



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

“DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE LA
CAPACIDAD CITOTÓXICA DE SISTEMAS
NANOPARTICULADOS A BASE DE ÁCIDO
POLI-LÁCTICO-CO-GLICÓLICO (PLGA)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

LEONARDO ERICK FLORES VÁZQUEZ

ASESOR: DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA
CO-ASESOR: DR. ROBERTO DÍAZ TORRES



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Desarrollo y evaluación de la capacidad citotóxica de sistemas nanoparticulados a base de ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA)

Que presenta el pasante: Leonardo Erick Flores Vázquez
Con número de cuenta: 304057861 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 ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 23 de agosto de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Raquel López Arellano	
VOCAL	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er. SUPLENTE	M.I. Claudia Mariano Hernández	
2do. SUPLENTE	QFB: Gabriela Rodríguez Patiño	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HHA/iac

El presente proyecto fue apoyado en su desarrollo con recursos de:

**PAPIIT IN220612. UNAM 2013
CÁTEDRA DE INVESTIGACIÓN CONS-09, PACIVE FES-Cuautitlán
CATEDRA DE DOCENCIA DOC-11, PACIVE FES-Cuautitlán**

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Jesús Flores y Felicitas Vázquez que siempre me han dado su apoyo incondicional y a quienes debo este triunfo profesional, por todo su trabajo y dedicación para darme una buena formación .De ellos es este triunfo y para ellos es todo mi agradecimiento, quiero que sepan que para mí son los mejores.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por recibirnos como a sus hijos y vernos crecer como personas y como profesionistas.

A la Facultad de estudios superiores Cuautitlán y a todos los profesores que contribuyeron en mi formación.

Al Dr. Roberto Díaz Torres y la Dra. Patricia Ramírez Noguera, asesores de este proyecto, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa del mismo, pero sobre todo por los conocimientos compartidos, la motivación y el apoyo recibido a lo largo del tiempo que tengo de conocerlos, por ser un ejemplo para mí en el sentido profesional y personal, gracias de corazón por todo.

Al Dr. Gustavo Rivera por compartir sus conocimientos y brindarme sus consejos para el presente proyecto.

A Giovanna Duran Ramírez por ser mi compañera de estudios y de vida durante todos estos años, gracias por acompañarme durante esta etapa, esta tesis también es tuya.

A la Dra. Elizabeth García por haber contribuido al presente trabajo con su apoyo para las determinaciones de las pruebas de tamaño de partícula en su laboratorio a cargo en Psicofarma.

A la M. en C. Sofia González Gallardo quien nos permitió procesar muestras y obtener imágenes de microscopía electrónica en el Laboratorio de microscopía electrónica ubicado en el edificio L-501 en las instalaciones de la FES-CUAUTITLÁN.

DEDICATORIAS

La presente tesis se la dedico a mi familia que gracias a sus consejos y palabras de apoyo crecí como persona.

A mis padres por su apoyo, confianza y amor. Gracias por ayudarme a conseguir y cumplir mis metas y objetivos como persona y estudiante.

A mis Hermanos Janette y Alejandro, espero que el presente trabajo les sirva de inspiración y motivación para creer que todo lo que ustedes se imaginen lo pueden hacer posible siempre y cuando se tenga dedicación y disciplina, los quiero.

Gracias a esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme toda su ayuda y con quien he vivido momentos que nunca olvidare, ahora me toca regresar un poquito de todo lo inmenso que me han otorgado. Con todo mi cariño está tesis se las dedico a ustedes:

Giovanna Duran
Fernando Montalvo
Carlos Álvarez
John González
Alejandro Espinoza
Nancy Bautista
David Ramírez



1 CONTENIDO

1	CONTENIDO	1
1.1	ÍNDICE DE FIGURAS	3
1.2	ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	4
1.3	ÍNDICE DE TABLAS.....	4
1.4	ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	5
1.5	ABREVIATURAS	5
2	OBJETIVOS	6
2.1	OBJETIVO GENERAL	6
2.2	OBJETIVOS PARTICULARES	6
3	MARCO TEÓRICO.....	7
3.1	DEFINICIÓN DE NANOPARTÍCULAS	7
3.2	CLASIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.....	7
3.2.1	Nanopartículas de origen natural	7
3.2.2	Nanopartículas generadas por la actividad humana	7
3.3	HISTORIA	8
3.4	MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS	8
3.4.1	Método de emulsificación-evaporación del disolvente	9
3.4.2	Salting out	9
3.4.3	Nanoprecipitación.....	10
3.4.4	Polimerización Interfacial.....	10
3.4.5	Difusión del disolvente	10
3.4.6	Fluidos Supercríticos	11
3.5	POLÍMEROS	11
3.5.1	Solubilidad	12
3.5.2	Peso molecular y viscosidad intrínseca.....	12
3.5.3	Temperatura de transición vítrea (Tg)	12
3.6	ÁCIDO POLI-LÁCTICO (PLA)/ÁCIDO POLI-LÁCTICO-CO-GLICÓLICO (PLGA) ..	12
3.7	NANOPARTÍCULAS A BASE DE POLIÉSTERES.....	13
3.7.1	NANOPARTÍCULAS A BASE DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO-CO-GLICÓLICO ..	15
4	CARACTERIZACIÓN	16
4.1	DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS).....	16



4.2	POTENCIAL ZETA.....	17
4.3	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	17
4.4	MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN	18
5	TOXICIDAD	21
5.1	FACTORES QUE INFLUYEN EN LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS	21
5.1.1	QUÍMICOS	21
5.1.2	FÍSICOS.....	22
5.2	PRINCIPALES VÍAS DE ENTRADA	22
5.2.1	INHALATORIA.....	22
5.2.2	DÉRMICA	23
5.2.3	DIGESTIVA.....	23
6	NANOTOXICOLOGÍA.....	23
6.1	BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN	24
6.2	BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD.....	25
6.3	BIOMARCADORES DE RESPUESTA	25
7	EVALUACIONES DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA.....	25
7.1	ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR.....	26
7.1.1	VIABILIDAD CELULAR (MTT)	26
7.1.2	GLUTATIÓN (GSH)	27
8	JUSTIFICACIÓN.....	28
9	METODOLOGÍA	29
9.1	MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
9.1.1	MATERIALES.....	29
9.1.2	SOLUCIONES	30
9.1.3	EQUIPOS.....	31
9.1.4	MODELOS EXPERIMENTALES.....	31
9.2	MÉTODOS	31
9.2.1	PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.....	31
9.2.2	PREPARACIÓN DE DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS CON DIFERENTE TAMAÑO DE PARTÍCULA PARA EVALUAR LA CITOTOXICIDAD DE LOS MISMOS EN LÍNEAS CELULARES.....	36
9.2.3	ACONDICIONAMIENTO DE LAS NANOPARTÍCULAS PARA LA CARACTERIZACIÓN	37



9.2.4	ACONDICIONAMIENTO DE LAS NANOPARTÍCULAS PARA LOS CULTIVOS CELULARES	37
9.2.5	MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES.....	37
9.2.6	ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR	37
9.2.7	ENSAYO DE GLUTATIÓN.....	38
10	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	41
10.1	FACTORES QUE INFLUYEN EN EL TAMAÑO DE PARTÍCULA	41
10.1.1	ENSAYO DE EXPLORACIÓN.....	41
10.1.2	OPTIMIZACIÓN	44
10.2	CARACTERIZACIÓN (Microscopia electrónica)	47
	47
10.3	EVALUACIONES CITOTÓXICAS	49
10.3.1	VIABILIDAD CELULAR	49
10.3.2	ENSAYO DE GLUTATIÓN (GSH)	54
11	DISCUSIÓN	57
12	CONCLUSIONES	59
13	ANEXO.....	60
13.1	Gráficos obtenidos de la caracterización del tamaño de partícula mediante DLS (zetasizer).....	60
13.2	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA RESULTADOS DE GSH.	62
	Bibliografía.....	64

1.1 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 . Escala aproximada que relaciona el tamaño de diferentes estructuras con una nanopartícula.....	7
Figura 2. Dibujo esquemático de una nanocápsula y una nanoesfera	8
Figura 3. Representación esquemática del método emulsión- evaporación del disolvente (Llabot & Palma, 2008).	9
Figura 4 .Representación esquemática del método << Salting out>>.	10
Figura 5. Representación esquemática de una partícula cargada y su capa de deslizamiento	17
Figura 6. Representación esquemática de las partes de un microscopio electrónico de barrido.....	18
Figura 7. Representación esquemática de las partes de un Microscopio electrónico de transmisión	19
Figura 8. Esquema método preparación de nanopartículas de PLGA mediante el método emulsificación- evaporación del disolvente.....	32
Figura 9 . Figura 10 . Nanopartículas de 200 nm caracterizadas por Microscopia electrónica observadas a 40000 aumentos.	47
Figura 11 . Figura 12 Nanopartículas de 300 nm caracterizadas por Microscopia electrónica observadas a 40000 aumentos.	48



1.2 ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Tamaño de partícula para cada sistema obtenido en el ensayo de exploración.	42
Gráfico 2. Diagrama de Pareto que muestra los factores que más afectan al tamaño de las nanopartículas de acuerdo al ensayo de exploración (“screening”).	42
Gráfico 3. Tamaño de partícula obtenido en los sistemas preparados para la optimización del proceso.	45
Gráfico 4. Tendencia de los efectos principales sobre el tamaño de partícula.	46
Gráfico 5. Principales Interacciones entre componentes de las nanopartículas.	46
Gráfico 6. Porcentaje de viabilidad celular de células AML 12 expuestas en un periodo de tiempo de 4 horas.	50
Gráfico 7. Diferencias significativas entre tratamientos para un periodo de exposición de 4 HORAS para el ensayo de viabilidad celular.	51
Gráfico 8. Porcentaje de viabilidad celular de células AML 12 expuestas en un periodo de tiempo de 24 horas.	52
Gráfico 9. Diferencias significativas entre tratamientos para el ensayo de viabilidad celular en un periodo de exposición de 24 horas.	53
Gráfico 10. Estimación de Glutación. Cantidades expresadas en nanomoles de GSH por mg de Proteínas totales en células AML12 expuestas 4 Horas a las nanopartículas de 200 y 311nm.	55
Gráfico 11. Estimación de Glutación. Cantidades expresadas en nanoMoles de GSH por mg de Proteínas totales en células AML12 expuestas 24 Horas a las nanopartículas de PLGA de 200 y 311nm.	56

1.3 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructuras de poliésteres utilizados comúnmente en nanotecnología	15
Tabla 2 Resumen y comparación de las diferentes técnicas empleadas para la evaluación de tamaño de partícula.	19
Tabla 3. Factores y niveles del experimento de exploración.	33
Tabla 4. Respuesta estudiada.	34
Tabla 5. Diseño experimental: Determinación de factores principales.	34
Tabla 6. Diseño del experimento de optimización.	35
Tabla 7 .Tamaño de partícula para los experimentos de exploración.	41
Tabla 8. Efectos estimados de cada variable para el tamaño de partícula (“screening”).	43
Tabla 9. Análisis de varianza para tamaño de partícula.	44
Tabla 10. Tamaño de partícula para los experimentos de optimización.	45



1.4 ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Diagrama general para metodología, preparación de nanopartículas bajo condiciones de proceso específicas para su posterior evaluación citotoxicológica.40

1.5 ABREVIATURAS

PLGA- Ácido Poli Láctico-co-glicólico

PVA- Polivinil alcohol

GSH- Glutación reducido

GSSG- Glutación oxidado

nm- nanómetros

DSL- Dispersión de luz dinámica

FDA-Food and Drug administration

TEM- Microscopia electrónica de transmisión

SEM- Microscopia electrónica de barrido

MTT- (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazol)-2,5- difeniltetrazólico)

AML12- (células alfa de hígado de ratón)

BSA- Albumina sérica bovina

PBS- Tampón fosfato salino

DTNB- (ácido 5,5'-ditiobisnitrobenzoico)

DMSO- Dimetil sulfoxido



2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar sistemas nanoparticulados de diferentes tamaños a base de PLGA y evaluar la capacidad citotóxica de dichos sistemas mediante la estimación de la cantidad de glutatión (GSH) y la viabilidad (MTT) *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Elaborar sistemas nanoparticulados a base de PLGA bajo condiciones de proceso específicas
- Caracterizar los sistemas fabricados por tamaño de partícula mediante la técnica de dispersión Dinámica de la luz (DSL) y la morfología, mediante Microscopia Electrónica de Transmisión
- Evaluar la capacidad citotóxica a los sistemas nanoparticulados mediante las pruebas:
Viabilidad celular (MTT) y Glutatión (GSH), a dos diferentes tamaños (200 y 311 nanómetros) y en diferentes tiempos de exposición (4 y 24 horas) en líneas celulares hepáticas de ratón AML12.



3 MARCO TEÓRICO

3.1 DEFINICIÓN DE NANOPARTÍCULAS

- Partícula que es más pequeña que 100 nanómetros (milmillonésima parte de un metro). (Instituto Nacional de Cáncer)
- En nanotecnología comúnmente una nanopartícula es identificada como una partícula con un diámetro de 1 a 1000nm



Figura 1 . Escala aproximada que relaciona el tamaño de diferentes estructuras con una nanopartícula

3.2 CLASIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

3.2.1 Nanopartículas de origen natural

Algunas son de origen biológico, como por ejemplo muchos virus y bacterias y otras son de origen mineral o medioambiental como las que contiene el polvo de arena del desierto o las nieblas y humos derivados de la actividad volcánica o de los fuegos forestales. (Grácia & Lluís, 2010)

3.2.2 Nanopartículas generadas por la actividad humana

Las nanopartículas consecuencia de la actividad humana pueden ser generadas de forma involuntaria o deliberada.

Las nanopartículas producidas de forma involuntaria son las que se producen en ciertos procesos industriales bien conocidos, tales como la pirolisis a la llama del negro de carbono, producción de materiales a gran escala por procedimientos a altas temperaturas (como el humo de sílice, partículas ultra finas de óxido de titanio y metales ultra finos), procesos de combustión (diésel, carbón), obtención de pigmentos, o en procesos domésticos (barbacoas, humos de aceite).

Las nanopartículas generadas deliberadamente se producen mediante las llamadas nanotecnologías. Los métodos para la obtención de nanopartículas son, a grandes rasgos, de



dos tipos: los llamados “top-down”, en los que se llega a nanomateriales sometiendo materiales convencionales a diversos procesos y los “bottom-up” en los que se construyen nanopartículas a partir de átomos o moléculas. Son ejemplos de ellas las derivadas de la arcilla para reforzar y aumentar la resistencia del plástico, utilizadas en la fabricación de resinas para acabados del exterior de vehículos, y las que modifican propiedades ópticas de algunos materiales que se utilizan en cosmética. (Gràcia & Lluís, 2010)

3.3 HISTORIA

Considerado por la comunidad científica internacional como uno de los más "innovadores y ambiciosos" proyectos de la ciencia moderna, la nanotecnología tiene su antecedente más remoto en un discurso pronunciado en diciembre de 1959 por el físico Richard Feynman, ganador del Premio Nobel, quien estableció las bases de un nuevo campo científico.

Vinculado a la investigación científica desarrollada por las principales instituciones públicas de educación superior, la nanotecnología fomenta un modelo de colaboración interdisciplinario en campos como la llamada nanomedicina -aplicación de técnicas que permitan el diseño de medicamentos a nivel molecular, la nanobiología y el desarrollo de microconductores.

Su impacto en la vida moderna aún parece una historia de ciencia ficción. Fármacos que trabajan a nivel atómico, microchips capaces de realizar complejos análisis genéticos, generación de fuentes de energía inagotables, construcción de edificios con microrobots, combates de plagas y contaminación a escala molecular, son sólo algunos de los campos de investigación que se desarrollan con el uso de la nanotecnología, conocimiento que permite manipular la materia a escala nanométrica, es decir, átomo por átomo.

3.4 MÉTODOS DE FABRICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Como se señaló anteriormente, existen varios métodos diferentes para la preparación de nanopartículas, como así también numerosas formas de incorporar los fármacos en las partículas. A modo de ejemplo, los fármacos pueden ser encapsulados en la matriz polimérica, (en el núcleo de las nanopartículas), conjugados químicamente con el polímero, o adsorbidos en la superficie de la partícula. (Llabot & Palma, 2008).

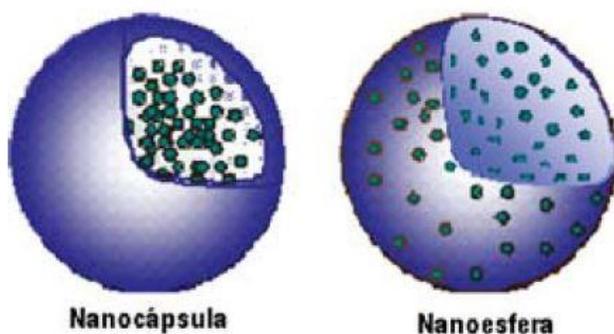


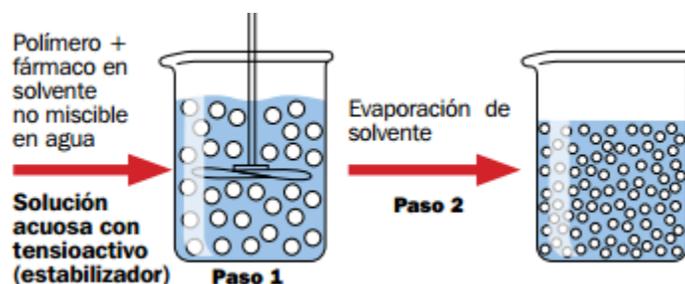
Figura 2. Dibujo esquemático de una nanocápsula y una nanoesfera



3.4.1 Método de emulsificación- evaporación del disolvente

El método emulsificación- evaporación es el más comúnmente utilizado para la preparación de las nanopartículas. La emulsificación- evaporación consiste en la disolución del polímero y el compuesto en un solvente orgánico (diclorometano o cloruro de metileno). La emulsión se prepara mediante la adición de agua y un surfactante a la solución de polímeros. En muchos casos, la formación de “nano-gotas” por parte del polímero es inducida por sonicación (ultrasonido) u homogeneización. El disolvente orgánico luego es evaporado y las nanopartículas son generalmente recolectadas por centrifugación y liofilización. Esta técnica ha dado buenos resultados para encapsular fármacos hidrofóbicos, pero ha tenido pobres resultados en la incorporación de agentes bioactivos de carácter hidrofílico. (Llabot & Palma, 2008)

Figura 3. Representación esquemática del método emulsión- evaporación del disolvente (Llabot & Palma, 2008).

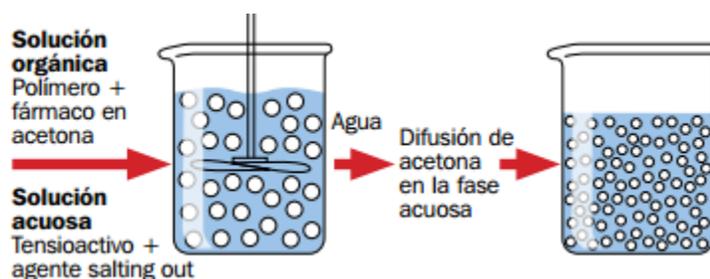


3.4.2 Salting out

Mediante esta técnica, se forma una emulsión agua/aceite que contiene polímeros, agua, acetona, acetato de magnesio, estabilizador (tensoactivo) y el componente activo. Posteriormente se añade agua hasta que el volumen es suficiente para permitir la difusión de la acetona en el medio acuoso, lo que resulta en la formación de nanopartículas. Esta suspensión se purifica por filtración de flujo transversal y liofilización. Sin embargo, una desventaja de este procedimiento es que usa sales que son incompatibles con muchos compuestos bioactivos. (Llabot & Palma, 2008)



Figura 4 .Representación esquemática del método << Salting out>>.



3.4.3 Nanoprecipitación

Con esta técnica, los fármacos y el polímero se disuelven en acetona y se añaden a una solución acuosa que contiene tensoactivos. Luego la acetona es evaporada a presión reducida y las nanopartículas permanecen en la suspensión acuosa resultando en partículas de 110 a 208 nm. (Llabot & Palma, 2008)

3.4.4 Polimerización Interfacial

El método de polimerización interfacial utiliza las ventajas de ciertos polímeros con rápida velocidad de polimerización. Utilizando ciertos monómeros (ej. Cianoacrilato) que se disuelven junto con el fármaco en éter de petróleo y etanol absoluto, se forma una mezcla que luego lentamente es extruida a través de una aguja sobre una solución acuosa del surfactante. En este caso las nanocápsulas se forman espontáneamente por polimerización del monómero después de iniciar el contacto con los iones presentes en el agua. La suspensión coloidal resultante puede concentrarse por evaporación a presión reducida. Algunos de los polímeros utilizados en la obtención de nanopartículas por este método son, poli (isobutilcianoacrilato) (PIBCA), y poli (isohexilcianoacrilato). Ejemplos de fármacos encapsulados son la insulina, calcitonina, indometacina, y compuestos citotóxicos utilizados en la terapia fotodinámica de tumores. Una de las ventajas de esta técnica es la alta eficiencia de encapsulación de fármacos (por ejemplo, insulina con un 95%). Además, otra ventaja es la obtención de nanocápsulas ya que por este método el polímero se forma in situ, lo que permite la constitución de una membrana de polímero que puede rodear el contorno de la fase interior de una emulsión aceite/agua o agua/aceite. En este caso, la principal desventaja es el uso de disolventes orgánicos necesarios para la fase externa. El lavado de disolventes y la sustitución por el agua representa un largo y difícil procedimiento. (Llabot & Palma, 2008).

3.4.5 Difusión del disolvente

Este método podría considerarse una modificación de la técnica «salting out», evitando el uso de sales y, por tanto, una serie de intensos pasos de purificación. Consiste en el uso de un disolvente parcialmente miscible en agua, que previamente se satura con agua para asegurar el equilibrio termodinámico entre ambos líquidos. El polímero se disuelve en el disolvente saturado con agua, y esta fase orgánica se emulsifica, bajo agitación vigorosa, en una solución acuosa que contiene un agente estabilizante. La posterior adición de agua al



sistema provoca la difusión del disolvente a la fase externa, formándose así las nanopartículas. Dependiendo del punto de ebullición del disolvente, éste puede eliminarse por destilación o por filtración de flujo transversal, este método es eficaz para la encapsulación de fármacos lipófilos. (Rocha & Ansorena, 2009)

3.4.6 Fluidos Supercríticos

Alguna de las técnicas explicadas previamente son complejas, y los productos obtenidos poseen un contenido residual de disolvente orgánico, una baja encapsulación, presentan degradación del principio activo o desnaturalización, una liberación de fármaco inadecuada, o propiedades físicas y morfológicas inapropiadas. Las técnicas basadas en fluidos supercríticos pueden ser una herramienta interesante para preparar productos nanoparticulados. En aplicaciones farmacéuticas, el fluido supercrítico más empleado es el CO₂, por su baja toxicidad. Moléculas como indometacina o ketoprofeno se han procesado recientemente en nanopartículas de poliésteres utilizando esta técnica. En esta técnica, el fármaco y el polímero se solubilizan en un fluido supercrítico, y la solución se expande a través de una boquilla. El fluido supercrítico se evapora durante el proceso de generación del aerosol, y las partículas de soluto finalmente precipitan y se recogen. Las principales ventajas que ofrece esta técnica son la reducción en el uso de disolventes orgánicos y la posibilidad de formar las nanopartículas sin recurrir a elevadas temperaturas. Sin embargo, este novedoso proceso requiere una elevada inversión inicial para la obtención del equipamiento necesario y operar a elevadas presiones usando sistemas de alta presión. Además, los fluidos supercríticos comprimidos demandan una serie de medidas de reciclado para reducir costes energéticos. Por último, es muy complicado disolver sustancias muy polares en CO₂ supercrítico. No obstante, el uso de cosolventes y/o tensoactivos permite disolver especies polares e iónicas. (Rocha & Ansorena, 2009)

3.5 POLÍMEROS

Los sistemas de transporte a base de materiales poliméricos en forma de nanopartículas requieren polímeros biocompatibles y biodegradables. Sin embargo, el riesgo potencial de infecciones e inmunogenicidad inducidas por sustancias poliméricas de origen animal o vegetal llevó a la necesidad de utilizar materiales sintéticos para reemplazar los polímeros naturales. Consecuentemente, una gran variedad de polímeros sintéticos han sido desarrollados en los últimos quince años, teniendo en cuenta el requisito básico para materiales de aplicación biomédica: estos polímeros deben ser completamente degradados y eliminados del organismo. Los poliésteres son un grupo particularmente atractivo para el desarrollo de sistemas poliméricos nanoparticulados de liberación controlada por su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Además, algunos miembros de este grupo de polímeros presentan baja inmunogenicidad y pueden ser combinados con una amplia variedad de fármacos y otras moléculas de interés terapéutico. (Rocha & Ansorena, 2009)



3.5.1 Solubilidad

Estos biopolímeros son solubles en gran número de solventes orgánicos e insolubles en soluciones acuosas. En un medio acuoso tienen la capacidad de absorber agua e hincharse, lo cual es una de las propiedades características, según el peso molecular y la composición monomérica. (López & Galán, 2010)

3.5.2 Peso molecular y viscosidad intrínseca

La adición de estos biopolímeros a un solvente le aumenta a éste considerablemente la viscosidad; este parámetro está proporcionalmente relacionado con su peso molecular, el cual a su vez está definido por el grado de polimerización. Los biopolímeros comúnmente utilizados para la elaboración de sistemas de micropartículas para la liberación controlada de antígenos tienen un peso molecular de entre 12.000 y 200.000. Existen biopolímeros de menor peso molecular, pero sus propiedades no son las más adecuadas para este propósito. Entre tanto, biopolímeros con peso molecular demasiado alto dificultan la preparación de estos sistemas (López & Galán, 2010)

3.5.3 Temperatura de transición vítrea (Tg)

Además de la composición y el peso molecular, la temperatura necesaria para alcanzar el estado vítreo (rígido y frágil) de estos biopolímeros, la cual es conocida como temperatura de transición vítrea (Tg), es una propiedad muy importante que debe tener en cuenta en la preparación de las microesferas y esencial para la evaluación de la estabilidad morfológica, propiedades de difusión y velocidad de biodegradación.

La Tg tiene relación directa con el peso molecular del biopolímero. La presencia de solventes orgánicos residuales o humedad en estos sistemas puede alterar la Tg en varios grados centígrados puede llegar a un valor cercano al de la temperatura corporal, lo cual podría afectar la velocidad de degradación de las nanoesferas y por consiguiente al perfil de liberación del antígeno. Además, podría verse disminuida a una temperatura equivalente a la de almacenamiento y causar alteraciones morfológicas y aglomeración de nanopartículas. (López & Galán, 2010)

3.6 ÁCIDO POLI-LÁCTICO (PLA)/ÁCIDO POLI-LÁCTICO-CO-GLICÓLICO (PLGA)

Entre los poliésteres utilizados en el desarrollo de nanopartículas destacan los poliésteres alifáticos, formados por una sucesión de unidades monoméricas de ácido láctico o bien de dímero láctico-co-glicólico. Estos biopolímeros han sido aprobados por la FDA para elaboración de sistemas de liberación de fármacos y otros usos biomédicos como la fabricación de suturas biodegradables. El L-PLA y el PLGA son compuestos que corresponden respectivamente al homopolímero lineal del ácido poli-L-láctico y a copolímeros lineales del D,L ácido láctico y glicólico, los cuales se pueden encontrar en proporciones monoméricas variables. La copolimerización del PLGA puede ser llevada a cabo por dos rutas distintas de síntesis:



1) policondensación del ácido láctico y del ácido glicólico a temperatura superior a 120 °C, o por debajo de esta temperatura en presencia de catalizadores, obteniendo así PLGA de bajo peso molecular ($PM < 10.000$ Da)

2) polimerización vía apertura de los dímeros cíclicos de los dos respectivos ácidos, resultando en copolímeros de alta masa y mejores propiedades mecánicas. Por otro lado, el peso molecular de PLA/PLGA es un parámetro que influye en la homogeneidad de la muestra. En general, polímeros de elevado peso molecular dan lugar a sistemas nanoparticulados con un bajo índice de polidispersión.

Las nanopartículas biodegradables de PLGA han sido utilizadas como vectores para la liberación controlada de proteínas, péptidos, vacunas, genes, factores de crecimiento, etc. (Rocha & Ansorena, 2009)

El PLGA presenta ventajas y desventajas como biomaterial para la encapsulación de macromoléculas terapéuticas. La degradación del PLA/PLGA, que ocurre por hidrólisis no enzimática, puede dar lugar a una acumulación de sus monómeros ácidos, lo que resulta en la reducción del pH local y consecuente desnaturalización de proteínas encapsuladas. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la ausencia de toxicidad de sus productos de degradación y su modulable velocidad de degradación hacen del PLGA el poliéster más utilizado en formulaciones nanoparticuladas de aplicación terapéutica. Otra importante ventaja del PLGA sobre el L-PLA, es que al presentar una velocidad de degradación más rápida, la probabilidad de que ocurran reacciones adversas debido a fragmentos cristalinos liberados por estos últimos, sea menor (Rocha & Ansorena, 2009)

3.7 NANOPARTÍCULAS A BASE DE POLIÉSTERES

Dentro de la nanotecnología, la búsqueda de polímeros para aplicaciones biomédicas ha experimentado un importante avance en las últimas tres décadas. Sobre todo, el estudio y desarrollo de polímeros sintéticos como componentes importantes de matrices utilizadas como vectores de moléculas terapéuticas. Dentro de los polímeros sintéticos destacan los poliésteres debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Los más utilizados son el ácido láctico (PLA) y los copolímeros formados por unidades monoméricas de ácido láctico y glicólico (PLGA), ya que han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para elaborar sistemas para la administración de sustancias activas por vía parenteral. Además, modificando el peso molecular, su grado de hidrofilia y la proporción de cada uno de los polímeros se puede controlar la velocidad de degradación de los mismos, el grado de encapsulación y el de liberación del fármaco o principio activo. Otros polímeros empleados para la obtención de nanopartículas son la poli- ξ -caprolactona, el poli-hidroxibutirato y el ácido-l-málico. El polímero empleado para formular las



nanopartículas afecta de manera importante a las propiedades y estructura de las partículas y condiciona sus posibles aplicaciones, así como la vía de administración.

Recientemente han resultado útiles los sistemas de liberación a base de polímeros biodegradables para formulaciones de liberación controlada de uso parenteral, debido a sus posibilidades de controlar la liberación del fármaco de forma efectiva. Entre estos polímeros han desempeñado una función importante los de los ácidos lácticos y glicólico teniendo en cuenta su disponibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y biocompatibilidad.

Con el fin de obtener mejores eficacias de encapsulación los poliésteres han sido empleados combinados con otros polímeros hidrofílicos lo que permite modificar las propiedades de la superficie de las nanopartículas obtenidas.

En este sentido, también se han llevado a cabo combinaciones de los poliésteres con el polivinil alcohol (PVA) con el fin de estabilizar las nanopartículas obtenidas.

Una gran variedad de fármacos pueden ser administrados utilizando vectores nanoparticulados. Así, las nanopartículas se pueden emplear para la liberación de sustancias tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Además pueden ser formuladas para que su liberación sea dirigida a determinados tejidos u órganos, como por ejemplo al cerebro, pulmones, hígado, bazo, sistema linfático, etc. Por lo tanto, las ventajas de este tipo de nanopartículas formuladas con poliésteres son las de ofrecer una protección al principio activo en las condiciones biológicas y permitir una liberación sostenida en el tiempo evitando así administraciones repetidas, lo que conlleva una mayor comodidad para el paciente. (Rocha & Ansorena, 2009)

Dentro de estas formulaciones se encuentran las nanoesferas que se han utilizado exitosamente para encapsular una amplia variedad de principios activos, incluyendo citostáticos, antiinflamatorios, péptidos y hormonas, entre otros. Estas nanoesferas son partículas esféricas análogas de las nanocápsulas pero sin una distinción clara entre núcleo y pared. Tiene una estructura monolítica preparada a partir de materiales biodegradables y con un gran espectro de velocidad de cesión y propiedades degradativas, donde el principio activo o agente terapéutico está distribuido a través de la matriz como una dispersión molecular o de partículas. Se han usado varios métodos para la preparación de nanoesferas de diferentes polímeros biodegradables, incluyendo polímeros naturales y sintéticos. La selección de un método de preparación adecuado depende de las propiedades del polímero y el principio activo que se utilice y puede afectar las características de las nanoesferas. (Ramos & Gómez, 2001)



Tabla 1. Estructuras de poliésteres utilizados comúnmente en nanotecnología

POLIÉSTER	ESTRUCTURA QUÍMICA
Ácido poliglicólico (PLA)	
Ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA)	
Policaprolactona (PCL)	
Polihidroxibutirato (PHB)	

3.7.1 NANOPARTÍCULAS A BASE DE ÁCIDO POLI-LÁCTICO-CO-GLICÓLICO

Entre los biopolímeros utilizados en el desarrollo de sistemas de nanopartículas para liberación controlada de fármacos, destacan los poliésteres alifáticos, formados por unidades monoméricas de ácido láctico y de ácido glicólico (PLGA). Estos biopolímeros están disponibles comercialmente para uso médico y han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para elaborar sistemas para la administración de sustancias activas por vía parenteral. Además, gracias a su biocompatibilidad, han sido ampliamente empleados en numerosas aplicaciones biomédicas, tales como suturas reabsorbibles e implantes.

En 1984 se reportó la utilización de microesferas elaboradas con PLGA para la liberación de la hormona luteinizante, y posteriormente se propuso la utilización de estos biopolímeros para la elaboración de sistemas de micropartículas para la liberación controlada de antígenos virales y bacterianos. Desde entonces, un amplio número de antígenos y fármacos de diversa naturaleza han sido microencapsulados en microesferas elaboradas con PLA y PLGA. (Rocha & Ansorena, 2009)



3.7.1.1 Biocompatibilidad

La degradación de PLA/PLGA ocurre por hidrólisis no enzimática, y genera como productos finales, ácido láctico y ácido glicólico, los cuales son posteriormente eliminados del cuerpo por medio del Ciclo de Krebs. Se ha demostrado la excelente biocompatibilidad de PLA/PLGA como materiales de sutura e implantes. En el caso de sistemas de micropartículas para administración parenteral, es un hecho conocido que después de la inyección intramuscular, subcutánea o intradérmica, se genera una respuesta inflamatoria aguda con presencia de macrófagos como células mayoritarias, 15 días después de la inyección y al final de la degradación del biopolímero. (Rocha & Ansorena, 2009)

4 CARACTERIZACIÓN

La nanotecnología utiliza un amplio rango de técnicas para el estudio de materiales y estructuras que están basados en la creación o presencia de partículas que tienen al menos una dimensión espacial inferior a 100 nm. A menudo estos materiales nano-estructurados presentan propiedades distintas a los materiales tradicionales, aún a pesar de estar compuestos por los mismos constituyentes químicos. (Oviedo, 2007)

Es necesario caracterizar los nanomateriales y las nanopartículas en este caso para poder estudiar las propiedades en un margen amplio de aplicaciones tecnológicas.

La caracterización de las nanopartículas incluye entre otras la microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia IR, dispersión de luz dinámica (DLS) y Potencial Z.

4.1 DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

La dispersión de luz dinámica es una tecnología bien adaptada a la medición de tamaño de nanopartículas en suspensiones.

DLS es una técnica óptica ampliamente utilizada para la medición de diámetros medios. Básicamente, el instrumental empleado consiste en:

- i) una fuente de luz láser monocromática que incide sobre la muestra a analizar;
- ii) un fotómetro posicionado a un dado ángulo de detección, θ_r , medido con respecto a la dirección de incidencia del láser sobre la muestra, y que colecta la luz dispersada por las partículas;
- iii) un correlador digital que conjuntamente con un software específico, permiten obtener la función de auto correlación de primer orden de la intensidad de luz dispersada a cada ángulo (Clementi, 2008)



4.2 POTENCIAL ZETA

El potencial Z es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre las partículas. Su medida proporciona una idea detallada de los mecanismos de dispersión y es la clave del control de dispersión electrostático

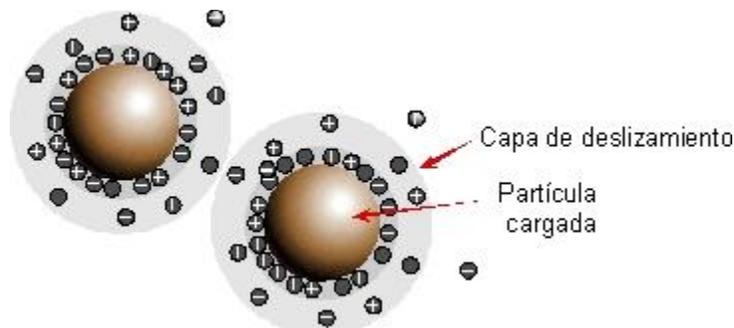


Figura 5. Representación esquemática de una partícula cargada y su capa de deslizamiento

El potencial Z es un parámetro extremadamente importante en una gran variedad de actividades industriales como las bebidas, cerámica, farmacéutica, medicina, procesamiento mineral o tratamiento de aguas. Muchas industrias usan grandes cantidades de agua, que pueden ser contaminadas durante el proceso de producción. El potencial Z puede ser usado para optimizar el uso de floculantes excesivamente caros y la velocidad del proceso de floculación

Cuando se formula una nueva suspensión o emulsión, uno de los mayores consumidores de tiempo es la medida de la estabilidad de las formulaciones candidatas en una gran variedad de condiciones. El potencial Z puede ser usado para el ensayo con éstas formulaciones para rechazar aquellas que resulten pobres en una etapa temprana; reduciendo el costo de un estudio de estabilidad. (iesmat, 2013)

4.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales inorgánicos y orgánicos, entregando información morfológica del material analizado. A partir de él se producen distintos tipos de señal que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características. Con él se pueden realizar estudios de los aspectos morfológicos de zonas microscópicas de los distintos materiales con los que trabajan los investigadores de la comunidad científica y las empresas privadas, además del procesamiento y análisis de las imágenes obtenidas. Las principales ventajas del SEM son la alta resolución ($\sim 100 \text{ \AA}$), la gran profundidad de campo que le da apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras.



El microscopio electrónico de barrido puede estar equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: un detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución SEI (Secondary Electron Image), un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie BEI (Backscattered Electron Image), y un detector de energía dispersiva EDS (Energy Dispersive Spectrometer) permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis e imágenes de distribución de elementos en superficies pulidas. (Grágeda, 2010)

Microscopio electrónico de barrido (SEM)

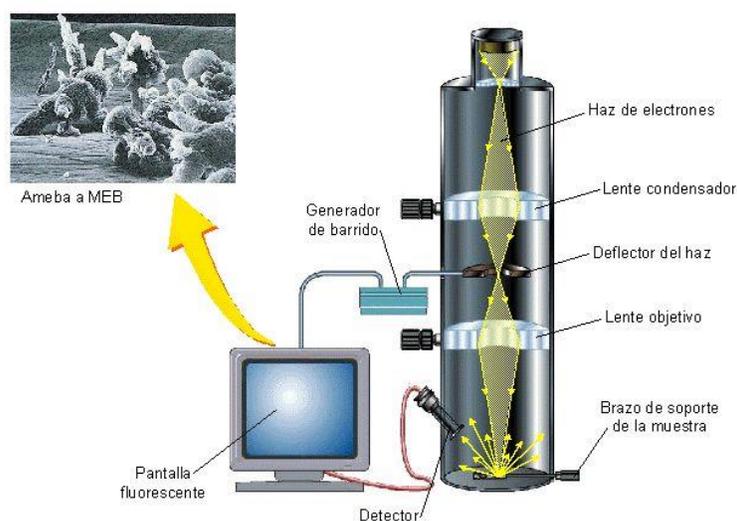


Figura 6. Representación esquemática de las partes de un microscopio electrónico de barrido.

4.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) aplicada a las ciencias de la vida permite estudiar a nivel celular y subcelular, citoquímico e inmunocitoquímico muestras biológicas, tejidos animales y vegetales, cultivos celulares y bacterianos, virus, estructuras subcelulares, y macromoléculas.

El microscopio electrónico de transmisión es un instrumento que utiliza como fuente de iluminación un haz de electrones que son generados por un filamento de tungsteno cuando este por efecto termoiónico se pone incandescente. Estos electrones son acelerados y dirigidos hacia la muestra mediante lentes electromagnéticas en condiciones de alto vacío.

Con el fin de observar la muestra en el microscopio electrónico de transmisión hay que prepararla previamente según métodos específicos de fijación, inclusión ultramicrotomía, o



crioultramicrotomía. La imagen que se obtiene es plana y monocromática (en blanco y negro) y se puede llegar a un límite de resolución de 0.3 nm.

Microscopio electrónico de transmisión (TEM)



Figura 7. Representación esquemática de las partes de un Microscopio electrónico de transmisión

Tabla 2. Resumen y comparación de las diferentes técnicas empleadas para la evaluación de tamaño de partícula.

Abreviatura	Técnica	Intervalo de análisis	Ventajas	Limitaciones
SEM	Microscopía electrónica (barrido electrónico)	50nm-100µm	Apariencia tridimensional y morfología de la muestra.	Delicada preparación de la muestra y su influencia en el resultado. Necesita alto vacío.
TEM	Microscopia electrónica de transmisión	50nm-100µm	Mayor capacidad de aumento y mayor resolución que la SEM	Delicada preparación de la muestra y su influencia en el resultado. Apariencia Bidimensional. Necesita alto vacío.



ESEM	Microscopía electrónica	50nm-100µm	No hay necesidad de recubrimiento conductor. Permite trabajar en modo de bajo vacío. Elevada resolución y gran profundidad de campo.	Complejidad de operación.
AFM	Microscopía electrónica detecta fuerzas a nivel atómico	10nm-1µm		Imposibilidad de efectuar barridos muy grandes de la superficie
Contador coulter	Señal eléctrica relacionada con el diámetro al pasar la partícula a través de un orificio.	100nm-1000µm	Facilidad de Operación	Estrecho rango en escala nanométrica. Ajustes y cambio de componentes del aparato para efectuar el análisis a lo largo de un amplio intervalo de diámetros. No proporciona información de la morfología de la muestra.
DLS	Dispersión de luz	60 nm - 2 mm	Dispositivo totalmente automatizado capaz de hacer medidas de movilidad sobre suspensiones coloidales diluidas con gran precisión.	



5 TOXICIDAD

Las propiedades de los nanomateriales, tales como área de la superficie, composición química, tamaño, forma o carga, tienen una influencia importante en sus propiedades toxicológicas. Por tanto, estos nanomateriales pueden ser igual o más perjudiciales que las partículas o fibras de escala no nanométrica del mismo material.

Un aspecto importante es si la versión en nanoescala de un material en particular supone un riesgo que sea significativamente diferente, en tipo o intensidad, de la forma en macroescala del mismo material. Por ejemplo, tipos de polvo como el TiO_2 que se habían considerado como no tóxicos y que se habían utilizado incluso como polvo no nocivo de control en estudios de toxicología de partículas, han mostrado respuesta tóxica en su versión nano.

La información toxicológica del material en escala normal puede servir como base para las estimaciones preliminares sobre la toxicidad de una nanopartícula, junto con los estudios toxicológicos *in vivo* e *in vitro* y los estudios epidemiológicos que hayan podido realizarse.

Hasta el momento, los estudios experimentales en animales han mostrado que la respuesta biológica a ciertas nanopartículas puede ser mayor que la encontrada para la misma masa de partículas más grandes de composición química similar, debido probablemente al aumento del área superficial. Además del número de partículas y del área superficial, otras características podrían influir en la respuesta biológica, incluyendo la solubilidad, forma, carga, superficie química, propiedades catalíticas, contaminantes adsorbidos (por ejemplo, metales pesados o endotoxinas), así como el grado de aglomeración. (Gálvez & Celia, 2010)

5.1 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS

5.1.1 QUÍMICOS

5.1.1.1 *Composición química*

La composición química de la sustancia es obviamente uno de los parámetros que determinan sus propiedades toxicológicas, ya que, en principio, cuanto más tóxico sea el material a tamaños de partículas convencionales, mayor será también su toxicidad a nivel nanométrico. (Gálvez & Celia, 2010)

5.1.1.2 *Solubilidad*

La solubilidad (en fluidos biológicos) es otro parámetro importante. Dependiendo de su composición química algunas nanopartículas pueden disolverse más rápidamente que otras en los fluidos biológicos. Al disolverse se pierde la estructura de nanopartícula y las propiedades toxicológicas específicas de éstas, son similares a las de cualquier otro contaminante con efectos sistémicos. (Gálvez & Celia, 2010)



5.1.2 FÍSICOS

5.1.2.1 *Tamaño*

El pequeño tamaño de las nanopartículas, que constituye su principal característica diferencial, les confiere unas propiedades importantes desde el punto de vista toxicológico, pues al disminuir el tamaño se produce un considerable aumento del área por unidad de superficie y un mayor número de átomos en la superficie, lo que aumenta la reactividad de la partícula. En general, cuanto más reactiva sea una sustancia, más tóxica es. Esto hace que una determinada masa de nanomateriales en forma de nanopartículas sea más reactiva que la misma masa de material en escala mayor. (Gálvez & Celia, 2010)

5.1.2.2 *Forma*

Las nanopartículas pueden tener diferentes formas (esfera, fibra, tubo, anillo, hojas...). Se ha comprobado que, en términos generales, la toxicidad es mayor para nanopartículas con forma tubular, seguida de formas irregulares, y sería menor para nanopartículas esféricas, considerando iguales el resto de parámetros toxicológicos.

La toxicidad parece, por tanto, estar agravada por la forma fibrosa o filamentosa de las nanopartículas. (Gálvez & Celia, 2010)

5.1.2.3 *Estado de aglomeración*

Las nanopartículas tienen una tendencia natural a formar aglomerados o agregados, de hecho las nanopartículas no suelen encontrarse aisladas.

Los aglomerados son grupos de partículas unidas mediante fuerzas relativamente débiles tipo van der Waals, electrostáticas o de tensión superficial, que pueden redispersarse por medios mecánicos. Mientras que los agregados son grupos de partículas fuertemente asociadas cuya redispersión por medios mecánicos no resulta fácil.

Estos dos fenómenos pueden cambiar el lugar de depósito de las nanopartículas en el organismo, ya que un agregado de nanopartículas se depositará en unas zonas u otras del tracto respiratorio dependiendo de su estado de agregación o aglomeración debido al distinto diámetro aerodinámico. También pueden modificar la toxicidad pues, en una estructura relativamente compacta, el área de superficie específica expuesta es menor teóricamente que la de una estructura abierta o tipo cadena. (Gálvez & Celia, 2010)

5.2 PRINCIPALES VÍAS DE ENTRADA

Existen tres vías principales mediante las cuales los seres humanos pueden estar expuestos a nanomateriales: a) vía inhalatoria) vía dérmica, c) vía digestiva.

5.2.1 INHALATORIA

Los nanomateriales inhalados, dependiendo de su tamaño, forma y composición química, son capaces de penetrar y depositarse en los diferentes compartimentos del aparato respiratorio, en la región extra-torácica incluyendo la boca, fosas nasales, la laringe y la



faringe; la región traqueo-bronquial, de la tráquea a los bronquios; y la región alveolar que comprende los bronquiolos y los alvéolos. La deposición puede tener lugar como consecuencia de la sedimentación gravitatoria, la impactación inercial, la intercepción, de las partículas con la superficie de contacto; por fenómenos de difusión relacionados con los movimientos aleatorios de las partículas muy finas y por la atracción electrostática debida a su carga. Las partículas de alrededor de 300 nm son las que se depositan menos ya que son demasiado gruesas para que los fenómenos de difusión les puedan influir y, por otro lado, son demasiado pequeñas para que los fenómenos de impactación y sedimentación tengan influencia sobre ellas. A partir de este valor la deposición crece de manera significativa siendo la difusión el fenómeno predominante. Las partículas ultrafinas superiores a 10 nm se depositan mayoritariamente en la región alveolar y las inferiores a 10 nm se depositan principalmente en la región extratorácica y en una menor cantidad en la región traqueo bronquial. En estudios realizados con ratas se ha observado que pueden depositarse nanopartículas en la región nasal y que éstas, son capaces de trasladarse hasta el cerebro a través del nervio olfativo. (Gràcia & Lluís, 2010)

5.2.2 DÉRMICA

No se han descrito efectos específicos para la salud relacionados con la exposición dérmica a partículas ultrafinas, aunque hay estudios que sugieren que este tipo de partículas pueden penetrar a través de los folículos pilosos, donde los constituyentes de las partículas pueden disolverse en condiciones acuosas y penetrar a través de la piel. Por otro lado, hay que tener en cuenta que, dado que la penetración directa a través de la piel ha estado descrita para partículas con un diámetro de 1000 nm (1 μm), es razonable pensar que las nanopartículas penetrarán con mayor facilidad. (Gràcia & Lluís, 2010)

5.2.3 DIGESTIVA

Tampoco se han descrito efectos específicos para la salud relacionados con la ingestión de nanopartículas que puede tener lugar debido a malas prácticas higiénicas durante el manejo de nanomateriales o también a través de la deglución de las retenidas en las vías altas de sistema respiratorio. (Gràcia & Lluís, 2010)

6 NANOTOXICOLOGÍA

Los avances en ingeniería de nano estructuras con un control muy preciso en forma y tamaño, la elucidación de sus propiedades únicas y la demostración de sus amplias aplicaciones han hecho a la nanotecnología una excitante área de investigación. Ya que este campo pasó de descubrimientos académicos a productos industriales, han surgido ciertas preocupaciones respecto a la toxicidad de las nano estructuras. Actualmente, no se tiene un entendimiento completo sobre la relación de las interacciones con respecto a la forma, tamaño, composición y agregación de estos sistemas y no es claro si la exposición a humanos, animales, insectos y plantas pueden producir respuestas biológicas dañinas. Es



por esto que surgió una nueva subdisciplina de la nanotecnología, llamada nanotoxicología (Chan, 2007).

Dentro de la nanotoxicología los estudios *in vitro* utilizando líneas celulares son actualmente los más socorridos y pueden dar indicios muy importantes sobre la toxicidad de sistemas mesoscópicos en general. Sin embargo, siempre queda la duda de si en un sistema biológico completo la toxicidad será correlacionable. Por esta razón el estudio en modelos *in vivo* es necesario

Las alteraciones bioquímicas, fisiológicas moleculares o celulares inducidas por agentes xenobióticos permiten correlacionar estos eventos con la dosis de exposición y los niveles del agente tóxico con la magnitud de los diferentes efectos al organismo. Por ello se ha tenido que utilizar biomarcadores, los cuales son observaciones medibles de las alteraciones biológicas. Se pueden definir como modificaciones, presencia de componentes, estructuras, procesos y/o reacciones que se atribuyen de manera directa o indirecta a la exposición de sustancias xenobióticas. Los biomarcadores se dividen en tres categorías: de exposición, efecto o susceptibilidad. Con ellos es posible establecer una evaluación de riesgo en consideración de variables toxicocinéticas y toxicodinámicas (Gasca, 2012).

“En general todos los autores distinguen tres tipos de biomarcadores: de exposición, de susceptibilidad y de respuesta (o efecto)” (Manahan, 2002).

6.1 BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN

Puede ser un compuesto exógeno (o un metabolito) dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales (sangre y orina) o incluso aire espirado. En el caso de tóxicos acumulativos, la dosis interna puede también reflejar la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales. Por ejemplo, la concentración de bifenilos policlorados (PCBs) en sangre refleja la cifra acumulada en los principales órganos de depósito (tejido graso). Bernard y Lauwerys dividen los biomarcadores de exposición en dos subgrupos: selectivos y no selectivos, basándose en la especificidad de las pruebas de detección. Los biomarcadores selectivos se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos (ej. plomo en sangre) y los no selectivos constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición (ej. tioéteres en orina como indicadores de exposición a sustancias electrófilas y, por tanto, reflejo de la absorción de sustancias mutagénicas y cancerígenas (Gil, 2008)



6.2 BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD

Sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Se deben generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN y sus fragmentos de restricción (RFLPs), clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas

Entre ellos podemos distinguir dos tipos: marcadores de polimorfismos de sistemas activadores y marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores. Los marcadores de polimorfismos de sistemas activadores permiten estimar la actividad de las enzimas del citocromo P-450. Las hemoproteínas conocidas como citocromos P450 (CYP) están implicadas en la toxicidad de numerosos xenobióticos. El sistema isoenzimático microsomal del citocromo P450 humano está constituido por un mínimo de 30 genes diferentes, que se agrupan en distintas familias (en función de la semejanza de secuencias aminoacídicas) de las cuales las más importantes son las familias I, II, III y IV [11-13] que a su vez, se agrupan en subfamilias (A, B, C, D,.....) Constituidas por genes polimórficos, de los cuales en la toxicocinetica los más importantes son el CYP1A1 de la familia I (representa la actividad de la arilhidrocarburo hidroxilasa) y el CYP1IIC8 y CYP1IID6, de la familia II. (Gil, 2008)

6.3 BIOMARCADORES DE RESPUESTA

El biomarcador de respuesta o efecto es indicativo de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARN-m, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos (auto anticuerpos) contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (núcleo, membrana, etc...) (Gil, 2008)

7 EVALUACIONES DE LA CAPACIDAD CITOTÓXICA

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado.

Los llamados ensayos de citotoxicidad son capaces de detectar mediante diferentes herramientas metodológicas, alteraciones a mecanismos celulares conocidos, efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o reparación del daño entre otras. Estos nos permiten conocer las repercusiones producto de la exposición de sustancias xenobióticas con la potencialidad para comprometer la viabilidad de diversos fenómenos celulares, bioquímicos o moleculares. Dentro de estos eventos destaca el estudio de la integridad membranal. Este tipo de daño, puede a su vez; relacionarse con alteraciones específicas de estructuras como el citoesqueleto, metabolismo celular, síntesis y degradación proteica, liberación de



constituyentes celulares o productos, la regulación iónica y la división celular entre otros eventos toxicodinámicos (Brenda Gasca, 2012).

Se considera que el estrés oxidativo es una respuesta de la célula a diversas fuentes de daño, que se expresa por una relación anormal entre especies de alto potencial oxidante y los sistemas antioxidantes, a favor de las primeras; con alteraciones en la relación estructura-función de los diferentes niveles de organización biológica. La magnitud del estrés dependerá de la capacidad celular en modular los efectos de las especies reactivas (Ela Céspedes Miranda, 2008).

A continuación se mencionan los dos ensayos utilizados en este trabajo para estimar el estrés oxidativo asociado a la exposición de nanopartículas a base de PLGA.

7.1 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR

Dentro de la batería de ensayos *in vitro* como métodos de toxicología alternativa útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad.

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. A partir de aquí, diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para evaluar la viabilidad celular resultante a la exposición a fármacos y compuestos químicos los efectos tóxicos de las drogas y los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios, órganos o células aisladas y líneas celulares establecidas. Dentro de los ensayos conocidos y validados se encuentran el ensayo de captación del rojo neutro, enlazamiento al azul de kenacid y el ensayo de reducción del Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) entre otros (Arencibia & Rosario, 2003).

7.1.1 VIABILIDAD CELULAR (MTT)

Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo lo cual es capaz de medirse mediante la formación de un compuesto colorido, formado durante la acción mitocondrial debida a una reacción de reducción. El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble que se conoce como formazan. El producto de la reacción queda retenido en las células y puede ser liberado mediante su solubilización. De esta forma es cuantificada la cantidad de MTT reducido mediante un método espectrofotométrico, ya que se produce como consecuencia de la reacción un cambio de coloración del amarillo al azul. La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la Integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazan



después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa (Arencibia & Rosario, 2003)

Análisis de los resultados.

Los resultados se expresarán como porcentaje (%) de células vivas, según la siguiente relación:

$$\% = \frac{\text{Absorbancia células tratadas}}{\text{Absorbancia células controles}} \times 100$$

7.1.2 GLUTATIÓN (GSH)

La creciente participación de los radicales libres en un gran número de patologías ha provocado un gran interés en el área médica por conocer mucho más sobre ellos, por lo que en los últimos años se han acentuado su estudio para poder saber de qué forma es que dañan a nuestro organismo. El aumento descontrolado de radicales libres en nuestro organismo va a provocar lo que se conoce como estrés oxidativo, ya que ocurre un desbalance entre la producción de sustancias pro-oxidantes y sustancias antioxidantes, éste estrés oxidativo se asocia al envejecimiento y a varias patologías como la Diabetes Mellitus, Síndrome Metabólico, Enfermedad Cardiovascular, entre otras. Un importante antioxidante natural de nuestro organismo es el Glutatión; El glutatión existe en estado reducido (GSH) y oxidado (GSSG). En estado reducido, el grupo tiol de la cisteína es capaz de donar un equivalente de reducción ($H^+ + e^-$) a otras moléculas inestables, tales como las especies reactivas del oxígeno. En la donación de un electrón, el glutatión mismo llega a ser reactivo, pero reacciona fácilmente con otro glutatión reactivo para formar disulfuro de glutatión (GSSG). Esta reacción es posible gracias a la relativamente alta concentración de glutatión en las células (hasta 5 mm en el hígado). El glutatión puede ser regenerado a partir de GSSG mediante la enzima glutatión reductasa. Su cuantificación permite asociarla con el estado óxido-reducción presente tras la exposición a agentes xenobioticos

En las células y tejidos sanos, más del 90% del glutatión total está en la forma reducida (GSH) y menos del 10% en forma de disulfuro (GSSG). Un aumento de la proporción GSSG/GSH se considera una señal de estrés oxidativo.

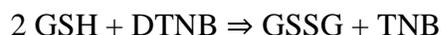
Uno de los problemas importantes en la determinación tanto de los mecanismos de estrés oxidativo y de señalización REDOX es la medición de las diferentes formas de tioles en las células. Las formas predominantes son la forma reducida de GSH y GSSG (Henry Jay Forman, 2009).

Considerando la importancia del GSH en la modulación del estrés oxidativo celular en este trabajo se estimara su concentración en células hepáticas expuestas a las nanopartículas de interés con objeto de conocer los efectos sobre los niveles de GSH intracelular.



El ensayo de glutatión (GSH) se realizó empleando una reacción de óxido-reducción con el ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB)

Este ensayo cíclico tiene lugar en dos pasos. En el primero de ellos el glutatión reducido en presencia de DTNB se oxida:



Y en un segundo paso la enzima glutatión reductasa cataliza la reacción siguiente:



Siendo:

GSH: forma reducida del glutatión.

GSSG: forma oxidada del glutatión.

DTNB: 5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico).

TNB: 5-thio-2-ácido nitrobenzoico.

NADPH: forma reducida del fosfato del dinucleótido de nicotinamida y de adenina.

NADP+: forma oxidada del fosfato del dinucleótido de nicotinamida y de adenina (Navarro & Duque, 2010)

8 JUSTIFICACIÓN

El avance tecnológico y científico de nuestros tiempos, sin lugar a dudas, le ha proporcionado al ser humano la posibilidad de intervenir sobre otros seres y sobre su medio, lo cual ha producido modificaciones esenciales, profundas y de un efecto aún no conocido hasta el presente en el campo científico y en el momento actual, de gran expansión tecnológica, no se puede prever cuáles serán los límites de esas modificaciones.

La nanotecnología y los nanomateriales ofrecen expectantes y nuevas oportunidades que prometen mejorar la calidad de vida de las personas, pero al mismo tiempo el conocimiento científico sobre los riesgos asociados con esos materiales es limitado, especialmente por la diversidad de nanomateriales y sus potenciales aplicaciones.

Diversos estudios *in vitro* e *in vivo* se han realizado en diferentes especies animales para determinar la biotoxicidad de las nanopartículas. Los efectos tóxicos están relacionados con sus diferentes componentes químicos, independientemente de las características y propiedades que se encuentran en la materia inicial de que son elaboradas. Las propiedades que más influyen en la toxicidad de las nanopartículas son la composición química, área de superficie, número y tamaño de las partículas.

Un aspecto importante es si la versión en nanoescala de un material en particular supone un riesgo que sea significativamente diferente, en tipo o intensidad, de la forma en macroescala del mismo material, en este caso sabemos que los sistemas de liberación



controlada deben estar constituidos por materiales biocompatibles con el organismo. Siendo así, los polímeros tienen una amplia aplicación en el desarrollo de estos sistemas, entre los biopolímeros utilizados en el desarrollo de sistemas de micropartículas para la liberación controlada de antígenos destacan los poliésteres alifáticos, formados por unidades monoméricas de ácido láctico y de ácido glicólico (PLGA), en este trabajo decidimos usar PLGA para la fabricación de nanopartículas por su creciente demanda en preparación de nanopartículas como sistemas de liberación controlada, y sobre todo porque estos biopolímeros están disponibles comercialmente para uso médico y han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration)

Con el presente trabajo se pretende generar información y los datos experimentales acerca del efecto citotóxico asociado al estrés oxidativo que pueden ejercer nanopartículas a base de PLGA de diferentes tamaños (200nm y 300nm) a células hepáticas de ratón (AML12). Conociendo algunas propiedades fisicoquímicas de las Nanopartículas en estudio será posible correlacionar estas propiedades con los efectos en sistemas biológicos experimentales en estudio.

Se ha reportado que; las superficies de las nano estructuras están involucradas en muchas reacciones oxidativas y catalíticas. Si estas reacciones inducen citotoxicidad, se ha sugerido que está podría ser más grande que la materia prima debido a la relación área/ volumen ya que para el material a nanoescala es mucho más grande. (Grácia & Lluís, 2010)

9 METODOLOGÍA

9.1 MATERIALES Y MÉTODOS

9.1.1 MATERIALES

9.1.1.1 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS A BASE DE PLGA

- ❖ Ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA)
- ❖ Polivinil alcohol (PVA)
- ❖ Acetona
- ❖ Agua destilada

9.1.1.2 CULTIVOS CELULARES

- ❖ Buffer de Fosfatos
- ❖ Pen Strep (Penicilin Streptomycin) (*GIBCO*)
- ❖ Suero fetal bovino (FBS) (*GIBCO*)
- ❖ L-Glutamine 200Mm 100x (*GIBCO*)
- ❖ Advanced DMEM (Dilbecco's Modified Eagle Medium) 1X (*GIBCO*)
- ❖ Para la preparación de PBS:
 - Fosfato de potasio monobásico 99.2% (*J.T Baker*)



- Fosfato dibásico de sodio 99-100.5% (*J.T Baker*)
- Cloruro de sodio 99.5% (*Prod.Quim.Monterrey*)
- Cloruro de potasio 100% (*J.T Baker*)

9.1.1.3 ENSAYO DE VIABILIDAD

- ❖ 2-Propanol, for molecular biology $\geq 99\%$ (*Sigma*)
- ❖ Detergente Biológico Nonidet©P40 substitute (*Biochemika Fluka*)
- ❖ MTT thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide 97.5% (*TLC Sigma*)

9.1.1.4 ENSAYO DE GLUTATION

- ❖ Ácido perclórico (*J. T. Baker*)
- ❖ Protease inhibitor cocktail tablets. Complete mini, EDTA-free. (*ROCHE*)
- ❖ Detergente biológico Triton®
- ❖ EDTA sal disódica, dihidrato, cristal. Reactivo (*J. T. BAKER*)
- ❖ Glutathione reduced. (*MP Biomedicals. LLC*).
- ❖ DTNB (5,5'-Dithio-Bis (2-Nitrobenzoic Acid) (*Sigma-Aldrich*)
- ❖ Albúmina sérica bovina Molecular Biology Tested (*Sigma*)
- ❖ Protein Assay Dye Reagent Concentrate (*BIO RAD*)

9.1.2 SOLUCIONES

9.1.2.1 MEDIO DE CULTIVO

- Medio de cultivo DMEM advance (*GIBCO*) suplementado con L-glutamina 0.04M, SFB al 5% y 1% de Antibiótico Streptomycin penicillium (*GIBCO*)

9.1.2.2 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTT)

- Buffer de Fosfatos pH 7.2-7.4
- MTT a una concentración de 5mcg/ml estéril
- Solución de ácido clorhídrico al 0.04N con 1% de Nonidet en alcohol isopropílico de uso biológico

9.1.2.3 ENSAYO DE GLUTATIÓN

- PBS con 1% de Tritón® e inhibidor de proteasas
- Ácido Perclórico 2.5%
- Stock de Glutación 0.05M
- Solución de DTNB
- Buffer PBS/EDTA 0.005M pH 8

9.1.2.4 SOLUCIONES PARA PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

- PVA en agua destilada
- PLGA en Acetona
- NaOH 0.01N pH 7.2-7.4



9.1.3 EQUIPOS

- Agitador magnético MRC®
Modelo GMH-5E
- Agitador mecánico Homogenizer
Glas-Col Variable Speed
Reversible. Modelo: CAT:099C
K54
- Balanza analítica Sartorius BL
120S
- pHmetro OAKTON pH 510 series
pH/mV/°C meter
- Microcentrífuga con control de
temperatura Microfuge® 22R
CentrifugeBeckmanCoulter
- ZetasizerNanoseries
- Estufa
- Espectro UV-VIS
spectrophotometer DU*64
BECKMAN
- Incubadora para cultivos celulares
Shel lab CO2 INCUBATOR
- Campana de flujo laminar
Industrias Figursa Mod. CFV-90

9.1.4 MODELOS EXPERIMENTALES

La línea celular utilizada en este proyecto para la evaluación de la capacidad citotóxica de las nanopartículas fue AML12 (hígado de ratón alfa 12).

La línea celular AML12 (alfa hígado del ratón 12) se establece a partir de hepatocitos de ratón (CD1 tensión, línea MT42) transgénicos para TGF alfa humano. (ATCC)

Por microscopía electrónica, estas células presentan características típicas de hepatocitos como peroxisomas.

9.2 MÉTODOS

9.2.1 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Para la preparación de los sistemas nanoparticulados a base de PLGA, se utilizó el método de emulsión- evaporación del disolvente.



Esquema método emulsión- evaporación

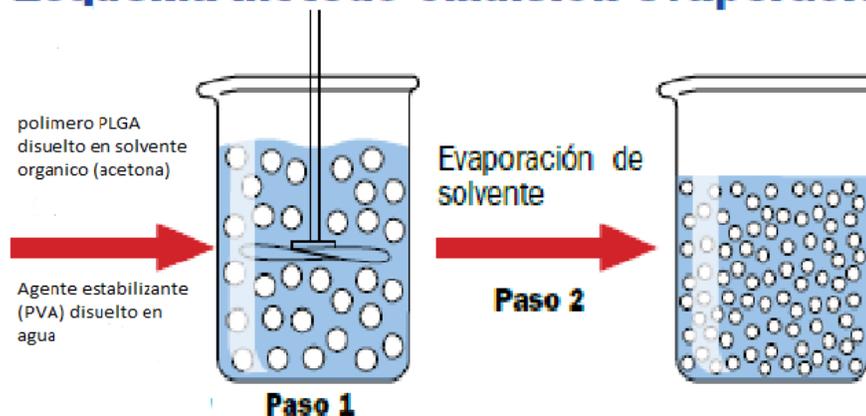


Figura 8. Esquema método preparación de nanopartículas de PLGA mediante el método emulsificación- evaporación del disolvente.

Cada sistema se preparó de la siguiente manera en concordancia con las condiciones definidas en el diseño experimental.

1. En un vaso de precipitados de 30 ml se colocan 20 ml de agua destilada y se mantienen en agitación constante con las rpm definidas en el diseño experimental.
2. Se añade a continuación la cantidad de tensoactivo (PVA) indicada para dicho sistema en el diseño experimental y se mantiene la agitación hasta disolver el tensoactivo, una vez disuelto esta será la solución A.
3. Simultáneamente en otro vaso de precipitados de 20 ml colocar el volumen de acetona requerido de acuerdo al sistema a preparar y disolver el polímero (PLGA), una vez disuelto el polímero esta será la solución B.
4. En un solo movimiento verter la solución B en la solución A, la cual continuará en agitación constante.
5. Una vez homogeneizado el nuevo sistema y después del tiempo de agitación establecido en el diseño de experimentos con ayuda de un rotavapor se eliminará el disolvente.
6. Verter el sistema resultante en un tubo de ensaye y refrigerar.
7. De esta manera se prepararon todos los sistemas.



9.2.1.1 DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES PRINCIPALES QUE INFLUYEN EN EL TAMAÑO DE LAS NANOPARTÍCULAS, EXPERIMENTO DE EXPLORACIÓN

El diseño de experimentos proporciona el marco estadístico para variar todos los factores simultáneamente y obtener información confiable con un número reducido de experimentos, es decir, con la máxima eficiencia. Dado que el material y las pruebas a realizar son costosos, se eligió esta metodología para la planeación de los experimentos en este trabajo.

Con esta primera serie de experimentos se buscó definir los factores principales que participan en la obtención de nanopartículas de PLGA por el método emulsión- evaporación del disolvente.

Se consideraron todos los factores controlables capaces de tener influencia en el proceso y en las respuestas. Estos factores constituyen un número de variables independientes, por lo que para mantener un número razonable de experimentos a realizar, se eligió trabajar únicamente con dos niveles de cada factor, a este tipo de diseños se les conoce como “screening” o de exploración.

El diseño experimental que se eligió, fue por lo tanto un diseño experimental factorial fraccionado de seis factores a dos niveles (2^{5-1}), con el fin de conocer de manera estadística cuales de estas variables independientes tienen mayor influencia sobre la respuesta evaluada (Tamaño de partícula).

Los valores superiores e inferiores de las variables se escogieron tomando en cuenta experimentación anterior en este u otro tipo de nanopartículas.

Tabla 3. Factores y niveles del experimento de exploración.

Numero de factores 5			NIVELES	
Nombre del factor	Etiqueta	Unidades	bajo	alto
Velocidad de agitación	Velocidad	rpm	100	200
Cantidad de polímero	PLGA	gramos	0.015	0.05
Cantidad de tensoactivo	PVA	gramos	0.01	0.02
Tiempo de agitación	Tiempo	minutos	5	10
Volumen de Acetona	acetona	mililitros	10	15



La respuesta que se estudio es la siguiente:

Tabla 4. Respuesta estudiada.

Respuesta	Etiqueta	unidades
Tamaño de partícula	size	nanómetros

El diseño factorial aplicado, implica realizar 16 experimentos que fueron aleatorizados para evitar errores sistemáticos. Se utilizó el software estadístico Statgraphics Centurion XV© para conocer las combinaciones de los factores y el orden aleatorio en que se deben efectuar los experimentos quedando así la preparación de los sistemas de exploración, este tipo de diseño de experimentos nos permite conocer cuáles son las variables que más efecto tienen sobre la respuesta a evaluar.

Tabla 5. Diseño experimental: Determinación de factores principales.

# De experimento	Polimero PLGA (g)	Agente estabilizante (PVA)	Acetona (ml)	Velocidad de agitación(rpm)	Tiempo de agitación(min)
1	0.015	0.01	15	100	10
2	0.05	0.01	15	100	30
3	0.05	0.02	15	100	10
4	0.015	0.02	10	200	30
5	0.05	0.02	15	200	30
6	0.015	0.01	15	200	30
7	0.015	0.02	15	100	30
8	0.05	0.02	10	200	10
9	0.05	0.01	10	100	10
10	0.015	0.02	10	100	10
11	0.05	0.02	10	100	30
12	0.015	0.01	10	100	30
13	0.05	0.01	15	200	10
14	0.015	0.01	10	200	10
15	0.015	0.02	15	200	10
16	0.05	0.01	10	200	30

9.2.1.2 Optimización del proceso

Una vez que se realiza el diseño experimental exploratorio (factorial fraccionado) se procede a ejecutar un diseño de optimización y conocer en que niveles tenemos que fijar las variables que resultaron tener mayor efecto sobre la respuesta deseada. Para efectos de ser mas didacticos.



Los resultados del diseño experimental de exploración arrojaron que las variables que más afectaban al tamaño de los sistemas nanoparticulados fueron (ver la sección de resultados): concentración de polímero (PLGA), concentración de estabilizante (PVA) y tiempo de agitación, motivo por el cual se decidió mantener la velocidad de agitación y la cantidad de disolvente constantes, así que una vez que se determinaron los factores que afectan principalmente el tamaño de partícula de los sistemas nanoparticulados, una segunda serie de experimentos se realizó fijando las variables que tenían menor influencia sobre la respuesta evaluada. En esta sección se muestra solo el diseño experimental de exploración y el diseño experimental de optimización, ya que en la parte de resultados se mostraran los valores obtenidos de cada serie de experimentos y cómo fue que escogimos las variables para realizar el diseño experimental de optimización.

La segunda serie de experimentos, se trata también de un diseño experimental factorial de tipo $3^2 \times 2^1$ y consta por lo tanto de 18 experimentos. La respuesta a estudiar nuevamente es el tamaño de partícula.

Las variables independientes y las variables fijas se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 6. Diseño del experimento de optimización.

Sistema	Polimero PLGA (g)	Agente estabilizante (PVA) (g)	Acetona (ml)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de agitación (min)
1	0.010	0.007	15	200	5
2	0.010	0.007	15	200	10
3	0.015	0.007	15	200	5
4	0.015	0.007	15	200	10
5	0.020	0.007	15	200	5
6	0.020	0.007	15	200	10
7	0.010	0.01	15	200	5
8	0.010	0.01	15	200	10
9	0.015	0.01	15	200	5
10	0.015	0.01	15	200	10
11	0.020	0.01	15	200	5
12	0.020	0.01	15	200	10
13	0.010	0.013	15	200	5
14	0.010	0.013	15	200	10
15	0.015	0.013	15	200	5
16	0.015	0.013	15	200	10
17	0.020	0.013	15	200	5
18	0.020	0.013	15	200	10



9.2.2 PREPARACIÓN DE DOS SISTEMAS NANOPARTICULADOS CON DIFERENTE TAMAÑO DE PARTÍCULA PARA EVALUAR LA CITOTOXICIDAD DE LOS MISMOS EN LÍNEAS CELULARES

Como resultado de la optimización efectuada para la preparación de los sistemas nanoparticulados se obtuvo una ecuación de predicción dentro de los rangos de las variables estudiadas y como estas modifican el tamaño de partícula, dicha ecuación fue aplicada para preparar 2 sistemas nanoparticulados con diferentes tamaños de partícula, se buscó obtener el sistema con menor tamaño y el sistema con mayor tamaño, pero al momento de filtrar a través de membrana de 0.22micras para esterilizar y poder utilizar en los cultivos celulares se obtuvieron tamaños diferentes a lo predicho por los modelos dando como resultado nanopartículas de 200 y 311 nm, la preparación de dichos sistemas se describe a continuación.-

9.2.2.1 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE 200 nm

1. Se pesaron en la balanza analítica 0.007 g de Polivinil alcohol (PVA) y 0.009621 g de PLGA.
2. Se disolvió el polivinil alcohol en la solución de NaOH con un pH 7.2-7.4 y se mantuvo en agitación constante.
3. Simultáneamente se disolvieron 0.009621 g de PLGA en 5 ml de acetona
4. El PLGA disuelto en acetona se adicionó a la solución que se encontraba en agitación la cual contenía el agente estabilizante (PVA).
5. Se mantuvo la agitación constante (200rpm) durante 30 minutos.
6. Eliminar el disolvente en un rotavapor.
7. Filtrar la solución resultante, sellar y mantener en refrigeración.

9.2.2.2 PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE 311 nm

1. Se pesaron en la balanza analítica .020 g de Polivinil alcohol (PVA).
2. Se disolvió el polivinil alcohol en la solución de NaOH con un pH 7.2-7.4 y se mantuvo en agitación constante.
3. Simultáneamente se disolvieron .050 g de PLGA en 10 ml de acetona.
4. El PLGA disuelto en acetona se adicionó a la solución que se encontraba en agitación y la cual contenía el agente estabilizante (PVA).
5. La agitación constante se mantuvo (100rpm) durante 30 minutos
6. Se eliminó el disolvente en un rotavapor.
7. Se filtró la solución resultante y se mantuvo en refrigeración.



9.2.3 ACONDICIONAMIENTO DE LAS NANOPARTÍCULAS PARA LA CARACTERIZACIÓN

Con respecto a las pruebas TEM, tamaño de partícula y potencial Z, se entregó una porción de los sistemas nanoparticulados de 200nm y 300nm respectivamente al personal responsable de realizar las pruebas, las cuales se llevaron a cabo en colaboración con Psicofarma S.A. De C.V. y cuyo análisis corrió gracias a la colaboración con la Dra. Elizabeth García García.

Para TEM únicamente se requería de una gota fijando una rejilla de cobre carbono. Se dejó secar a temperatura ambiente. Las lecturas de microscopía electrónica corrieron a cargo y en colaboración con M. en C. Sofía Hernández Gallardo.

9.2.4 ACONDICIONAMIENTO DE LAS NANOPARTÍCULAS PARA LOS CULTIVOS CELULARES

Para la administración de las nanopartículas a los cultivos celulares (AML12) se requirió un pH cercano al fisiológico (pH 7.2-7.4), sin comprometer la estabilidad de las nanopartículas se añadió por goteo Hidróxido de sodio 0.01 N hasta conseguir un pH cercano al fisiológico y esta solución de Hidróxido de sodio en adelante fue la que se usó para la preparación de las nanopartículas. Posteriormente las soluciones resultantes fueron filtradas en ambiente estéril con filtros tipo pirinola de poro 0.22micras, las condiciones descritas en este apartado serán consideradas en adelante como formulaciones finales.

9.2.5 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES

El mantenimiento de los cultivos celulares de la línea AML12 se llevó a cabo de la siguiente manera. Se sembraron las células en suspensión de cajas Petri plásticas con superficie para cultivo celular y se añadió medio DMEM “advanced” suplementado al 8% con Suero fetal bovino (SFB) y al 1% de antibióticos (pen/strept).

Después de 48 a 72 hrs de incubación las células llegan a un estado de confluencia y posteriormente fueron tripsinizadas para recuperar las células en suspensión y realizar subcultivos.

Las condiciones de incubación fueron a 37°C, 5% de ambiente de CO₂ y 90% de humedad relativa en completa esterilidad.

9.2.6 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

1. Las células AML12 se sembraron en cajas de 12 pozos.
2. Se mantuvieron en incubación a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia.
3. Cuando las células llegaron a un estado de confluencia se añadió la dosis correspondiente de nanopartículas a cada pozo de acuerdo al diseño experimental.



4. Una vez aplicado el tratamiento nuevamente se mantenían a 37 °C y 5 % de CO₂ durante 4 o 24 horas dependiendo cual fuera el caso, para permitir que la sustancia actuara en todas las células en caso de que su acción fuese sobre una fase específica del ciclo celular.
5. Después de transcurrido el tiempo de exposición se añadieron 50 µL de MTT (mg/ml) en solución tampón libre de calcio y magnesio.
6. Se incubo por 4 horas a 37 °C para permitir la formación de cristales de formazán.
7. Luego se eliminó el sobrenadante.
8. Se añadió 100 µL de isopropanol.
9. Se dejaron los cultivos a temperatura ambiente hasta que los cristales de formazán se disolvieran
10. En un espectrómetro se determinó la densidad óptica de cada muestra y se obtiene el % de viabilidad mediante la siguiente relación
% Viabilidad = DO células tratadas/ DO células control x 100

9.2.7 ENSAYO DE GLUTATIÓN

1. Se preparó una curva estándar de glutatión reducido a partir de una solución stock de 50nM.
2. Para esta prueba las células son expuestas a las nanopartículas por 4 o 24 horas dependiendo cual sea el tiempo de exposición.
3. Para la preparación de la muestra una vez transcurrido el tiempo de exposición se retiró el medio y se lavaron las células con PBS frío.
4. Se retiró el PBS con el que se lavó y se adiciono nuevamente PBS frío a cada pozo
5. Se realizó raspado para obtener las células de los pozos.
6. Se colocaron las células obtenidas de cada pozo en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 12000 rpm 4°C por 10 minutos.
7. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante. El botón resultante se re suspendió nuevamente en PBS frío con inhibidores de proteasas (0.1% Tritón X-100, 100Mm de PMSF (Fluoruro de p-metil sulfoxido), EDTA 5Mm).
8. El sistema resultante se sometió a ultrasonicación con 3 pulsos de 10 segundos cada uno a una amplitud de 97 MHz.
9. Después de la sonicación se centrifugo nuevamente a 12000 rpm 4°C por 10 minutos.
10. Se tomaron 10 microlitros del sobrenadante para determinar proteínas totales
11. A el volumen restante se agregó la misma cantidad en volumen de ácido sulfosalícilico al 5% .
12. Se centrifuga a 12000 rpm 10 min a 4°C
13. Se recupera el sobrenadante
14. Al sobrenadante recuperado se adiciona solución amortiguadora de fosfatos que contiene DTNB y EDTA



15. Se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos.
16. se realizó la lectura de absorbancia en un espectrofotómetro.

9.2.7.1 Determinación de proteínas totales mediante el método de Bradford

1. Se realizó una curva estándar utilizando albumina sérica bovina a una concentración de 1mg/ml (BSA) y reactivo de Bradford diluido 1:3 (una parte de solución de Bradford y tres partes de agua des-ionizada).
2. Para la preparación de la muestra se tomaron los 10 micro litros que se reservaron desde el tratamiento de la muestra para la determinación de proteínas y se adicionaron 490 micro litros de PBS.
3. Se tomaron 40 micro litros del sistema anterior y se adicionaron 160 micro litros de solución diluida de Bradford.
4. Las muestras se colocan en una micro placa de 96 pozos junto con la curva de calibración y se realizó la lectura en un espectrofotómetro Visible a 595nm.



METODOLOGÍA DIAGRAMA GENERAL

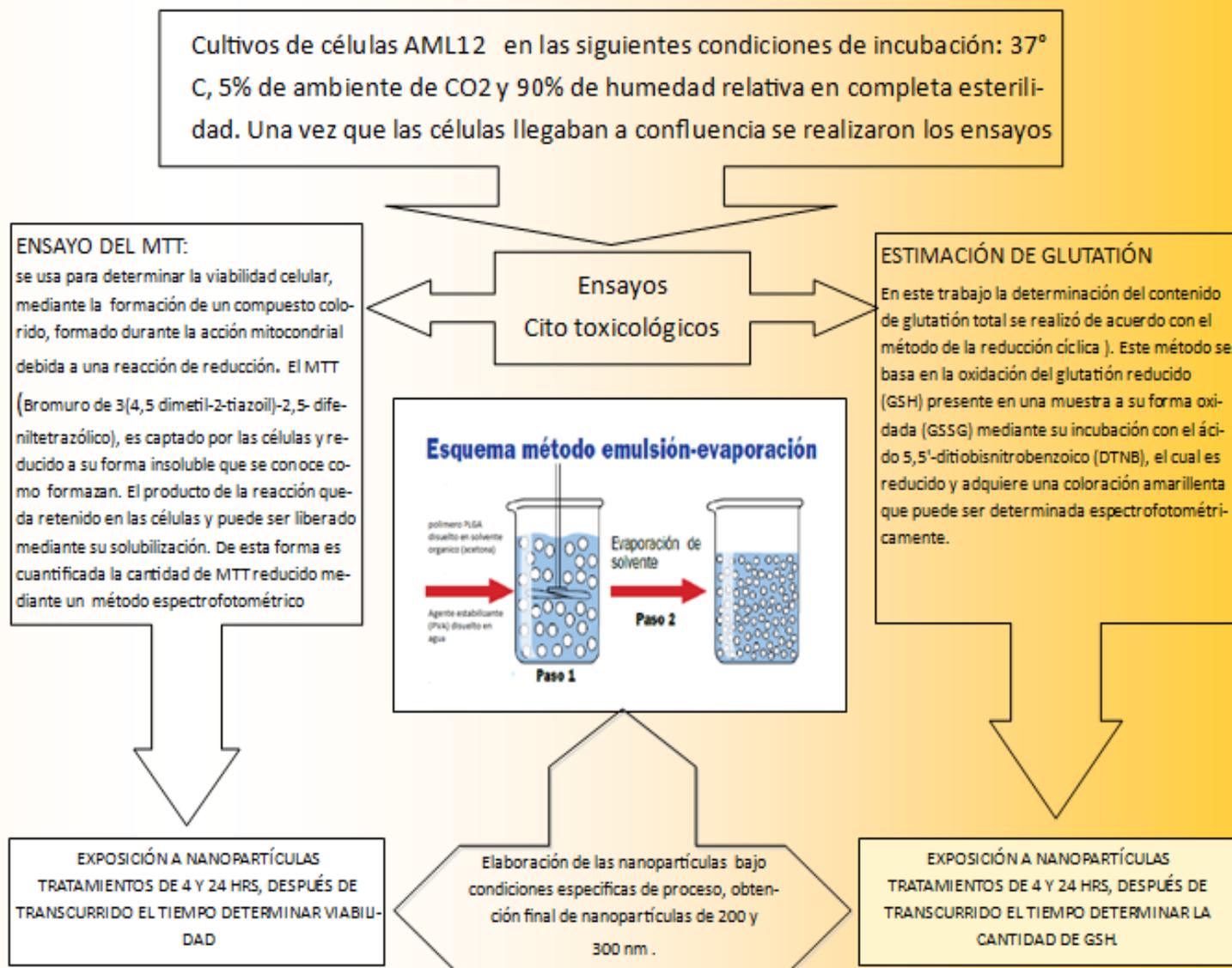


Ilustración 1. Diagrama general para metodología, preparación de nanopartículas bajo condiciones de proceso específicas para su posterior evaluación citotóxica.



10 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

10.1 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL TAMAÑO DE PARTÍCULA

10.1.1 ENSAYO DE EXPLORACIÓN

Los resultados de tamaño de partícula del experimento de exploración fueron los siguientes:

Tabla 7 .Tamaño de partícula para los experimentos de exploración.

Sistema	Polímer o PLGA (g)	Agente estabilizante (PVA)	Acetona (ml)	Velocidad de agitacion	Tiempo de agitación (min)	TAMAÑO DE PARTÍCULA (nm)
1	0.015	0.01	15	100	10	149.3
2	0.05	0.01	15	100	30	167.2
3	0.05	0.02	15	100	10	215.9
4	0.015	0.02	10	200	30	176.8
5	0.05	0.02	15	200	30	205
6	0.015	0.01	15	200	30	161.5
7	0.015	0.02	15	100	30	209.6
8	0.05	0.02	10	200	10	198
9	0.05	0.01	10	100	10	174
10	0.015	0.02	10	100	10	181.9
11	0.05	0.02	10	100	30	211.1
12	0.015	0.01	10	100	30	139.7
13	0.05	0.01	15	200	10	148.4
14	0.015	0.01	10	200	10	131.3
15	0.015	0.02	15	200	10	173.1
16	0.05	0.01	10	200	30	198

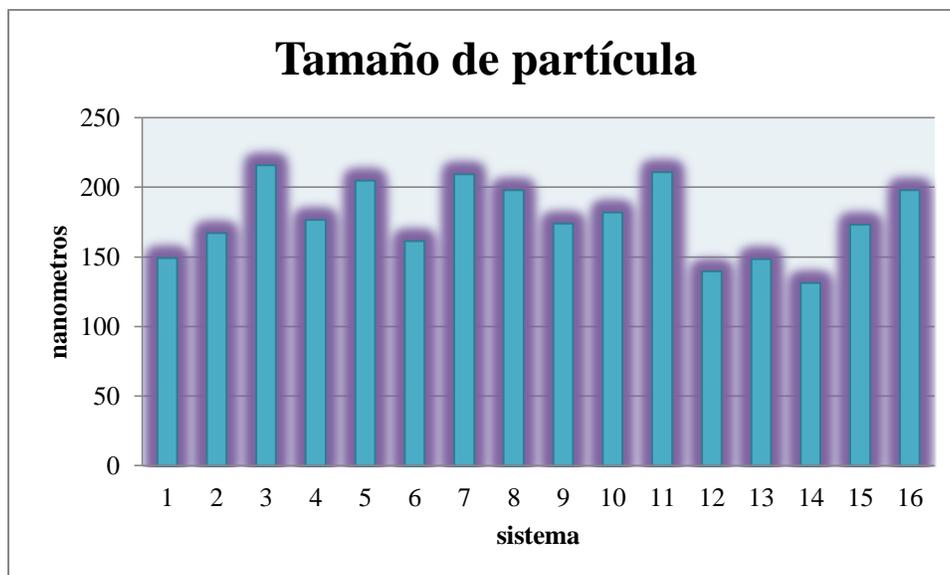


Gráfico 1. Tamaño de partícula para cada sistema obtenido en el ensayo de exploración.

Como se puede observar en los resultados para tamaño de partícula (tabla 7 y grafico 1) en los diferentes sistemas se obtuvieron nanopartículas de diferente tamaño (nm) las cuales van desde los 131.3 nm(sistema 13) hasta los 215.9 nm (sistema 3) Determinar la influencia de un factor sobre la respuesta implica conocer el cambio de esta cuando se va de un nivel a otro y su significancia estadística. Lo primero queda definido por el “efecto estimado” de cada factor y la significancia estadística puede determinarse mediante un diagrama de Pareto Estandarizado.

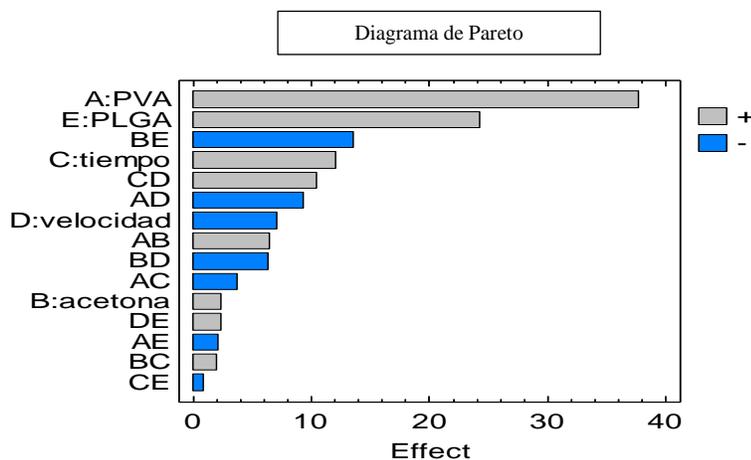


Gráfico 2. Diagrama de Pareto que muestra los factores que más afectan al tamaño de las nanopartículas de acuerdo al ensayo de exploración (“screening”).



En un diagrama de Pareto estandarizado, se representa el valor absoluto del efecto estimado para cada factor y las interacciones posibles, del más significativo al menos significativo y con una línea vertical que indica el límite de significancia estadística para un 95% de confianza.

En el Grafico 2. Se muestra el diagrama de Pareto estandarizado de los efectos estimados sobre el tamaño de partícula en el ensayo de exploración (screening), observamos que únicamente los efectos de la cantidad de PVA (Tensoactivo) y cantidad de PLGA (polímero), son estadísticamente significativos y por lo tanto estos factores pueden considerarse como variables principales.

Tabla 8. Efectos estimados de cada variable para el tamaño de partícula (“screening”).

Efecto estimado para tamaño (nm)

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>
A:PVA	37.75
B:acetona	2.4
C:tiempo	12.125
D:velocidad	-7.075
E:PLGA	24.3
AB	6.55
AC	-3.725
AD	-9.325
AE	-2.15
BC	2.025
BD	-6.425
BE	-13.55
CD	10.5
CE	-0.875
DE	2.375

De acuerdo a la Tabla 8. Podemos notar que el efecto PVA (cantidad de tensoactivo) es la variable de mayor efecto positivo (37.75), indicando que a mayor concentración de tensoactivo, mayor tamaño de partícula obtendremos y la segunda variable en importancia fue la concentración del polímero (PLGA) con un valor de 24.3 positivo lo que también indica que a mayor concentración mayor será el tamaño de partícula obtenido. Por otro lado, decidimos utilizar también la variable tiempo de agitación que aunque no era significativa mostraba un efecto importante sobre el tamaño de partícula. La variable velocidad de agitación tiene un efecto negativo, lo que significa que cuando aumenta esta variable, disminuye el tamaño de partícula y la variable cantidad de acetona tuvo un efecto muy bajo sobre el tamaño de partícula. Estas dos últimas variables se decidió considerarlas constantes en la etapa de optimización que a continuación se reporta.

**Tabla 9. Análisis de varianza para tamaño de partícula.**

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	Df	Cuadrados medios	F-Ratio	P-Value
A:PVA	3013.88	1	3013.88	9.13	0.0073
B:PLGA	2179.42	1	2179.42	6.60	0.0193
C:acetona	288.277	1	288.277	0.87	0.3625
D:vel agitacion	87.9784	1	87.9784	0.27	0.6120
E:tiempo	97.9054	1	97.9054	0.30	0.5927
AB	82.8336	1	82.8336	0.25	0.6225
AC	19.0585	1	19.0585	0.06	0.8128
AD	947.431	1	947.431	2.87	0.1075
AE	343.415	1	343.415	1.04	0.3213
BC	1061.52	1	1061.52	3.22	0.0898
BD	7.1519	1	7.1519	0.02	0.8846
BE	3.09349	1	3.09349	0.01	0.9240
CD	229.019	1	229.019	0.69	0.4158
CE	64.4982	1	64.4982	0.20	0.6638
DE	143.68	1	143.68	0.44	0.5178
Total error	5943.0	18	330.166		
Total (corr.)	20308.7	33			

R-cuadrada = 70.7367 %

Error std. = 18.1705

Error absoluto = 10.7693

Durbin-Watson estadística = 2.60587 (P=0.9446)

10.1.2 OPTIMIZACIÓN

Los resultados del diseño de exploración “screening”, arrojaron que las variables que tenían un efecto significativo o que se acercaban a este fueron concentración de polímero (PLGA), concentración de estabilizante (PVA) y nosotros decidimos incluir tiempo de agitación (Grafico 1) que aunque no tiene un efecto significativo, la magnitud es considerablemente más grande que las variables que no escogimos y es muy cercana a las que resultaron ser significativas, además por experiencia en nuestro grupo de investigación sabemos que puede ser una variable muy importante, motivo por el cual se decidió mantener la velocidad de agitación y la cantidad de disolvente constantes, y de nueva cuenta se procedió a realizar un diseño de experimentos para optimizar el procedimiento de la preparación de los sistemas y de alguna manera poder predecir el tamaño de partículas en los sistemas.

En esta segunda serie de experimentos las variables con efectos no significativos que arrojó el ensayo de exploración se mantuvieron constantes, y se llevó a cabo un diseño factorial de tipo $3^2 \times 2^1$ que arrojó 18 experimentos.

Los resultados de tamaño de partícula de los experimentos de optimización son los siguientes:



Tabla 10. Tamaño de partícula para los experimentos de optimización.

SISTEMA	POLÍMERO PLGA (g)	AGENTE ESTABILIZANTE (PVA)	ACETONA (ml) cte	Velocidad de agitación (rpm) cte	Tiempo de agitación (min)	TAMAÑO DE PARTÍCULA (nm)
1	0.010	0.007	15	200	5	141.7
2	0.010	0.007	15	200	10	154.6
3	0.015	0.007	15	200	5	180.4
4	0.015	0.007	15	200	10	128.9
5	0.020	0.007	15	200	5	154.6
6	0.020	0.007	15	200	10	156.2
7	0.010	0.01	15	200	5	126.7
8	0.010	0.01	15	200	10	179.2
9	0.015	0.01	15	200	5	154.9
10	0.015	0.01	15	200	10	169.9
11	0.020	0.01	15	200	5	146.2
12	0.020	0.01	15	200	10	152.4
13	0.010	0.013	15	200	5	161.6
14	0.010	0.013	15	200	10	142.6
15	0.015	0.013	15	200	5	143.9
16	0.015	0.013	15	200	10	141
17	0.020	0.013	15	200	5	180.4
18	0.020	0.013	15	200	10	144.2

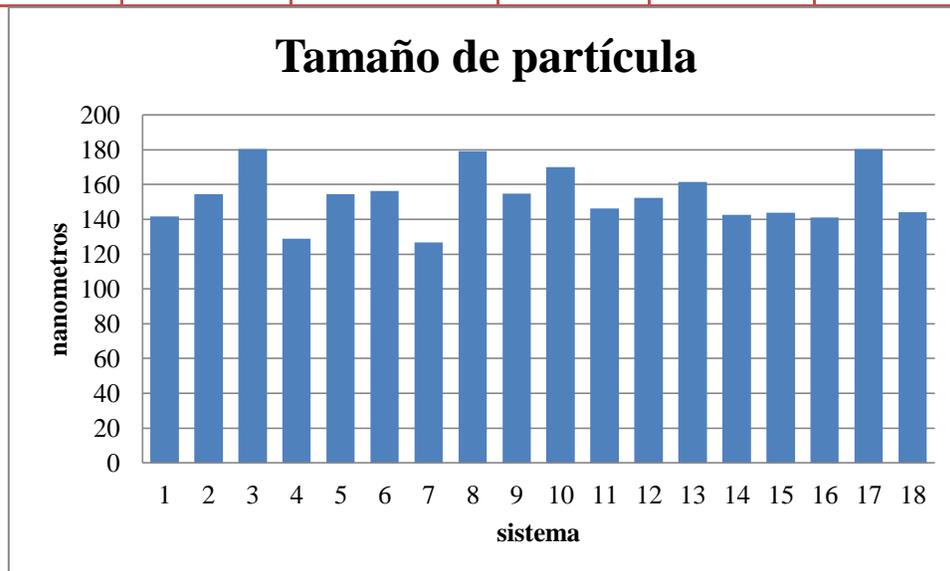


Gráfico 3. Tamaño de partícula obtenido en los sistemas preparados para la optimización del proceso.



Una vez que se llevó a cabo el diseño de optimización, se conjuntaron los de este diseño de optimización y del primer diseño de experimentos de exploración (“screening”) para buscar una ecuación que pudiera aplicarse para determinar el tamaño de partícula en base a las variables en estudio, los resultados se analizaron en el programa Statgraphics evaluando el efecto de cada variable y calculando los coeficientes correspondientes para generar un modelo estadístico.

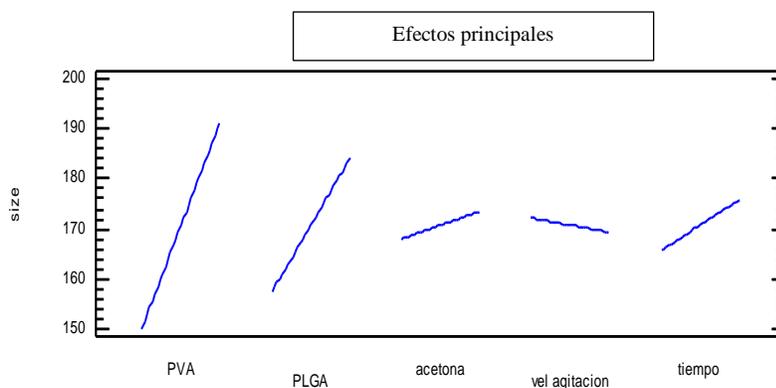


Gráfico 4. Tendencia de los efectos principales sobre el tamaño de partícula.

En el gráfico 5. Podemos Observar de manera representativa el signo y la magnitud de los efectos estimados de cada una de las variables sobre el tamaño de partícula de las nanopartículas a base de PLGA, la pendiente positiva indica que la variación es creciente, es decir, mayor tamaño de partícula en el nivel alto del factor; en contraposición la pendiente negativa indica menor tamaño de partícula en el nivel alto del factor.

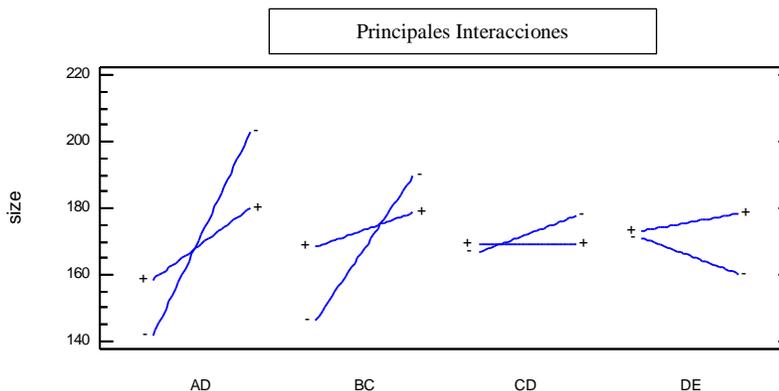


Gráfico 5. Principales Interacciones entre componentes de las nanopartículas.



Finalmente en base del análisis experimental podemos obtener una ecuación para predecir el tamaño de nanopartículas en nanómetros manipulando las variables consideradas en el presente trabajo. Para llegar a esta ecuación se juntaron los datos del diseño exploratorio y los resultados del diseño de optimización. Nuestro objetivo fue generar el tamaño de partícula menor posible y el mayor posible para evaluar el efecto del tamaño sobre sistemas biológicos. Después de fabricar los dos sistemas a menor tamaño y a mayor tamaño se filtraron por membrana de 0.22 micras y los tamaños finales fueron de 200nm y 311nm, que son los que finalmente se probaron en sistemas biológicos.

Tamaño de partícula(nm) = 170.719 + 20.6796*PVA + 13.4188*PLGA + 2.77138*acetona - 1.42718*vel agitación + 5.06169*tiempo - 9.91837*PVA*vel agitación - 8.32404*PLGA*acetona - 2.68163*acetona*vel agitación + 4.04607*vel agitación*tiempo

10.2 CARACTERIZACIÓN (Microscopia electrónica)

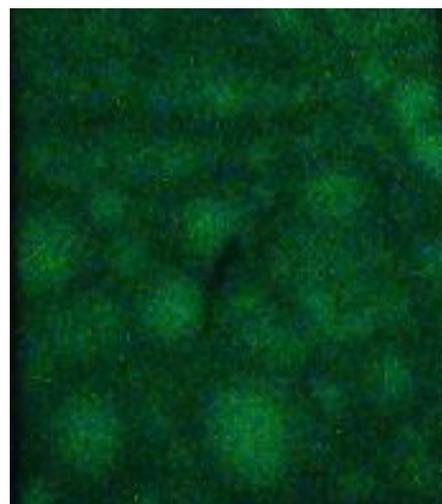
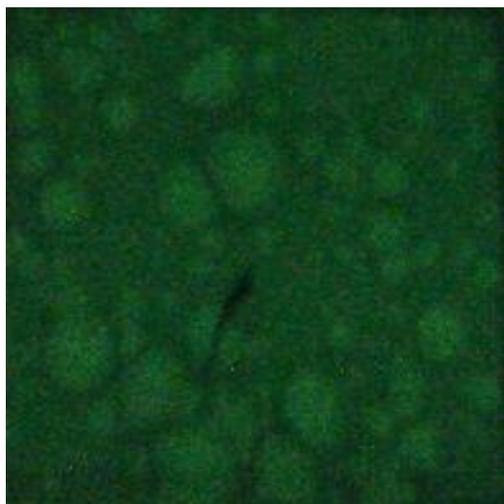


Figura 9 . Figura 10 . Nanopartículas de 200 nm caracterizadas por Microscopia electrónica observadas a 40000 aumentos.

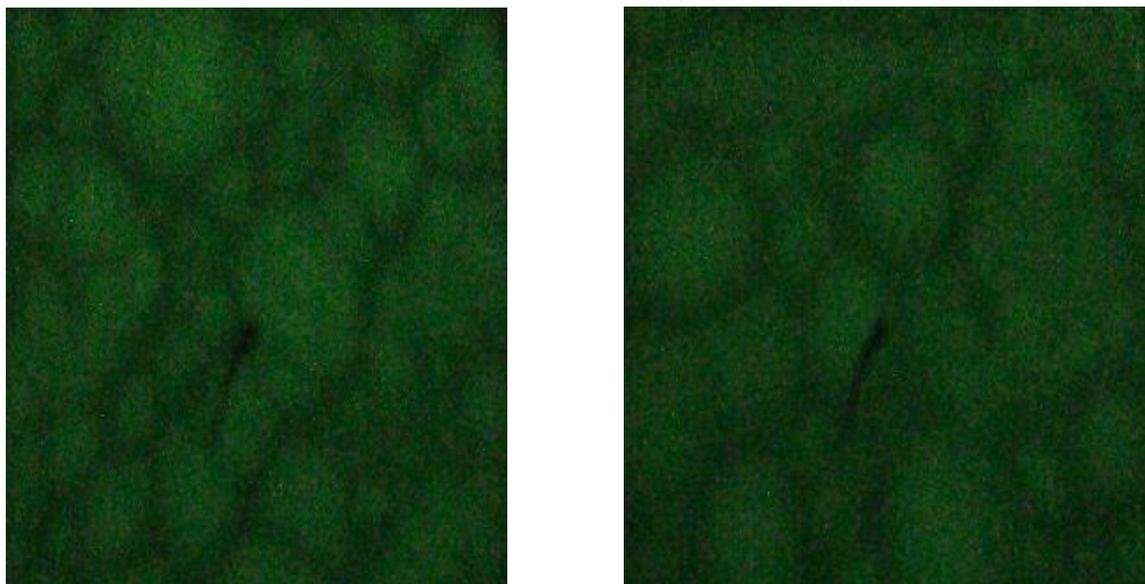


Figura 11 . Figura 12 Nanopartículas de 300 nm caracterizadas por Microscopia electrónica observadas a 40000 aumentos.

Se obtuvieron nanopartículas esféricas después de haber sido filtradas por membrana con un tamaño de poro de 0.22 μm para su esterilidad.

Se ha comprobado que, en términos generales, la toxicidad es mayor para nanopartículas con forma tubular, seguida de formas irregulares, y sería menor para nanopartículas esféricas, considerando iguales el resto de parámetros toxicológicos.

Para las nanopartículas de 311 nm podemos observar que tienen una tendencia natural a formar aglomerados, de hecho las nanopartículas no suelen encontrarse aisladas.

Los aglomerados son grupos de partículas unidas mediante fuerzas relativamente débiles tipo Van der Waals, electrostáticas o de tensión superficial, que pueden redispersarse por medios mecánicos.

Este fenómeno puede cambiar el lugar de depósito de las nanopartículas en el organismo, ya que un aglomerado de nanopartículas se depositará en unas zonas u otras, por ejemplo del tracto respiratorio dependiendo de su estado de agregación o aglomeración debido al distinto diámetro aerodinámico.



10.3 EVALUACIONES CITOTOXICOLÓGICAS

10.3.1 VIABILIDAD CELULAR

Se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, también llamado prueba de inhibición de la succinato deshidrogenasa, que es un método espectrofotométrico que mide cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables y que se basa en la capacidad que tienen las deshidrogenasas mitocondriales de las células metabólicamente activas de reducir la sal de tetrazolium (MTT), de color amarillo e hidrofílica, a un compuesto hidrofóbico (formazán), de color azul oscuro.

Tras la captación del MTT las células se rompen y se solubiliza el formazán con DMSO, la absorbancia de cada muestra es directamente proporcional al número de células viables.

A continuación se muestran los resultados expresados en porcentaje de viabilidad celular para cada tratamiento durante una exposición de 4 hrs a nanopartículas a base de PLGA y su análisis estadístico para observar si existen diferencias significativas entre tratamientos.

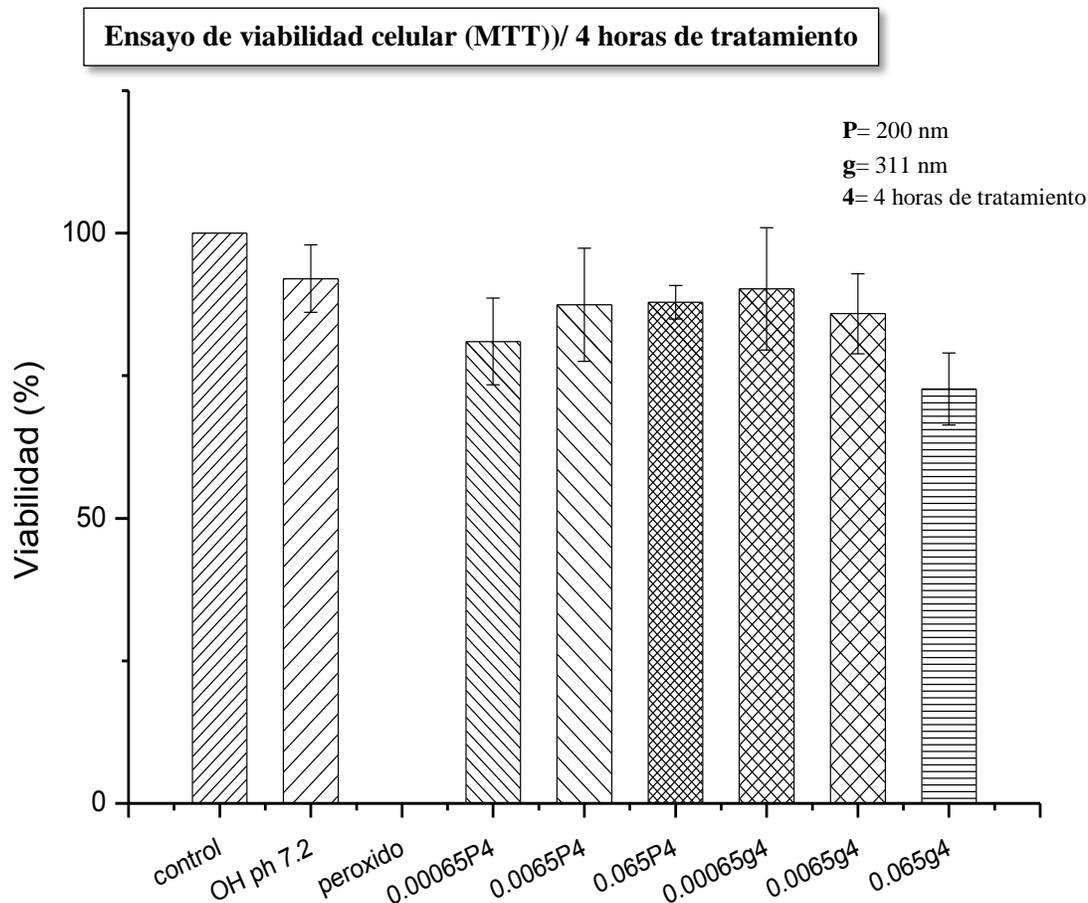


Gráfico 6. Porcentaje de viabilidad celular de células AML 12 expuestas en un periodo de tiempo de 4 horas , donde los números representan las tres diferentes dosis para cada tamaño (0.00065, 0.0065 y 0.065 mg) la letra P después de la dosis representa que se tratan de nanopartículas pequeñas es decir de 200nm y la letra g después de la dosis representa nanopartículas grandes es decir de 311nm, referenciadas con un control negativo (100% de viabilidad), un control de referencia administrando medio de dispersión sin nanopartículas y un control positivo (Peróxido de Hidrogeno).

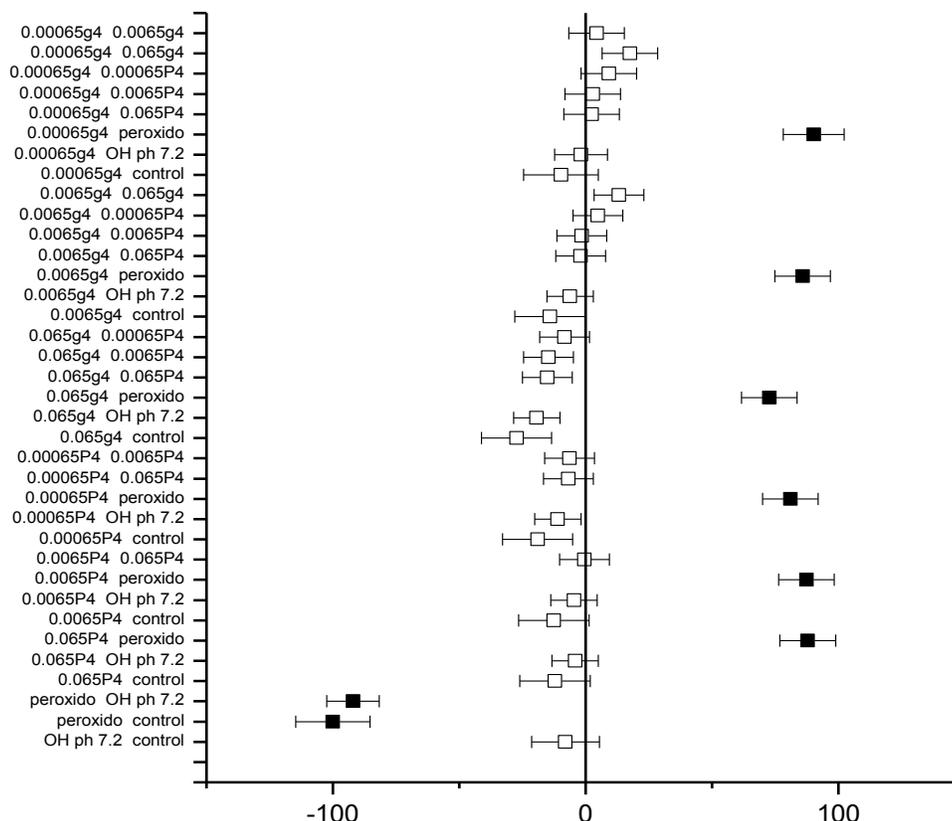


Gráfico 7. Diferencias significativas entre tratamientos para un periodo de exposición de 4 HORAS para el ensayo de viabilidad celular. Las barras marcadas con negro prueba diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Realizando el análisis estadístico para la prueba de viabilidad (Gráfico 6 y 8), los resultados muestran que la exposición de las nanopartículas de 200 y 311 nm por un periodo de 4 horas con las células no altera su viabilidad para ninguna de las dosis, teniendo valores por encima del 70%; esto indica que es apto para considerar a una célula en condiciones viables, realizando la comparación con respecto al control negativo (sin exposición a agente toxico).

Podemos observar en el grafico 8. Que entre las diferentes exposiciones de las células AML12 a las nanopartículas de interés no existieron diferencias significativas con respecto al control negativo. La única exposición que comprometió la viabilidad celular fue el control positivo (peróxido de hidrogeno) como era de esperarse, dado el efecto oxidoreductor celular asociado ya conocido.

Los siguientes resultados muestran el mismo ensayo de viabilidad celular, a las mismas dosis y tamaños de partícula, ahora modificando el tiempo de exposición a las células AML12 con las nanopartículas de PLGA durante un periodo de 24 hrs.

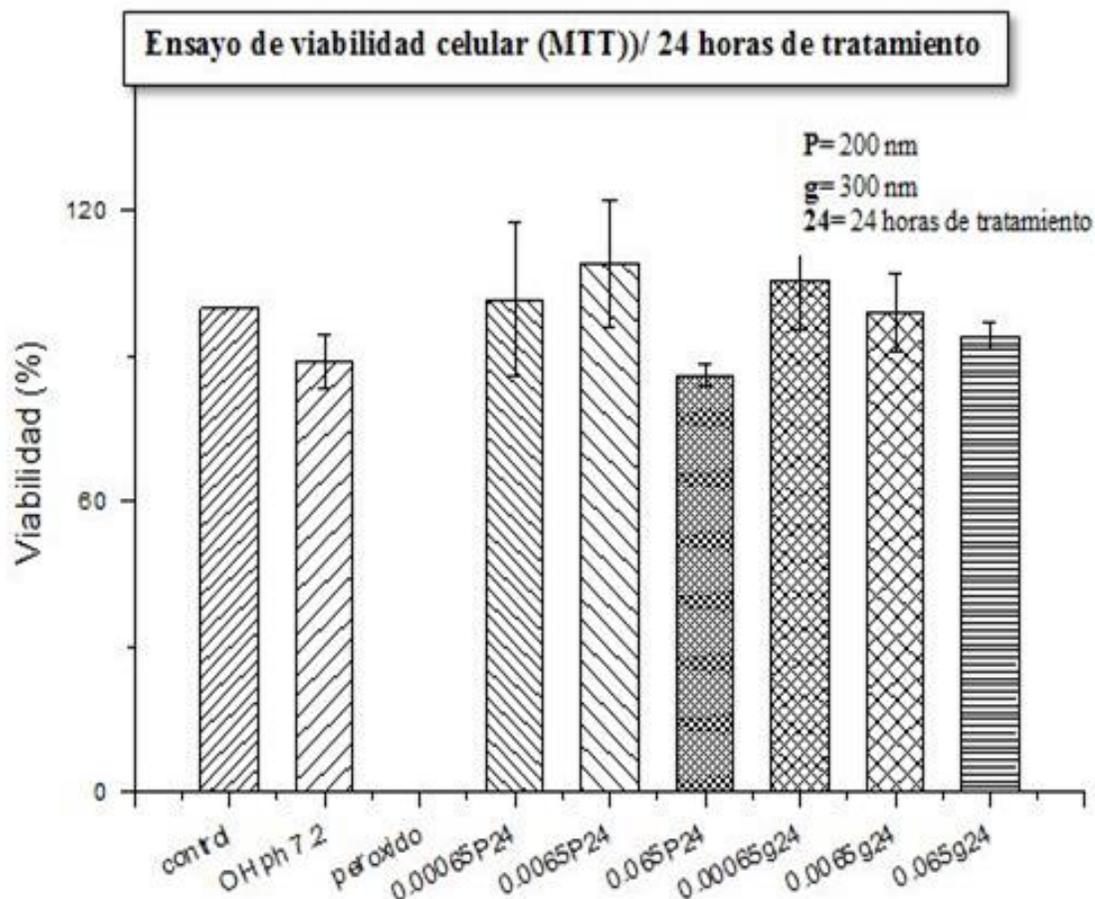


Gráfico 8. Porcentaje de viabilidad celular de células AML 12 expuestas en un periodo de tiempo de 24 horas, donde los números representan las tres diferentes dosis para cada tamaño (0.00065, 0.0065 y 0.065 mg) la letra P después de la dosis representa que se tratan de nanopartículas pequeñas es decir de 200nm y la letra g después de la dosis representa nanopartículas grandes es decir de 311nm, referenciadas con un control negativo (100% de viabilidad), un control de referencia administrando medio de dispersión sin nanopartículas y un control positivo (Peróxido de Hidrogeno).

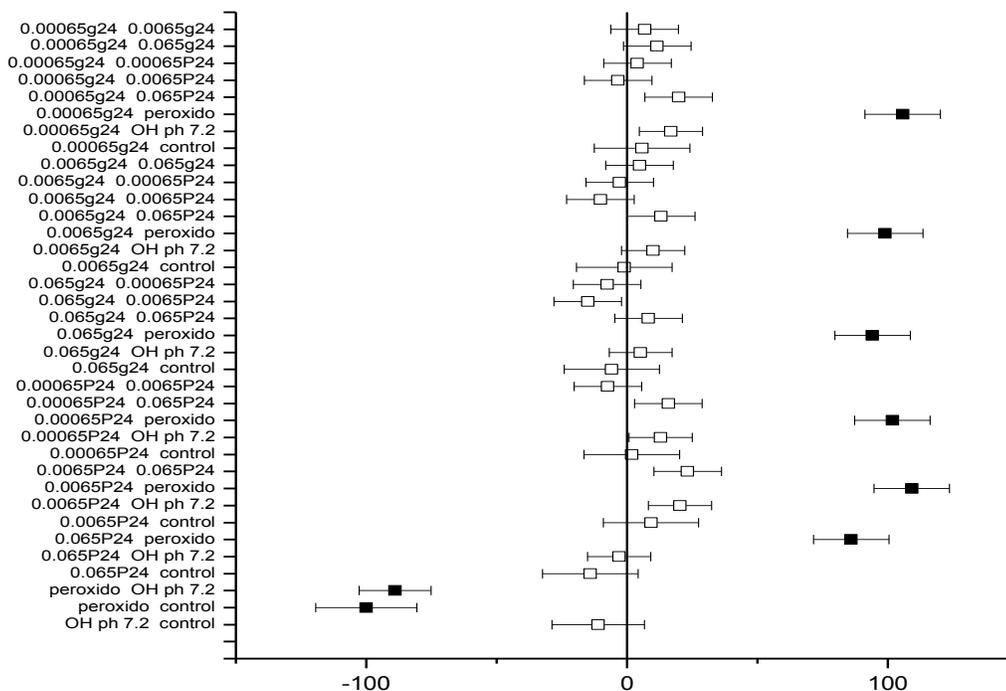


Gráfico 9. Diferencias significativas entre tratamientos para el ensayo de viabilidad celular en un periodo de exposición de 24 HORAS. Las barras marcadas con negro prueba diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Realizando el análisis estadístico para la prueba de viabilidad (Gráfico 7 y 9), los resultados muestran que la exposición de las nanopartículas de 200 y 311 nm durante 24 horas con las células no altera su viabilidad significativamente respecto al control negativo (sin exposición a agente tóxico) para ninguna de las dosis, teniendo valores por encima del 70%; esto indica que las nanopartículas en estudio no comprometen la viabilidad de las células AML12.

Podemos observar en el gráfico 9. Que entre tratamientos administrados con nanos no existe diferencia significativa, ya que el único tratamiento que presentó muerte celular fue el control positivo (peróxido de hidrógeno) ocasionando la muerte de las células del tratamiento.



10.3.2 ENSAYO DE GLUTATIÓN (GSH)

El aumento descontrolado de Radicales libres en organismos vivos o células *in vitro* se ha asociado con daño celular asociado al estrés Oxidativo, ya que ocurre un desbalance entre la producción de sustancias pro-oxidantes y sustancias antioxidantes, éste estrés oxidativo se asocia al envejecimiento y a varias patologías como la Diabetes Mellitus, Síndrome Metabólico, Enfermedad Cardiovascular, entre otras. El principal antioxidante natural de nuestro organismo es el Glutati6n reducido (GSH), el cual junto a un grupo de enzimas que funcionan en su presencia, puede neutralizar los radicales libres evitando de esta forma que provoque da1o en el organismo

En este trabajo la determinaci6n del contenido de glutati6n total se realiz6 de acuerdo con el m6todo de la reducci6n c6clica DTNB-GSSG (Anderson, 1985). Este m6todo se basa en la oxidaci6n del glutati6n reducido (GSH) presente en una muestra a su forma oxidada (GSSG) mediante su incubaci6n con el 6cido 5,5'-ditiobisnitrobenzoico (DTNB), el cual es reducido y adquiere una coloraci6n amarillenta que puede ser determinada espectrofotom6tricamente. El GSSG generado es reducido por acci6n de la enzima glutati6n reductasa (GSSGrd) en presencia de NADPH. El GSH formado se oxida de nuevo, dando lugar a un ciclo continuo en el cual la velocidad de reducci6n del DTNB (con el consiguiente incremento de la absorbancia) es proporcional a la cantidad total de glutati6n (GSH + GSSG).

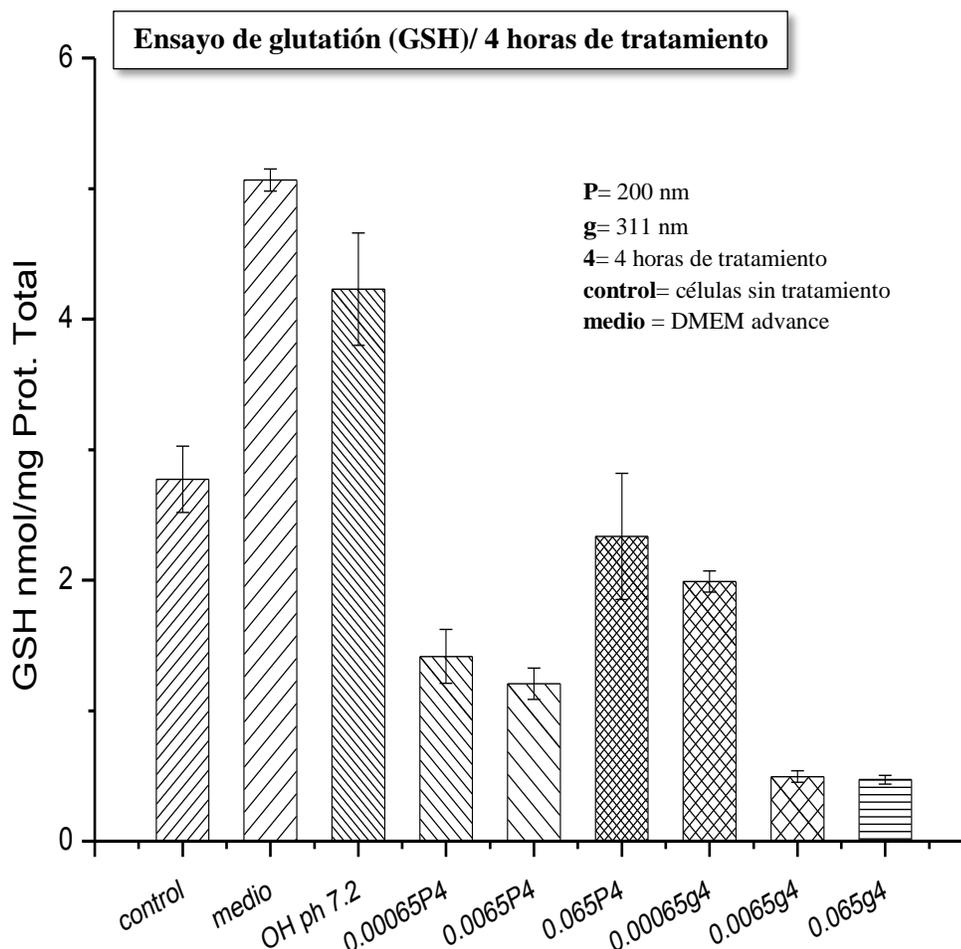


Gráfico 10. Estimación de Glutación. Cantidades expresadas en nanomoles de GSH por mg de Proteínas totales en células AML12 expuestas 4 Horas a las nanopartículas de 200 y 311nm, a tres diferentes dosis para cada tamaño (0.0006,0.0065 y 0.065 mg) y referenciadas con controles.

Como podemos observar en el gráfico 10 existen diferencias significativas entre tratamientos administrados con nanos con respecto al control negativo con excepción de la dosis 0.065P4. Es importante mencionar que en ninguna de las exposiciones de las células a nanopartículas la cantidad de GSH expresada en nM de GSH/mg de proteína se encontró por encima del GSH cuantificado para el control, lo que refleja que las células mostraron una sensibilidad significativa (Ver análisis estadístico en anexos) diferencial en relación a la cantidad de GSH presente después de la exposición a las nanopartículas de interés.

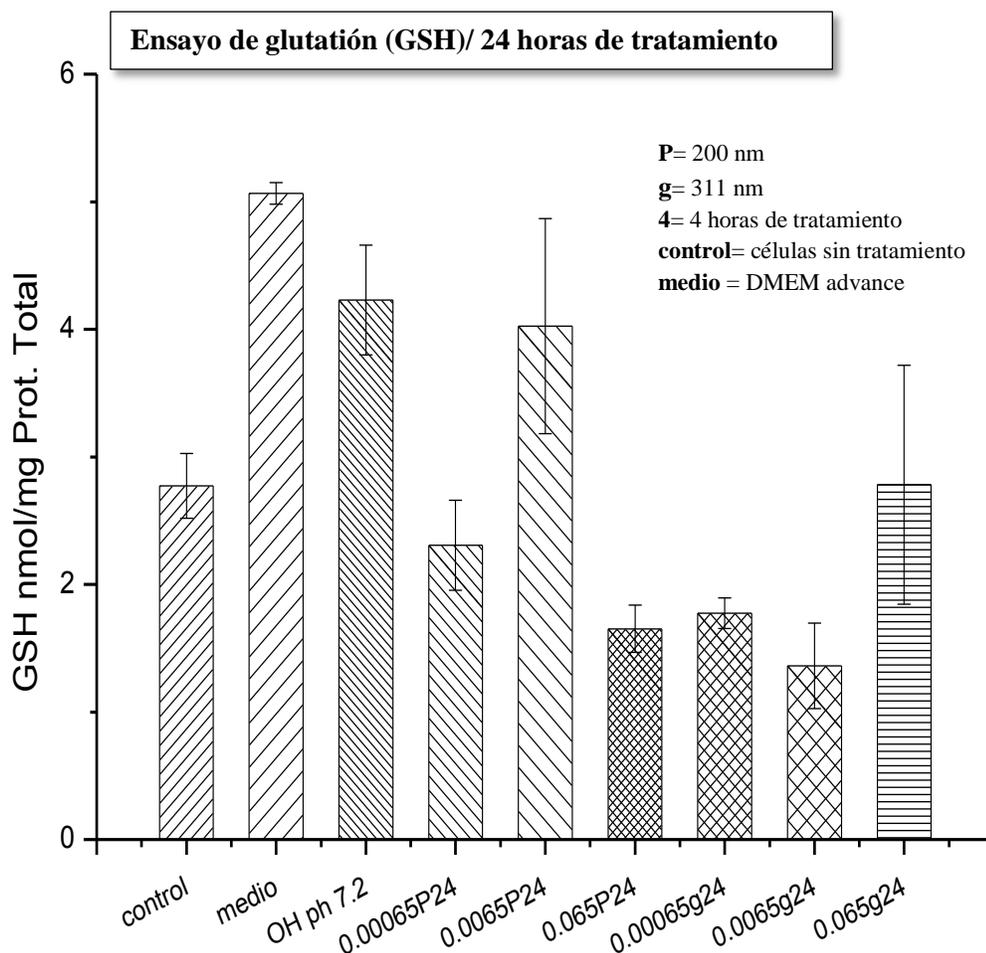


Gráfico 11. Estimación de Glutatión. Cantidades expresadas en nanoMoles de GSH por mg de Proteínas totales en células AML12 expuestas 24 Horas a las nanopartículas de PLGA de 200 y 311nm, a tres diferentes dosis para cada tamaño (0.065,0.0065 y 0.00065 mg) y referenciadas con controles.



En el gráfico 11, podemos observar que existen diferencias significativas entre las estimaciones de la concentración de GSH en células expuestas a nanopartículas de PLGA durante 24 hrs con respecto a los controles. También podemos observar en la gráfica 12 un incremento de GSH para el tratamiento de 200nm a una dosis de 0.0065 mg, observamos que el valor de GSH es mayor que el presentado para el tratamiento control, lo que refleja la sensibilidad de estas células a las nanopartículas obtenidas.

Es interesante el efecto del medio de dispersión sobre la respuesta de las células tras su exposición, (gráfica 11) y que habrá de considerarse en la preparación de este tipo de nanopartículas.

Un aumento de la relación de GSSG a GSH se considera indicativo de estrés oxidativo.

11 DISCUSIÓN

En este trabajo se decidió evaluar el efecto de las nanopartículas de Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) y su efecto sobre sistemas biológicos. En este caso el sistema biológico a utilizar fue la línea celular AML12 las cuales son células hepáticas de ratón. Para evaluar el efecto de las nanopartículas se fabricaron dos tamaños de partícula diferentes, pues se ha visto que el efecto del tamaño es importante en su interacción con sistemas biológicos. Actualmente hay una suposición común documentada de que el tamaño de las nanopartículas les permite entrar fácilmente a los tejidos, células, organelos y estructuras biomoleculares funcionales (DNA, Ribosomas) ya que el tamaño físico actual de las nanopartículas es similar a muchas moléculas biológicas (anticuerpos, proteínas) y a otras estructuras (virus). La entrada de las nanopartículas dentro de un sistema biológico puede causar daño, el cual podría subsecuentemente causar problemas a la salud. Sin embargo, algunos estudios recientes han demostrado que debido a su tamaño, las nanopartículas no entran libremente a todos los sistemas biológicos, sino que está regulada por mecanismos de reconocimiento de moléculas funcionales adicionadas a las superficies involucradas. En general la relación entre tamaño, forma y química de superficie de las nanopartículas así como la correlación con su biodistribución intracelular e in vivo es desconocida. Sistemáticamente, no se pueden predecir los movimientos y la localización de las nanopartículas después de su exposición intracelular o in vivo basado en las propiedades de la partícula en este momento, y tales estudios tienen que ser hechos antes de que se evalúe la toxicidad de nanopartículas de forma sistemática. En este trabajo se obtuvieron nanopartículas monodispersas esféricas de 200 y 311nm después de un diseño experimental de exploración y optimización. Se acondicionaron las nanopartículas para poder ser utilizadas en cultivos celulares ajustándose el pH entre 7.2 y 7.4, además que se esterilizaron por filtración a través de membrana de 0.22 micras.

Los resultados obtenidos muestran que en la interacción durante 4 y 24 horas con células hepáticas de ratón AML12 por parte de las nanopartículas de Ácido poli-láctico-co-



glicólico de 200nm y 311 nm puede existir un componente de efecto del tamaño de nanopartícula ya que se observó que células viables fueron sensiblemente diferentes en la cantidad de GSH.

Los resultados de este trabajo tesis son muy interesantes ya que la cantidad de GSH estimado después de la exposición a nanopartículas de 200 nm (P) en periodos de tiempo cortos mostro un efecto dosis-dependiente. Esto puede deberse a que las nanopartículas de menor tamaño y en menor cantidad aumentan el área por unidad de superficie y por lo tanto un mayor número de átomos en la superficie, lo que aumenta la reactividad de la partícula, esto hace que una determinada masa de nanopartículas de menor tamaño (200nm) que otras (311 nm) sea más reactiva aun cuando se encuentran a la misma concentración. Este efecto no se presentó a las 24 horas. Ya que en este tiempo y con la máxima cantidad de nanopartículas probadas el GSH disminuyó a valores por debajo del control negativo y del medio de dispersión sugiriéndonos que se comprometieron los mecanismos bioquímicos de GSH a estas dosis. En el caso de las nanopartículas de mayor tamaño 311nm (g) estos mecanismos se comprometieron considerablemente en los periodos cortos de exposición (4hrs) para las 2 mayores dosis empleadas en este trabajo. A las 24 hrs de exposición parecería que las células responden de manera dosis-dependiente a la inducción de GSH, este comportamiento se podría explicar aclarando que las nanopartículas son de mayor tamaño y en menor concentración y que las nanopartículas tienen una tendencia natural a formar aglomerados o agregados, por lo tanto en este caso el estrés oxidativo pudo ser generado debido a dicho principio.

Con respecto a la viabilidad celular los resultados muestran que la exposición de las nanopartículas de 200 y 311 nm durante 4 y 24 horas con las células no altera su viabilidad significativamente respecto al control negativo (sin exposición a agente toxico) para ninguna de las dosis, teniendo valores por encima del 70%; esto indica que las nanopartículas en estudio no comprometen la viabilidad de las células AML12.



12 CONCLUSIONES

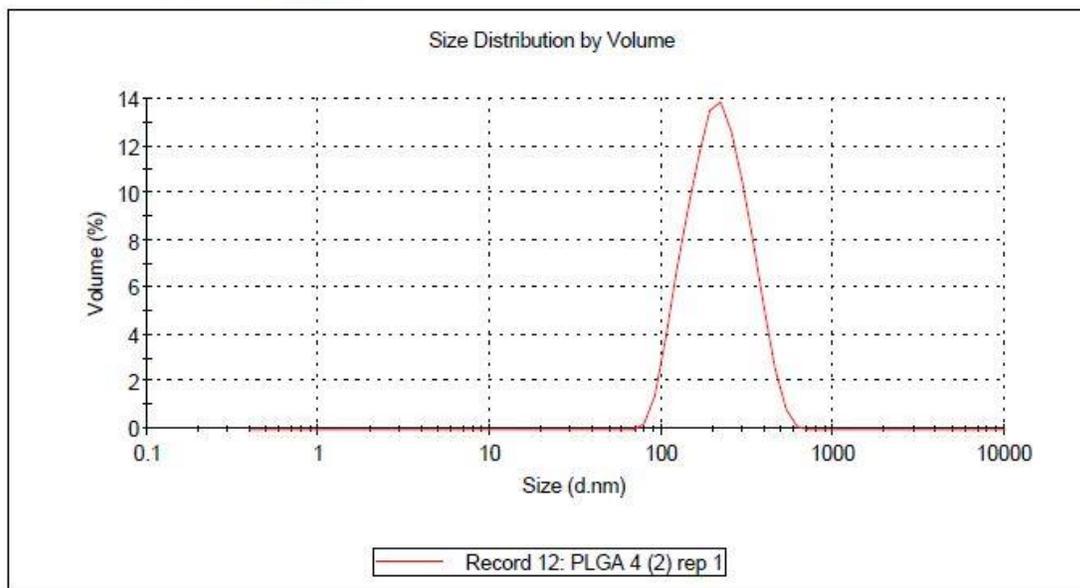
- Se elaboraron sistemas nanoparticulados a base de PLGA bajo condiciones de proceso específicas encontrándose que las variables que influenciaban significativamente el tamaño de las nanopartículas fueron la concentración de PVA y la concentración de PLGA. Encontrándose las condiciones óptimas para obtener los menores tamaños de partícula.
- Los sistemas nanoparticulados fabricados fueron caracterizados por tamaño de partícula mediante la técnica de dispersión Dinámica de la luz (DSL) obteniendo nanopartículas de diferentes tamaños (200nm y 311nm) y en poblaciones monodispersas y la morfología se evaluó mediante Microscopia Electrónica de Transmisión observándose nanopartículas esféricas .
- Se evaluó la capacidad citotóxica a los sistemas nanoparticulados mediante la prueba de Viabilidad celular (MTT) en líneas celulares hepáticas de ratón AML12, observando que no existe compromiso de la viabilidad asociada a la exposición de nano partículas a base de PLGA en las diferentes dosis evaluadas bajo el esquema experimental empleado en este trabajo de tesis.
- Se evaluó la capacidad citotóxica a los sistemas nanoparticulados mediante la estimación de Glutación (GSH) en líneas celulares hepáticas de ratón AML12, comparando los distintos tratamientos se observa que el daño asociado al estrés oxidativo es diferente, depende en gran medida de la dosis y tiempo de exposición así como de la talla de las nanopartículas de Ácido poli-láctico-co-glicólico obtenidas en este trabajo.



13 ANEXO

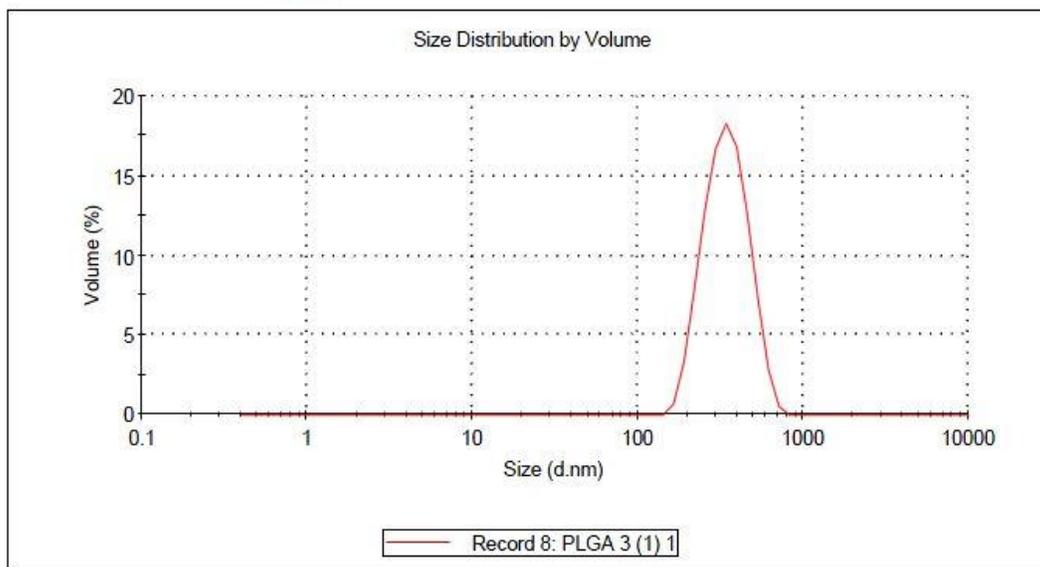
13.1 Gráficos obtenidos de la caracterización del tamaño de partícula mediante DLS (zetalyzer).

	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 200.0	Peak 1: 229.4	100.0	91.60
Pdl: 0.129	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.952	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality: Good			



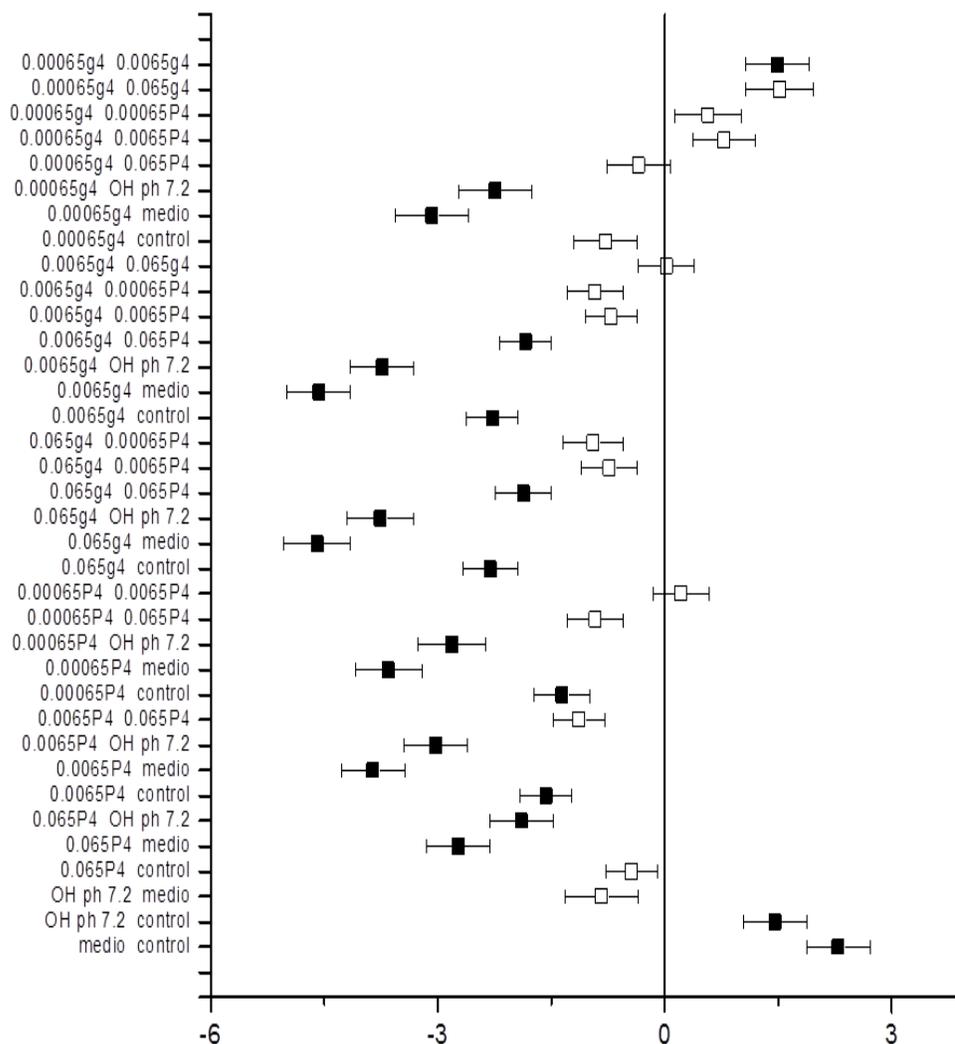


	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 315.2	Peak 1: 354.2	100.0	105.2
Pdl: 0.069	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.973	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : Good			

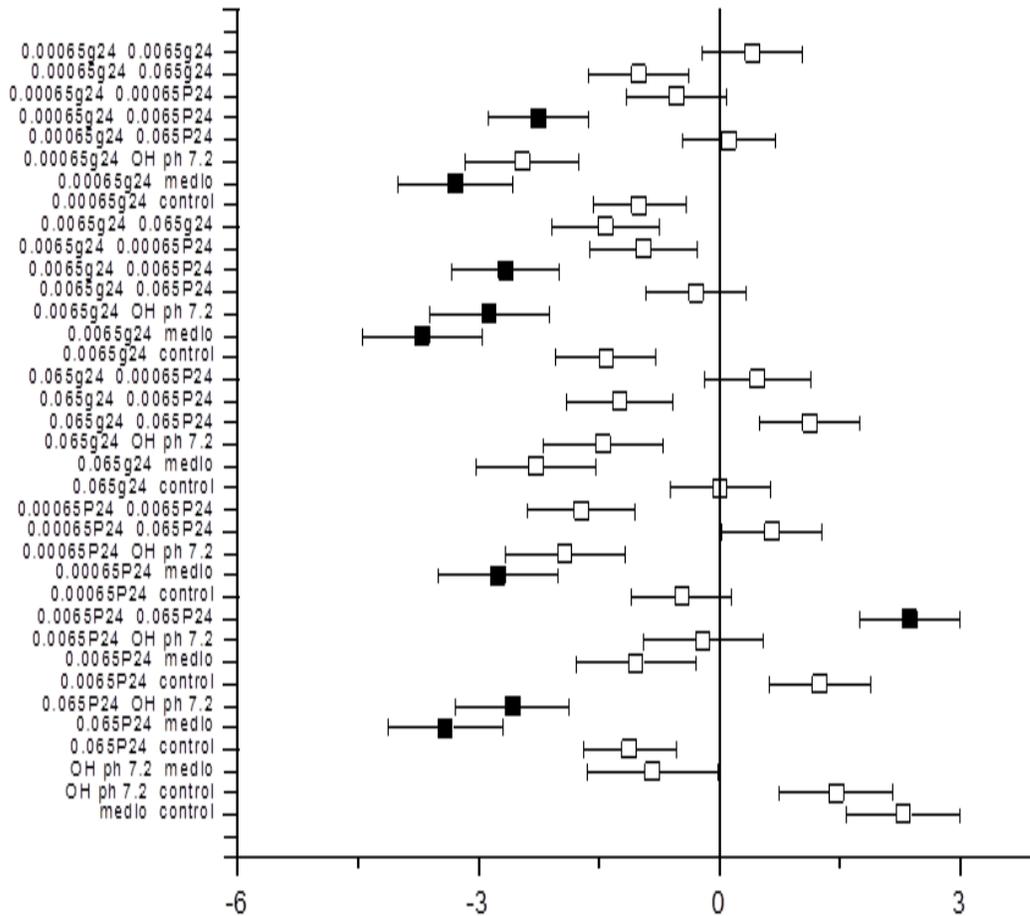




13.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA RESULTADOS DE GSH.



Diferencias significativas entre tratamientos para el ensayo de glutatión en un periodo de exposición de 4 HORAS. Las barras marcadas con negro prueba diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos



Diferencias significativa entre tratamiento para el ensayo de glutatión en un tiempo de exposición de 24 HORAS. Las barras marcadas con negro prueba diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos



Bibliografía

- iesmat*. (13 de junio de 2013). Obtenido de <http://www.iesmat.com/tecnologias-potencialz.htm>
- Arencibia, F., & Rosario, L. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de Toxicología en línea*, 40.
- Astete, C. E., & Sabliov, C. M. (2006). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(3), 247-289.
- Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Karydas, A., & Ithakissios, D. (2002). PLGA mPEG nanoparticles of cisplatin: In vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *Journal of Controlled Release*, 79(1), 123-135.
- Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Livaniou, E., Evangelatos, G., & Ithakissios, D. (2003). Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA–mPEG nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 259(1), 115-127.
- Bala, I., Hariharan, S., & Kumar, M. (2004). PLGA nanoparticles in drug delivery: The state of the art. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21(5), 387.
- Carrera, O. (2011). *La bioética y las biotecnologías en medicina*.
- Cleementi, L. (2008). Estimación de distribuciones de tamaños de partícula por técnicas de dispersión de luz. 2° *Encuentro de jóvenes investigadores en ciencia y tecnología de materiales* (pág. 5). misiones: asociación argentina de materiales.
- Feng, S., Mei, L., Anitha, P., Gan, C. W., & Zhou, W. (2009). Poly (lactide)-vitamin E derivative/montmorillonite nanoparticle formulations for the oral delivery of docetaxel. *Biomaterials*, 30(19), 3297.
- Ferreira, P. T. (2010). Requerimientos de energía en los procesos de fabricación a nanoescala. *Lámpsakos*, (4), 36-43
- Gálvez, V., & Celia, T. (2010). Toxicología de las nanopartículas. *Seguridad y salud en el trabajo*, 6-12.
- Gil, F. (2008). *El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana*. Facultad de Medicina de la Universidad de Granada .



- Grácia, M., & Lluís, P. (2010). *Riesgos asociados a la nanotecnología*. Insituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo.
- Hans, M., & Lowman, A. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(4), 319-327.
- Hernández, S. G. (2012). Nanopartículas como nuevos sistemas de liberación de fármacos para el tratamiento de alzheimer. *MoleQla: Revista De Química De La Universidad Pablo De Olavide*, (7), 75-78.
- Holz, J., Einloft, S., & Ligabue, R. Propiedades térmicas de micro e nanoesferas de plga/mentol.
- Hrkach, J. S., Peracchia, M. T., Bomb, A., & Langer, R. (1997). Nanotechnology for biomaterials engineering: Structural characterization of amphiphilic polymeric nanoparticles by NMR spectroscopy. *Biomaterials*, 18(1), 27-30.
- II, B. Aplicación in vitro de nanopartículas poliméricas como sistemas de liberación controlada de Fármacos. Grupo De Física De Fluidos y Biocoloides, , 137.
- Grágeda, M. (s.f.). *APLICACIONES DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM)*. Chile: Facultad de ciencias físicas y matemáticas, Universidad de Chile.
- Llabot, J. M., & Palma, S. (2008). Nanopartículas poiméricas sólidas. *Farmacotecnia*, 40-47.
- López, A., & Galán, C. (2010). Polímeros polilácticos-review. *Química de alimentos. Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia, Tunja*.
- López, G. D., & Gally, T. Nanotecnología en la currícula de los ingenieros.
- Mendoza Uribe, G., & Rodríguez-López, J. L. (2007). La nanociencia y la nanotecnología: Una revolución en curso. *Perfiles Latinoamericanos: Revista De La Facultad Latinoamericana De Ciencias Sociales, Sede México*, (29), 161-186.
- Moutinho Grenha, A. M. Microencapsulación de nanopartículas de quitosano para la administración pulmonar de macromoléculas terapéuticas. Univ Santiago de Compostela.
- Navarro, M., & Duque, J. (2010). Biología Molecular - Actividades biológicas del complejo clotrimazol-oro(I)-trifenilfosfina. *Salus online*, 216-232. Recuperado el 15 de Junio de 2013, de http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/actividades_bio_leuc.pdf
- Oviedo, U. d. (2007). *Aplicaciones industriales de la nanotecnología*. Oviedo: Tresalia comunicación.



- Ramos, D., & Gómez, M. (2001). Métodos de obtención de microesferas biodegradables. *Rev Cubana Farm*, 126-35.
- Ravi Kumar, M., Bakowsky, U., & Lehr, C. (2004). Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials*, 25(10), 1771-1777.
- Rocha, F., & Ansorena, E. (2009). *Nanosistemas a base de poliésteres*. Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra.
- Toledo, P. G. Nanociencia en el departamento de ingeniería química de la universidad de concepción. *Avisos*, 717, 68.