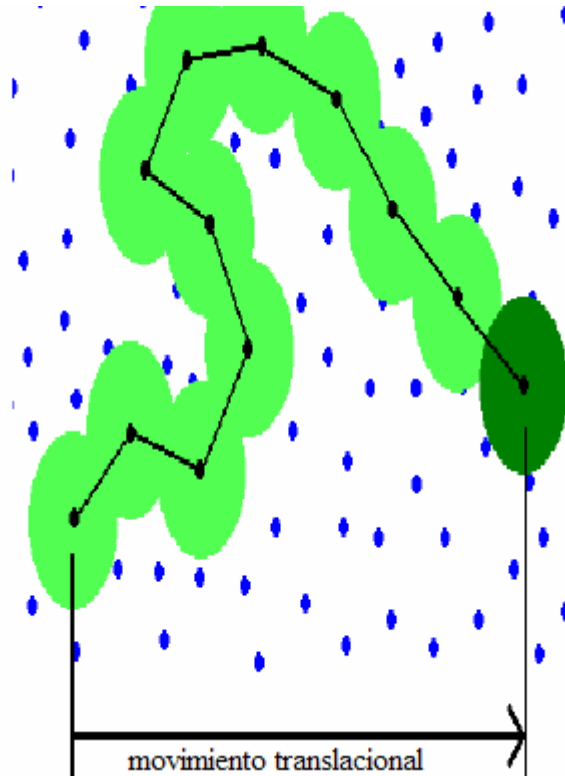


Figura 24: Se muestra de manera esquemática el movimiento browniano de una partícula, el cual es ocasionado por la interacción de las partículas con el solvente.



Figura 25: Fotografía de uno de los instrumentos comerciales más utilizados para la determinación del tamaño y potencial zeta de las nanopartículas ([www.malverninstruments.com](http://www.malverninstruments.com)).

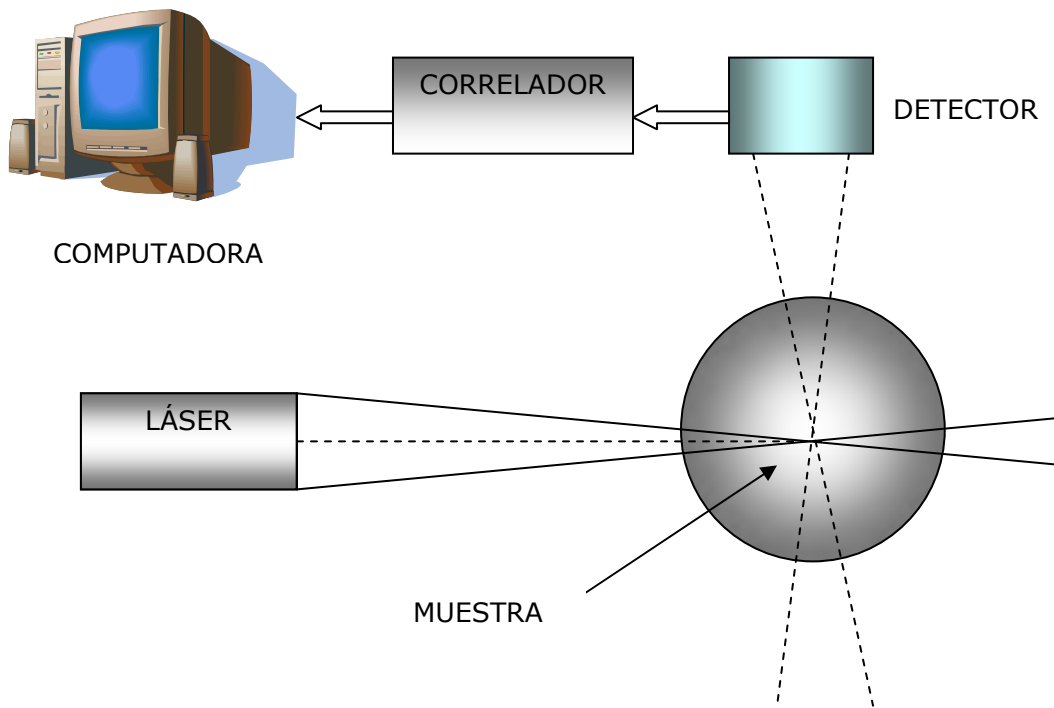


Figura 26: Funcionamiento del instrumento para medir el tamaño de las nanopartículas por medio de la espectroscopia de correlación de fotones. Un haz de rayos láser incide sobre la muestra, la luz es dispersada y detectada. El correlador mide la intensidad de las fluctuaciones, y la computadora analiza los datos para determinar el tamaño y la distribución de las nanopartículas.

Otra técnica utilizada es la microscopía electrónica la cual es también fácil de aplicar, sin embargo algunos materiales no se pueden visualizar por medio de esta técnica. En el microscopio electrónico se utiliza un haz de electrones enfocados hacia las nanopartículas, los cuales son refractados, reflejados y amplificados sobre una pantalla fluorescente, así permitiendo su visualización (Fig. 27) (Hall, 1970).

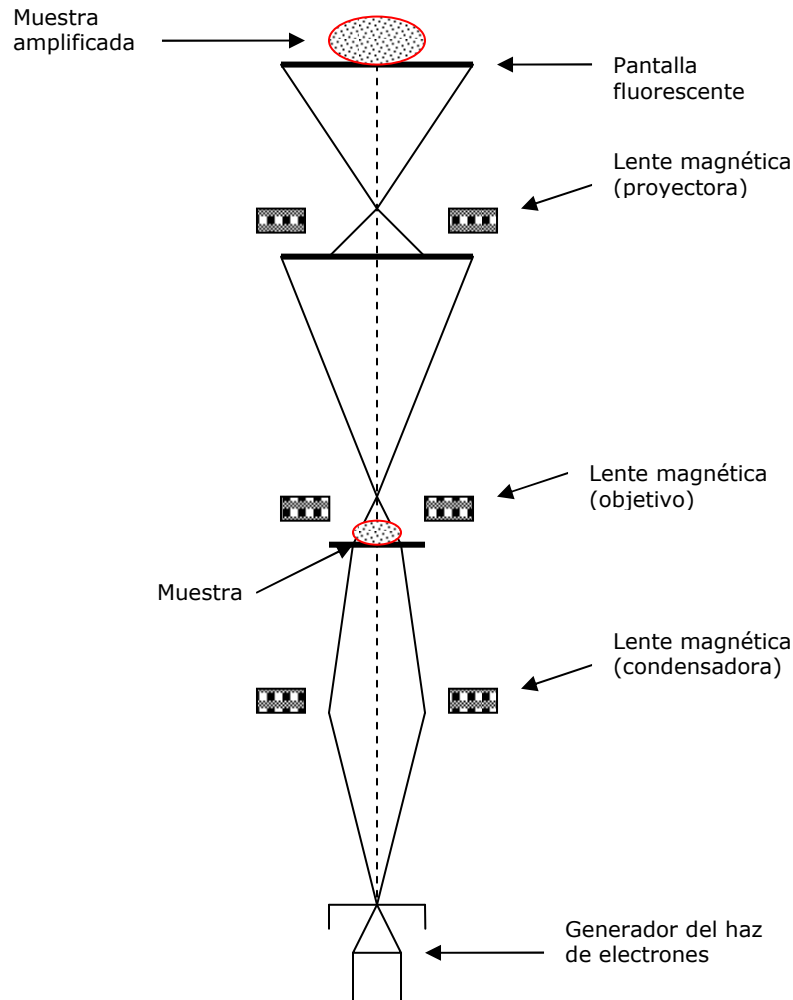


Figura 27: Se muestra un esquema del funcionamiento de un microscopio electrónico.

Algunas técnicas de microscopía más actuales para determinar el tamaño de las nanopartículas son:

**Microscopía electrónica de barrido**, este tipo de microscopía permite examinar más a fondo las superficies de las nanopartículas, aquí los electrones se bombardean sobre el objeto de interés y entonces se produce una emisión de electrones secundarios que son detectados y proyectados sobre un tubo de rayos catódicos para su observación. Las muestras requieren un recubrimiento con oro.

**Microscopía de fuerza atómica:** esta no emplea la corriente de efecto túnel<sup>9</sup>, por lo que se puede utilizar para visualizar objetos que no sean conductores. Una sonda (por lo general una punta consistente de fibras de silicio metálico o nitruro de silicio) proyecta electrones sobre la superficie del material a observar, entonces los electrones son repelidos por la nube de electrones de los átomos superficiales, por lo tanto la sonda se va moviendo de arriba hacia abajo a lo largo de la superficie explorada, este movimiento es registrado por un haz de un rayo láser que se dirige sobre la punta y reflejado finalmente hacia un fotodiodo, este último es el encargado de recoger la información de la muestra. Esto es analizado por una computadora y convertido en una imagen tridimensional (Fig. 28).

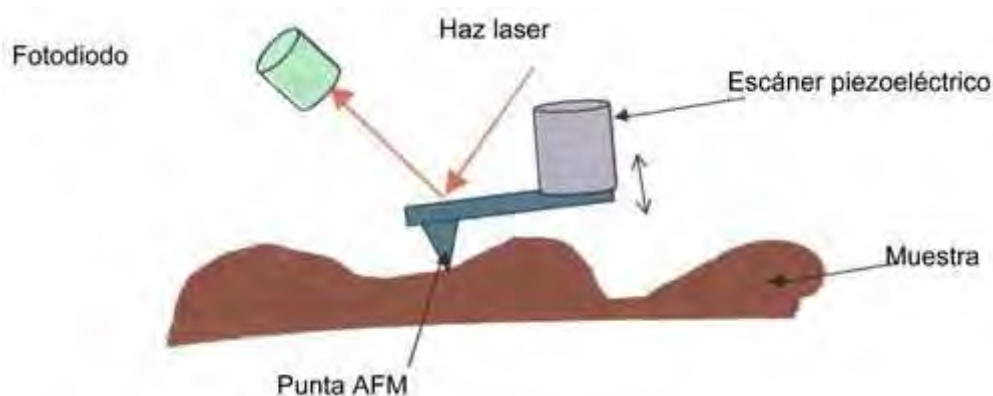


Figura 28: Microscopio de fuerza atómica (AFM) ([www.ceramicaycristal.com.ar](http://www.ceramicaycristal.com.ar)).

**Microscopía de barrido de efecto túnel:** con una sonda (punta similar a la utilizada en el microscopio de fuerza atómica) se aplica un voltaje en una superficie de un material conductor, a causa de la poca distancia entre la superficie y la sonda, se crea una pequeña corriente

<sup>9</sup> Efecto túnel: es aquel en el cual los electrones pasan a través de una barrera de potencial estrecha, que debería constituir una región prohibida (no deberían pasar los electrones), si los electrones se trataran como partículas clásicas. (Diccionario de Física, 1976).

de electrones, por el principio del efecto túnel. La cantidad de electrones que pasan de la superficie a la sonda depende de la distancia entre estas dos, es decir entre más cerca, más corriente y viceversa. Este movimiento de electrones es analizado por una computadora y transformado en una imagen tridimensional de los objetos (Fig. 29). Actualmente solo se pueden analizar muestras de materiales conductoras o semiconductoras (Fig. 30).

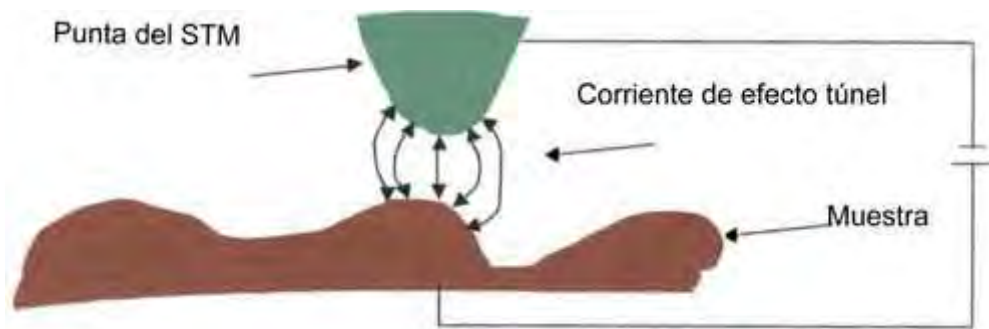


Figura 29: Microscopio de barrido de efecto túnel (STM).  
([www.ceramicaycristal.com.ar](http://www.ceramicaycristal.com.ar)).

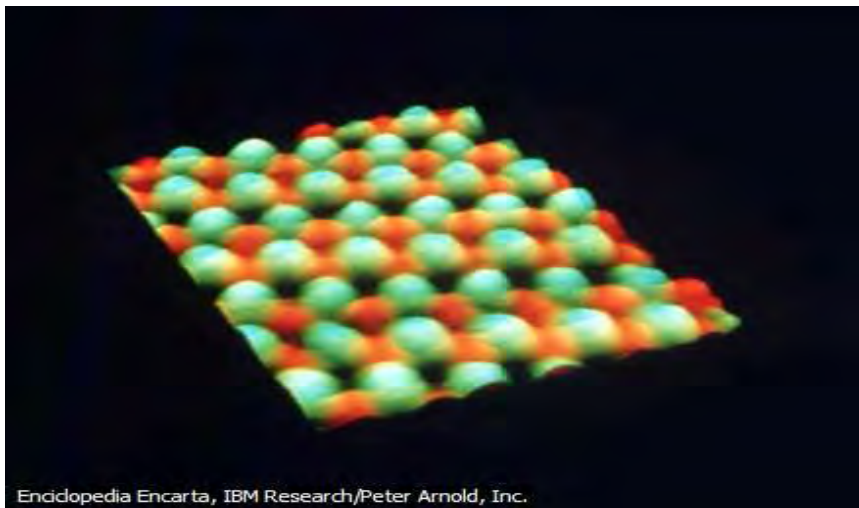


Figura 30: Fotografía obtenida con un microscopio de barrido de efecto túnel, donde se pueden ver los átomos de un cristal de germanio (Enciclopedia Encarta, 2008).

### **3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA FORMA DE LAS NANOPARTÍCULAS**

La forma de las nanopartículas se determina por medio de las diferentes técnicas de microscopía electrónica.

La microscopía electrónica requiere el uso de un agente de recubrimiento que se aplica a las nanopartículas. Aunque hoy en día existen técnicas donde no es necesario recubrirlas, este método consiste en enfriar las nanopartículas a muy bajas temperaturas y utilizar microscopía electrónica de criotransmisión. También se utiliza la microscopía electrónica de barrido (Fatal *et al*, 2002).

### **3.3 CARATERIZACIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL DE LAS NANOPARTÍCULAS**

La carga superficial de las nanopartículas se mide a través de su potencial zeta.

Las nanopartículas presentan una carga eléctrica debido a sus características iónicas y bipolares. Para medir el potencial zeta se utiliza un instrumento que mide este parámetro. Las nanopartículas se rodean por otras partículas iónicas con carga opuesta, a estas últimas se les llama la capa difusa. Por fuera de la capa difusa hay una mezcla de partículas iónicas de diferentes cargas formando una especie de nube, por lo que reciben el nombre de la doble capa difusa (Li *et al*, 2007).



El medidor del potencial zeta funciona de la siguiente manera: al aplicar un voltaje a la solución en la cual las nanopartículas están dispersas, las nanopartículas van a migrar hacia el electrodo de polaridad opuesta. Entonces por medio de un haz láser se mide la velocidad de migración de las nanopartículas, la cual es convertida por medio de una computadora en el valor de potencial zeta correspondiente (Fig. 31) (Li *et al*, 2007).

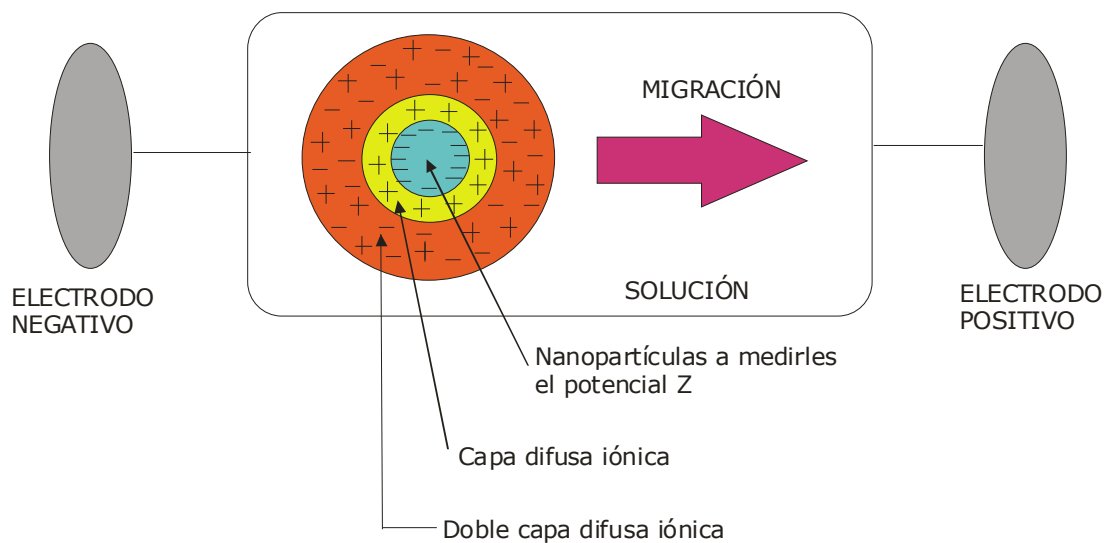


Figura 31: Funcionamiento del medidor del potencial zeta.

Una de las ecuaciones que se utiliza para el cálculo del potencial zeta es la de Helmholtz-Smoluchowsky:

$$U_p = V_p E = \zeta \epsilon \eta$$

donde:  $U_p$ = movilidad electroforetica,  $V_p$ = velocidad electroforetica,  $E$ = intensidad del campo electrico,  $\zeta$ = potencial zeta,  $\epsilon$ = permitividad,  $\eta$ = viscosidad del medio (Li *et al*, 2007).

La ecuación que nos permite el cálculo del potencial zeta por medio de un haz láser y la movilidad electroforética de las nanopartículas es la siguiente:

$$U_p = \frac{\Delta\nu\lambda_0}{2nE\sin(\theta/2)}$$

donde:  $U_p$ = movilidad electroforética,  $\Delta\nu$ = corrimiento de la frecuencia Doppler,  $\lambda_0$ = longitud de onda del láser en el vacío,  $n$ = índice de refracción del medio,  $E$ = campo eléctrico aplicado,  $\theta$ = ángulo de dispersión del láser (Li *et al*, 2007).

### **3.4 CARACTERIZACIÓN DEL PESO MOLECULAR DE LAS NANOPARTÍCULAS**

El peso molecular de las nanopartículas se determina generalmente con una cromatografía de permeación en gel (Kreuter, 1994).

“La cromatografía de permeación en gel, que se ha denominado de tamices moleculares o filtración en gel, es un tipo de cromatografía sólido-líquido que separa los polímeros polidispersos en fracciones por tamizado en un gel de poliestireno con enlaces cruzados u otro de características semejantes. El gel de poliestireno, que sirve de fase estacionaria, se puede obtener comercialmente en una gran variedad de tamaños de poro (1 a  $10^6$  nm). Puesto que las moléculas pequeñas penetran más fácilmente en las partículas de gel, las fracciones de más alto peso molecular se separaran antes. De esta manera, la cromatografía de permeacion en gel separa las fracciones

de acuerdo con su tamaño. El peso molecular es función del volumen efectivo ocupado por la cadena del polímero en disolución” (Fig.32) (Seymour, 1998).

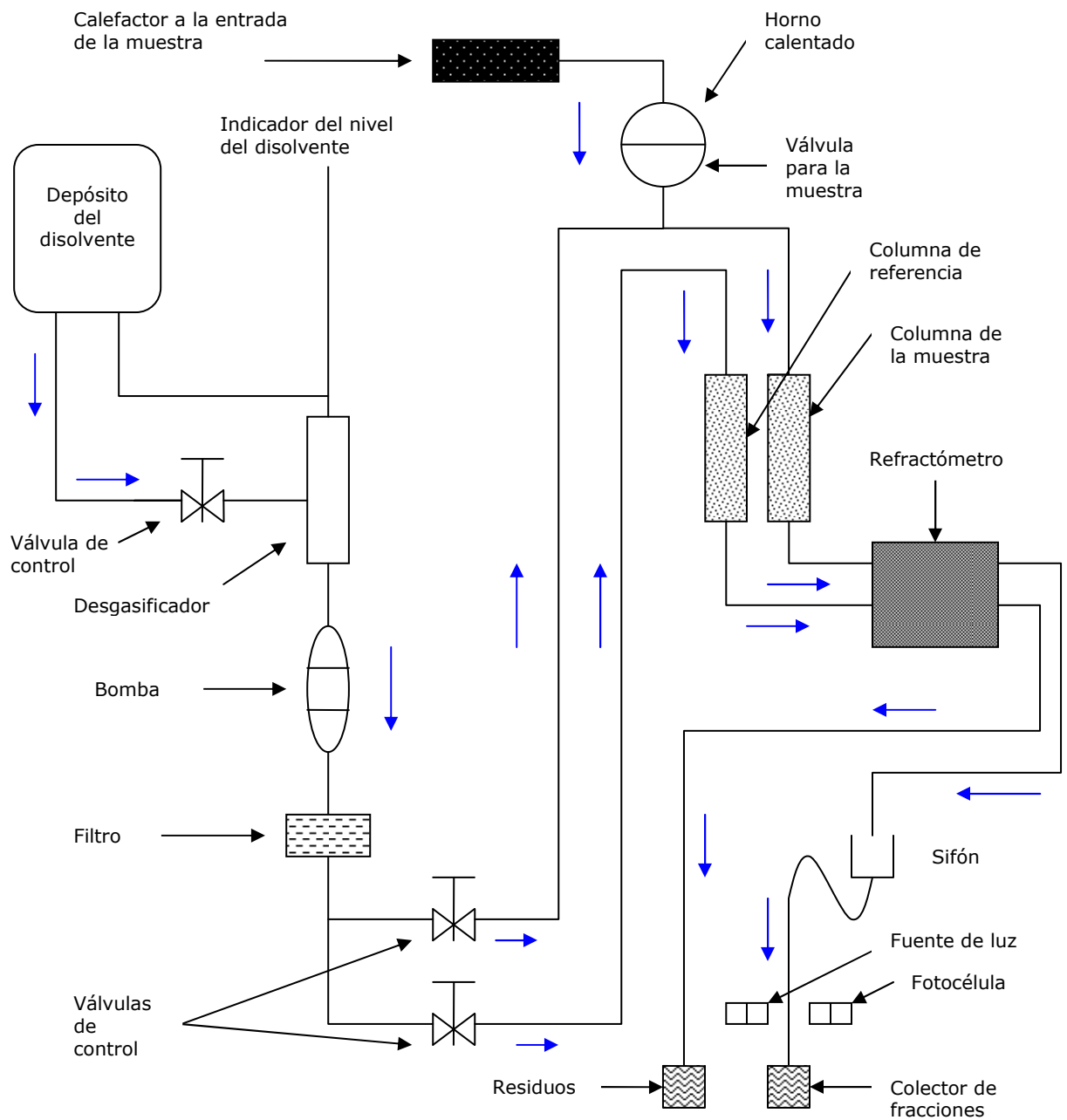


Figura 32: Se muestra el esquema de flujo de la disolución y disolvente en un cromatógrafo de permeación en gel (Seymour, 1998).

### 3.5 CARACTERIZACIÓN DE LA CRISTALINIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS

Los polímeros presentan una estructura cristalina por lo que las nanopartículas al estar formadas de polímeros biodegradables y no biodegradables presentan esta propiedad.

Para determinar la cristalinidad se utilizan las técnicas de difracción de rayos X y calorimetría diferencial de barrido.

La difracción<sup>10</sup> de rayos X por un cristal presentan un patrón de interferencia típico para una sustancia cristalina. La longitud de onda de los rayos X son comparables en tamaño con la distancia entre los átomos de muchos cristales, y la repetición de los monómeros actúa como una red cristalina, donde son difractados los rayos X. Por lo tanto el patrón de interferencia emitido es detectado en un difractómetro. El detector es un instrumento que convierte los rayos X en pulsos de corriente eléctrica (Fig.33).

---

<sup>10</sup> Difracción: desviación que experimentan las ondas en su propagación rectilínea cuando chocan con obstáculos o cuando penetran por aberturas; sobre todo cuando el diámetro de estas es comparable o mas pequeño que la longitud de onda (Diccionario de Física, 1976).

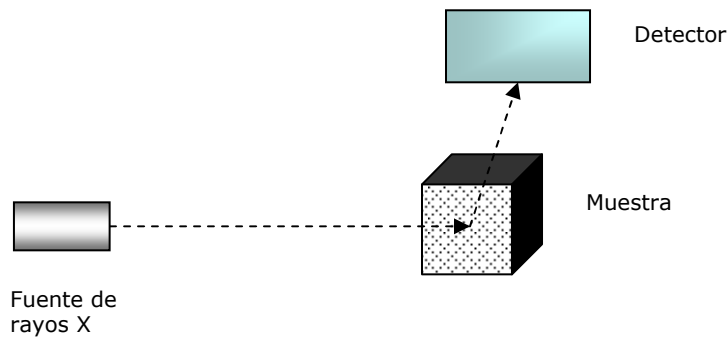


Figura 33: Esquema de un difractómetro de rayos X.

“La calorimetría diferencial de barrido es un método analítico instrumental térmico en el que se mide la diferencia entre el calor absorbido por una muestra de un polímero y un patrón mediante la electricidad consumida a medida que aumenta la temperatura” (Fig.34) (Seymour, 1998).

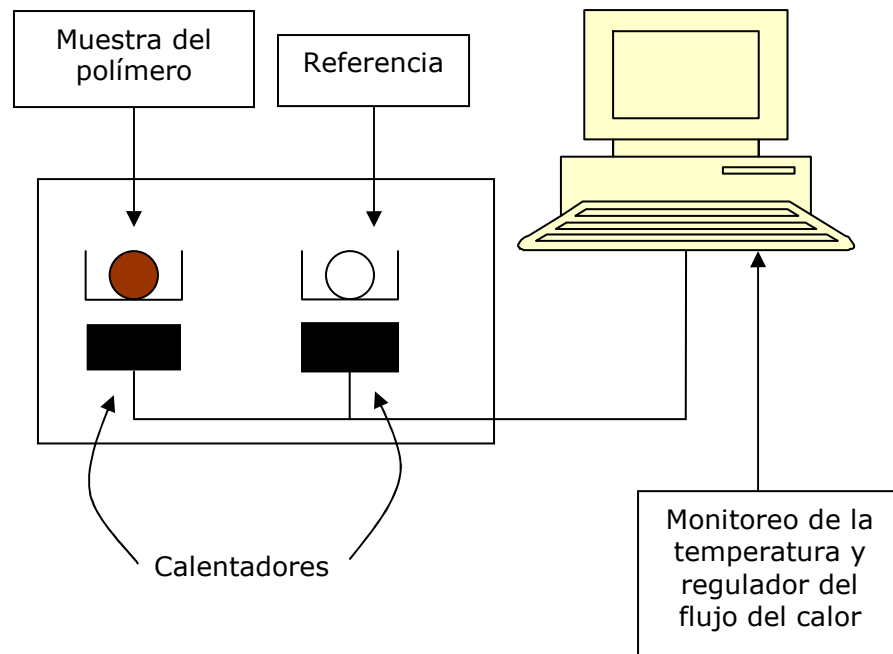


Figura 34: Esquema de un aparato calorimetría diferencial de barrido. (www.pscr.usm.edu).

El resultante es un gráfico denominado termograma, donde se muestra la información del polímero en estudio. El área bajo la curva obtenida es una medida directa del calor de transición, además se obtiene el punto de fusión. Un termograma es característico de cada polímero o sustancia en particular (Fig. 35).

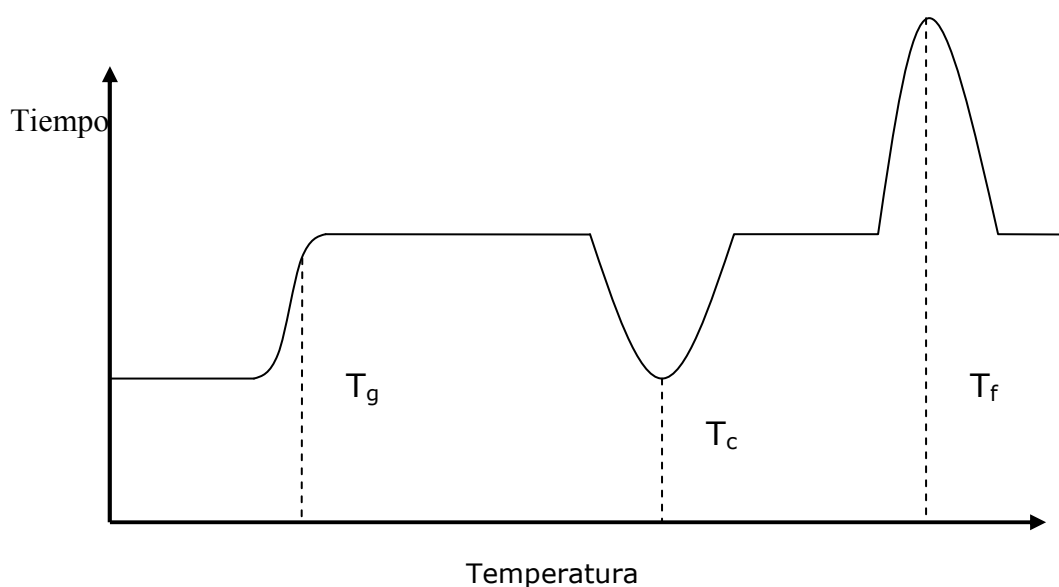


Figura 35: Ejemplo de un termograma:  $T_g$ : temperatura de transición vítrea,  $T_c$ : temperatura de cristalización,  $T_f$ : temperatura de fusión (www.pscr.usm.edu).

### 3.6 CARACTERIZACIÓN DE LA HIDROFOBICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS

Esta propiedad se evalúa por medio de la cromatografía de interacción hidrofóbica, esta consiste en hacer pasar las nanopartículas a través de una columna que contiene un gel hidrofóbico de interacción cromatográfica (Fig. 36). Las nanopartículas que son retenidas por el gel y solo pueden ser

extraídas después de la adición de un tensoactivo se consideran hidrófobas. Por otro lado las nanopartículas que no son retenidas por el gel se consideran hidrofílicas.

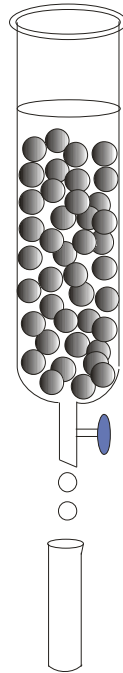


Figura 36: Columna cromatografica de interacción hidrofóbica.

### **3.7 CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES DE SUPERFICIE DE LAS NANOPARTÍCULAS**

La adsorción de proteínas plasmáticas por parte de las nanopartículas se puede medir con una electroforesis en gel de poliacrilamida en 2 dimensiones. La electroforesis es una técnica en la cual las moléculas (proteínas) se separan de acuerdo a su carga eléctrica que poseen, cuando se someten a un campo eléctrico externo (Fig. 37). Las moléculas con carga negativa se desplazan hacia el electrodo positivo y las de carga positiva hacia el electrodo negativo. Esta emigración de las moléculas depende del pH del medio

utilizado. Finalmente se obtiene un patrón de bandas, cuya distancia del punto de inicio de la corrida corresponda a su tamaño molecular. Lo de dos dimensiones es por que la dirección de la migración de las proteínas se cambia después de la primera corrida (Soberon, 1996).

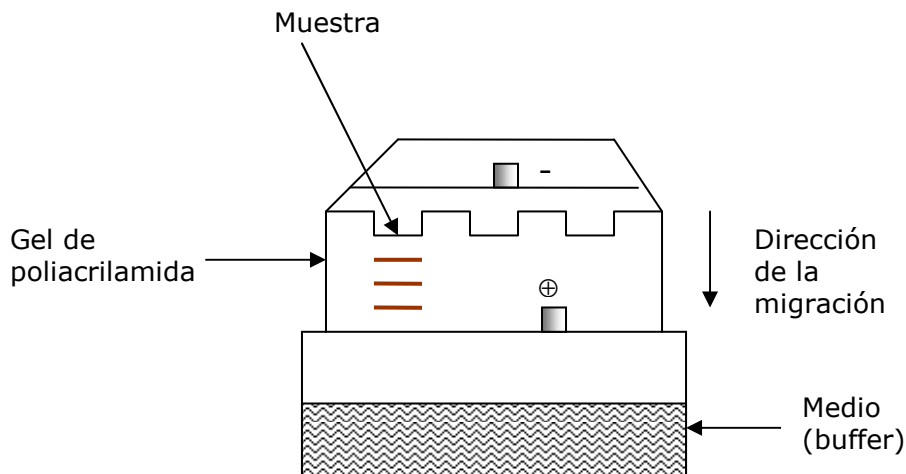


Figura 37: Dibujo de cómo se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida.

Para determinar la composición química de la superficie de las nanopartículas se utiliza la *espectroscopia fotoelectrónica de rayos x*.

En la espectroscopia fotoelectrónica de rayos x (XPS) "la muestra se bombardea con una haz de rayos x de energía  $h\nu$ , de ella se desprenden electrones del interior con una energía cinética ( $E_k$ ) que supera la energía de enlace ( $E_B$ ) y la función de trabajo ( $\phi$ ). Estos electrones interiores se llaman fotoelectrones de rayos x. la ecuación de la energía puede expresarse de la siguiente manera:

$$E_k = h\nu - E_B - \phi$$



Las energías cinéticas de estos electrones expulsados que se originan en los primeros 30 Ångstrom de la superficie se miden mediante la XPS (Fig. 38).

Las funciones de un espectrómetro fotoelectrónico de rayos x son la producción de una intensa radiación de rayos x para irradiar la muestra y fotoexpulsar electrones interiores, la introducción de los electrones expulsados en un analizador de energía, la detección de los electrones de energía analizada y el suministro de una salida apropiada de una intensidad de señal función de la energía de unión de los electrones" (Fig. 39) (Seymour, 1998).

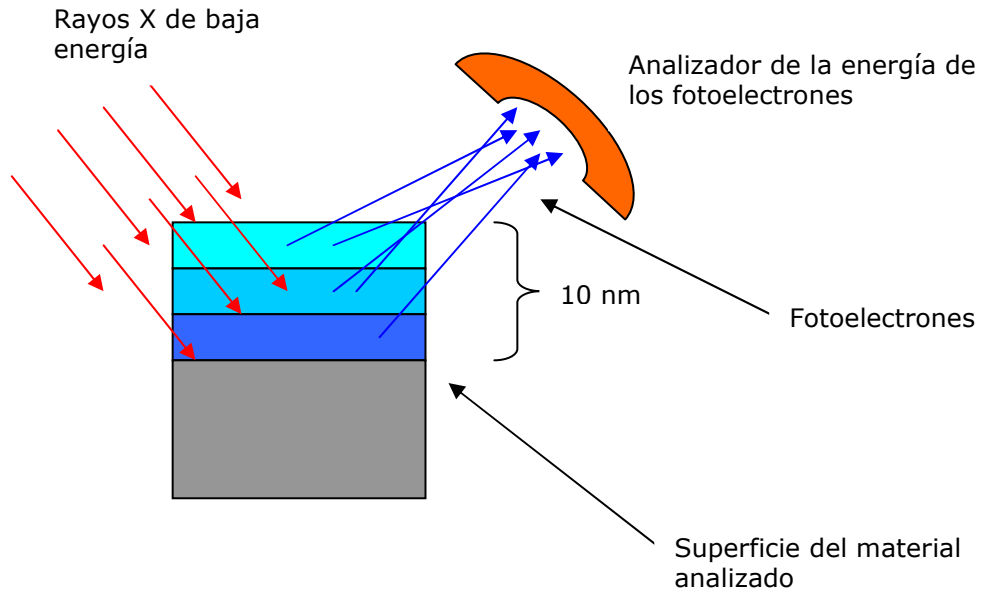


Figura 38: Principio de funcionamiento de la espectroscopia fotoelectrónica de rayos X.

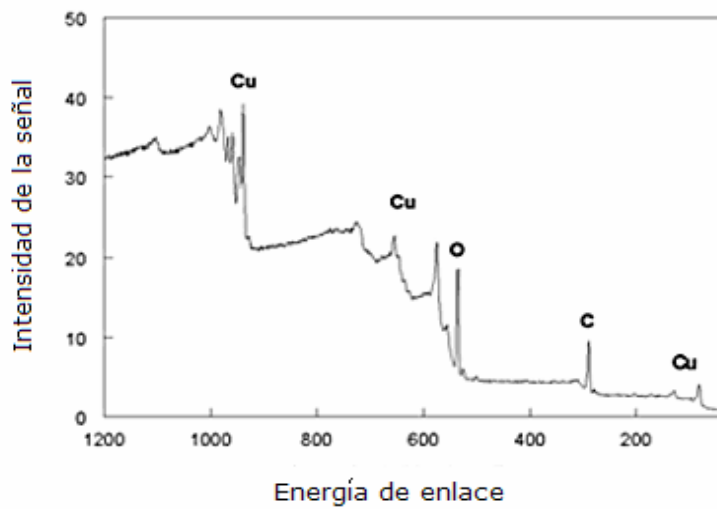


Figura 39: Espectro obtenido con la espectroscopia fotoelectrónica de rayos X de la superficie del cobre tricloroetano ([www.slac.stanford.edu](http://www.slac.stanford.edu)).

## CAPÍTULO 4

### 4. APLICACIONES DE LAS NANOPARTÍCULAS

En la actualidad se ha incrementando el número de aplicaciones de las nanopartículas en las áreas de tecnología farmacéutica, diagnóstico de enfermedades, tratamiento de enfermedades mortales como el cáncer, etc.

#### 4.0 TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES

##### 4.1 TRATAMIENTO DEL CANCER CON NANOPARTÍCULAS

###### 4.1.1 NANOPARTÍCULAS DE DOXORRUBICINA

Uno de los factores que limitan el uso de fármacos en la quimioterapia es la falta de especificidad hacia las células tumorales, por lo que su índice terapéutico es bajo, de esta manera se ha aumentado la toxicidad de los fármacos anticancerígenos para las células normales. Se pretende que con el uso de las nanopartículas, haya una mejor selectividad hacia las células neoplásicas<sup>11</sup>, reduciendo los efectos secundarios.

La doxorubicina (DXR) es un fármaco que se utiliza en el tratamiento de los siguientes tipos de cáncer: sarcomas de tejidos blandos, osteogénico y de otros tipos (Fig.40); enfermedad de

---

<sup>11</sup> El término neoplasia etimológicamente significa "formación nueva" (de neo, nuevo y plasia, formación), hay neoplasias benignas y malignas o cáncer (Torroella *et al*, 1998).

Hodgkin, linfomas no Hodgkin, leucemias agudas, tumores de mamas, de vías genitourinarias, tiroides, pulmones, estomago y neuroblastoma. El principal efecto secundario que ocasiona es la cardiomiopatía (Goodman and Gilman *et al*, 1996).

La DXR se une con el ADN afectando la síntesis de ADN y ARN, también interactúa con las membranas celulares alterando sus funciones (Goodman and Gilman *et al*, 1996).

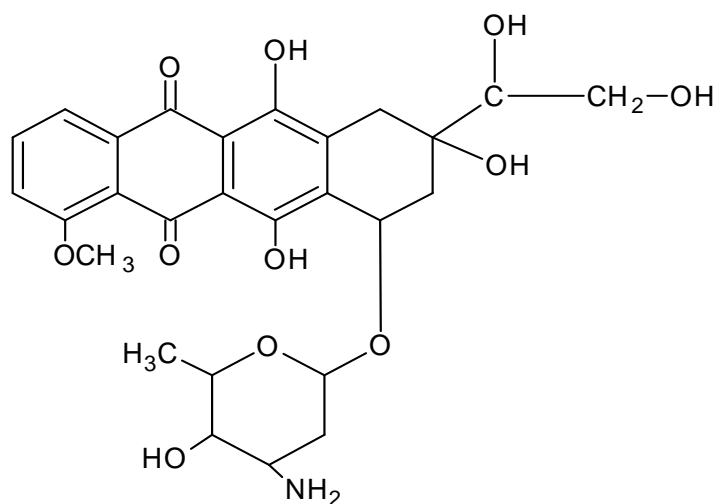


Figura 40: Molécula de doxorubicina (DXR).

Tabla 3: Propiedades biofarmacéuticas y efectos adversos de la doxorubicina (Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 2002).

Propiedades biofarmacéuticas	Efectos adversos
La forma farmacéutica es una solución inyectable, soluble en agua, vía de administración intravascular, tiene una distribución rápida en todo el cuerpo, no cruza la barrera hematoencefálica, vida media de 20-48 hrs.	Altamente irritante para los tejidos, causa nauseas, vómitos, alopecia, mucositis, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, toxicidad hematológica, embriotóxica, teratogénica.

Las primeras nanoesferas con DXR se utilizaron para el tratamiento de leucemia linfocítica L-1210. Se compararon las mismas dosis por la vía intravenosa de DXR en la forma farmacéutica comercial y nanoesferas de PIBCA cargadas con DXR. Se encontró que los ratones utilizados incrementaron su promedio de vida con las nanoesferas de DXR respecto de los otros a los que se les administró la DXR en forma normal (Fig. 41); sin embargo, finalmente ambos grupos de ratones perecieron (Leroux *et al*, 1996).

Otro tipo de neoplasia en el que se utilizaron las nanopartículas fue en el reticulosoma M5076. Se usaron nanoesferas de PACA con DXR, el número de metástasis<sup>12</sup> se redujeron respecto de la DXR en forma libre. Se tomaron biopsias de los hígados de los animales en estudio, los cuales mostraron una disminución del número de células cancerígenas dentro del tumor (Fattal *et al*, 2002).

Se han realizado estudios en ratones con nanoesferas de PIHCA con DXR y se encontró que eran efectivas contra el tratamiento de metástasis hepáticas, se redujeron el número de metástasis hepáticas y hubo un incremento en el promedio de vida (Leroux *et al*, 1996).

---

<sup>12</sup> Metástasis: es la manera en la que los tumores se diseminan hacia fuera (invadiendo otros tejidos) del tumor cancerígeno. Reciben el mismo nombre los tumores que se desarrollan de la manera anteriormente explicada. (Diccionario Mosby, 1998).

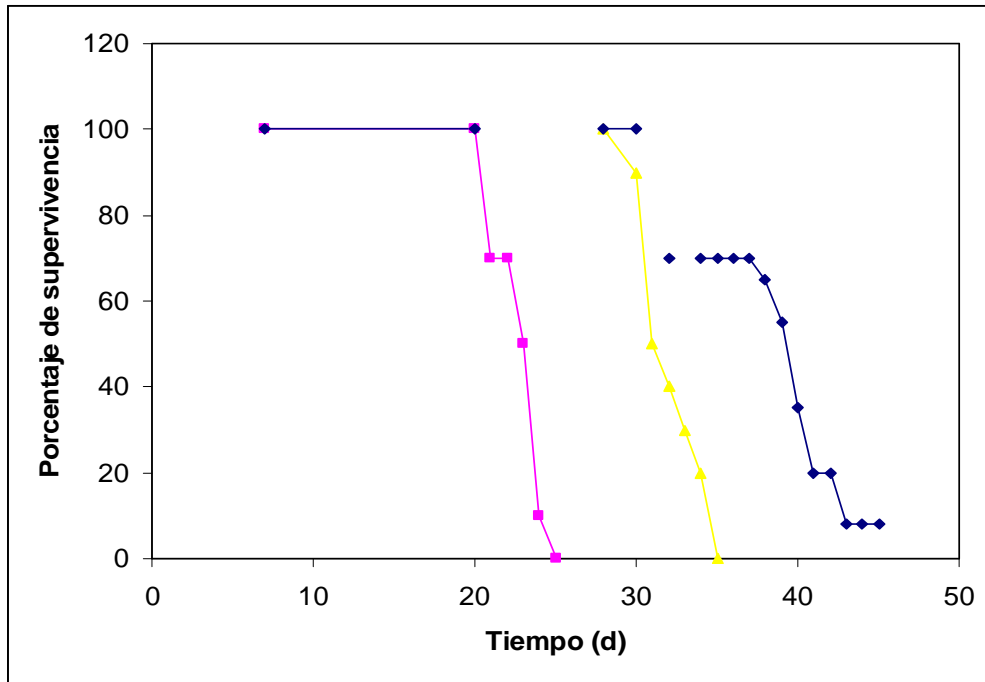


Figura 41: Se observa el tiempo (en días) de supervivencia de un ratón: (□ ) no tratados, (▽) tratados con 10 mg/kg de DXR libre en vía intravenosa, (◇) tratados con nanoesferas de PIHCA con DXR. A todos los lotes se les aplicó una sola dosis al día 7 (Leroux *et al*, 1996).

Las nanopartículas con DXR tienen la habilidad de vencer la resistencia a los fármacos que desarrollan las células cancerígenas. El mecanismo de acción de resistencia a los fármacos es complejo (Fig. 43). La DXR penetra en la célula a través de difusión pasiva una vez dentro de la célula se une a la glicoproteína-P ubicada en la membrana celular, esta proteína utiliza energía en forma de ATP para bombear hacia fuera de la célula a la DXR. En un estudio realizado in vitro se utilizaron nanoesferas de PIBCA con DXR contra células tumorales U-937, como se observa en la gráfica se redujo la salida de nanoesferas con DXR respecto de la DXR en forma libre (Fig.42) (Leroux *et al*, 1996).

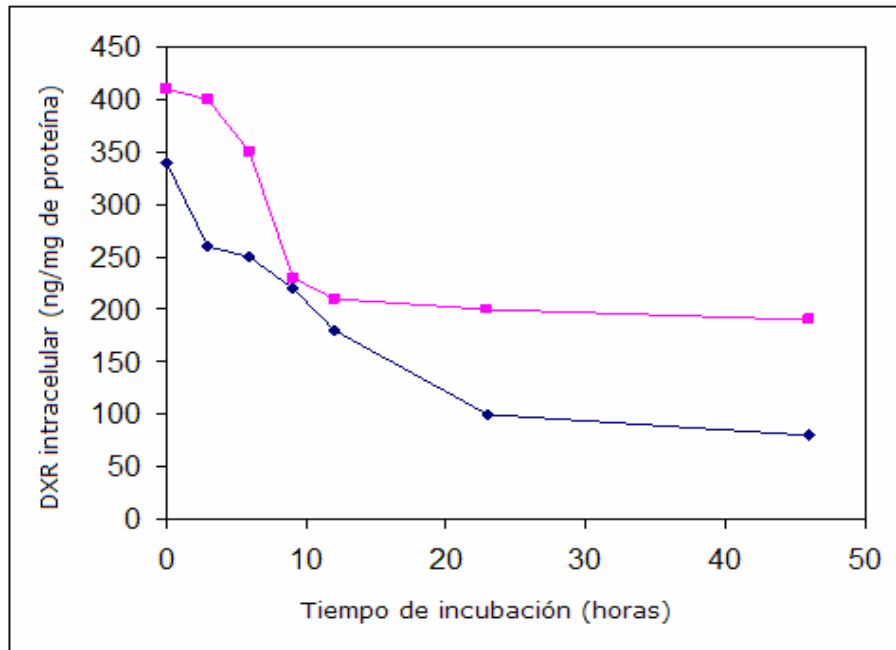


Figura 42: Las células se cultivaron por 4 horas a 37°C con 0.5µg/ml de DXR libre (◇), o nanoesferas con DXR(□). Después de este tiempo se lavaron con una solución salina en buffer de fosfatos, las células se resuspendieron en un medio libre del fármaco por 48 horas (Leroux *et al*, 1996).

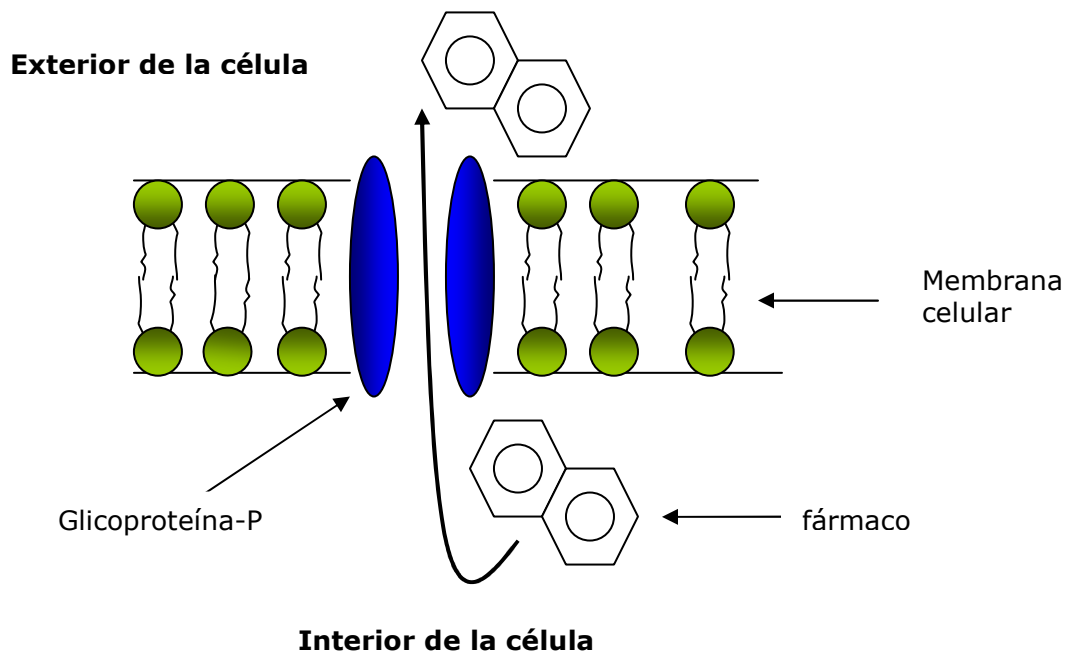


Figura 43: Se muestra el mecanismo de acción de la resistencia a los fármacos por parte de las células tumorales. La glicoproteína-P utiliza energía en forma de ATP para bombear hacia fuera de la célula al fármaco.

Otra aplicación de la DXR y nanocápsulas con colesterol de muramil tripéptido (MTP) o muramil dipéptido (MDP), estos últimos son agentes inmunoestimulantes que activan a los macrófagos con un efecto citostático hacia las células tumorales. El posible mecanismo de acción es que los macrófagos producen óxido nítrico, molécula altamente reactiva y tóxica, que reduce el transporte mitocondrial de electrones (Fig. 44). Este tipo de nanopartículas se han probado en estudios in vivo y se ha reportado su eficiencia contra metástasis del hígado (Leroux *et al*, 1996).

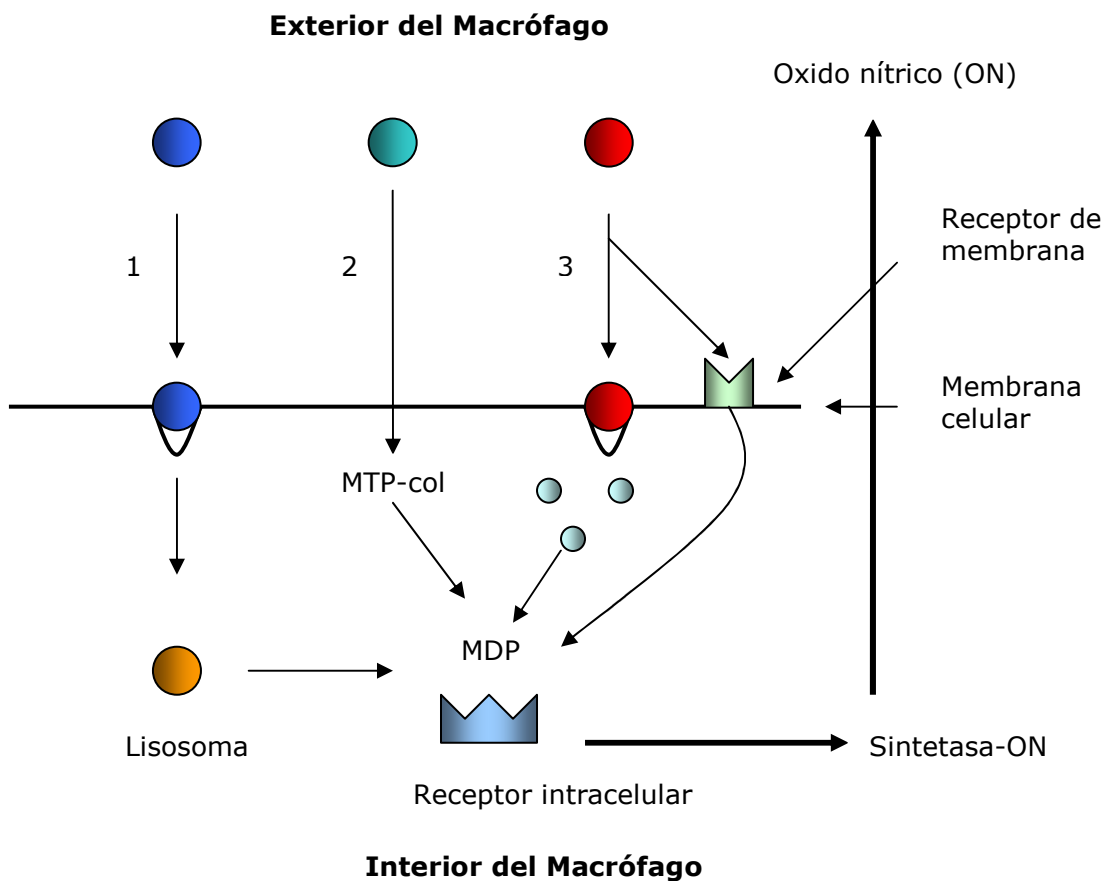


Figura 44: Diferentes mecanismos por medio del cual MTP-colesterol en nanocápsulas o MDP libre e hidrofílico pueden penetrar hacia adentro de los macrófagos alveolares, de esta manera induciendo una activación de estas células mediante la liberación de Oxido Nítrico (ON): (1) fagocitosis de nanocápsulas, (2)



difusión pasiva de MTP-colesterol, (3) entrada de MDP mediante un receptor en la membrana celular o por pinocitosis (Leroux *et al*, 1996).

En la búsqueda de una molécula que fuera capaz de inhibir la glicoproteína-P se encontró a la ciclosporina A, por lo que se probó con DXR en nanoesferas de PIBCA. Esta combinación fue bastante eficiente contra la resistencia a los fármacos (Fattal *et al*, 2002).

La distribución de las nanopartículas con DXR en los seres vivos depende de las características del material acarreador (hidrofobicidad). Después de una administración intravenosa las nanopartículas son atrapadas por el sistema retículo endotelial, minutos después se acumulan en el hígado y el bazo (Leroux *et al*, 1996).

Por último hay que decir que este tipo de nanopartículas tienen algo de toxicidad. Se ha observado un incremento de la toxicidad en la médula ósea y en los riñones. La toxicidad depende del polímero usado en la elaboración de las nanopartículas, por ejemplo se demostró que las nanoesferas de PACA con efectos más citotóxicos hacia las células cancerígenas fueron aquellas con las cadenas del polímero más cortas; por otra parte, este tipo de nanoesferas ocasionan un efecto mielosupresivo<sup>13</sup> en la médula ósea. (Vauthier *et al*, 2003).

---

<sup>13</sup> Inhibición del proceso de producción células sanguíneas y plaquetas en la médula ósea (Diccionario Mosby, 1998).

#### 4.1.2 NANOPARTÍCULAS DE 5-FLUOROURACILO

Se utiliza en el tratamiento de carcinomas metastásicos de la glándula mamaria y vías gastrointestinales, carcinomas de ovario, cuello uterino, vejiga, próstata, páncreas y zonas bucofaríngeas.

El 5-Fluorouracilo es un análogo del uracilo (Fig. 45), por lo que inhibe eficazmente la función del ARN, actúa como inhibidor reversible de la enzima timidilato sintetasa. (Goodman and Gilman *et al*, 1996).

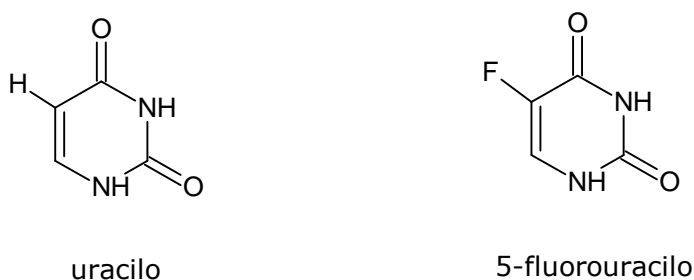


Figura 45: Molécula de uracilo y 5-fluorouracilo.

Se han utilizado nanoesferas de PACA con el 5-fluorouracilo en el tratamiento de carcinomas aumentando su eficacia, pero también se incrementó su toxicidad.

Las nanoesferas de albúmina y 5-fluorouracilo resultaron eficaces contra el carcinoma de ascitis<sup>14</sup> Ehrlich (Kreuter J., 1994).

<sup>14</sup> Acumulación anormal de líquido intraperitoneal que contiene grandes cantidades de proteínas y electrolitos (Diccionario Mosby, 1998).

### 4.1.3 NANOPARTÍCULAS DE PACLITAXEL

El paclitaxel es una molécula que se aisló de la corteza del tejo en 1971, es un inhibidor de la mitosis, estimula la formación de microtúbulos, como consecuencia se detiene el ciclo celular en la mitosis (Fig. 46). Se utiliza en el tratamiento del cáncer ovárico, seno, pulmones, esófago, cuello y cabeza (Goodman and Gilman *et al*, 1996).

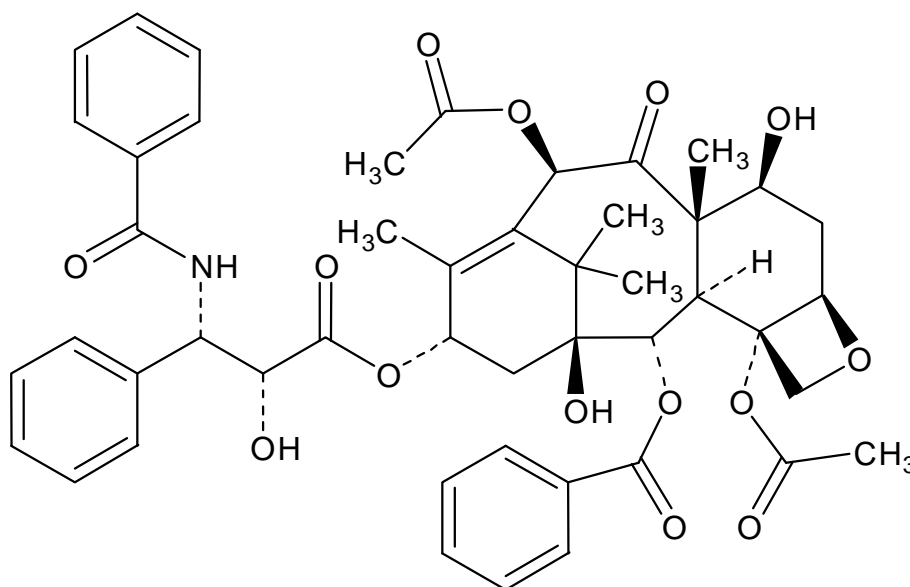


Figura 46: Molécula de paclitaxel.

La molécula de paclitaxel es muy poco soluble en agua, pero si es soluble en solventes orgánicos como el etanol. La formulación actualmente disponible es Chremophor EL (contiene aceite de castor polietoxilado y etanol para solubilizar el fármaco). Sin embargo la presentación anterior tiene efectos secundarios graves, como

reacciones de hipersensibilidad, neurotoxicidad, nefrotoxicidad (Kim *et al*, 2005).

En el desarrollo de una nueva formulación nombrada Abraxane<sup>®</sup>, recientemente aprobada por la FDA, se utilizaron nanopartículas de albúmina cargadas con paclitaxel (Fig. 47). Estas nanopartículas evitan los efectos tóxicos del Chremphor EL, además toman ventaja de los receptores de albúmina en las células cancerígenas para liberar el fármaco directamente en el tumor (Fahmy *et al*, 2005).



Figura 47: Abraxane<sup>®</sup> es un medicamento elaborado en base a nanopartículas, contra el cáncer de mama, aprobado por la FDA para su comercialización. ([www.healthcentral.com/breast-cancer/find-drug-82588-73.html](http://www.healthcentral.com/breast-cancer/find-drug-82588-73.html)).

Otra forma de preparar el paclitaxel es en forma de nanopartículas de ácido poliláctico-co-glicólico. Se han realizado estudios con células cancerígenas de pulmón NCI-H69, las cuales perdieron el 70 % de su viabilidad a una dosis de 0.025  $\mu\text{g/ml}$  (Fonseca *et al*, 2002).

#### 4.1.4 NANOPARTÍCULAS DE METOTREXATO

El metotrexato es un antagonista del ácido fólico, fue uno de los primeros fármacos antineoplásicos contra la leucemia (Fig. 48). Es un inhibidor de la dihidrofolato reductasa, también inhibe las enzimas que dependen de folato en la síntesis de la purina y del timidilato. El ácido fólico es un factor esencial en los alimentos y de él se deriva una serie de cofactores para la síntesis de ADN y ARN (Bevan *et al*, 1982).

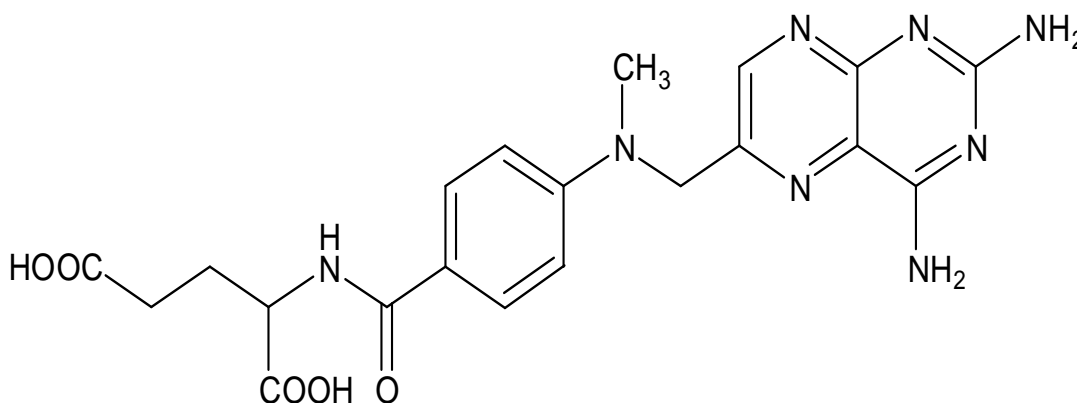


Figura 48: Molécula de metotrexato.

Se utilizaron nanoesferas de PBCA cargadas con metotrexato contra el osteosarcoma obteniéndose una reducción del 50% del crecimiento del tumor versus el metotrexato libre (Leroux *et al*, 1996).

#### 4.1.5 NANOPARTÍCULAS DE MITOXANTRONA

La mitoxantrona es un análogo de la doxorubicina, causa menos toxicidad cardíaca (Fig.49). Se utiliza para el tratamiento de leucemias no linfocíticas agudas. También ocasiona daños al ADN, lo separa en filamentos (Goodman and Gilman *et al*, 1996).

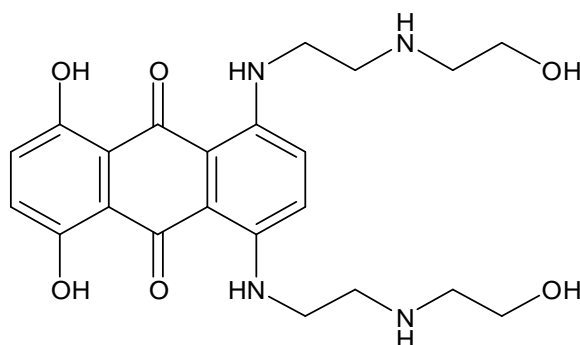


Figura 49: Molécula de mitoxantrona.

Nanopartículas lipídicas con mitoxantrona se utilizaron contra el cáncer de mama. El porcentaje de inhibición del tumor fue del 81 % con nanopartículas, mientras que con el fármaco libre en solución y con una dosis al doble respecto del anterior fue de 82 %. Se observó una mayor toxicidad en el hígado y pulmones en la formulación del fármaco en solución. Hubo una reducción en el tamaño del tumor utilizando nanopartículas (41.85 mm<sup>3</sup>), con la mitoxantrona en solución el tamaño fue de 119.32 mm<sup>3</sup> (Lu Bin *et al*, 2006).

#### 4.1.6 NANOPARTÍCULAS DE DACTINOMICINA

La dactinomicina es un fármaco de origen natural que se obtiene de una especie de *Streptomyces* (Fig. 50). Se utiliza en el tratamiento de algunas neoplasias de niños y el coriocarcinoma. La dactinomicina tiene la capacidad de unirse al ADN quedando bloqueada la capacidad

de duplicación del ADN por parte de la ARN polimerasa (Goodman and Gilman *et al*, 1996).

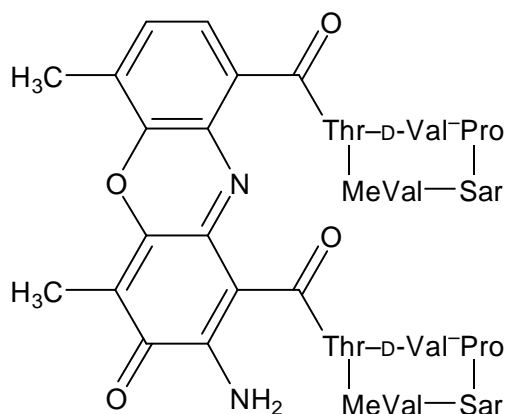


Figura 50: Molécula de dactinomicina.

La utilización de nanoesferas de PHCA con dactinomicina se utilizó para el tratamiento de un sarcoma S250 en ratas. Resulto mucho más efectivo reduciendo el tamaño del tumor respecto del fármaco en forma libre, además los animales sobrevivieron por más tiempo (Leroux *et al*, 1996).

#### 4.1.7 NANOPARTÍCULAS DE VINDESINA

Este anticancerígeno proviene de una planta llamada Vinca (Fig. 51). Son agentes alcaloides antimicóticos. La molécula de vindesina se une a la tubulina evitando su polimerización en microtubulos. Como los microtubulos intervienen en el proceso de la mitosis, esta se detiene (Goodman and Gilman *et al*, 1996).

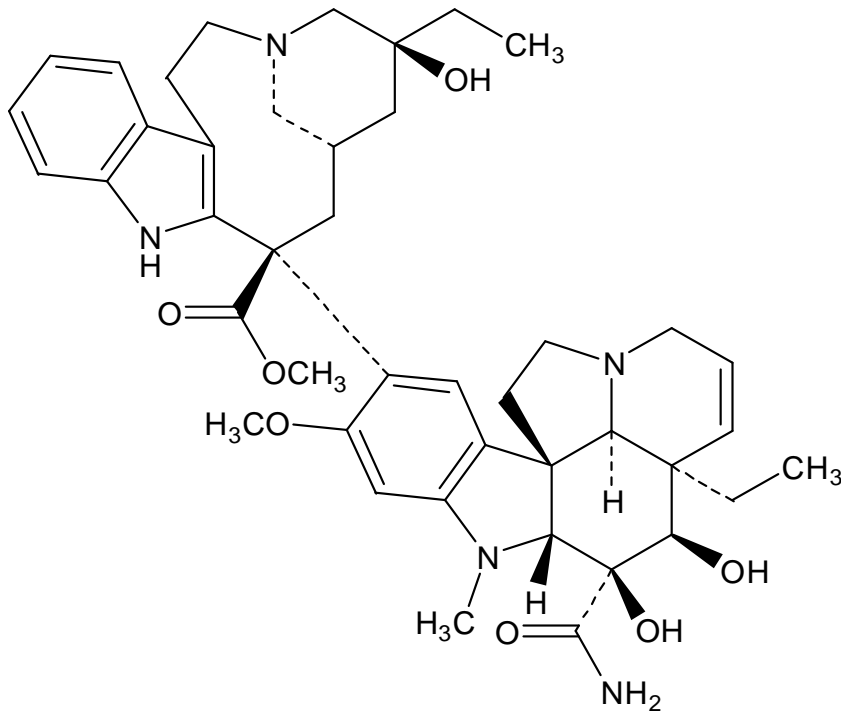


Figura 51: Molécula de vindesina.

Un estudio realizado con nanoesferas magnéticas de albúmina con vindesina contra el sarcoma Yoshida en ratas Holtzman, demostró que el 85% de las ratas que recibieron el tratamiento con nanoesferas magnéticas, detuvieron el crecimiento del tumor (Leroux *et al*, 1996).

#### 4.1.8 NANOPARTÍCULAS DE TAMOXIFENO

El tamoxifeno es un fármaco antiestrógeno, actúa como inhibidor competitivo de la unión de estradiol a los receptores de estrógeno, por lo que se inhibe el crecimiento de las células tumorales (Fig. 52). Se utiliza como preventivo del cáncer de mama y coadyuvante durante la terapia del mismo (Goodman and Gilman *et al*, 1996).



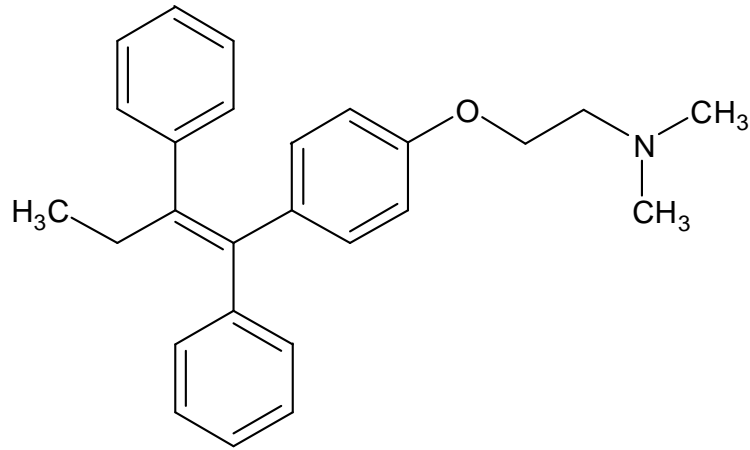


Figura 52: Molécula de tamoxifeno.

Se utilizaron nanopartículas de óxido de polietileno-poli- $\epsilon$ -caprolactona, posteriormente se recubrieron con óxido de polietileno-óxido de polipropileno-óxido de polietileno (Pluronic<sup>®</sup>). La biodistribución en vivo del fármaco en solución, con nanopartículas sin fármaco, nanopartículas modificadas en su superficie con Pluronic<sup>®</sup> F68 y F108 cargadas con fármaco. La mayor cantidad de fármaco en el tumor se obtuvo con las nanopartículas de Pluronic<sup>®</sup> F68 a las 6 horas después de la administración (Fig. 53).

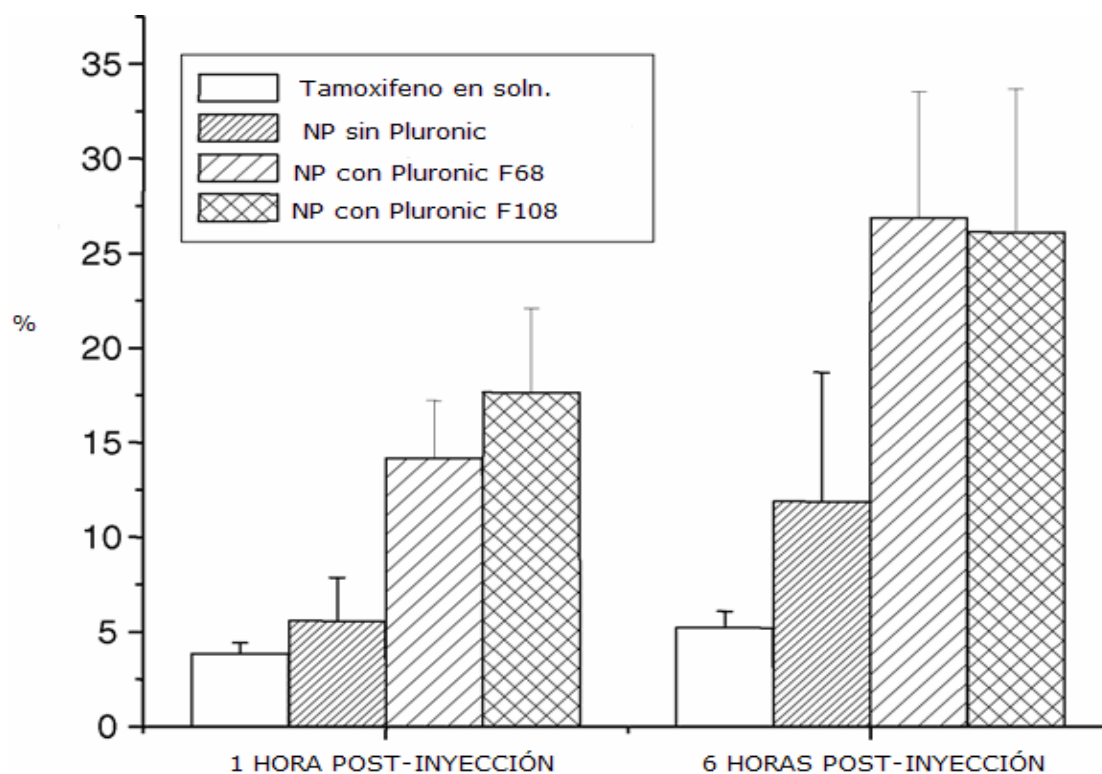


Figura 53: Concentraciones tumorales en función del tiempo del tamoxifeno en solución, nanopartículas (NP) sin Pluronic, y nanopartículas modificadas en su superficie con Pluronic F68 y 108 (Shenoy *et al*, 2005).

Las nanopartículas penetran a las células tumorales a través de una endocitosis, dando como consecuencia un efecto farmacológico mayor. Se observó que los polímeros formando las nanopartículas no son tóxicos. Una vez dentro de la célula las nanopartículas se degradan por efecto de las enzimas lipasas y otras enzimas hidrolíticas, donde liberan el fármaco (Shenoy *et al*, 2005).

#### 4.1.9 NANOPARTÍCULAS DE CISTATINAS

Las cistatinas son un nuevo tipo de antineoplásicos de origen proteico, muestran una especificidad hacia las células tumorales. Las cistatinas son inhibidores extracelulares de las proteasas de cisteína. Ahora bien, las proteasas de cisteínas son un grupo de enzimas que intervienen en varios procesos celulares tales como: reabsorción ósea, mantenimiento de la matriz extracelular, presentación de los antígenos, etc. (Fig. 54). Entonces, las cistatinas al inhibir a las proteasas de cisteína producen una degradación de la matriz extracelular y de la membrana celular, de esta manera se detiene la metástasis (Cegnar *et al*, 2004).

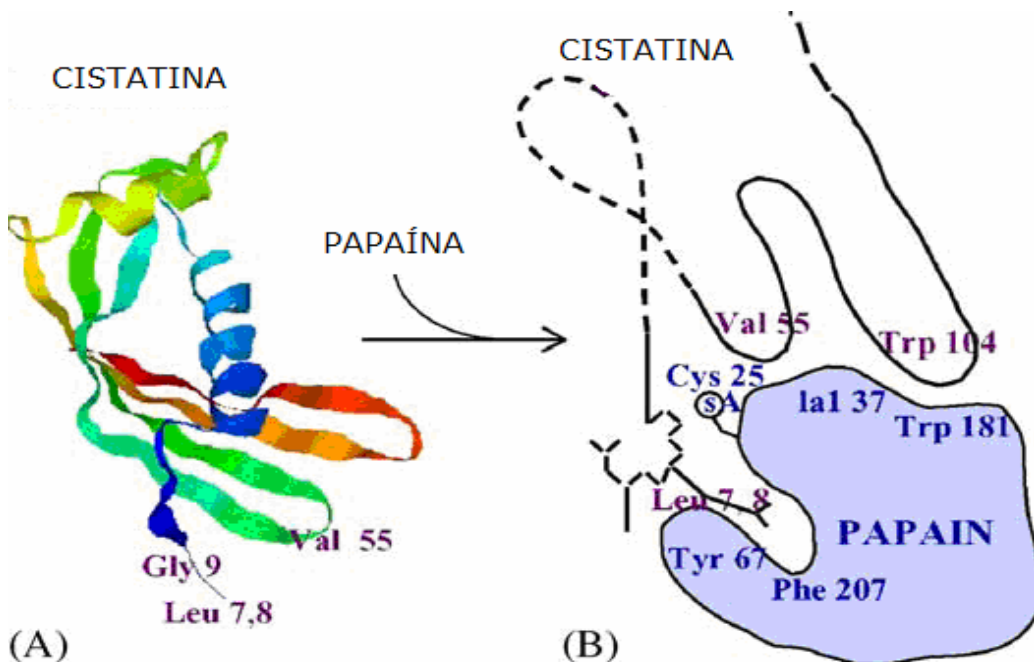


Figura 54: A) Estructura tridimensional de la cistatina de pollo; B) Inhibición de la enzima papaína (cisteína proteasa) a través de la interacción con la cistatina (Cegnar *et al*, 2004).

Sin embargo al utilizar proteínas en la terapia contra el cáncer, tenemos que estas tienen una baja biodisponibilidad y un tiempo de vida media muy corto. Para lograr que las cistatinas lleguen al tumor con éxito se están utilizando nanopartículas hechas con ácido poliláctico-co-glicólico las cuales son biodegradables, por otra parte esto representa un reto ya que las proteínas son inestables durante su encapsulación, pueden desnaturalizarse y por lo tanto perder su actividad terapéutica. La técnica utilizada de preparación fue la de doble emulsificación por el proceso de baja energía, el porcentaje de fármaco encapsulado fue alto, ya que únicamente se perdió el 15 % de la actividad del mismo. Sin embargo, en altas concentraciones el polímero utilizado presenta efectos tóxicos, por ejemplo a una concentración de 50  $\mu\text{g}$  NP/ml se ha encontrado que las células cultivadas in vitro mueren (Cegnar *et al*, 2004).

Para probar la efectividad de la cistatina en nanocápsulas se realizaron dos experimentos con células cultivadas in vitro. En un primer experimento la cistatina fue marcada con un colorante fluorescente, conforme se fue incrementando el tiempo se fueron notando una mayor cantidad de manchas fluorescentes dentro de las células, lo que no pasaba con la cistatina en forma libre (Fig. 55) (Cegnar *et al*, 2004).

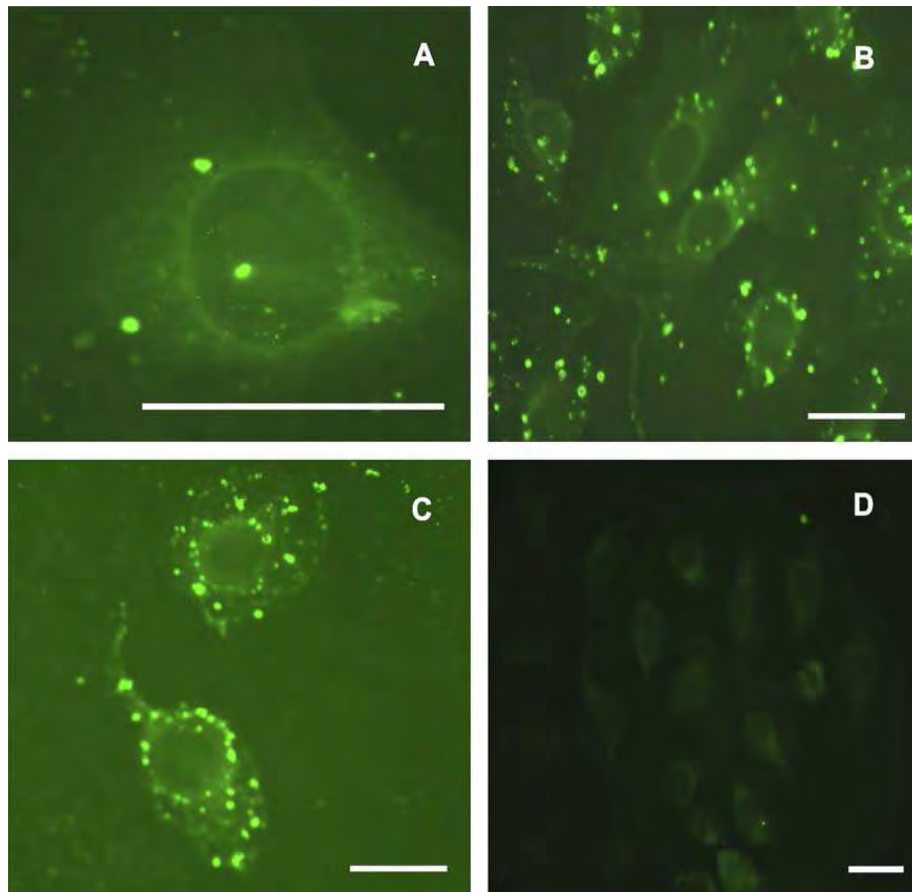


Figura 55: Paso de las nanopartículas de cistatina hacia adentro de las células tumorales. A) 10 minutos después de haberlas incubado a una concentración de  $100\mu\text{g NP/ml}$ ; B) 30 minutos después de la incubación; C) 45 minutos después de la incubación; D) 45 minutos después de la incubación con cistatina en forma libre con una concentración de  $0.1\mu\text{M}$ . Las barras representan una escala de  $20\mu\text{m}$  (Cegnar *et al*, 2004).

En el otro experimento se midió la efectividad de la cistatina contra su blanco, es decir contra la catepsina B (Fig. 56). La identificación de la enzima se realizó con un sustrato fluorogénico. Cuando las células fueron tratadas con las nanocápsulas cargadas con cistatina la fluorescencia fue disminuyendo, demostrando la efectividad de las nanopartículas al inhibir a la catepsina B; la cistatina en forma libre y

las nanopartículas sin fármaco no demostraron tal efectividad (Cegnar *et al*, 2004).

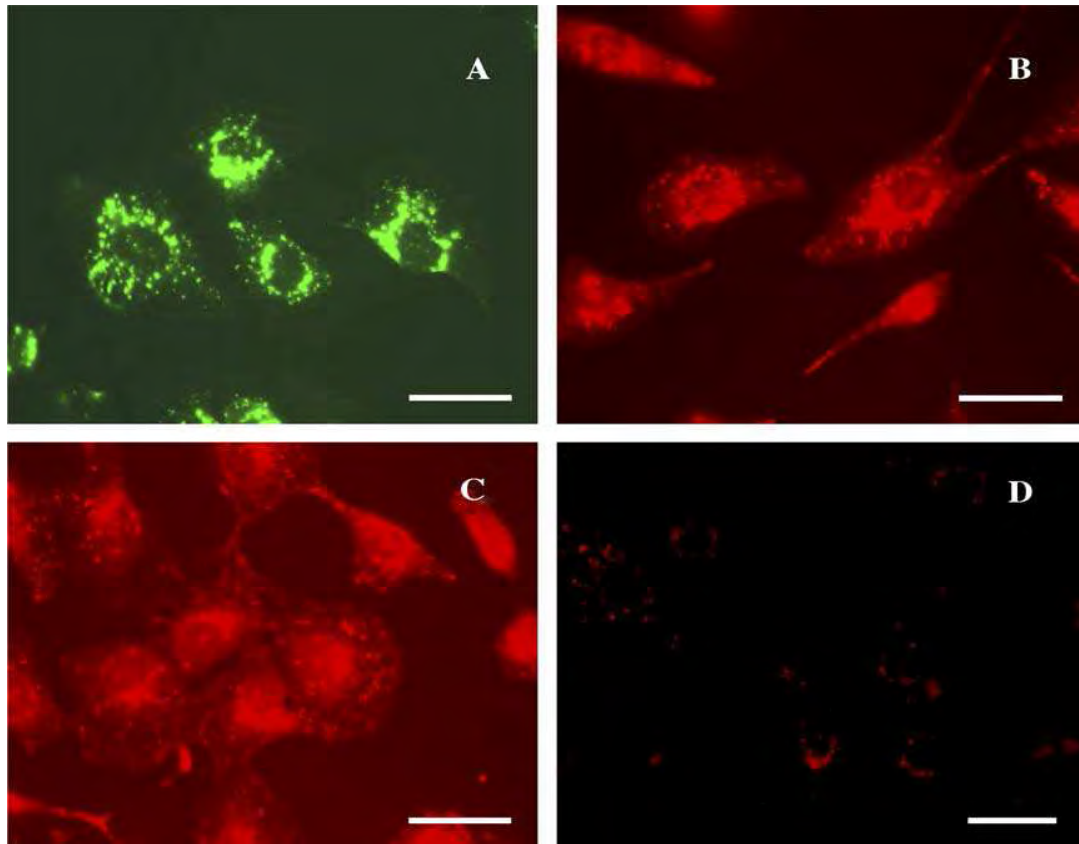


Figura 56: Actividad de la catepsina B en células. A) Localización inmunocitoquímica de la catepsina B; B) Actividad de la catepsina B; C) Células preincubadas 10 min. con 0.1  $\mu$ M de cistatina; D) Células preincubadas 10 min. con 50  $\mu$ g/ml de nanopartículas con cistatina. Las barras representan una escala de 20  $\mu$ m (Cegnar *et al*, 2004).

#### 4.1.10 NANOPARTÍCULAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO

Los oligonucleótidos antisentido son fragmentos sintéticos de ADN con sus secuencias de bases complementarias al ARNm, por lo tanto pueden modular la expresión de genes individuales.

Los oligonucleótidos tienen muy poca estabilidad en fluidos biológicos y no pasan muy fácilmente a través de las células. La preparación de las nanopartículas con los oligonucleótidos presenta un problema porque estos últimos no tienen afinidad por los polímeros PACA y el ácido poliláctico. Para resolver esto se está utilizando un tensoactivo catiónico como el bromuro de cetiltrimetilamonio adsorbido en la superficie de la nanopartícula. Este tipo de nanopartículas han dado buenos resultados en contra del tumor Ha-ras en ratones (Lambert *et al*, 2001).

El sarcoma de Ewing es un tipo de tumor originado en la medula ósea, se caracteriza por dolor, fiebre y leucocitosis. El uso de nanocápsulas de PACA con núcleo acuoso cargadas con el oligonucleótido antisentido se han estado utilizando para el tratamiento de este tipo de cáncer. En un estudio realizado se encontró una reducción en el tamaño del tumor (Lambert *et al*, 2000).

Tabla 4: Efectividad de los oligonucleótidos antisentido. ASs: oligonucleótido antisentido de fosfodiéster fosforotionato, CTs: control del oligonucleótido anterior, ASp: oligonucleótido antisentido de fosfodiéster completo, Ctp: control del oligonucleótido anterior (Lambert *et al*, 2000).

TRANSPORTADOR	OLIGO	DOSIS DEL OLIGO (mg/kg)	VOLUMEN DEL TUMOR	% INHIBICIÓN
NANOESFERA	ASs	5	0,18	82
NANOESFERA	CTs	5	0,96	4
NINGUNO	ASs	5	0,9	10
NANOCÁPSULA	ASp	4	0,34	66
NANOCÁPSULA	Ctp	4	0,97	3
NINGUNO	ASp	4	0,77	23
NINGUNO	Ctp	4	0,81	19

## 4.2 TRATAMIENTO INFECCIONES INTRACELULARES CON NANOPARTÍCULAS

### 4.2.1 NANOPARTÍCULAS DE AMPICILINA

Las enfermedades intracelulares constituyen un campo de interés debido a que presentan un problema porque las células infectadas pueden llegar a constituir un reservorio para alguna clase de microorganismos, los cuales son protegidos de la acción de los antibióticos dentro de los lisosomas. El pH ácido de los lisosomas reduce la actividad antimicrobiana de los fármacos, por lo tanto aumentando la resistencia a la quimioterapia (Fattal *et al*, 2002).

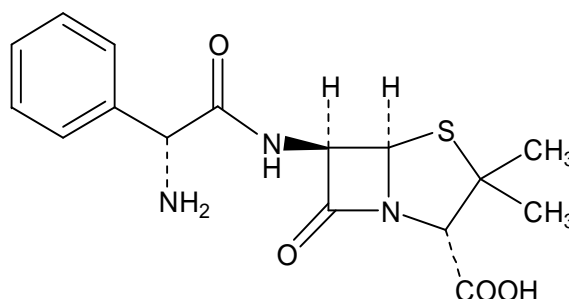


Figura 57: Molécula de ampicilina.

La ampicilina es un fármaco betalactámico derivado de la penicilina, es efectiva contra la bacteria *Listeria monocytogenes* (Fig. 57). La utilización de nanoesferas de PIHCA cargadas con ampicilina se aplicaron en ratones infectados con esta bacteria produciéndoles daño



en el hígado y en el bazo. Se encontró que la actividad terapéutica de la ampicilina en las nanoesferas fue mayor que en su forma libre. Los conteos bacteriales se redujeron hasta 20 veces menos en comparación con los ratones no tratados (Fattal *et al*, 2002).

En la salmonelosis también se han estado utilizando las nanoesferas con ampicilina. Se utilizó un modelo experimental con ratones infectados con la bacteria, todos los ratones a los cuales se les aplicó una sola inyección de nanoesferas con ampicilina sobrevivieron, por otro lado a los ratones control y a los tratados con ampicilina en forma libre no sobrevivieron (Fattal *et al*, 2002).

### **4.3 TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES**

#### **NEURODEGENERATIVAS CON NANOPARTÍCULAS**

Las terapias para las enfermedades del sistema nervioso central se ven limitadas por la barrera hematoencefálica, la cual no permite el paso de cualquier sustancia hacia el cerebro.

**La Barrera hematoencefálica:** sirve como mecanismo de defensa del cerebro contra toxinas y patógenos, se puede considerar que la barrera es más de tipo anatómico que fisiológico, y esta se encuentra en los vasos capilares sanguíneos cerebrales, las células de este tipo de tejido se encuentran unidas más estrechamente que las de los tejidos normales (Fig. 58). Como consecuencia de esto las moléculas de peso molecular superior a 2000 Daltons son excluidas, así como

moléculas hidrofílicas que de igual manera no pasan (Pasantes *et al*, 1991).

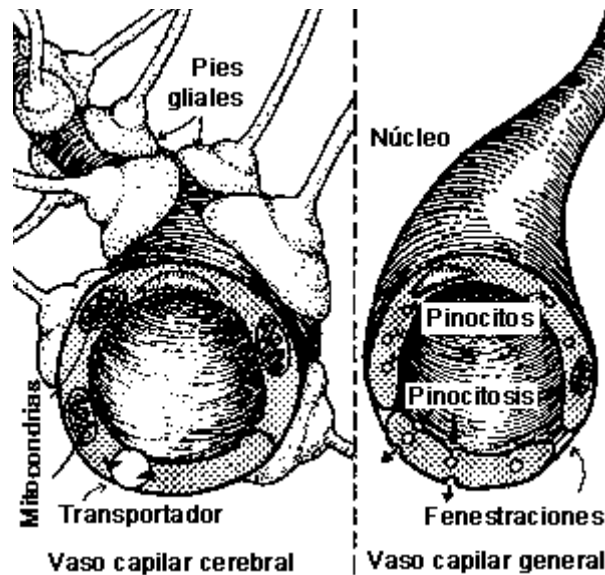


Figura 58: La barrera hematoencefálica se encuentra en los vasos capilares cerebrales. Los vasos capilares normales presentan aberturas (fenestraciones), mientras que los cerebrales no las muestran. Otra característica de los vasos capilares cerebrales es que contienen más mitocondrias para proveer energía adicional para los mecanismos de transporte activo (omega.edu.ilce.mx.3000).

### Mecanismos Por Los Cuales Las Nanopartículas Penetran La Barrera Hematoencefálica

a) A través de un gradiente de concentración, por medio del cual las nanopartículas se difunden hacia los vasos capilares, pasándolos y liberándose el fármaco dentro del cerebro (Fig. 59) (Roney *et al*, 2005).

b) Por un efecto detergente de los tensoactivos utilizados en la elaboración de las nanopartículas, esto causa que las membranas de

las células endoteliales tengan un aumento en su permeabilidad hacia el paso de las nanopartículas (Fig. 59) (Roney *et al*, 2005).

c) Las nanopartículas por si mismas pueden tener la capacidad de permear las uniones estrechas de la barrera hematoencefálica (Fig. 59) (Roney *et al*, 2005).

d) Las nanopartículas pueden ser endocitosadas por las células endoteliales, seguido por la liberación de su contenido dentro de las mismas células y posteriormente su paso hacia el cerebro. Este tipo de mecanismo es el más probable que ocurra y es de los más estudiados (Fig. 59). Este mecanismo se debe a que las NP adsorben a las Apolipoproteínas E (Apo E) sobre la superficie de su recubrimiento con el polisorbato 20, 40, 60 y 80.

Apo E participan en el transporte de lípidos esenciales al cerebro por lo que hay un receptor específico para esta proteína llamado LDL. Entonces probablemente el polisorbato unido utiliza este receptor para penetrar las células endoteliales (Kreuter, 2001).

e) El polisorbato 80 utilizado como agente de recubrimiento, puede disminuir el reflujo, especialmente el causado por la glicoproteína-P. Como ya se ha mencionado en las aplicaciones para el tratamiento del cáncer el polisorbato 80 es un inhibidor de la glicoproteína-P, la cual es la causante de la resistencia a los fármacos (Fig. 59) (Kreuter, 2001).

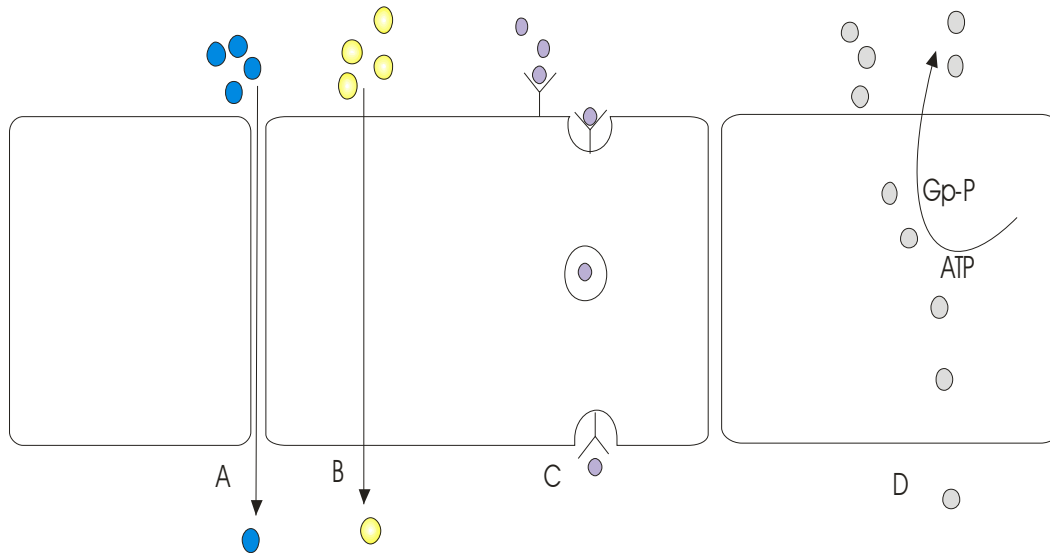


Figura 59: Los distintos mecanismos por los que atraviesan la barrera hematoencefálica las nanopartículas: A) Paso debido a un gradiente de concentración o a la naturaleza misma de las nanopartículas, B) El efecto detergente ocasionado por los tensoactivos que tienen las NP permite su difusión, C) Endocitosis de las NP mediante un receptor, D) El polisorbato 80 bloquea a la glicoproteína-P (Gp-P) y por lo tanto ayuda a que las NP no sean bombeadas hacia afuera de la célula.

### 4.3.1 ALZHEIMER

Es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a personas de la tercera edad principalmente. Hay una pérdida progresiva de la función cognitiva, de la memoria, se presenta un tipo de demencia. Este mal es el resultado de la deposición de placas amiloides entre las uniones sinápticas de las neuronas de la corteza. El término amiloide se debe a unas proteínas llamadas  $\beta$ -amiloides que el organismo produce de manera normal. En un organismo sano estas proteínas son fragmentadas y eliminadas. Sin embargo, debido a un defecto en los genes, esta proteína no es degradada y se va acumulando en forma de placas (Fig. 60).

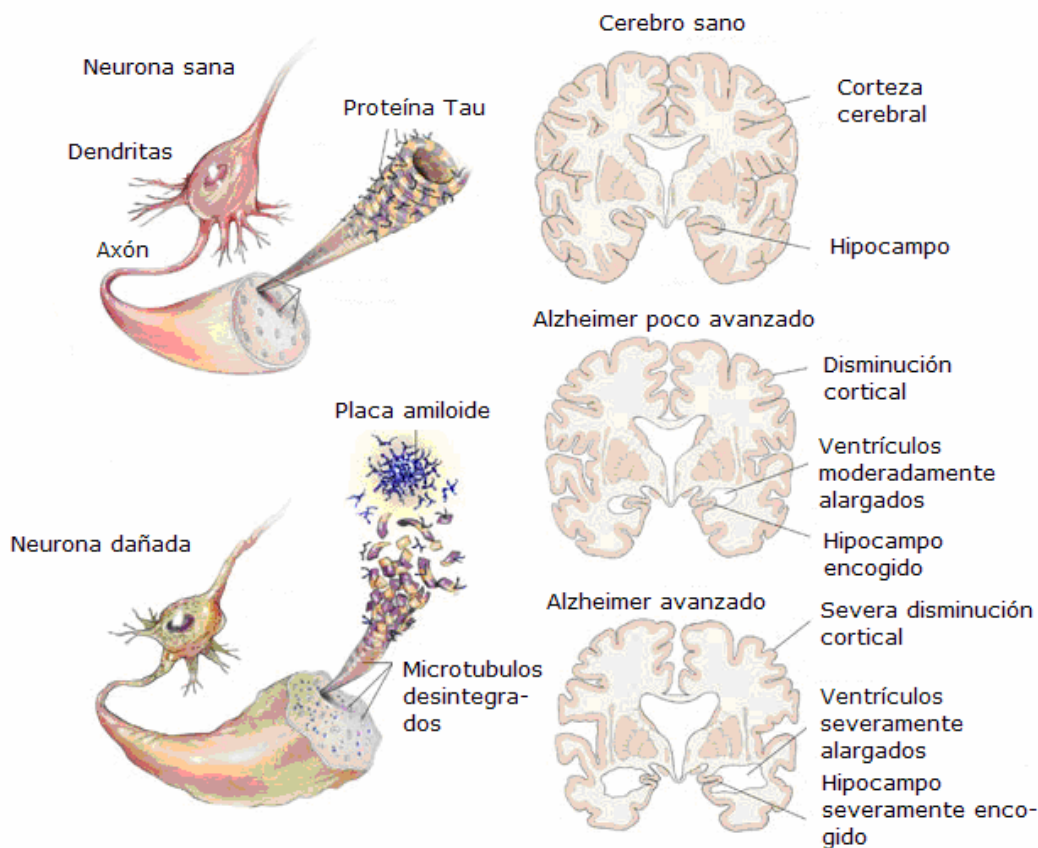


Figura 60: La acumulación de la placa amiloide provoca daño en las neuronas, como consecuencia las áreas de la corteza se van degenerando lo que provoca los síntomas del Alzheimer (www.ahaf.org).

Un derivado de la quinolina, la cual se utiliza para tratar la malaria, el clioquinol es buen agente quelante del Cu/Zn, tiene la propiedad de solubilizar in vitro las placas A $\beta$  y también inhibe la acumulación del péptido A $\beta$  in vivo, en ratones transgénicos.

Recientemente se han estado preparando nanocápsulas de N-butilcianoacrilato con clioniquinol. Estas nanocápsulas tienen una mayor facilidad de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que pueden ofrecer un nuevo tipo de tratamiento contra el Alzheimer (Roney *et al*, 2005).

### 4.3.2 PRINCIPALES FÁRMACOS UTILIZADOS PARA EL PASO DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

Tabla 5: Algunos fármacos utilizados para cruzar la barrera hematoencefálica.

FÁRMACO	TIPO NANOPARTÍCULA	EFEECTO TERAPEUTICO	REFERENCIA
Dalargin	PBCA	antinociceptivo	Kreuter, 2001
Loperamida	PBCA	antinociceptivo	Kreuter, 2001
Tubocurarina	PBCA	Bloqueador muscular	Kreuter, 2001
Doxorubicina	PBCA	anticancerígeno	Kreuter, 2001
MRZ-2/578	PBCA	antiepiléptico	Kreuter, 2001
Paclitaxel	Cetil-alcohol/polisorbato	antitumoral	Koziara, 2004

### 4.4 TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

La administración de fármacos por la vía pulmonar ofrece la ventaja de poder administrar los agentes terapéuticos al sitio de acción para alguna afección local. Los pulmones ofrecen una gran área de absorción, además se evita el efecto del primer paso por el hígado, hay una rápida absorción del fármaco y por lo tanto una concentración plasmática alta (Fig. 61).



Figura 61: Esquema de la vía pulmonar (healthlibrary.epnet.com).

#### 4.4.1 TUBERCULOSIS

Es una enfermedad causada por el microorganismo *Mycobacterium tuberculosis*. Los principales síntomas son: sudores nocturnos, hemorragia pulmonar, expectoración purulenta y disnea.

La utilización de los agentes terapéuticos como rifampicina, isoniazida y pirazinamida encapsulados dentro de nanopartículas hechas de PLGA por medio de la vía oral, ha logrado tiempos largos de permanencia en ratones. El aumento del tiempo en las concentraciones plasmáticas permite que la frecuencia en la administración de los medicamentos sea menor y consecuentemente una mayor complacencia por parte de las personas enfermas (Pison *et al*, 2006).

Se realizó otro estudio con los mismos fármacos y el mismo tipo de nanopartícula solo que ahora la vía de administración fue la pulmonar. Se infectaron cerdos de pigna con tuberculosis. Una sola dosis de esta formulación dio concentraciones plasmáticas por 6-8 días y una concentración en los pulmones superior a los 11 días. La utilización de 5 dosis durante 10 días por vía pulmonar, produjo la ausencia de los microorganismos patógenos en los pulmones, por otra parte la aplicación de 46 dosis diarias por la vía oral dio como resultado los mismos efectos del estudio anterior (Pison *et al*, 2006).

#### **4.4.2 LIBERACIÓN AEROSOLICA EN PULMONES DE LAS NANOPARTÍCULAS**

La vía pulmonar permite la liberación local de los agentes terapéuticos para las siguientes patologías: fibrosis quística, asma, cáncer de pulmón, infecciones pulmonares. Por medio de esta vía de administración se reducen los efectos secundarios, por lo que se puede aumentar la dosis del fármaco utilizado para lograr un mayor efecto terapéutico.

En el diseño de las nanopartículas se debe tener presente que el tamaño es un factor importante, ya que existe el diámetro aerodinámico de masa media, se ha estimado que este debe ser de aproximadamente de 1-5  $\mu\text{m}$  para que las partículas se depositen en la región alveolar, la cual es la zona de máxima absorción en los



pulmones. Las nanopartículas por su tamaño permiten que sean perfectamente nebulizadas y alcancen la región alveolar (Dailey *et al*, 2003).

Los polímeros para elaborar nanopartículas que han dado buenos resultados son: lactosa, gelatina, ácido poliláctico, PBCA. Otro problema a superar por las nanopartículas es que en ocasiones por su tamaño, se encuentran en el límite del diámetro aerodinámico de masa media, de esta manera se encuentran en la región de transición en donde no se depositan, no hay difusión de las mismas y no hay sedimentación. Para resolver el problema se ha propuesto incorporar a la NP dentro de micropartículas, estas se pueden ajustar al tamaño deseado y una vez que se depositan en el lugar deseado pueden liberar a las NP (Fig. 62) (J.O.-Sham, 2004).

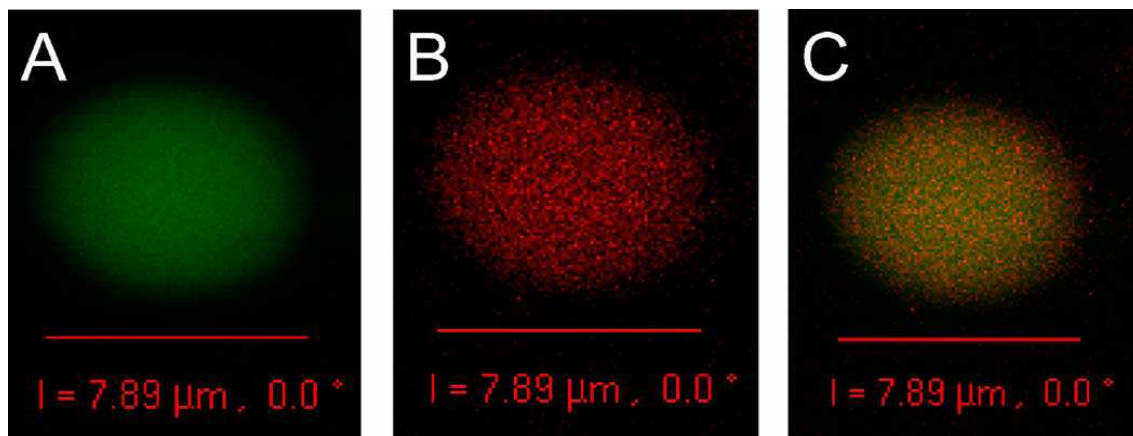


Figura 62: A) micropartícula transportadora, B) nanopartículas en el interior de la micropartícula, C) las imágenes A y B superpuestas (J.O.-Sham, H., 2004).

## 4.5 UTILIZACIÓN DE LA VÍA NASAL PARA LA ADMINISTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

La vía nasal también ofrece una buena alternativa para la administración de fármacos por medio de las nanopartículas. Las mucosas nasales ofrecen una forma alterna de cruzar la barrera hematoencefálica, ya que se ha probado en los animales y humanos la existencia de tal conexión (Illum L., 2004,).

**Fisiología de la nariz humana:** la superficie total de la nariz humana es de aproximadamente 150 cm<sup>2</sup> en los hombres y de un poco menos en las mujeres. La cavidad nasal está dividida en dos partes por el tabique nasal, y de manera general la nariz se divide en tres partes: el vestíbulo nasal, la región respiratoria y la región olfatoria (Fig. 63).

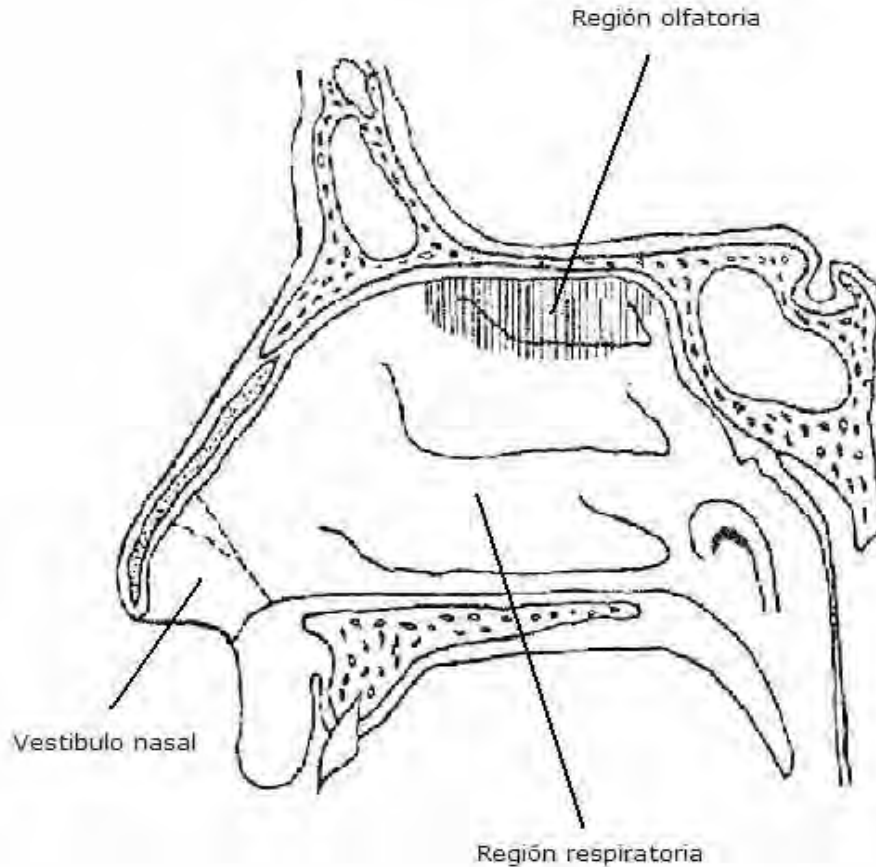


Figura 63: Esquema de la nariz humana (Illum, 2004).

El vestíbulo nasal tiene un área de  $0.6 \text{ cm}^2$ , está cubierto con un tejido epitelial escamoso estratificado. La región olfatoria está ubicada en la parte alta de la nariz, el área que ocupa es de  $4 \text{ cm}^2$ , lo que equivale al 3-5% del área total de la cavidad nasal. La región respiratoria está cubierta con tejido epitelial escamoso, el cual va cambiando gradualmente en tejido columnar pseudoestratificado; esto le confiere, debido a su gran área, una gran capacidad de absorción de fármacos (lipofílicos) (Illum L., 2004)

Los mecanismos mediante los cuales se transportan los fármacos desde las vías nasales hasta el cerebro son dos principalmente:

a) La absorción del fármaco lipofílico a través del tejido de la zona olfatoria y su transporte a lo largo del axon de las neuronas y su posterior liberación en el cerebro. Este tipo de transporte es muy lento (Illum L., 2004).

b) La absorción del fármaco por parte de las células epiteliales olfatorias y posteriormente la captación por el sistema nervioso central o el fluido cerebroespinal. De esta manera se alcanza el cerebro de manera más rápida (Illum L., 2004).

#### **4.5.1 NANOPARTÍCULAS DE POLIETILENGLICOL-ÁCIDO POLILÁCTICO CONJUGADAS CON LECTINA PARA SU ADMINISTRACIÓN INTRANASAL**

El medio que rodea a las mucosas nasales es demasiado hostil para algunos tipos de fármacos, especialmente a los de tipo biotecnológico, tales como péptidos, proteínas y ADN. Por lo tanto, la protección de este tipo de moléculas se logra poniéndolas dentro de nanopartículas, y además por lo anteriormente explicado se logra una mayor absorción de estas a través de las mucosas nasales.

Las nanopartículas de PEG-APL previenen la agregación de estas en la superficie de las mucosas nasales y a consecuencia de esto aumenta su absorción, sin embargo las cadenas de PEG inhiben la interacción con las células epiteliales, de esta manera se tiene una bioadhesión pobre. Para superar las anteriores desventajas se propone la utilización de ligandos como las lectinas, las cuales son proteínas o

glicoproteínas de origen no inmunológico que reconocen a las moléculas de azúcar por lo que se pueden unir a los componentes glicosilados de las membranas (mucoadhesión).

La efectividad de este tipo de nanopartículas se evaluó en ratas. Se hicieron dos grupos, a un grupo se le administraron NP de PEG-APL y al otro grupo las mismas NP solo que a estas se les recubrió con lectinas. Los resultados obtenidos son bastante prometedores, la concentración plasmática fue más del doble en las NP con lectina respecto de las que no tenían el recubrimiento, también se cuantificó la presencia de NP en cerebro, lo que nos da como consecuencia que hay una penetración de la barrera hematoencefálica por parte de las NP, pero además, también hay paso directo hasta el cerebro de las NP a través de las mucosas nasales (Gao X., 2006).

#### **4.5.2 NANOPARTÍCULAS RECUBIERTAS CON QUITOSÁN PARA MEJORAR LA MUCOADHESIÓN**

El quitosán es un polisacárido derivado de la quitina, la cual a su vez es un polisacárido proteico e insoluble, que constituye el exoesqueleto de crustáceos (langostas, camarón, cangrejos).

La quitina es de estructura muy similar a la celulosa, es un polímero de unidades de glucosa (Fig. 64). La diferencia entre los dos polímeros es que el grupo hidroxilo en la posición C-2 de la celulosa es reemplazado en la quitina por un grupo acetomido-(-NHCOCH<sub>3</sub>) (García E., 1998).

La quitina es desatilada y convertida en quitosán, mediante una hidrólisis con NaOH o KOH a temperaturas elevadas, siendo este un polímero modificado en sus grupos funcionales (los grupos acetomido son hidrolizados y se liberan los grupos amino) lo cual lo hace hidrosoluble, biodegradable, biocompatible y de baja toxicidad. La naturaleza polieléctrica del quitosán lo hace que se una con la superficie de la mucosa cargada negativamente (Cui F., 2006).

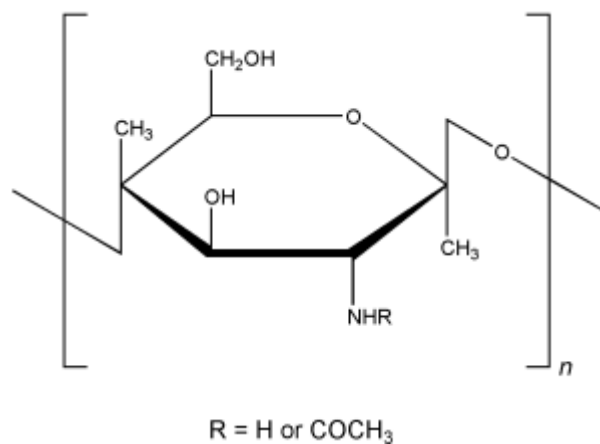


Figura 64: Molécula de quitosán.

#### 4.6 ADMINISTRACIÓN ORAL DE NANOPARTÍCULAS

La vía oral para la administración de nanopartículas presenta una serie de ventajas, a causa de su naturaleza no invasiva se evita el dolor, por ejemplo, que en otras vías de administración por periodos prolongados causa desagrado y el no seguimiento de los tratamientos por parte de los pacientes de manera continua.

Principalmente los estudios se han enfocado a la liberación de proteínas y péptidos dentro de nanopartículas, esto se debe a que

estas biomoléculas se degradan fácilmente en el estómago e intestinos, lo que provoca una baja o nula biodisponibilidad con fines terapéuticos (Rieux *et al*, 2006).

#### **4.6.1 DESCRIPCIÓN BÁSICA DEL INTESTINO DELGADO**

El intestino delgado está dividido en tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon. Básicamente la absorción de alimentos y sustancias útiles se efectúa en el yeyuno e íleon. A su vez dentro de estos tejidos se encuentran principalmente los enterocitos y las células caliciformes.

La función de los enterocitos es controlar el paso de macromoléculas y patógenos, además de permitir la absorción de nutrientes (Fig. 65). Las células caliciformes secretan la mucina (fluido viscoso compuesto principalmente de proteínas altamente glucosiladas), la cual recubre y protege el epitelio intestinal.

También dispersos a través de la mucosa intestinal se encuentran los nódulos linfáticos solitarios, y en el íleon se encuentran los nódulos linfáticos agregados (placas de Peyer). Las células M se encuentran localizadas principalmente en la placas de Peyer, estas células liberan material extraño (antígenos) para inducir la respuesta inmune.

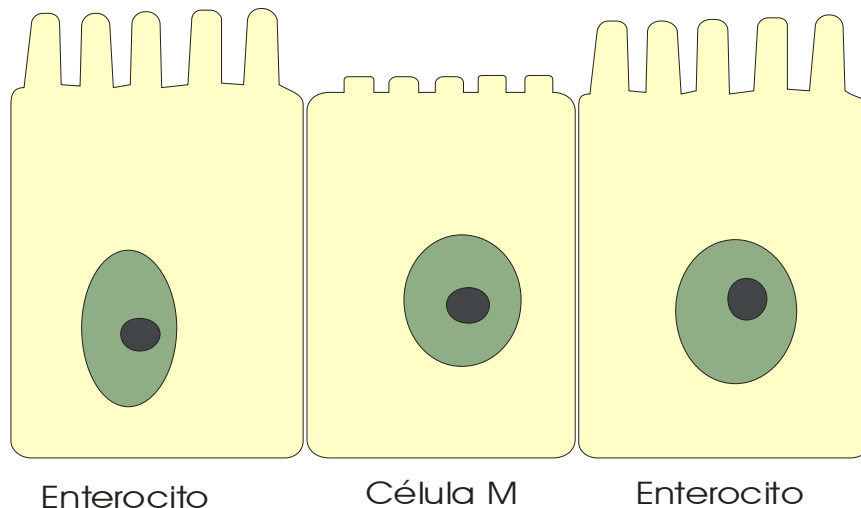


Figura 65: se presentan a los enterocitos con sus vellosidades que favorecen la absorción de nutrientes. Por su parte las células M son blanco para las NP.

#### **4.6.1.2 MECANISMOS POR MEDIO DE LOS CUALES LAS NANOPARTÍCULAS ATRAVIESAN LA MUCOSA INTESTINAL**

Las macromoléculas, tales como péptidos, proteínas y nanopartículas, cruzan los epitelios intestinales generalmente a través de dos vías:

- a) Ruta paracelular: se presenta mediante el paso de las nanopartículas entre el espacio de célula a célula (espacio intercelular).
- b) Ruta transcelular: esta es a través de un mecanismo de transporte conocido como transcitosis. En las células endoteliales existen vesículas, las cuales transportan, en su caso a las nanopartículas, desde el exterior de los capilares mediante una endocitosis seguida por exocitosis en el lado intersticial de las células (Ganong, 2002).



#### 4.6.1.3 TRANSPORTE PARACELULAR DE LAS NANOPARTÍCULAS

La ruta paracelular tiene algunas desventajas debido al pequeño espacio entre las células que es entre 3 a 10 Å, lo que dificulta el transporte de las NP (Fig. 66). Sin embargo, esto se puede superar mediante el uso de tensoactivos, mediante lo cual se aumentan las propiedades de absorción de fármacos, desafortunadamente esto llega a dañar a las mucosas del epitelio intestinal.

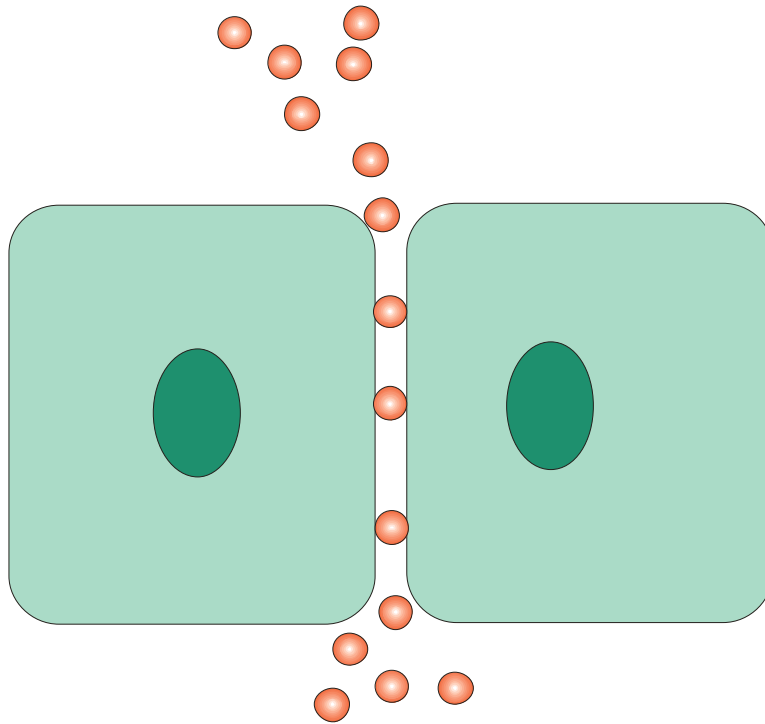


Figura 66: Transporte paracelular de nanopartículas.

El quitosán, almidón y polímeros tiolados, todos ellos hidrosolubles, han resultado exitosos en el transporte paracelular.

Los ácidos poliacrílicos y el quitosán en solución pueden aumentar este tipo de transporte, esto es a través de interacciones entre las membranas celulares cargadas negativamente y las cargas positivas

de los polímeros, o por la complejación de  $\text{Ca}^{2+}$  que se encuentra en la estructura de los espacios intercelulares. Lo importante en estos resultados es que el quitosán forma uniones reversibles sobre las células Caco-2, disminuyendo de esta manera daños celulares (Rieux, *et al*, 2006).

#### 4.6.1.4 TRANSPORTE TRANSCELULAR DE LAS NANOPARTÍCULAS

Como se ha explicado los principales tipos de células blanco para el transporte de las nanopartículas son las células M y los enterocitos. Por su parte los enterocitos se ven involucrados en el transporte por transcitosis, aunque la cantidad de nanopartículas transportadas es generalmente baja (Fig. 67). Las placas de Peyer, que se encuentran junto a las células M, son mejores para el acarreamiento de las NP (Rieux *et al*, 2006).

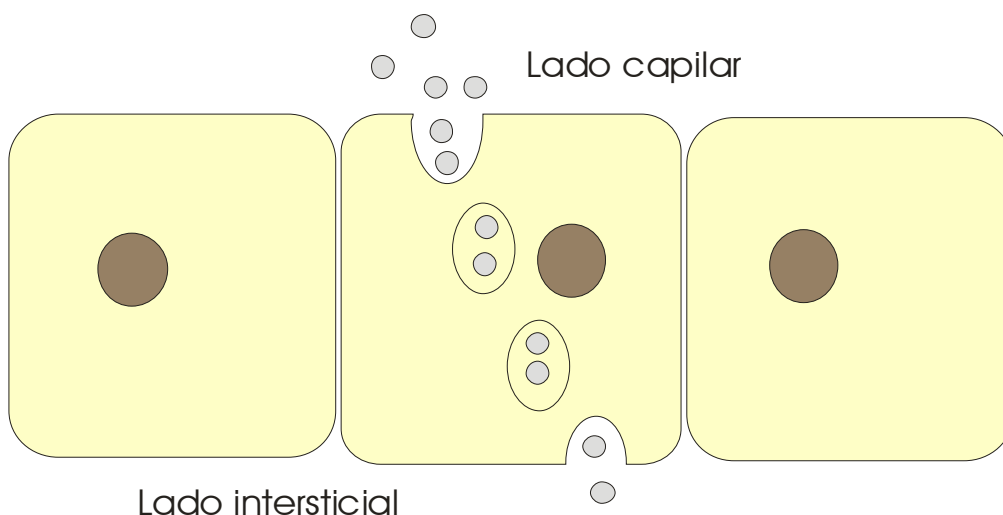


Figura 67: Proceso de transcitosis en el transporte de nanopartículas.

Los factores que influyen en el transporte transcelular son:

- a) Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, como: potencial zeta, hidrofobicidad y la presencia de un agente ligante en la superficie.
- b) La fisiología del tracto gastrointestinal.
- c) El tipo de modelo animal usado en los experimentos.

Se están desarrollando dos principales estrategias para optimizar la absorción de las nanopartículas por medio de la vía oral:

- 1) La adaptación de las propiedades del polímero para una mejor absorción de las NP por parte de las células M y los enterocitos.
- 2) La unión de ligandos específicos a las cadenas poliméricas de las NP para aumentar de manera selectiva los blancos en las células.

TABLA 6: Estrategias para optimizar la absorción por vía oral de las NP (Rieux *et al*, 2006).

<b>CÉLULA DIANA</b>	<b>PARÁMETRO</b>	<b>ESTRATEGIA PARA AUMENTAR EL TRANSPORTE</b>	<b>POLÍMERO/ MOLÉCULA</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
CÉLULAS EPITELIALES	Mucoadhesión	NP recubierta con polímero/ molécula mucoadhesivos	Ácido poliacrílico  Quitósán PVA	Aumento de la concentración de NP en el sitio de absorción.  NP de PVA son 2.9 veces mejor transportadas que las NP de poliestireno.
	Tamaño de la NP	Tamaño óptimo de la NP	Vit. E TGSP	NP/Vit. E TGSP 1.4 veces mejor comparadas con las NP de PVA. El tamaño óptimo es 100-200 nm. Las NP hidrófobas son mejor transportadas que la hidrofílicas.
	Hidrofobicidad/ hidrofiliidad	Mejorar el balance hidrófobo/hidrofílico de la superficie de la NP.  Recubrir la superficie de la NP con un polímero hidrofílico	PEG	Buena influencia sobre la biodisponibilidad Mejor estabilidad Facilitación en el transporte de NP Mayor afinidad de las NP por las células Caco-2.
	Cargas superficiales	Estabilizadas por el DMAB catiónico	DMAB	La captación de DMAB fue significativamente mayor que las NP de PVA cargadas negativamente.
	Temperatura			El transporte activo es inhibido a 4°C.

CÉLULA DIANA	PARÁMETRO	ESTRATEGIA PARA AUMENTAR EL TRANSPORTE	POLÍMERO/ MOLÉCULA	OBSERVACIONES
CÉLULAS M	Tamaño  Hidrofobicidad/ hidrofiliidad  Cargas superficiales	Tamaño óptimo de la NP  NP hidrofóbicas	PMMA, PHB PLA, PLGA	El tamaño óptimo es de 100-200 nm. Las NP hidrofóbicas mejor transportadas que las hidrofílicas. Las NP hidrofóbicas y cargadas negativamente son mejor transportadas.
CÉLULAS EPITELIALES (ESPECÍFICO)	Célula Diana	NP acopladas a lectina  NP-Glucomanan (polisacárido)	WGA  Glucomanan	Este tipo de NP aumento en mas de 12 veces su interacción con las células Caco-2, respecto del control (NP con PEG). El polisacárido utilizado ayuda a la estabilidad en el estomago y facilita la interacción con los receptores de manosa.
CÉLULAS M (ESPECÍFICO)	Célula Diana	NP acopladas a lectina  Anticuerpos	UEA-1  WGA  IgA	Hay una gran especificidad hacia las células Caco-2 de ratones. La captación por las células M es alta, aunque a menor nivel respecto del UEA-1. NP unidas a IgA muestran especificidad con las células M.

#### **4.6.2 ADMINISTRACIÓN DE VACUNAS Y PROTEÍNAS POR VÍA ORAL**

Las nanopartículas pueden aumentar la biodisponibilidad de péptidos, vacunas y proteínas, ya que las NP las protegen de los fluidos gastrointestinales. Por ejemplo para las personas con diabetes tipo I llega a ser bastante molesto la aplicación diaria de insulina por las vías subcutáneas e intramusculares, por lo que se ha venido realizando numerosos esfuerzos para encapsular a la insulina dentro de nanocápsulas.

Los estudios elaborados en la mayoría de los casos, se han realizado en animales, lo que trae como consecuencia que muchas veces no se puede extrapolar los resultados obtenidos a los seres humanos. En algunas ocasiones la biodisponibilidad es muy baja por lo que no se alcanzan las dosis terapéuticas o la precisión de la dosis es difícil de lograrla.

Entonces una buena alternativa para lo anteriormente explicado es la utilización de fármacos potentes que requieran de dosis terapéuticas pequeñas o de acción local. Por ejemplo se ha descubierto que los tejidos intestinales linfoides son reservorios del virus VIH-1, estos tejidos son excelentes blancos para las nanopartículas de poli(isohexilcianoacrilatos) cargadas con AZT (antiviral).

En lo que respecta a la aplicación de vacunas a través de la vía oral por medio de NP se logra evitar el dolor y riesgos de infección asociados con las inyecciones. La liberación de vacunas en las

mucosas intestinales induce respuestas inmunes sistémicas y mucosales.

Tabla 7: Administración oral de péptidos y proteínas encapsuladas en NP (Rieux et al, 2006).

Molécula	Polímero	Tamaño(nm)	Especie	Observaciones
Insulina	PIBCA	300	Rata	Disminución de la glucemia de 300 mg/dl a un nivel normal de 125 mg/dl.
Insulina	Quitósán	270-340	Rata	Dosis de insulina de 50U/kg y 100 U/kg fueron efectivas al reducir la hipoglucemia.
Insulina	Quitósán-glucomanan		Rata	Retraso de respuesta hipoglucémica 14 horas después de la administración.
Calcitonina	Quitósán recubiertas con PLGA	200-300	Rata	Reducción de los niveles de calcio en sangre, hasta después de 12 horas de la administración.
Calcitonina	PEG-Quitósán	160-250	Rata	Aumento en la absorción intestinal de la calcitonina de salmón
Ciclosporina A	Quitósán	100-150	Perro	1.8 veces más alta la biodisponibilidad comparadas con la microemulsión Neoral®
Ciclosporina A	Ácido poli(metacrílico y metacrilato) copolímeros Eudragit® E100	37-107	Rata	La biodisponibilidad se incremento en 32.5-13.6 % comparada con el Neoral.
Dalargin	PBCA/Tween 80 y PEG 20000	100	Ratón	Efecto analgésico mayor al recubrir las NP.
mEpo ADN	Quitósán	70-150	Ratón	Rápido aumento del hematocrito sostenido durante una semana.
AZT	PIBCA	250	Rata	Las nanoesferas se concentraron eficientemente en la placas de Peyer 4 veces más que la solución.

El desarrollo de vacunas por vía oral es una gran alternativa para su liberación por medio de NP ya que no se requieren grandes dosis para conseguir una estimulación del sistema inmune.

Tabla 8: Respuestas inmunes después de la administración oral de vacunas (Rieux *et al*, 2006).

Antígeno	Polímero	Tamaño (nm)	Especie	Observaciones
Toxoide del tétanos	PVAL-PLGA	100,500 1.5µm	Ratón	Se encontró en circulación anticuerpos contra la toxina y una respuesta inmunitaria en saliva, en los fluidos del intestino y alvéolos.
Subunidad de la toxina B del cólera	PLGA	420	Ratón	Hubo una inducción de anticuerpos contra la toxina del cólera.
BSA (50µg a 200 µg)	PLGA	1000	Ratón	Hay una dosis-respuesta con los anticuerpos IgG.
BSA	PLGA	200, 500,1000	Ratón	Mayores niveles sericos de IgG con NP de 1000nm.
Antígeno protector de <i>B. pertussis</i>	PLGA	200-600	Ratón	Tres dosis orales del antígeno confieren protección contra <i>B. pertussis</i> .
Lisatas de <i>Helicobacter pylori</i>	PLGA	320	Ratón	Hay una respuesta elevada de IgA mucosal contra <i>H. pylori</i> .
Código de ADN contra un alérgeno de cacahuete	Quitósán	200	Ratón	Hay producción de IgA, IgG2 sericos y reducción de reacciones anafilácticas.
Plasmido de ADN contra el alérgeno Der p1	Quitósán	500	Ratón	Producción de anticuerpos IgG2 e IgA en circulación.
Proteína de <i>Toxoplasma gondii</i> /ADN	Quitósán	400	Ratón	La respuesta inmunitaria es alta. Hay niveles altos de anticuerpos anti-GRA1.
Antígeno del rotavirus VP6 y ADN	PLGA	500	Ratón	Anticuerpos IgA en el intestino protegen contra el rotavirus.



## 4.7 ADMINISTRACIÓN OCULAR DE NANOPARTÍCULAS

La estructura anatómica del ojo humano presenta una serie de protecciones efectivas en contra de agentes extraños y en consecuencia también, en contra de la liberación de algunos tipos de fármacos de acción local.

### 4.7.1 ANATOMÍA DEL OJO HUMANO

El globo ocular es una estructura esférica con un diámetro aproximado de 2.5 cm. La parte exterior consiste de tres capas de tejido:

- Capa externa o esclerótica.- tiene una función protectora.
- Capa media o úvea.- a su vez consta de tres partes: la coroides muy vascularizada, cuerpo ciliar, y finalmente el iris.
- Capa interna o retina.- sensible a la luz.

La cornea es una membrana resistente, compuesta por cinco capas, a través de la cual la luz penetra al interior del ojo (Fig. 68) (Ludwig, 2005).

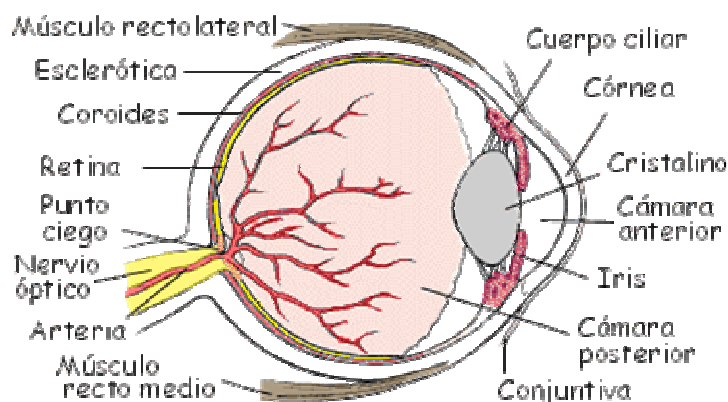


Figura 68: Esquema del ojo humano. ([http://www\\_siste\\_com\\_ar-images-Television-El\\_Ojo\\_Humano5\\_jpg.htm](http://www_siste_com_ar-images-Television-El_Ojo_Humano5_jpg.htm)).

#### 4.7.2 LIBERACIÓN DE FÁRMACOS POR MEDIO DE NANOPARTÍCULAS A TRAVÉS DE LA VÍA OCULAR

La utilización de nanopartículas para el tratamiento de enfermedades de los ojos es importante debido a una acción local, así se evitan los efectos secundarios.

Por otra parte hay una serie de barreras en los ojos que evitan que haya un buen efecto terapéutico cuando se aplican los fármacos en otro tipo de formas farmacéuticas. Solo del 1-3 % del fármaco penetra la cornea y alcanza los tejidos intraoculares (Fattal, 2002).

La utilización de agentes antiglaucomatosos tales como el betaxolol, carteol, y metipranolol dentro de nanocápsulas de poli-( $\epsilon$ -caprolactona) mostraron una reducción de la absorción no corneal, lo que reduce los efectos secundarios que se ocasionan con los fármacos en forma libre. El mecanismo de acción de las nanocápsulas de poli-( $\epsilon$ -caprolactona) es por medio de una endocitosis de la cornea, y además no hay afectación de las células. Las nanopartículas de PIBCA si ocasionaron daños celulares (lisis) (Fattal *et al*, 2002).

Otro polímero utilizado es el quitosán ya que debido a sus propiedades mucoadhesivas tiene una muy buena absorción a través de la cornea. La ciclosporina A, inmunosupresivo, se introdujo en nanocápsulas teniendo una concentración 5 veces mayor en la cornea comparada con una solución oleosa (Fattal *et al*, 2002).

## **4.8 DIAGNÓSTICO Y VISUALIZACIÓN MEDIANTE NANOPARTÍCULAS**

El diagnóstico temprano de enfermedades, por ejemplo el cáncer, es de vital importancia ya que se evitan complicaciones al grado de que sea difícil su tratamiento.

### **4.8.1 DIAGNÓSTICO *IN VITRO***

Las nanopartículas ayudan a proteger a los marcadores de la degradación y por lo tanto tenemos una menor dispersión del colorante y una mayor sensibilidad.

Ya se han elaborado nanoesferas de poliestireno fluorescentes (Fluospheres<sup>®</sup> (fluorescencia verde) y Transfluospheres<sup>®</sup> (fluorescencia roja)) estas se usaron para detectar el receptor del factor de crecimiento epidermal en células A431 (Fig. 69). Los resultados mostraron que las nanoesferas fueron hasta 25 veces más sensitivas que los marcadores solos de estreptavidina-fluoresceína (Brigger *et al*, 2002).

Otra de las técnicas que se han utilizado son nanocápsulas con marcadores inorgánicos, ya que estos últimos son muchos más estables a la luz respecto de los anteriormente comentados.

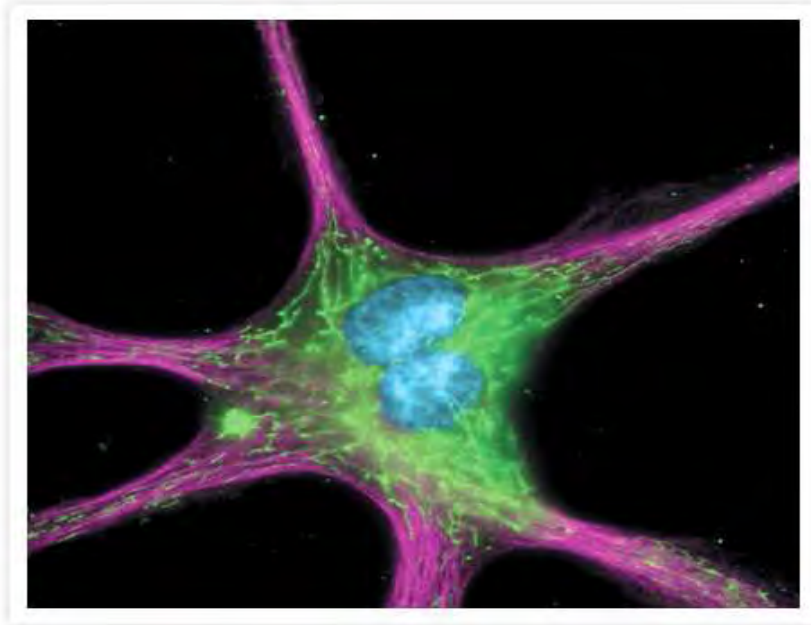


Figura 69: Imagen de las nanopartículas Fluospheres® dentro de una célula ([probes.invitrogen.com/handbook/print/0401.html](http://probes.invitrogen.com/handbook/print/0401.html)).

#### 4.8.2 DIAGNÓSTICO *IN VIVO*

En el diagnóstico *in vivo* de tumores cancerígenos los marcadores se utilizan con éxito para la detección de células malignas ya que las nanopartículas se pueden dirigir con éxito hacia este tipo de células.

#### 4.8.3 IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA

La utilización de nanopartículas superparamagnéticas se utilizan como agentes contrastantes para visualizar imágenes de resonancia magnética. Estas NP consisten de un núcleo de óxido de hierro, o algún otro derivado insoluble ferrito, los cuales pueden estar recubiertos con un polímero o no.

Hay comercialmente dos productos de este tipo: Lumirem® (nanopartículas de óxido de hierro recubiertas de silicón con un

tamaño de 300 nm) y Endorem<sup>®</sup> (nanopartículas de magnetita recubiertas con dextran con un tamaño de 150 nm). Estos productos se utilizan como agentes contrastantes para visualizar tumores.

Endorem<sup>®</sup> es captado preferentemente por las células de Kupffer por lo que de esta manera se pueden detectar enfermedades en este tipo de células (Brigger *et al*, 2002).

Lumirem<sup>®</sup> se utiliza para observar imágenes del tracto gastrointestinal y poder detectar alguna patología (Brigger *et al*, 2002).

## CAPÍTULO 5

### NANOPARTÍCULAS DE LA TERCERA GENERACIÓN

Paul Ehrlich fue uno de los primeros científicos en proponer el concepto de "bala mágica", y se refería a encontrar un fármaco que se uniera de manera específica contra una célula diana en estado patológico, para lograr un efecto terapéutico mayor. Una de las ventajas que se consiguen al alcanzar tal especificidad es el evitar los efectos secundarios. Sin embargo en la práctica es difícil encontrar una molécula que tenga las características antes explicadas, por lo tanto se espera que las nanopartículas de la tercera generación puedan ayudar para cumplir los objetivos de tener una selectividad hacia las células con daños (Fahmy *et al*, 2005).

Las características que se espera que tengan las nanopartículas de la tercera generación son:

- a) La nanopartícula como un núcleo en donde va ir el fármaco.
- b) Un recubrimiento con polímeros hidrofílicos para lograr un mayor tiempo de permanencia en el torrente sanguíneo.
- c) Un ligando que se una de manera específica contra la célula diana, y este puede ser un anticuerpo monoclonal, azúcares, péptidos, ácido fólico, etc. (Fig. 70) (Couvreur, 2005).

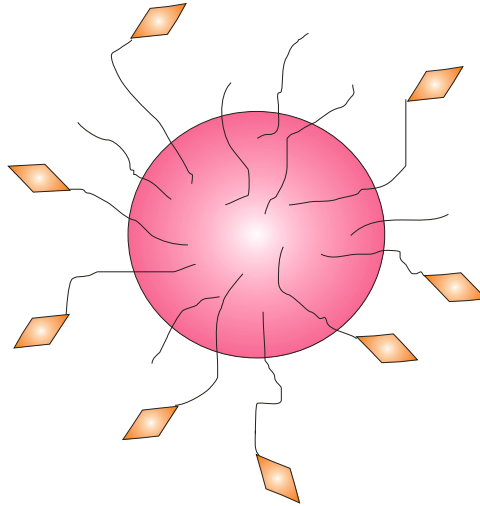


Figura 70: Nanopartícula de la tercera generación la cual se compone de un núcleo polimérico, cadenas de polietilenglicol, y de ligandos específicos.

### 5.1 NANOPARTÍCULAS CON ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los anticuerpos son proteínas del tipo inmunoglobulinas sintetizadas por las células (linfocitos B) del sistema inmune en respuesta a la entrada de una sustancia extraña al cuerpo (antígeno). Los anticuerpos se unen a los antígenos de manera específica.

Los anticuerpos son moléculas con una forma parecida a la letra "Y", tienen una forma básica simétrica compuesto por dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas unidas por puentes disulfuro (Cannon *et al*, 2007).

Las cadenas ligeras y pesadas tienen regiones variables aminoácidas en su parte superior (región Fab), esto es lo que les da la propiedad de reconocer a los antígenos y su alta especificidad (Fig. 71) (Abbas *et al*, 2004).

En la parte de abajo del anticuerpo se encuentra la región constante (región Fc), esta parte no cambia en su secuencia de aminoácidos y

bastante similar incluso entre varias especies de animales (Abbas *et al*, 2004).

Hay cinco clases conocidas de anticuerpos que son: IgA, IgG, IgD, IgE e IgM. El término Ig significa inmunoglobulina; las letras A, D, E, G y M se refieren a una clasificación según la variación de la región C de las cadenas pesadas. El anticuerpo IgG es el que se encuentra en mayor cantidad en el cuerpo, el IgM es el que se produce primero en los recién nacidos y el primero en aparecer en una infección, el IgE es asociado a las alergias, el IgA se encuentra en la leche materna y saliva (Enciclopedia Encarta, 2008).

Sitio de unión al antígeno

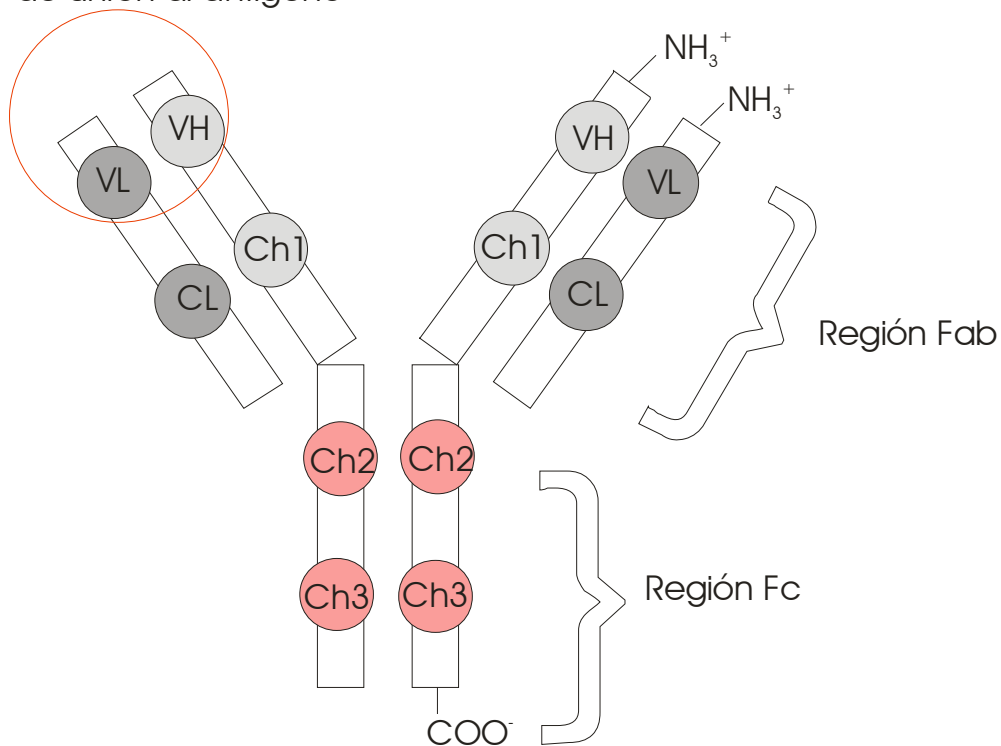


Figura 71: Esquema de anticuerpo.- La región Fab es la zona variable y el sitio de unión a los antígenos, donde  $V_H$  es la cadena pesada variable y  $V_L$  es la cadena ligera variable. La región Fc es la región constante, donde Ch son las cadenas carboxiterminales.



Los anticuerpos se pueden clasificar de manera general en:

**a) Anticuerpos policlonales:** cuando se inyecta un antígeno a un animal surge una respuesta inmune por lo que se producen anticuerpos; sin embargo, debido a que están involucrados varios tipos de linfocitos B, y como cada tipo de célula produce un tipo de anticuerpo diferente, entonces en el plasma sanguíneo no hay un solo tipo de anticuerpo, a esta mezcla de anticuerpos se les conoce como policlonal (Cannon *et al*, 2007).

**b) Anticuerpos monoclonales:** los descubridores de la técnica para desarrollar los anticuerpos monoclonales fueron: Georges Kohler y Cesar Milstein en 1975, esta se basa en el hecho de que los linfocitos B normales solo producen un solo tipo de anticuerpo; ahora bien, es necesario identificar a las células con la más alta especificidad, hacer a estas inmortales y seleccionarlas, de esta manera se obtienen los anticuerpos monoclonales (debido a que provienen de un solo clon o célula) (Roitt *et al*, 2003).

Para la preparación de los anticuerpos, a un ratón se le inyecta el antígeno de interés, una vez que se obtiene la respuesta inmune los linfocitos B del bazo del ratón son extraídos. Después estas células son fusionadas con células mutantes, para esto se usa una sustancia fusionadora, por ejemplo, polietilenglicol o una corriente eléctrica. A continuación se utiliza un medio de cultivo denominado HAT (contiene hipoxantina y timidina) donde solo pueden crecer los hibridomas.

Finalmente se seleccionan las células productoras del anticuerpo esperado (Fig. 72) (Roitt *et al*, 2003).

Los anticuerpos obtenidos directamente de los ratones se llaman murínicos y son altamente inmunogénicos en los seres humanos. Para evitar reacciones inmunológicas se han desarrollado los anticuerpos quiméricos y humanizados.

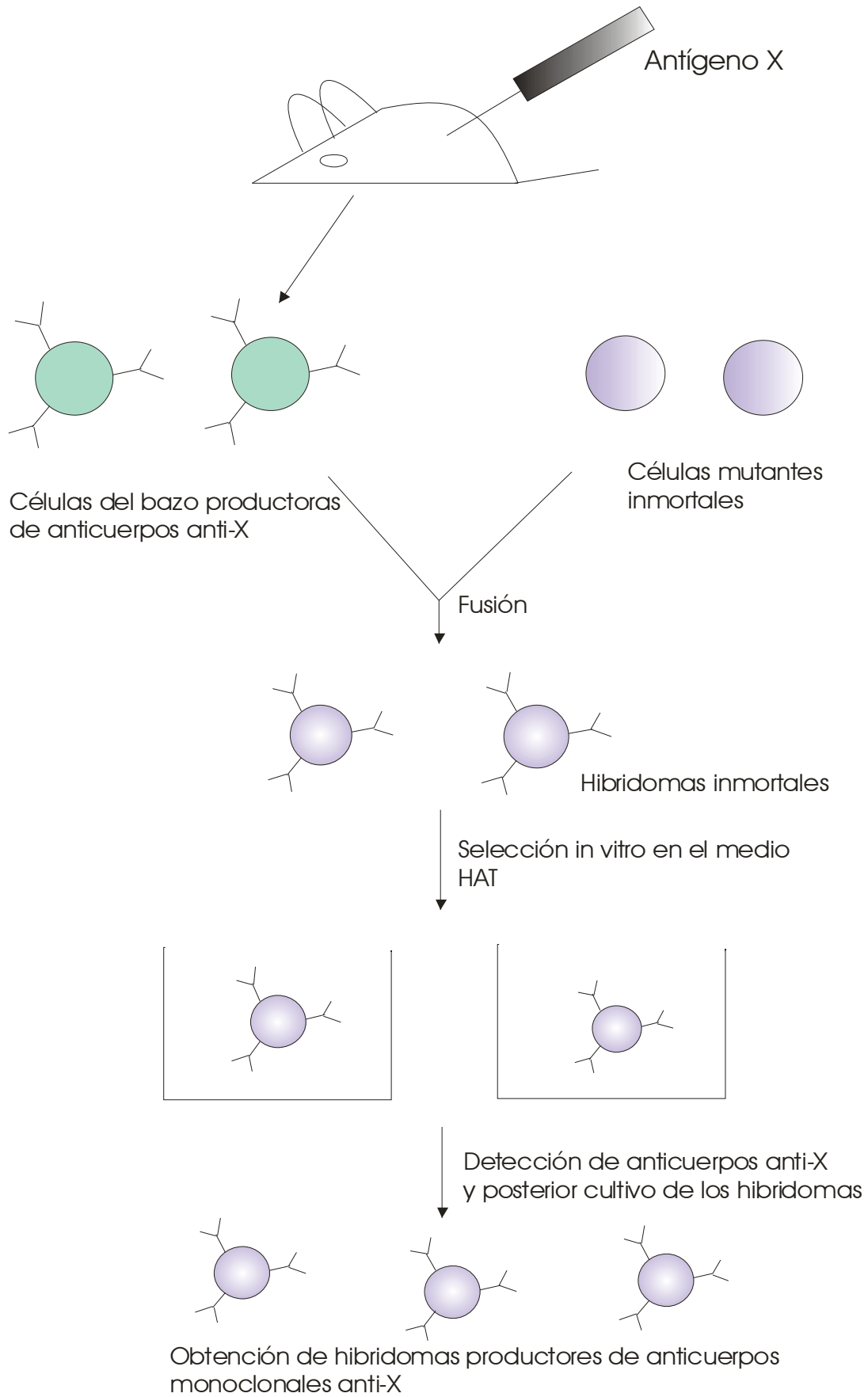


Figura 72: Diagrama de flujo de la obtención de anticuerpos monoclonales.

**c) Anticuerpos monoclonales quiméricos:** estos se caracterizan por tener la región Fc de un anticuerpo humano (IgG) y la región Fab son de ratón (Fig. 73). La unión de las dos regiones se logra mediante métodos químicos o con la ingeniería genética (Cannon *et al*, 2007).

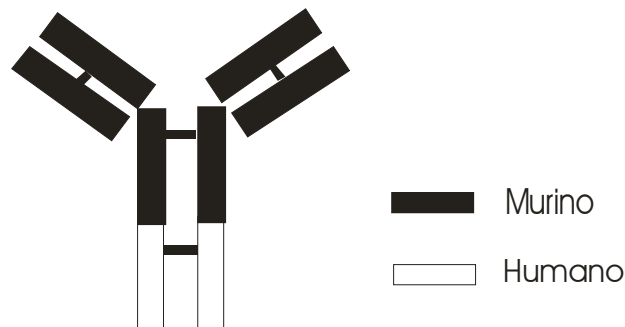


Figura 73: Anticuerpo quimérico, la región oscura es de ratón, la región transparente es de origen humano.

**d) Anticuerpos monoclonales humanizados:** con los avances en ingeniería genética se logran obtener únicamente las regiones CDR (las responsables de la unión de los antígenos) de origen murino, de esta manera el resto del anticuerpo es en su mayoría de origen humano, lo cual asegura una compatibilidad del 95 % con los anticuerpos humanos (Fig. 74) (Cannon *et al*, 2007).

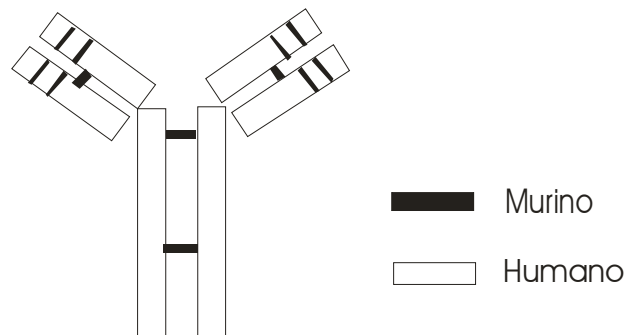


Figura 74: Anticuerpo humanizado, se observa que las regiones CDR son las únicas de origen murino (ratón), mientras que la mayor parte es de origen humano.

### 5.1.1 MÉTODOS DE ACOPLAMIENTO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES A LAS NANOPARTÍCULAS

Uno de los aspectos de importancia en el diseño de este tipo de nanopartículas es como se van a unir los anticuerpos monoclonales a estas. Una de las técnicas consiste en la unión covalente del anticuerpo a la NP, también la unión puede ser a través de un polímero hidrosoluble.

Los grupos funcionales más utilizados que deben tener los anticuerpos monoclonales son los grupos carboxilos y los grupos sulfhidrilo amino, esto es para favorecer el acoplamiento.

Sin embargo si al anticuerpo monoclonal y a las nanopartículas les falta el grupo funcional se les puede introducir por medio de reacciones específicas:

a) Para convertir un alcohol o un grupo amino a un grupo carboxilo se hace por medio del anhídrido succínico (Fig. 75) (Cannon *et al*, 2007).

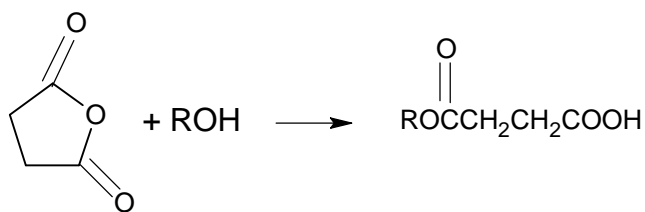


Figura 75: Reacción para convertir un alcohol a un grupo carboxilo.

b) El 2-iminotiolano convierte un grupo amino en uno sulfhidrilo (Fig. 76) (Cannon *et al*, 2007).

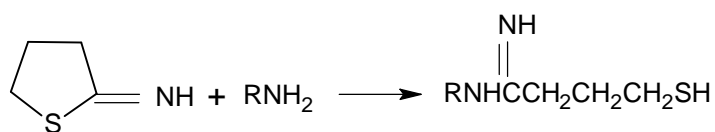


Figura 76: Reacción para convertir un grupo amino a sulfhidrilo.

c) Para la unión del anticuerpo a la nanopartícula se utiliza la carbodiimida diciclohexílica (DCC), esta acopla los grupos aminos con los carboxilos vía enlaces amidas (Fig. 77) (Cannon *et al*, 2007).

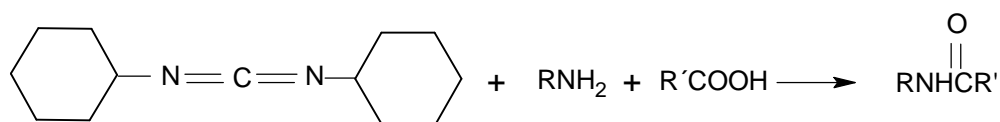


Figura 77: Reacción para la unión de anticuerpos a la nanopartícula.

d) Otra forma es a través de una esterificación de un fármaco o polímero, los grupos carboxilos de estos últimos son unidos a la succimida N-hidroxi (NHS) en la presencia de carbodiimida (DCC) para formar un éster activo el cual reacciona con un grupo amino de los anticuerpos (Fig. 78) (Cannon *et al*, 2007).

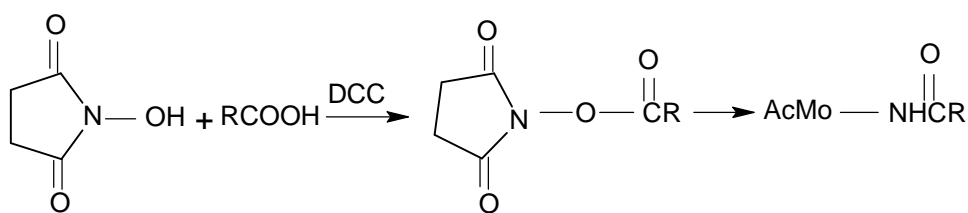


Figura 78: Reacción de esterificación para la unión de anticuerpos a la nanopartícula.

### **5.1.2 NANOPARTÍCULAS ACOPLADAS AL ANTICUERPO MONOCLONAL TRASTUZUMAB**

El anticuerpo monoclonal trastuzumab es del tipo IgG1 humanizado, y tiene su blanco en el receptor del factor de crecimiento epidermal 2 (HER2). El trastuzumab ha sido aprobado por la FDA con el nombre comercial de Herceptin<sup>®</sup>, se utiliza principalmente para el tratamiento del cáncer de mama en fase de metástasis. El mecanismo de acción es de manera de citostático, es decir deteniendo el crecimiento celular descontrolado, esto se logra bloqueando el receptor HER2 por medio del anticuerpo monoclonal (Steinhauser *et al*, 2006).

El receptor HER2 se encuentra en la superficie de las membranas celulares. Este se encuentra sobre expresado de 20-30 % en las células cancerígenas.

Las nanopartículas elaboradas con albúmina humana debido a su biodegradabilidad, no toxicidad y no antigenicidad se utilizan como acarreadores de fármacos. Por lo consiguiente se pueden utilizar para la unión de anticuerpos monoclonales en su superficie.

Para realizar el acoplamiento de los anticuerpos a las nanopartículas se procede primero a la tiolación del anticuerpo trastuzumab, esto se hace poniéndolo en incubación junto con el reactivo 2-iminotiolano dentro de un buffer de fosfatos a pH 8.0. Los grupos amino del anticuerpo reaccionan con el 2-iminotiolano, produciéndose así los grupos sulfhidrilo.

Las nanopartículas se prepararon con un polímero heterobifuncional a base de polietilenglicol (PEG), para esto las NP se colocan junto con el NHS-PEG5000-Mal en un búffer de fosfatos pH 8.0 y dejándose incubar por 1 hora a 20°C. Los grupos funcionales amino y carboxilos presentes en la superficie de la nanopartícula reaccionan con el NHS-PEG5000-Mal formando las cadenas largas de polietilenglicol con grupos reactivos maleinimidos en sus extremos.

La unión final se realiza juntando el trastuzumab tiolado y las nanopartículas activadas, se ponen en incubación por 12 horas a 20°C. Los grupos maleinimidos de las NP reaccionan covalentemente con el trastuzumab tiolado (Fig. 79).

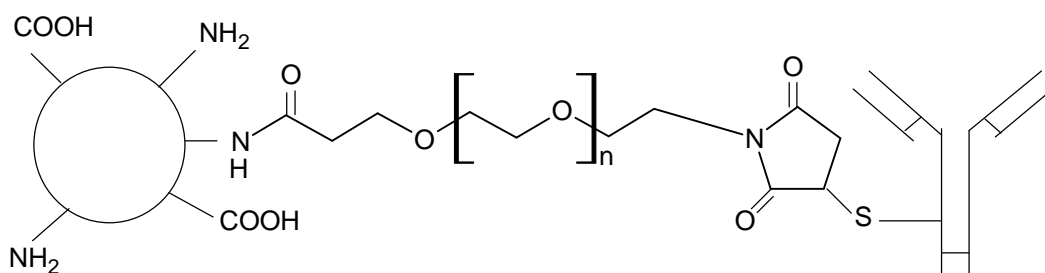


Figura 79: Nanopartícula con su modificación de superficie, donde en un extremo se encuentra el anticuerpo monoclonal trastuzumab.

Para medir la efectividad de estas nanopartículas se realizaron pruebas in vitro con células cancerígenas que tienen el receptor HER-2.

Se realizaron pruebas con dos tipos de nanopartículas: unas fueron elaboradas como se explicó anteriormente, y las otras únicamente con cadenas de polietilenglicol (PEG) en su superficie. Después de 30 minutos de incubación hubo un 64.23% de NPs con trastuzumab



unidas a las células, mientras que las NPs con polietilenglicol se unieron un 3.59%. A las 24 hrs. de incubación aumento la unión de las NPs con PEG un 39.62%, en tanto que las de trastuzumab disminuyeron a 51.22% (Steinhauser *et al*, 2006). De esta manera se muestra como las NP con anticuerpos monoclonales tienen una gran selectividad hacia las células blanco.

## 5.2 EL RECEPTOR FOLATO Y SU UTILIDAD COMO BLANCO PARA LAS NANOPARTÍCULAS DE LA TERCERA GENERACIÓN

El receptor folato es una proteína de membrana la cual muestra una gran afinidad hacia el ácido fólico. A su vez el ácido fólico es una vitamina esencial para los seres vivos ya que participa en la síntesis de los ácidos nucleicos (Fig. 80).

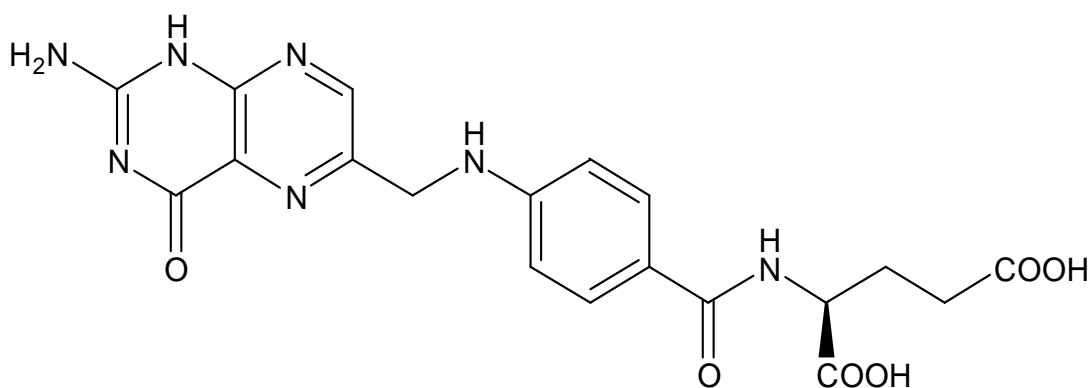


Figura 80: Molécula del ácido fólico, la cual actúa como coenzima para la formación de los ácidos nucleicos.

La gran ventaja de este receptor folato es que se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de células cancerígenas como: ovario, endometrio, colon, seno, pulmón, cerebro y riñón principalmente (Hilgenbrink *et al*, 2005).

Por lo tanto la unión del ácido fólico con nanopartículas, hace que estas últimas tengan una gran especificidad hacia los tumores cancerígenos. El mecanismo mediante el cual las NP llegan al interior de las células es a través de una endocitosis (Hilgenbrink *et al*, 2005).

### **5.2.1 NANOPARTÍCULAS DE ALBÚMINA ACOPLADAS CON ÁCIDO FÓLICO**

Una forma de aumentar la selectividad de las nanopartículas es añadiéndoles moléculas de ácido fólico, el cual tiene una gran afinidad hacia los receptores folato ubicados en las superficies celulares.

Se prepararon nanopartículas de albúmina bovina por la técnica de desolvatación. Se sintetizó la molécula éster N-Hidroxisuccinimida de ácido fólico (NHS-folato). Después se conjugaron las NPs con las moléculas de folato. Esto se hizo mezclando 50 mg de NHS-folato disuelto en 1 ml de sulfóxido de dimetilo con 2 ml de una suspensión de NPs, se mantuvo en agitación por 45 minutos a temperatura ambiente, finalmente se filtraron las NPs.

Se hicieron cultivos celulares usando células SKOV3 (líneas celulares de cáncer humano de ovario). Las NPs se marcaron con moléculas fluorescentes. Después se incubaron las NPs con las células a 37°C por varios periodos de tiempo. Por último se lavaron las células para

así determinar la internalización de las NPs marcadas dentro de los cultivos celulares.

Dentro de los resultados obtenidos se midieron la cantidad de nanopartículas internadas dentro de las células por medio de la espectrofotometría de fluorescencia. Se observó un incremento en la fluorescencia al aumentar el tiempo, pero al llegar a las 0.5 horas de incubación, empezó a declinar la absorción por parte de las células, la cual se atribuye a la saturación de los receptores folato (Fig. 81) (Zhang *et al*, 2004).

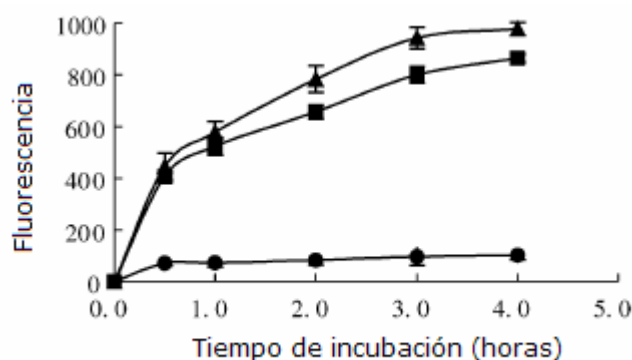


Figura 81: Seguimiento de las nanopartículas absorbidas por las células SKOV3, se incubaron a 37°C a diferentes intervalos de tiempo. (Δ) Células tratadas con NP folatadas, fluorescentes y lavadas con buffer de fosfatos. (□) Células tratadas con NP folatadas, fluorescentes y lavadas con solución salina a pH 3. (●) Células tratadas con NP fluorescentes y lavadas con buffer de fosfatos (Zhang *et al*, 2004).

También se realizó una observación mediante un microscopio de fluorescencia. Se realizaron cultivos celulares con nanopartículas marcadas fluorescentemente (0.15mg/ml) e incubadas a 37°C durante 3 horas (Fig. 82). Los resultados se muestran en las siguientes imágenes:

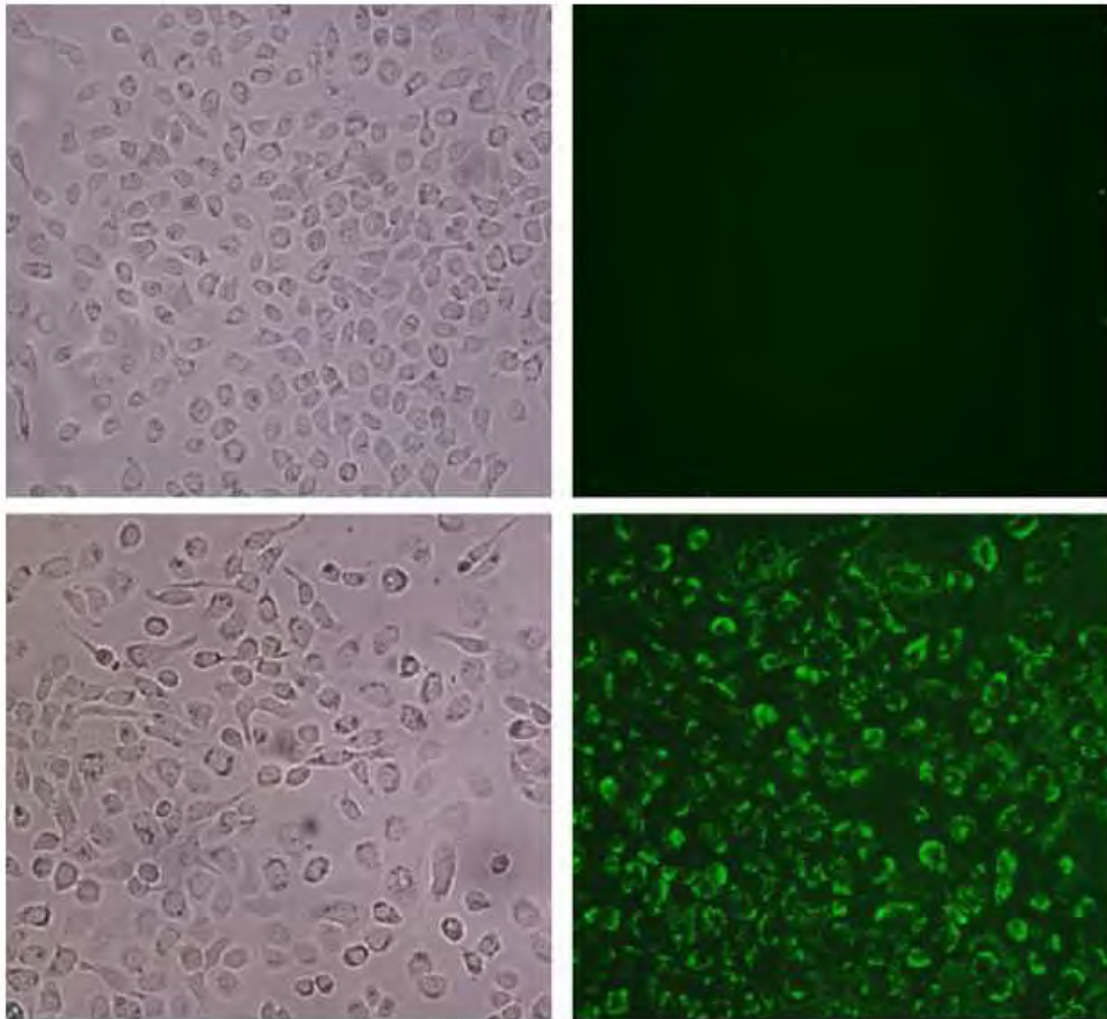


Figura 82: Imágenes mostrando los efectos de la internalización de las nanopartículas hacia las células SKOV3. Las imágenes del lado izquierdo fueron tomadas con un microscopio de contraste de fases y las del lado derecho fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia. Las dos fotografías superiores fueron realizadas con células tratadas con NP fluorescentes y después lavadas (control), mientras que las dos fotografías inferiores fueron realizadas con células tratadas con NP fluorescentes, folatadas y lavadas. La amplificación fue de 200x. (Zhang *et al*, 2004).

Las nanopartículas con folato tienen un gran potencial para el tratamiento contra el cáncer, debido a que los tumores frecuentemente tienen receptores folato sobreexpresados (Zhang *et al*, 2004).

## CONCLUSIONES

Para la realización de la presente tesis se llevó a cabo una revisión bibliográfica que consistió en:

- a) Planteamiento de objetivos.
- b) Búsqueda, recopilación y depuración bibliográfica de la información en revistas, libros y páginas de Internet.
- c) Realizar el trabajo escrito.

La presente revisión bibliográfica cumple con los objetivos planteados, ya que describe las diferentes técnicas de elaboración de las nanopartículas así como su caracterización, también enumera las aplicaciones más importantes en el área terapéutica y en el diagnóstico, por último tiene una función pedagógica debido a que proporciona información actual sobre sistemas nanoparticulados en el área farmacéutica.

## COMENTARIOS FINALES

La nanotecnología es una de las áreas en donde se esperan grandes descubrimientos, en particular dentro de las ciencias de la salud. Las nanopartículas han tenido un desarrollo relativamente corto, sin embargo, sus avances han sido espectaculares.

Las técnicas de elaboración de las nanopartículas son métodos prácticos de realizar, por lo tanto la investigación en esta parte de la tecnología farmacéutica se puede llevar a cabo satisfactoriamente en un laboratorio.

Por otra parte en las aplicaciones de las nanopartículas dentro del tratamiento de enfermedades crónicas y mortales, en los estudios *in vitro* e *in vivo* con animales se han obtenido resultados prometedores, en particular en el tratamiento de algunos tipos de cáncer. Hay que destacar la salida al mercado del primer medicamento elaborado en base a las nanopartículas contra el cáncer de mama llamado Abraxane<sup>®</sup>, el cual reduce de manera significativa los efectos secundarios del medicamento usado comúnmente.

Las nanopartículas de la tercera generación serían un gran avance en las investigaciones sobre las nanopartículas, ya que estas tendrían una gran selectividad hacia las células que tienen únicamente daños, de esta manera se evitan los efectos secundarios indeseados de muchos medicamentos. Esto mejoraría la calidad de vida de muchas personas, sobretodo las que padecen enfermedades crónicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, A.; Lichtman, A. (2004). *Inmunología Celular y Molecular*. 5ª ed. España, Elsevier. p. 43-63.
2. Barnabas, W.; Malay, K.S.; Kumaraswamy, S.; Kokilampal, P.S.K.; Nallupillai, P.; Bhojraj, S. (2008). Poly(n-butylcyanoacrylate) Nanoparticles Coated with Polysorbate 80 for the Targeted Delivery of Rivastigmine into the Brain to Treat the Alzheimer's Disease. *Brain Research*. 1200, 159-168.
3. Beck-Broichsitter, M; Gauss, J.; Packhaeuser, C.B.; Lahnstein, K.; Schmehl, T.; Seeger, W.; Kissel, T.; Gessler, T. (2009). Pulmonary Drug Delivery with Aerosolizable Nanoparticles in an *ex vivo* Lung Model. *International Journal of Pharmaceutics*. 367, 169-178.
4. Bevan, J. (1982). *Fundamentos de Farmacología*. 2ª ed. México, Harla S.A. de C.V. p. 694-705.
5. Brigger, I.; Dubernet, C.; Couvreur, P. (2002). Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54, 631-651.
6. Cannon, J.; Hui, H.; Gupta, P. (2007). Drug Delivery: Monoclonal Antibodies. En *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. USA. Marcel Dekker, Inc. p. 1132-1148.
7. Canuto, Mayra, et al. (2006). Factores a Considerar en la Elaboración de un Plan Nacional de Nanotecnología en México. Tesis de Licenciatura. UNAM. p. 1-21.
8. Cegnar, M.; Kos, J.; Kristl, J. (2004). Cystatin Incorporated in Poly (lactide-co-glycolide) Nanoparticles: Development and Fundamental Studies on Preservation of Its Activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 22, 357-364.
9. Cegnar, M.; Premzl, A.; Zavasnik-Bergant, V.; Kristl, J.; Kos, J. (2004). Poly (lactide-co-glycolide) Nanoparticles as a Carrier System for Delivering Cysteine Protease Inhibitor Cystatin Into Tumor Cells. *Experimental Cell Research*. 301, 223-231.
10. Choi, Sung-Wook; Kim, Jung-Hyun. (2007). Design of Surface-Modified Poly(D,L-lactide-co-glycolide) Nanoparticles for Targeted Drug Delivery to Bone. *Journal of Controlled Release*. 122, 24-30.

11. Cohen, S.; Bernstein, H. (1996). Microparticulate Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines. USA. Marcel Dekker, Inc. Vol. 77. p. 203-242.
12. Couvreur, P. (2001). Drug Vectorization or How to Modulate Tissular and Cellular Distribution of Biologically Active Compounds. *Ann Pharm Fr.* 59, 232-238.
13. Couvreur, P.; Couarraze, G.; Devissaguet, J.P.; Puisieux, F. (1996). Nanoparticles: Preparation and Characterization. En *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*. USA. Vol. 73. Marcel Dekker, Inc. p. 183-211.
14. Csaba, N.; Garcia-Fuentes, M.; Alonso, M.J. (2009). Nanoparticles for Nasal Vaccination. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 61, 140-157.
15. Cui, F.; Qian, F.; Yin, C. (2006). Preparation and Characterization of Mucoadhesive Polymer-Coated Nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 316, 154-161.
16. Dailey, L.; Schmehl, T.; Gessler, T.; Wittmar, M.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Kissel, T. (2003). Nebulization of Biodegradable Nanoparticles: Impact of Nebulizer Technology and Nanoparticle Characteristics on Aerosol Features. *Journal of Controlled Release*. 86, 131-144.
17. Delgado, A.C.; Minguillon, C.LL.; Juglar, T.J. (2003). Introducción a la Química Terapéutica. 2ª ed. España, Ediciones Díaz de Santos. p. 10-132.
18. Diccionario de Física. (1976). Madrid. Ediciones Rioduero de EDICA, S.A. p. 66,81.
19. Diccionario Mosby (CD ROOM). (1998). 5a. Edición. España. Ediciones Harcourt, S.A.
20. Dreis, S.; Rothweiler, F.; Michaelis, M.; Cinatl Jr., J.; Kreuter, J.; Langer, K. (2007). Preparation, Characterisation and Maintenance of Drug Efficacy of Doxorubicin-Loaded Human Serum Albumin (HSA) Nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 341, 207-214.
21. Enciclopedia Encarta (DVD). (2008). USA. Microsoft Corporation.
22. Fahmy, T.; Fong, P.; Goyal, A.; Saltzman, W. (2005). Targeted for Drug Delivery. *Nanotoday*. August, 18-26.



23. Faraji, A.H.; Wipf, Peter. (2009). Nanoparticles in Cellular Drug Delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 17, 2950-2962.
24. Fattal, E.; Vauthier, C. (2002). Nanoparticles as Drug Delivery Systems. En *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. USA. Marcel Dekker, Inc. p. 1864-1882.
25. Fonseca, C.; Simões, S.; Gaspar, R. (2002). Paclitaxel-Loaded PLGA Nanoparticles: Preparation, Physicochemical Characterization and In Vitro Anti-tumor Activity. *Journal of Controlled Release*. 83, 273-286.
26. Frisbee, S.; McGinity, J.W. (1994). Influence of no Ionic Surfactants on the Physical and Chemical Properties of a Biodegradable Pseudolatex. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 40, No.6. 335-363.
27. Ganong, William. (2002). Fisiología Médica. 20ª ed. México, El Manual Moderno. p. 31-40.
28. Gao, X.; Tao, W.; Lu, W.; Zhang, Q.; Zhang, Y.; Jiang, X.; Fu, S. (2006). Lectin-Conjugated PEG-PLA Nanoparticles: Preparation and Brain Delivery After Intranasal Administration. *Biomaterials*. 27, 3482-3490.
29. García, Elizabeth G. (1998). Caracterización del Quitosán como Excipiente de Compresión Directa. Tesis de Licenciatura. FESC, UNAM. p. 46-51.
30. Gaumet, M.; Gurny, R.; Delie, F. (2009). Interaction of Biodegradable Nanoparticles with Intestinal Cells: The Effect of Surface Hydrophilicity. *International Journal of Pharmaceutics*. 1-8.
31. Gaumet, M.; Vargas, A.; Gurny, R.; Delie, F. (2008). Nanoparticles for Drug Delivery: The Need for Precision in Reporting Particle Size Parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 69, 1-9.
32. Gelperina, S.; Maksimenko, O.; Khalansky, A.; Vanchugova, L.; Shipulo, E.; Abbasova, K.; Berdiev, R.; Wohlfart, S.; Chepurnova, N.; Kreuter, J. (2009). Drug Delivery to the Brain Using Surfactant-Coated Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles: Influence of the Formulation Parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1-7.
33. Goodman, L. (1996). Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9ª ed. México, McGraw-Hill. p. 1309-1367.

34. Hagens, W.I.; Oomen, A.G.; H. de Jong, W.; Cassee, F.R.; Sips, A. J.A.M. (2007). What do We (Need to) Know About the Kinetics Properties of Nanoparticles in the Body?. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 49, 217-229.
35. Hall, C.E. (1970). Microscopía Electrónica. España, Ediciones Urmo. p. 13-37.
36. Hilgenbrink, A.; Low, P. (2005). Folate Receptor-Mediated Drug Targeting: From Therapeutics to Diagnostics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 94, 2135-2146.
37. Illum, L. (2004). Is Nose-to-Brain Transport of Drugs in Man a Reality? *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 56, 3-17.
38. Kratz, Felix. (2008). Albumin as a Drug Carrier: Design of Prodrugs, Drug Conjugates and Nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 132, 171-183.
39. Kreuter, J. (1994). Nanoparticles. En *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. USA. p. 165-190.
40. Kreuter, J. (2001). Nanoparticulate Systems for Brain Delivery of Drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 47, 65-81.
41. Koziara, J; Lockman, P.; Allen, D; Mumper, R. (2004). Paclitaxel Nanoparticles for the Potential Treatment of Brain Tumors. *Journal of Controlled Release*. 99, 259-269.
42. Kumari, A.; Yadav, Sudesh K.; Yadav, Subhash C. (2010). Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 75, 1-18.
43. Lambert, G.; Bertrand, J.; Fattal, E.; Subra, F.; Pinto-Al-Phandry, H.; Maluy, M; Auclair, C.; Couvreur, P. (2000). EWS Fli-1 Antisense Nanocapsules Inhibits Ewing Sarcoma-Related Tumor in Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 279, 401-406.
44. Lambert, G.; Fattal, E.; Couvreur, P. (2001). Nanoparticle Systems for the Delivery of Antisense Oligonucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 47, 99-112.
45. Langer, K.; Anhorn, M.G.; Steinhauser, I.; Dreis, S.; Celebi, D.; Schrickel, N.; Faust, S.; Vogel, V. (2008). Human Serum Albumin (HSA) Nanoparticles: Reproducibility of Preparation Process and

Kinetics of Enzymatic Degradation. *International Journal of Pharmaceutics*. 347, 109-117.

46. Leroux, J.P.; Doelker, E.; Gurny, R. (1996). The Use of Drug-Loaded Nanoparticles in Cancer Chemotherapy. En *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*. USA. Vol. 73. Marcel Dekker, Inc. p. 535-575.

47. Li, L.; Tian, Y. (2007). Zeta Potential. En *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. USA. Marcel Dekker, Inc. p. 4117-4126.

48. Lu, B.; Xiong, S.; Yang, H.; Yin, X.; Chao, R. (2006). Solid Lipid Nanoparticles of Mitoxantrone for Local Injection Against Breast Cancer and Its Lymph Node Metastases. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 28, 86-95.

49. Ludwig, A. (2005). The Use of Mucoadhesive Polymers in Ocular Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 57, 1595-1639.

50. McMurry, J. (2001). Química Orgánica. 5ª ed. México, Internacional Thomson Editores. p. 118.

51. Mistry, A.; Stolnik, S.; Illum, L. (2009). Nanoparticles for Direct Nose-to-Brain Delivery of Drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 379, 146-157.

52. Montasser, I.; Briancon, S.; Lieto, J.; Fessi, H. (2000). Méthodes D'Obtention Et Mécanismes De Formation De Nanoparticules Polymériques. *J. Pharm. Belg.* 55, 155-167.

53. Nagarwal, R.C.; Kant, S.; Singh, P.N.; Maiti, P.; Pandit, J.k. (2009). Polymeric Nanoparticulate System: A Potential Approach for Ocular Drug Delivery. *Journal of Controlled Release*. 136, 2-13.

54. Oxford Dictionary of Chemistry. (2000). 4a ed. Great Britain, Market House Books. p. 152-154, 482, 483.

55. Pasantes, H.; Sánchez, J.; Tapia, R. (1991). Neurobiología Celular. 1ª ed. México, Fondo de Cultura Económica. p. 9-11.

56. Peracchia, M.; Vauthier, C.; Passirani, C.; Couvreur, P.; Labarre, D. (1997). Complement Consumption by Poly (Ethylene Glycol) in Different Conformations Chemically Coupled to Poly (Isobutil 2-Cyanoacrylate) Nanoparticles. *Life Sciences*. 61, 749-761.

57. Pison, U.; Welte, T.; Giersig, M.; Groneberg, D. (2006). Nanomedicine for Respiratory Diseases. *European Journal of Pharmacology*. 533, 341-350.
58. Reimold, I.; Domke, D.; Bender, J.; Seyfried, C.A.; Radunz, H.E.; Fricker, G. (2008). Delivery of Nanoparticles to the Brain Detected by Fluorescence Microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 70, 627-632.
59. Rieux, A.; Fievez, V.; Garinot, M.; Schneider, Y-J.; Pr eat, V. (2006). Nanoparticles as Potential Oral Delivery Systems of Proteins and Vaccines: A Mechanistic Approach. *Journal of Controlled Release*. 1-27.
60. Roitt, I.; Delves, P. (2003). Inmunolog a Fundamentos. 10a ed. Argentina, Editorial Medica Panamericana. p. 133-141.
61. Roney, C.; Kulkarni, P.; Arora, V.; Antich, P.; Bonte, F.; Wu, A.; Mallikarjuana, N.; Manohar, S.; Liang, H.; Kulkarni, A.; Sung, H.; Sairam, M.; Aminabhavi, T. (2005). Targeted Nanoparticles for Drug Delivery Through the Blood-Brain Barrier for Alzheimer's Disease. *Journal of Controlled Release*. 1-22.
62. Rosenstein, E. (2000). DEF Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 46<sup>a</sup> ed. México, Ediciones PLM.
63. Seymour, R.; Carraher, C.E. (1998). Introducción a la Química de los Polímeros. España, Editorial Reverte. p. 98, 121-177.
64. Sham, J.; Zhang, Y.; Finlay, W.; Roa, W.; L benberg, R. (2004). Formulation and Characterization of Spray-Dried Powders Containing Nanoparticles for Aerosol Delivery to the Lung. *International Journal of Pharmaceutics*. 269, 457-467.
65. Sheng, Y.; Liu, Ch.; Yuan, Y.; Tao, X.; Yang, F.; Shan, X.; Zhou, H.; Xu, F. (2009). Long-Circulating Polymeric Nanoparticles Bearing a Combinatorial Coating of PEG and Water-Soluble Chitosan. *Biomaterials*. 30, 2340-2348.
66. Shenoy, D.; Amiji, M. (2005). Poly (ethylene oxide)-Modified Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) Nanoparticles for Targeted Delivery of Tamoxifen in Breast Cancer. *International Journal of Pharmaceutics*. 293, 261-270.
67. Soberon, F.X. (1999). La Ingeniería Genética y La Nueva Biotecnología. 2<sup>a</sup> ed. México, Fondo de Cultura Econ mica. p. 23-29.

68. Soppimath, K.; Aminabhavi, T.; Kulkarni, A.; Rudzinski, W. (2001). Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices. *Journal of Controlled Release*. 70, 1-20.
69. Steinhauser, I.; Spänkuch, B.; Strebhardt, K.; Langer, K. (2006). Trastuzumab-Modified Nanoparticles: Optimisation of Preparation and Uptake in Cancer Cells. *Biomaterials*. 27, 4975-4983.
70. Sung, J.C.; Pulliam, B.L.; Edwards, D.A. (2007). Nanoparticles for Drug Delivery to the Lungs. *Trends in Biotechnology*. 25, No. 12, 563-570.
71. Torroella, M.; Villa, S. (1998). Bases Genéticas del Cáncer. 1ª ed. México, Fondo de Cultura Económica. p. 11-20.
72. Vasir, J.K.; Labhasetwar, V. (2007). Biodegradable Nanoparticles for Cytosolic Delivery of Therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59, 718-728.
73. Vauthier, C.; Dubernet, C.; Fattal, E.; Pinto-Alphandary, H; Couvreur, P. (2003). Poly (Alkylcyanoacrylates) as Biodegradable Materials for Biomedical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55, 519-548.
74. Vila, J.L. (2001). Tecnología Farmacéutica. España, Editorial Síntesis. Volumen II. p. 298, 441-445.
75. Williams, J.; Clifford, A. (2000). Supercritical Fluid, Methods and Protocols. USA, Humana Press. p. 1-13.
76. Wingrove, A.; Caret, R. (1984). Química Orgánica. México, Harla S.A. de C.V. p. 393.
77. Yang, W.; Peters, J.I.; Williams III, R.O. (2008). Inhaled Nanoparticles-A Current Review. *International Journal of Pharmaceutics*. 356, 239-247.
78. Yoshioka, T.; Hashida, M.; Muranishi, S.; Sezaki, H. (1981). Specific Delivery of Mitomycin C to the Liver, Spleen and Lung: Nano and Microspherical Carriers of Gelatin. *Int. J. Pharm.* 8, 131.
79. Zhang, L.; Hou, S.; Mao, S.; Wei, D.; Song, X.; Lu, Yi. (2004). Uptake of Folate-Conjugated Albumin Nanoparticles to the SKVO3 Cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 287, 155-162.