



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE FABRICACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS PREPARADAS A BASE DE POLIETIL
CIANOACRILATO-QUITOSAN Y SU RELACIÓN CON LA
VIABILIDAD CELULAR ASÍ COMO SU LOCALIZACIÓN *IN VITRO*
EN CÉLULAS HEPÁTICAS DE RATÓN**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

ALEJANDRO ZIMMERMANN STEIN

ASESOR: Dra. PATRICIA RAMIREZ NOGUERA

COASESOR: Dr. ROBERTO DÍAZ TORRES

CUAUTITÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2015



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe 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

Optimización del proceso de fabricación de nanopartículas preparadas a base de polietil cinoacrilato- quitosán y su relación con la viabilidad celular así como su localización in vitro en células hepáticas de ratón

Que presenta la pasante: Alejandro Zimmermann Stein
Con número de cuenta: 305535429 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 29 de Octubre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|-------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | DAR. Juan José Díaz Esquivel | |
| VOCAL | Dra. Raquel López Arellano | |
| SECRETARIO | Dra. Patricia Ramírez Noguera | |
| 1er. SUPLENTE | M. en C. Tais Nopal Guerrero | |
| 2do. SUPLENTE | QFB. Azucena Lee Mendoza | |

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

HMI/lac

Agradecimientos:

Quiero agradecer a mi familia por brindarme siempre todo su apoyo incondicional siempre que lo necesité y ayudarme a salir adelante en la vida brindándome todo su cariño y comprensión. Fueron 6 años llenos de alegrías y de tristezas, altos y bajos pero siempre logré salir adelante con el apoyo de ustedes.

Agradezco a mi Opa por introducirme al mundo de la química desde que era pequeño, siendo una gran influencia a la hora de elegir mi carrera y estoy seguro de que donde sea que esté estará orgulloso de tener otro químico en la familia

A mi Oma, que me acompañó durante el largo y duro camino de la carrera y que nos dejó antes de que pudiera terminar este gran proyecto en mi vida y sé que donde sea que esté estará orgullosa de mi.

Quiero agradecer a todos los amigos que hice en la carrera ya que sin su apoyo a la hora de estudiar y su amistad la carrera se hubiera convertido en un trámite más, en vez de un periodo importante en mi vida del cual me llevo muchos buenos recuerdos de fiestas, reuniones y equipos de laboratorio.

Agradezco a mis amigos de toda la vida por escucharme cuando les hablaba entusiasmado sobre mi tesis y todos los problemas que tenía con ella y hacer como que me entendían a pesar de que no tenían la menor idea de lo que estaba hablando.

Agradezco a todos los profesores que tuve a lo largo de la carrera por compartir conmigo y con mis compañeros sus conocimientos en las respectivas asignaturas y, en algunos casos, sus experiencias en la industria farmacéutica.

Agradezco mucho a la Doctora Patricia Ramírez Noguera y al Doctor Roberto Díaz Torres por todo el tiempo y recursos que invirtieron en mi tesis. Fue más de un año lleno experiencias y buenos recuerdos y sobre todo lleno de aprendizaje.

Un agradecimiento especial a Laboratorios Psicofarma por apoyarme con su equipo y su tiempo para realizar la realización de algunas pruebas en mis nanopartículas.

Este proyecto se realizó con recursos del proyecto PAPIIT-UNAM Clave IN220612.

Índice:

| | |
|---|----|
| Agradecimientos | 3 |
| 1. Marco teórico | |
| 1.1 Definición de nanopartícula | 11 |
| 1.2 Historia de las nanopartículas farmacéuticas | 11 |
| 1.3 Clasificación | |
| 1.3.1 Nanopartículas a base de proteínas | 12 |
| 1.3.2 Nanopartículas a base de polisacáridos | 13 |
| 1.3.3 Nanopartículas a base de lípidos (liposomas) | 13 |
| 1.3.4 Nanopartículas a base de polímeros | 14 |
| 1.4 Nanopartículas de quitosán | 14 |
| 1.5 Nanopartículas de alquil cianoacrilato | 15 |
| 1.6 Nanopartículas de Quitosan/Polialquilcianoacrilato | 15 |
| 1.7 Métodos de preparación | |
| 1.7.1 Reacciones de polimerización (Polireacciones) | 16 |
| 1.7.1.1 Polimerización catiónica | 16 |
| 1.7.1.2 Polimerización aniónica | 16 |
| 1.7.1.3 Polimerización por emulsión | 17 |
| 1.7.1.4 Polimerización por mini y micro emulsión | 17 |
| 1.7.1.5 Polimerización interfacial | 18 |
| 1.7.1.6 Polimerización controlada o polimerización viva vía radical | 18 |
| 1.7.2 Evaporación del solvente | 18 |
| 1.7.3 Salting-out | 19 |
| 1.7.4 Nanoprecipitación | 19 |
| 1.7.5 Diálisis | 19 |
| 1.7.6 Tecnología de fluidos supercríticos | 20 |
| 1.7.7 Coacervación o gelación iónica | 20 |
| 1.8 Métodos de caracterización | 20 |

| | |
|---|----|
| 1.8.1 Tamaño de partícula | 21 |
| 1.8.2 Propiedades de superficie de las nanopartículas | 22 |
| 1.8.3 Potencial Zeta | 22 |
| 1.8.4 Microscopía electrónica | 23 |
| 1.8.4.1 Microscopía electrónica de transmisión (MET) | 24 |
| 1.8.4.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB) | 24 |
| 1.8.5 Microscopía confocal | 25 |
| 1.9 Optimización estadística | 26 |
| 1.10 Nanotoxicología | 26 |
| 1.10.1 Ensayos de citotoxicidad | 27 |
| 1.10.1.1 Ensayo de micro cultivo de Tetrazolio (MTA) | 28 |
| 1.10.1.2 Viabilidad celular | 28 |
| 2. Justificación del proyecto | 29 |
| 3. Objetivos | 30 |
| 4. Materiales y métodos | |
| 4.1 Materiales y reactivos | 31 |
| 4.2 Tratamientos utilizados | 31 |
| 4.3 Métodos | |
| 4.3.1 Preparación de los sistemas para el Screening | 34 |
| 4.3.2 Preparación de los sistemas para el diseño experimental de optimización | 35 |
| 4.3.3 Tripsinización | 36 |
| 4.3.4 Prueba de viabilidad celular (MTT) | 37 |
| 4.3.5 Microscopía confocal | |
| 4.3.5.1 Preparación de los sistemas para microscopía confocal | 38 |
| 4.3.5.2 Centrifugación con glicerol | 39 |
| 4.3.5.3 Montaje de las muestras para microscopía confocal | 40 |

| | |
|---|----|
| 5. Resultados y Análisis de resultados | |
| 5.1 Optimización estadística | |
| 5.1.1 Screening | 41 |
| 5.1.2 Diseño de Experimentos de Optimización | 43 |
| 5.2 Viabilidad celular | 45 |
| 5.3 Microscopía confocal | 47 |
| 6. Conclusiones | 50 |
| 7. Referencias | 51 |
| 8. Anexos | |
| 8.1 Preparación de ácido acético al 1% | 53 |
| 8.2 Preparación de PBS pH=7.4 | 54 |
| 8.2.1 Esterilización del PBS | 55 |
| 8.3 Trabajo en áreas estériles | 56 |
| 8.4 Cultivo celular | 57 |
| 8.5 Cambio de medio de cultivo celular | 58 |
| 8.6 Subcultivos | |
| 8.6.1 Subcultivos en cajas Petri | 59 |
| 8.6.2 Subcultivos en placas de 6 pozos | 60 |
| 8.6.3 Subcultivos en placas de 12 pozos | 61 |
| 8.7 Preparación de buffer de Nonideth | 62 |
| 8.8 Preparación de la solución de H ₂ O ₂ | 62 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Método de preparación por el método de evaporación de solvente en una emulsión doble | 19 |
| Figura 2. Esquema general de un microscopio electrónico | 23 |
| Figura 3. Preparación de nanopartículas para los sistemas de Screening | 34 |
| Figura 4. Preparación de nanopartículas para los sistemas de Optimización | 35 |

| | |
|---|----|
| Figura 5. Proceso de tripsinización | 36 |
| Figura 6. Prueba de viabilidad (MTT) | 37 |
| Figura 7. Preparación de los sistemas nanoparticulados para microscopía confocal | 38 |
| Figura 8. Centrifugación con glicerol | 39 |
| Figura 9. Montaje de las muestras | 40 |
| Figura 10. Modelo para Tamaño de Partícula del modelo de Screening. | 42 |
| Figura 11. Diagrama de cuadrado para el tamaño de partícula (Optimización) | 44 |
| Figura 12. Células hepáticas contrateñidas con yoduro de propidio (40x) | 48 |
| Figura 13. Localización de nanopartículas de tamaño mayor marcadas con FITC (40x) | 48 |
| Figura 14. Co-localización de nanopartículas de tamaño mayor marcadas con FITC y la zona nuclear de las células hepáticas contrateñidas con yoduro de propidio (40x) | 48 |
| Figura 15. Célula hepática y nanopartículas de tamaño mayor observadas en contraste de fases (40x) | 49 |
| Figura 16. Célula hepática contrateñida con yoduro de propidio (100x) | 49 |
| Figura 17. Localización de nanopartículas de tamaño mayor marcadas con FITC (100x) | 49 |
| Figura 18. Co-localización de nanopartículas de tamaño mayor marcadas con FITC y la zona nuclear de la célula hepática contrateñida con yoduro de propidio (100x) | 49 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Principales métodos de caracterización de las nanopartículas | 21 |
| Tabla 2. Tabla de los diferentes potenciales Z y su estabilidad | 23 |
| Tabla 3. Lista de materiales y reactivos | 31 |
| Tabla 4 Factores y niveles a considerar en el Screening | 32 |
| Tabla 5. Sistemas para el diseño experimental del Screening | 33 |
| Tabla 6. Sistemas para el diseño experimental de optimización | 35 |
| Tabla 7. Sistemas del Screening y el tamaño de partícula obtenido para cada sistema | 41 |
| Tabla 8. Análisis de varianza para el tamaño de partícula (Screening) | 42 |
| Tabla 9. Coeficientes de regresión para tamaño de partícula (Screening) | 43 |

| | |
|---|----|
| Tabla 10. Sistemas del diseño de experimentos de optimización y el tamaño de partícula obtenido para cada sistema | 43 |
| Tabla 11: Análisis de varianza para el tamaño de partícula (Optimización) | 44 |
| Tabla 12: Coeficientes de regresión para el tamaño de partícula (Optimización) | 45 |

Índice de Gráficas

| | |
|---|----|
| Gráfica 1. Resultados de la prueba de MTT para células hepáticas de ratón expuestas a dosis bajas y dosis altas de nanopartículas de dos tamaños diferentes a ácido acético al 1% (control negativo) y peróxido (control positivo). | 46 |
| Gráfica 2. Análisis de ANOVA, 95% de confianza. | 47 |

Índice de abreviaturas

°C: Grados Centígrados

µm: micras o micrómetros (1×10^{-6} metros)

AML12: Hepatocitos de ratón, código: ATCC® CRL-2254™

ATCC: American Type Culture Collection

CHI: Quitosán

CLSM: Microscopía Confocal de Barrido Laser (por sus siglas en inglés)

CO₂: Dióxido de Carbono

DBI: Dosis baja de nanopartículas de tamaño mínimo

DBII: Dosis baja de nanopartículas de tamaño máximo

DAI: Dosis alta de nanopartículas de tamaño mínimo

DAII: Dosis alta de nanopartículas de tamaño máximo

DLS: Dynamic light scattering

DMA: Metacrilato de dodecilo (por sus siglas en inglés)

DMSO: Dimetil Sulfóxido

ECA: Etilcianoacrilato

g: gramos

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno

HAc: Ácido Acético

HCl: ácido clorhídrico

HR: Humedad relativa

IC₅₀: Concentración mínima inhibitoria media máxima

kV: Kilo Volts

L.D.: laser difraction

MEB: Microscopía Electrónica de Barrido

MET: Microscopía Electrónica de Trnasmisión

min: Minutos

mL: mili litros

MTA: Mineral Trióxido Agregado

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)2H-tetrazolio

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

mV: mili Volts

N: Normal

NP: Nanopartículas

o/w: aceite en agua

OD: Densidad Óptica

PBS: Buffer Fosfato salino (por sus siglas en inglés)

PCS: Photon correlation spectroscopy

PECA: Polietil cianoacrilato

PEG: Polietilenglicol

pH: Potencial Hidrógeno

PVA: Polivinil alcohol

Radiación U.V.: Radiación Ultra Violeta

rpm: Revoluciones por minuto

SMA: Estearil metacrilato (por sus siglas en inglés)

TPP: Tripolifosfato

w/o/w: agua en aceite en agua

Z: Potencial Z

nm: Nanómetros (1×10^{-9} metros)

1. Marco teórico:

1.1 Definición de nanopartícula

Las nanopartículas están definidas como partículas con un tamaño en un rango de 10 a 1000nm en las que el principio activo puede estar disuelto, atrapado, encapsulado o adherido a la matriz de la nanopartícula. En los últimos años, las nanopartículas poliméricas, especialmente aquellas recubiertas con algún polímero hidrosoluble como el polietilenglicol (PEG), han sido utilizadas como potenciales dispositivos para la administración de fármacos debido a su habilidad para circular durante largos periodos de tiempo, dirigirse a un órgano en particular y como transporte de ADN en terapia genética entre muchos otros usos (Mohanraj & Chen, 2006).

El término nanopartícula polimérica es un término general para cualquier tipo de nanopartícula polimérica, pero específicamente para nanoesferas y nanocápsulas. Las nanoesferas son partículas matriciales, es decir que son partículas cuya masa es completamente sólida y las moléculas pueden ser adsorbidas en la superficie de la esfera o encapsuladas dentro de la partícula y por lo general son esféricas. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares que actúan como un tipo de reservorio, en el cuál las sustancias atrapadas están confinadas a una cavidad que consiste en un núcleo líquido (oleoso o acuoso) rodeado de una cubierta de material sólido (Prasad Rao & Geckeler, 2011).

1.2 Historia de las nanopartículas

El desarrollo de las nanopartículas comenzó desde inicios de los años 50's cuando se comenzaron a hacer grandes avances en la biofarmacia y la farmacocinética.

A lo largo de los años, diferentes combinaciones de materiales fueron probadas para la administración de vacunas y otros productos farmacéuticos con mayor o menor éxito.

Las primeras formulaciones de nanopartículas no llegaron muy lejos debido a la alta cantidad de surfactantes y fase orgánica requerida para la formación de estas nanopartículas así como la alta toxicidad del monómero. Sin embargo, con el tiempo, se fueron encontrando combinaciones más viables para la fabricación de las nanopartículas como:

- La utilización de gelatina y albúmina usando la desolvatación que ocurre al agregar alcohol o alguna sal inorgánica en altas concentraciones.
- La utilización de poli metilcianoacrilato y polietil cianoacrilato para la fabricación de nanopartículas acrílicas rápidamente biodegradables.

También se ha intentado crear nanopartículas que puedan ser captadas por un campo magnético, sin embargo no se ha logrado encontrar un campo amplio para su uso ya que es muy difícil que el campo magnético alcance las zonas internas del organismo limitándolas a un uso superficial únicamente.

A pesar de que el desarrollo de las nanopartículas comenzó en la década de 1950, no fue hasta 1978 que se determinó la definición de "nanopartículas" para propósitos farmacéuticos y médicos. Hoy en día, la aplicación más importante de las nanopartículas es su uso para los tratamientos contra el cáncer ya que en muchos casos se ha observado un aumento en la eficacia del tratamiento y en otros casos una disminución de la toxicidad de los tratamientos (Kreuter J. , 2007).

En un estudio clínico se encontró que las nanopartículas cargadas de doxorubicina tuvieron un mayor índice terapéutico en comparación con la doxorubicina administrada de forma libre y se

encontraron indicios prometedores de superar la resistencia multi-fármacos. A pesar de que algunos de los pacientes que tomaron parte en el estudio presentaron efectos secundarios tales como fiebre, dolor en los huesos o algún otro tipo de reacción alérgica, estos efectos adversos fueron bien tolerados y rápidamente reversibles una vez que se suspendió el tratamiento (Kattan, y otros, 1992).

Otra ventaja importante que se ha encontrado en el uso de nanopartículas es su capacidad para transportar medicamentos a través de la barrera hematoencefálica.

Un estudio demostró que concentraciones significativas, 65 veces por arriba del límite de detección, de doxorubicina pueden ser alcanzadas sin que aumente la toxicidad del medicamento cuando este está unido a nanopartículas de polibutil cianoacrilato recubiertas con polisorbato 80 mientras que las concentraciones alcanzadas con el medicamento libre permanecieron por debajo del límite de detección (Guyalev, Gelperina, Skidan, Antropov, Kivman, & Kreuter, 1999).

También se ha encontrado que al recubrir las nanopartículas con cadenas de polietilenglicol se puede evitar la opsonización de las nanopartículas evitando que sean removidas rápidamente por los macrófagos en el hígado, los pulmones y la médula espinal y se puede aumentar el tiempo de circulación de las nanopartículas en la sangre. El recubrimiento también ayuda a disminuir la captación de las nanopartículas por el hígado (Kreuter J. , 2007).

1.3 Clasificación

Las nanopartículas pueden ser preparadas de una variedad de materiales como proteínas, polisacáridos, polímeros y lípidos, entre otros. La selección de los materiales depende de diferentes factores tales como: el tamaño de la nanopartícula que se requiere, las propiedades del fármaco con el que serán cargadas, las propiedades de la superficie de la nanopartícula (carga y permeabilidad), el grado de biodegradabilidad, biocompatibilidad y toxicidad, perfil de liberación deseado para el principio activo y la antigenicidad del producto final (Mohanraj & Chen, 2006).

1.3.1 Nanopartículas a base de proteínas

Los solventes utilizados como vehículos para tratamientos de quimioterapia han sido muy importantes como medio de administración intravenosa para agentes hidrofóbicos. Sin embargo, estos solventes han sido asociados con toxicidades severas que limitan la dosis causando reacciones de hipersensibilidad, neutropenia y neuropatía. La nanotecnología, utilizando albúmina humana, utiliza rutas naturales para liberar de forma selectiva cantidades mayores de principio activo en tumores mientras evita algunas de las toxicidades causadas por las formulaciones basadas en solventes. (Hawkins, Soon-Shiong, & Desai, 2008)

Debido a las toxicidades limitantes de la dosis y su impacto negativo sobre la indisponibilidad asociadas con las formulaciones convencionales, nuevos vehículos de liberación son necesarios para mejorar la actividad antitumoral y reducir la toxicidad de los tratamientos contra el cáncer.

La terapia con nanopartículas fabricadas a base de proteínas ofrece una solución potencial a muchos de los problemas asociados con las formulaciones basadas en el uso de solventes. Al evitar la toxicidad asociada con los solventes y explotando caminos endógenos para la albúmina, la liberación de principio activo basada en proteínas puede resultar en concentraciones mayores de principio activo intratumorales. Adicionalmente, al evitar la necesidad de una pre-medicación, sistemas de infusión especiales y tiempos de administración prolongados, la tecnología de nanopartículas a base de proteínas ofrece una mayor facilidad para la administración, tiempos más cortos de infusión y una menor carga sobre la salud.

La albúmina tiene características únicas que la hacen particularmente apropiada como vehículo para la liberación dirigida en tratamientos oncológicos. La albúmina es un acarreador natural de moléculas hidrofóbicas (vitaminas, hormonas y constituyentes del plasma) con propiedades de enlace no covalentes. La unión de sustancias hidrofóbicas con la albúmina es reversible y permite el transporte dentro del cuerpo y la liberación en la superficie de las células. En estudios clínicos realizados en cáncer de pecho metastático se demostró una mejora en la eficacia del tratamiento al utilizar nanopartículas de albúmina, un perfil de seguridad favorable y una mejor conveniencia para el paciente en comparación con el tratamiento sin nanopartículas (Hawkins, Soon-Shiong, & Desai, 2008).

1.3.2 Nanopartículas a base de polisacáridos

Los polisacáridos parecen ser los materiales más prometedores en la preparación de nanopartículas de transporte.

Los materiales poliméricos utilizados para la preparación de nanopartículas para la liberación de medicamentos deben ser al menos biocompatibles y de preferencia biodegradables. De entre todos estos materiales, los polisacáridos son los materiales poliméricos más populares para preparar nanopartículas para uso farmacéutico.

En la naturaleza, los polisacáridos pueden ser de origen algal (alginato), de origen botánico (pectina, goma guar), de origen microbiano (dextrano, goma xanthan) o de origen animal (quitosán, condroitina).

Los polisacáridos tienen varios grupos reactivos, un intervalo grande de pesos moleculares y composición química variable lo que contribuye a su diversidad en estructura y en propiedades. Debido a la presencia de varios grupos derivables en las cadenas moleculares, los polisacáridos pueden ser modificados fácilmente química y biológicamente resultando en muchos tipos de derivados. Al ser biomateriales naturales, los polisacáridos son altamente estables, seguros, no tóxicos, hidrofílicos y biodegradables. Adicionalmente, son muy abundantes en la naturaleza y su procesamiento es barato. La mayoría de los polisacáridos tienen grupos hidrofílicos tales como hidroxilo, carboxilo y grupos amino que pueden formar enlaces no covalentes con tejidos biológicos (membranas epiteliales y mucosas) a este fenómeno se le conoce como una bioadhesión.

Las nanopartículas fabricadas de polisacáridos bioadhesivos, podrían prolongar el tiempo de residencia y por lo tanto incrementar la absorbancia de los principios activos cargados en las nanopartículas. Estas características hacen que los polisacáridos sean una alternativa prometedora como transporte de principios activos y los problemas relacionados con la seguridad, la toxicidad y la disponibilidad se simplifican (Liu, Jiao, Wang, Zhou, & Zhang, 2008).

1.3.3 Nanopartículas a base de lípidos (liposomas)

Los liposomas son vesículas esféricas de bicapas compuestas de uno o varios fosfolípidos (generalmente fosfatidil clorina). Los fármacos lipofílicos pueden ser incorporados dentro de las bicapas lipídicas mientras que los fármacos hidrofílicos son disueltos en el interior del núcleo acuoso. La liberación del fármaco, la estabilidad *in vivo* y la bio distribución son determinadas por el tamaño, la carga superficial, la hidrofobicidad de la superficie y la fluidez de la membrana. La permeabilidad de membrana puede ser adaptada seleccionando los fosfolípidos e incorporando aditivos (colesterol por ejemplo). Es posible evitar una absorción endotelial rápida de los liposomas incorporando compuestos naturales o utilizando polietilén glicoles alterados

químicamente. El desarrollo de estos liposomas permite la realización de tratamientos focalizados. Los tratamientos basados en liposomas, también permiten la inyección intravenosa de fármacos lipofílicos con una baja solubilidad en agua (anfotericina B). La toxicidad de los sistemas de liposomas es 1/10 comparada con los sistemas comerciales basados en formulaciones micelares de anfotericina. Problemas de estabilidad química y fisicoquímica pueden llevar a la agregación de los liposomas y a la degradación del fármaco durante el almacenamiento y comprometer el rendimiento de los transportes de fármacos basados en liposomas. (Mehnert & Mäder, 2001)

1.3.4 Nanopartículas a base de polímeros

Las interacciones entre las nanopartículas y las biomoléculas son de gran interés para la bionanotecnología. Para proveer una unión específica y fuerte, las nanopartículas poliméricas a menudo son conjugadas con ligandos biomoleculares como péptidos y anticuerpos.

La unión no específica de proteínas a las nanopartículas puede ser mejorada adjuntando polietilenglicol a la nanopartícula. Las nanopartículas de polímeros sintéticos capaces de unirse a biomoléculas específicas son de gran interés como sustitutos de ligandos naturales como los anticuerpos. Estas nanopartículas pueden ser utilizadas como materiales para diagnóstico, herramientas de investigación en biología molecular, liberación de principios activos, terapia para algunas enfermedades y como antídotos para toxinas y virus (Hoshino, y otros, 2009).

En este trabajo de tesis optimizamos nanopartículas preparadas a base de quitosán y polietilenoacrilato. A continuación se resaltan algunas de sus características y usos.

1.4 Nanopartículas de quitosán

La quitina es, después de la celulosa, el polímero más abundante que se puede encontrar en la naturaleza siendo componente de las ostras, insectos y la pared celular de las bacterias y hongos.

El quitosán es el producto N-deacetilado de la quitina y debido a su biodegradabilidad y su biocompatibilidad reportadas, ha sido desarrollado para una gran variedad de aplicaciones biomédicas incluyendo sistemas de liberación de fármacos, estabilizando liposomas, como excipiente para controlar la liberación de formulaciones orales, sistemas de administración nasal y para preparar microesferas para encapsulación de enzimas, proteínas y células así como para la administración de ADN (Carreño-Gómez & Duncan, 1997).

Se han utilizado microesferas y micro cápsulas de quitosán para la administración de medicamentos de liberación prolongada y proteínas como albúmina sérica bovina. Se ha encontrado que las microesferas de quitosán de pequeño tamaño (<5µm) tienen la capacidad de liberar el fármaco en un sitio específico (He, Davis, & Illum, 1998).

La biocompatibilidad del quitosán debe ser definida en contexto con la ruta de administración propuesta, el polímero que se utilizará y el uso final que se le dará, ya que esta puede variar dependiendo del método y la vía de administración.

La citotoxicidad del quitosán es dependiente de la concentración, la sal utilizada y el peso molecular del polímero formado (Carreño-Gómez & Duncan, 1997).

1.5 Nanopartículas de Polialquil cianoacrilato

Los polialquil cianoacrilatos no fueron utilizados como polímeros hasta el inicio de los años 80. Sin embargo, los monómeros correspondientes se comenzaron a utilizar muchos años antes debido a sus excelentes propiedades adhesivas resultantes de las fuertes uniones que son capaces de formar con la mayoría de los sustratos polares, incluyendo tejidos y piel. Por lo tanto, estos monómeros han sido utilizados extensamente como adhesivos de tejido y pegamentos quirúrgicos. Un uso más reciente que se le ha dado a los polialquil cianoacrilatos es como transportadores nanoparticulados. Otras moléculas de interés incluyendo compuestos de baja estabilidad como los péptidos y ácidos nucleicos han sido combinadas con nanopartículas de polialquil cianoacrilato con propósitos de focalización. Hoy en día, las nanopartículas de polialquil cianoacrilato son consideradas el sistema polimérico de liberación de fármacos coloidales más prometedor y ya se encuentran en desarrollo clínico para terapia contra el cáncer.

La familia de nanopartículas de polialquil cianoacrilato está compuesta por nanoesferas, nanocápsulas conteniendo agua o aceite y nanoesferas core Shell.

La excreción total del material polimérico ocurre únicamente si las nanopartículas fueron diseñadas utilizando únicamente polímeros de bajo peso molecular (Vauthier, Dubernet, Fattal, Pinto-Alphandary, & Couvreur, 2003).

1.6 Nanopartículas de Quitosán/Polialquil cianoacrilato:

El desarrollo de sistemas bioadhesivos de liberación controlada ha cobrado gran importancia en los últimos años. Esto se debe a que estos sistemas pueden mejorar la eficacia de los medicamentos manteniendo una concentración terapéutica del fármaco o principio activo en el plasma por tiempos más prolongados inhibiendo así la dilución del principio activo y aumentando la actividad de este en el sitio específico de absorción.

Además, estos sistemas, tienen la capacidad de proteger al principio activo frente a una degradación enzimática lo que los hace muy útiles para aumentar la biodisponibilidad de péptidos bioactivos, proteínas y polisacáridos.

Las partículas de polialquil cianoacrilato han sido utilizadas con éxito para encapsular moléculas biológicamente activas con buenos resultados. Sin embargo las propiedades hidrofóbicas y aniónicas de estas nanopartículas las hacen poco viables para el desarrollo de sistemas bioadhesivos. Sin embargo, es posible cambiar las propiedades de la superficie de las nanopartículas con núcleo de polialquil cianoacrilato recubriéndolas con diferentes polisacáridos para mejorar su bioadhesión.

Entre los carbohidratos más utilizados en el medio farmacéutico se encuentra el quitosán, que es un polímero catiónico semisintético de naturaleza bioadhesiva. Este compuesto puede aumentar también la absorción de moléculas hidrofílicas. (Bravo-Osuna, Vauthier, Farabollini, Palmieri, & Ponchel, 2007)

1.7 Métodos de preparación:

Las nanopartículas poliméricas pueden ser obtenidas a partir de polímeros pre-formados o por la polimerización directa de monómeros utilizando una polimerización clásica o reacciones de polimerización (polireacciones). Otros métodos como la evaporación de solvente, salting-out, diálisis y tecnología de fluidos súper críticos pueden ser utilizados para la preparación de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pre-formados. La polimerización de los monómeros se puede realizar mediante diferentes técnicas como micro-emulsión, mini-emulsión, emulsión libre de surfactantes y polimerización interfacial. La elección del método de obtención de las nanopartículas depende de varios factores como el tipo de sistema polimérico que se desea, el campo de aplicación, el tamaño de partícula requerido, entre otros (Prasad Rao & Geckeler, 2011).

1.7.1 Reacciones de polimerización (Polireacciones)

Se le llama polireacciones a todas aquellas reacciones en las cuales a partir de la unión de moléculas de bajo peso molecular (monómeros) se forman moléculas de alto peso molecular (polímeros). Las reacciones de polimerización son reacciones en cadena que inician con la rápida unión de monómeros a un centro activo formando una cadena. Este paso dura entre 1 y 3 segundos, después la cadena se rompe y ya no toma parte en la reacción de adición. De esta manera, se forman continuamente nuevos centros activos que llevan a la formación de nuevas cadenas. (Geckeler & Stirn, 1993).

1.7.1.1 Polimerización catiónica

Existen tres grupos de monómeros que se pueden polimerizar de forma catiónica: monómeros con dobles o triples enlaces, sistemas anillados con heteroátomos y derivados de olefinas ricos en electrones. La reacción se puede iniciar en presencia de algún ácido (ácido sulfúrico, ácido perclórico, ácido clorhídrico), en presencia de carbocationes de alguna sal orgánica o con radiación ionizante (radiación U.V) (Geckeler & Stirn, 1993).

1.7.1.2 Polimerización aniónica

Los ésteres de los cianoacrilatos son unos de los monómeros más reactivos en las polimerizaciones aniónicas. La reacción de polimerización se inicia con trazas de bases débiles, incluyendo el agua, y solo se detiene en presencia de ácidos fuertes o súper ácidos.

También se ha demostrado que si se agrega un exceso de agua al sistema la reacción de polimerización se ve favorecida.

Couvreur desarrolló un método que consiste en agregar gota a gota el polímero en una solución de ácido clorhídrico (HCl) a un pH entre 2 y 3 que contenga un surfactante no iónico o polimérico.

Los factores a controlar son la concentración de los reactantes (monómero), el pH y la naturaleza y la concentración del surfactante tienen un papel determinante en el tamaño de las partículas que puede variar en un rango de 25nm hasta algunas micras.

Se utilizan monómeros de cianoacrilatos ya que estos eran, hasta hace poco, los únicos conocidos además de los ciclosiloxanos que polimerizaban de forma aniónica en el agua. (Limouzin, Caviggia, Ganachaud, & Hémerly, 2003)

A pH entre 2.25 y 3.5 se pueden obtener nanopartículas de bajo peso molecular y un tamaño de partícula que oscila entre 100 y 200nm mientras que a pH mayor a 5 ocurre una polimerización

rápida que resulta en la formación de grandes aglomerados sin estructura con una distribución de diferentes tamaños de partícula del polímero. (Behan, Birkinshaw, & Clarke, 2001)

Sin embargo, en un estudio realizado por Luc Vansnick y colaboradores se demostró que el peso molecular de las nanopartículas de polialquil cianoacrilato también puede ser modificado por la composición del medio de polimerización, la naturaleza de los monómeros y el principio activo que será ligado a la nanopartícula. También se resalta la influencia de los surfactantes ya que con el uso de estos, se obtienen polímeros de alto peso molecular.

Es importante determinar el peso molecular de los polímeros que forman las nanopartículas ya que el largo de las cadenas del polímero puede modificar su distribución en el organismo así como el ritmo de degradación del polímero y a su vez la biodisponibilidad del fármaco que es transportado dentro de la nanopartícula. (Vansnick, Couvreur, & Christiaens-Leyh, 1984)

Con este método de elaboración se comprobó que las nanopartículas comienzan a formarse en concurrencia con la formación de especies oligoméricas más que con el polímero de alto peso molecular. Esto refuerza la hipótesis de que las nanopartículas de cianoacrilato se forman por agregación de especies oligoméricas (Behan, Birkinshaw, & Clarke, 2001).

1.7.1.3 Polimerización por emulsión

Este es el método más utilizado para la producción de una gran cantidad de polímeros. El uso de agua como medio de dispersión es amigable con el ambiente y permite la fácil dispersión del calor durante el proceso de polimerización. En la polimerización por emulsión convencional, se utiliza agua como medio de dispersión, un polímero de baja solubilidad en el agua, un iniciador soluble en agua y un surfactante. En este proceso es necesario eliminar el surfactante del producto final, sin embargo los surfactantes son difíciles de eliminar por completo y es un proceso que requiere energía y tiempo lo que aumenta el costo de producción. Para evitar este problema se ha realizado una emulsión libre de surfactantes. Los reactivos utilizados para este proceso incluyen agua desionizada, un iniciador soluble en agua y el monómero. En estos sistemas de polimerización la estabilidad de las nanopartículas ocurre utilizando iniciadores ionizables o

co-monómeros iónicos (Prasad Rao & Geckeler, 2011).

1.7.1.4 Polimerización por mini y micro emulsión

La formulación típica para una polimerización por mini emulsión consiste de agua, la mezcla de monómero, un co-estabilizante, un surfactante y un iniciador. La principal diferencia entre este método y la polimerización por emulsión es la utilización de un compuesto de bajo peso molecular como co-estabilizante y el uso de un equipo con alto poder de cizallamiento (ultra sonido, etc.). Las mini emulsiones requieren un alto cizallamiento para alcanzar un estado estable y tienen una tensión interfacial mucho mayor a cero. A pesar de que este método utiliza una cantidad pequeña de surfactante, una parte de este queda en el polímero cambiando las propiedades de las nanopartículas poliméricas. Para superar este problema, se utiliza SMA (estearil metacrilato) y DMA (metacrilato de dodecilo) extremadamente hidrofílicos para estabilizar la mini emulsión durante la polimerización (Prasad Rao & Geckeler, 2011).

En la micro emulsión, el tamaño de partícula y el número promedio de cadenas por partícula son considerablemente menores que en la emulsión y la mini emulsión, un iniciador soluble en agua es agregado a la fase acuosa de una micro emulsión termodinámicamente estable conteniendo micelas hinchadas. La polimerización inicia de este estado termodinámicamente estable y formado de forma espontánea y depende de grandes cantidades de surfactantes (Prasad Rao & Geckeler, 2011).

1.7.1.5 Polimerización interfacial

La polimerización interfacial es uno de los métodos bien establecidos para la preparación de nanopartículas poliméricas. Este método involucra la polimerización de dos monómeros reactivos o agentes reactivos, que están disueltos respectivamente en dos fases y la reacción de polimerización ocurre en la interface de los dos líquidos (Prasad Rao & Geckeler, 2011).

1.7.1.6 Polimerización controlada o polimerización viva vía radical

Las limitaciones principales de la polimerización vía radical incluyen la falta de control sobre la masa molar, la distribución de la masa molar, la funcionalidad final y la arquitectura macromolecular. Estas limitaciones son debido a las rápidas reacciones terminales radical-radical.

Dentro de las reacciones de polimerización controladas se encuentran la polimerización nitroxida-metilada, polimerización radical de transferencia de átomo y la adición reversible y fragmentación de polimerización de transferencia de cadena (Prasad Rao & Geckeler, 2011).

1.7.2 Evaporación del solvente

La evaporación del solvente fue el primer método desarrollado para preparar nanopartículas poliméricas a partir de polímeros preformados. Su mayor desarrollo se encuentra en la tecnología farmacéutica donde polímeros biodegradables se han utilizado para la producción de medicamentos. En este método se preparan soluciones de polímero en solventes volátiles para formar emulsiones. Anteriormente se utilizaba cloroformo o diclorometano pero fueron sustituidos por acetato de etilo que tiene un mejor perfil toxicológico. A medida que el solvente es evaporado, la emulsión se convierte en una suspensión de nanopartículas.

Este método es el más utilizado para preparar nanopartículas utilizando una dispersión de polímero pre formado. En los métodos convencionales se puede preparar una emulsión simple como aceite-en-agua (o/w) o bien se puede preparar una emulsión doble como agua-en-aceite-en-agua (w/o/w). Estos métodos utilizan homogeneización de alta velocidad o ultrasonificación y el solvente se evapora mediante agitación constante a temperatura ambiente o bajo presión reducida. Después, las nanopartículas solidificadas pueden ser obtenidas mediante ultra centrifugación y finalmente el producto es liofilizado. Generalmente el polímero disuelto en un solvente orgánico forma la fase oleosa mientras que la fase acuosa contiene el estabilizante (Prasad Rao & Geckeler, 2011).

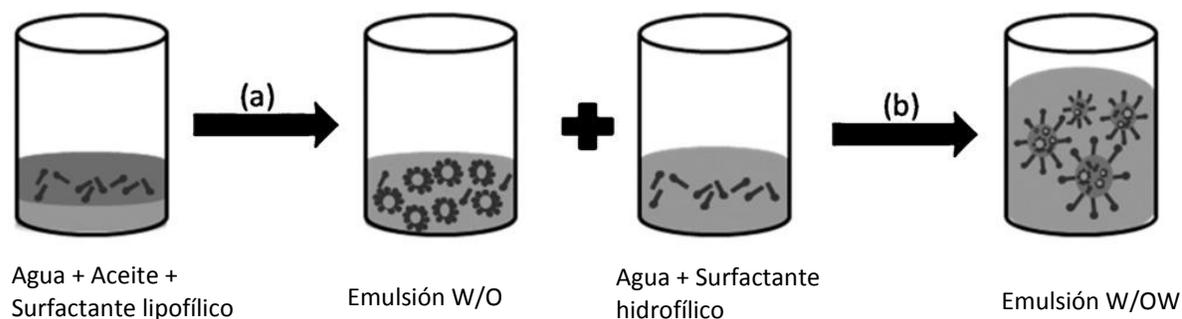


Figura 1. Método de preparación por el método de evaporación de solvente en una emulsión doble (Prasad Rao & Geckeler, 2011).

1.7.3 Salting-out

Este método es una versión modificada del método de evaporación del solvente que involucra un proceso de salting-out, que evita el uso de surfactantes y solventes clorados. La emulsión es formada por el polímero disuelto en un solvente que normalmente es completamente miscible con el agua (por ejemplo acetona) y la emulsificación de la solución polimérica se logra, sin utilizar grandes fuerzas de corte, disolviendo grandes cantidades de una sal o sacarosa con un gran efecto de salting-out en la fase acuosa (cloruro de magnesio, cloruro de calcio y acetato de magnesio son los electrolitos más utilizados). Las propiedades de miscibilidad del agua con otros solventes cambian cuando estos componentes se disuelven en el agua. Un efecto de salting-out inverso, logrado al diluir la emulsión con una gran cantidad de agua, lleva a la precipitación del polímero disuelto en las gotas de la emulsión. La migración del solvente por el polímero de las gotas de emulsión es inducida por la reducción de la concentración de sal o sacarosa en la fase continua de la emulsión (Prasad Rao & Geckeler, 2011).

1.7.4 Nanoprecipitación

Este método también es llamado método de desplazamiento de solvente. El principio básico de esta técnica se basa en la disposición del polímero después del desplazamiento de un solvente semipolar, miscible con el agua, de una solución lipofílica. La rápida difusión del solvente dentro de la fase no solvente (agua) resulta en la disminución de la tensión superficial entre las dos fases lo que aumenta el área superficial y lleva a la formación de pequeñas gotas de solvente orgánico. El sistema de nanoprecipitación consiste de tres componentes básicos: el polímero, el solvente del polímero y el no solvente (agua). Las nanopartículas se producen al adicionar lentamente la fase orgánica a la fase acuosa con agitación constante. Las nanopartículas con un tamaño bien definido se caracterizan por una distribución formada instantáneamente durante la rápida difusión de la solución polimérica en la fase acuosa (Prasad Rao & Geckeler, 2011).

1.7.5 Diálisis

La diálisis proporciona un método simple y efectivo para la preparación de nanopartículas poliméricas pequeñas. El polímero es disuelto en un solvente orgánico e introducido dentro de un tubo para diálisis con el calibre apropiado para las nanopartículas. La diálisis se lleva a cabo contra un no solvente miscible con el solvente. El desplazamiento del solvente dentro de la membrana es seguido por la progresiva agregación del polímero debido a la pérdida de solubilidad y a formación de suspensiones homogéneas de nanopartículas (Prasad Rao & Geckeler, 2011).

1.7.6 Tecnología de fluidos supercríticos

Se espera que la tecnología de fluidos supercríticos ofrezca una técnica efectiva para la producción de nanopartículas evitando la mayoría de los inconvenientes de los métodos tradicionales como es el uso de solventes orgánicos.

Se han desarrollado dos procesos para la producción de nanopartículas utilizando fluidos supercríticos:

1. Solución supercrítica de expansión rápida: este método consiste en disolver el soluto en un fluido supercrítico para formar una solución, seguido de una rápida expansión de la solución a través de un orificio o la boquilla de un capilar al ambiente. El alto grado de supersaturación acompañado de la rápida reducción de la presión en la expansión resulta en una nucleación homogénea y la formación de partículas bien dispersas (Prasad Rao & Geckeler, 2011).
2. Solución supercrítica de expansión rápida en un solvente líquido: es una modificación simple del método anterior que involucra la expansión de la solución supercrítica en un solvente líquido en vez de en el ambiente. Aparentemente el solvente líquido suprime el crecimiento de las partículas en la expansión haciendo posible obtener partículas en el rango de los nanómetros (Prasad Rao & Geckeler, 2011).

1.7.7 Coacervación o gelación iónica

Se ha investigado en la preparación de nanopartículas utilizando polímeros hidrosolubles biodegradables como quitosán, gelatina y alginato de sodio. El método involucra una mezcla de dos fases acuosas. En una de las fases se encuentra el polímero (quitosán por ejemplo) y en la otra se encuentra un poli anión (tripolifosfato de sodio por ejemplo). El grupo amino del quitosán, que tiene carga positiva, interactúa con el tripolifosfato que tiene carga negativa formando coacervados con un tamaño de partícula en el rango de los nanómetros (Mohanraj & Chen, 2006).

1.8 Métodos de caracterización

La nanotecnología es la ciencia que se encarga de realizar las mediciones en proporciones de nanoescala y su aplicación está presente en toda la nanotecnología, esta incluye la longitud y/o el tamaño, así como la medición de la fuerza, masa y carga eléctrica entre otras propiedades (Rivero González, 2013).

Los principales parámetros fisicoquímicos a determinar en las nanopartículas son el tamaño, la forma, las propiedades de la superficie, la densidad y la concentración de las partículas. El tamaño, así como la distribución de este, son parámetros importantes a determinar para lograr una administración intravenosa segura. Las propiedades de la superficie son importantes a considerar ya que estas propiedades son responsables de ciertas interacciones con el medio que rodea a las nanopartículas. Finalmente, la densidad y la concentración son requeridas para deducir el área superficial específica de las partículas junto con su tamaño (Swarbrick & Boylan, 2002).

Tabla 1: Principales métodos de caracterización de las nanopartículas

| Caracterización de Nanopartículas | |
|-----------------------------------|--|
| Potencial Z | <ul style="list-style-type: none"> • Dispersión electroforética de luz |
| Tamaño de Partícula | <ul style="list-style-type: none"> • Dispersión de luz dinámica • Difracción laser |
| Morfología | <ul style="list-style-type: none"> • Microscopía electrónica de barrido • Microscopía electrónica de transmisión • Microscopía confocal |

A continuación se comentan algunas de las características inherentes de los sistemas nanoparticulados así como algunos de los métodos empleados de estudio.

1.8.1 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula y la distribución del tamaño son las características más importantes de los sistemas nanoparticulados. Estos determinan la distribución *in vivo*, el destino biológico, la toxicidad y la habilidad de focalizar de este tipo de sistemas. Además, pueden influenciar la carga de fármaco, la liberación del fármaco y la estabilidad de las nanopartículas. La liberación del fármaco se ve afectada por el tamaño de partícula, ya que partículas más pequeñas tienen una mayor área superficial y por lo tanto la mayor parte del fármaco asociado a la nanopartícula estará en o cerca de la superficie de la nanopartícula, llevando a una rápida liberación del fármaco mientras que en partículas de mayor tamaño, se tienen una mayor cantidad de fármaco encapsulado y una difusión más lenta hacia el medio (Mohanraj & Chen, 2006).

Se ha encontrado que nanopartículas de 100nm de tamaño tienen una aceptación 2.5 veces mayor de fármaco que micro partículas de un tamaño de 1µm y 6 veces mayor que microesferas con un tamaño de 10µm. Las nanopartículas pueden atravesar a través de las capas mucosas del intestino en ratas mientras que las micropartículas se localizaron principalmente en el revestimiento epitelial (Mohanraj & Chen, 2006).

La espectroscopia de correlación de fotones o PCS (*photoncorrelationspectroscopy*) y la difracción laser o LD (*laser diffraction*) son dos de las técnicas más eficaces para determinar el tamaño de partícula.

La PCS, también conocida como dispersión de luz dinámica o DLS (*dynamic light scattering*), mide la fluctuación de la intensidad de la luz dispersada por el movimiento de las partículas. Esta técnica se puede aplicar para partículas con un tamaño desde algunos nanómetros hasta 3 micras pero no es capaz de detectar partículas de mayor tamaño. La difracción laser se basa en la dependencia del ángulo de difracción con el radio de la partícula. Debido a esta dependencia, las partículas de menor tamaño causan una dispersión más intensa en comparación con moléculas más grandes. Una clara ventaja de este método, es que cubre un rango más amplio de tamaño permitiendo detectar partículas que van desde los nanómetros hasta algunos milímetros.

Hay que tener en cuenta, que estas técnicas no miden el tamaño de partícula, más bien detectan los efectos de dispersión que son utilizados para calcular tamaños de partícula. Estos métodos pueden presentar dificultades con muestras que contengan partículas de diferentes tamaños por lo que la utilización de técnicas complementarias es muy útil. La microscopía óptica, a pesar de que no es sensitiva al nivel de los nanómetros, da una indicación rápida de la presencia y el

carácter de micropartículas o aglomerados de partículas presentes en la muestra. La microscopía electrónica provee, a diferencia de la PCS y la LD, información directa sobre la forma de la partícula. (Mehnert & Mäder, Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications, 2001)

1.8.2 Propiedades de la superficie de las nanopartículas

Cuando las nanopartículas son administradas vía intravenosa, son fácilmente reconocidas por el sistema inmune del cuerpo y son eliminados de la circulación por los fagocitos. La hidrofobicidad de la superficie de las nanopartículas determina la cantidad de componentes sanguíneos adsorbidos, principalmente proteínas (opsoninas). La unión de estas opsoninas a las nanopartículas llamada opsonización actúa como puente entre las nanopartículas y los fagocitos. Para incrementar la probabilidad de éxito de la focalización del fármaco por las nanopartículas, es necesario disminuir la opsonización y prolongar la circulación de las nanopartículas *in vivo*. Esto puede lograrse recubriendo la superficie de las nanopartículas con polímeros o surfactantes hidrofílicos, formulando las nanopartículas con co-polímeros biodegradables con segmentos hidrofílicos como el polietilenglicol, poloxamer, poloxamina y polisorbato 80 (Tween 80). Las nanopartículas recubiertas con Tween 80 han mostrado la capacidad de atravesar la barrera hemoencefálica (Mohanraj & Chen, 2006).

1.8.3 Potencial Zeta

Los sistemas dispersos representan una clase importante de formas de administración tales como emulsiones, suspensiones, microesferas, liposomas y nanopartículas. El medio de dispersión por lo general es acuoso y la fase dispersa puede ser partículas sólidas o gotas líquidas inmiscibles. Cargas eléctricas se forman en la interface entre la fase dispersa y el medio acuoso debido a diferentes mecanismos tales como la ionización de grupos funcionales de la superficie o la absorción específica de iones. Estas cargas eléctricas juegan un papel importante para determinar la interacción entre las partículas de la fase dispersa y la estabilidad física de los sistemas, en particular para aquellos sistemas en el tamaño de coloides. Las cargas superficiales también afectan la eficacia terapéutica y el destino que tendrán, *in vivo*, estos sistemas por lo que es importante comprender este fenómeno eléctrico para desarrollar este tipo de sistemas (Swarbrick & Boylan, 2002).

El potencial existente entre la superficie líquida unida a la partícula y la fase mayor de la solución es llamado potencial Zeta. Este potencial puede proveer una medida de la carga neta en la superficie de la partícula y la distribución en la interface. El potencial Zeta sirve como un parámetro importante para caracterizar la interacción electrostática entre las partículas en sistemas dispersos y como son afectadas estas propiedades por este fenómeno eléctrico. La carga superficial y los contraiones en su cercanía generan una doble capa que a su vez está dividida en dos partes separadas por un plano llamado capa Stern. Por lo general el número de iones en la capa Stern es menor a lo necesitado para lograr una neutralización de la carga superficial y ésta neutralización ocurre en una capa Gouy-Chapman fuera de la capa Stern. El potencial entre la capa líquida unida a la superficie de la partícula (plano shear) y la matriz de la solución es llamado el potencial zeta (Z) (Swarbrick & Boylan, 2002).

El potencial Zeta refleja el potencial eléctrico de las partículas y está influenciado por la composición de las partículas y el medio en el que están dispersas. Las partículas con un potencial Z sobre los (+/-) 30mV han demostrado ser estables en suspensión ya que la carga de la superficie previene la agregación de las partículas. El potencial Zeta también puede ser utilizado para determinar si el principio activo está encapsulado dentro de la nanopartícula o adsorbido en su superficie (Mohanraj & Chen, 2006).

Tabla 2: Tabla de los diferentes potenciales Z y su estabilidad (Riddic, 1968)

| Estabilidad | Potencial Z (mV) |
|------------------------|------------------|
| Muy buena | -100 a -60 |
| Buena | -60 a -40 |
| Moderada | -40 a -30 |
| Umbral de dispersión | -30 a -15 |
| Umbral de aglomeración | -15 a -10 |
| Fuerte aglomeración | -5 a +5 |
| Precipitación | |

1.8.4 Microscopía electrónica

El microscopio electrónico permite el examen directo de un nivel de estructura más fino de las estructuras que cualquier otro instrumento y revela detalles anteriormente inaccesibles. Como resultado, se ha aumentado notablemente el conocimiento de la organización de los tejidos de plantas y animales y han cambiado las ideas acerca del modo en que se han constituido las células y su funcionamiento. También se ha logrado un mayor entendimiento sobre la estructura y la reproducción de los virus (**Grimstone, 1981**).

La fuente de iluminación de un microscopio electrónico es el llamado “cañón electrónico” que usualmente consiste en un pequeño trozo de alambre en forma de “V” (el filamento o cátodo), junto con dos placas metálicas circulares con perforaciones taladradas en sus centros. Al aplicar un alto voltaje entre el filamento (negativo) y una de las placas (ánodo positivo), fluye una corriente a través del filamento y lo calienta hasta la incandescencia provocando la emisión de electrones que son atraídos por el ánodo que tiene una carga opuesta a la de los electrones y algunos pasan por la perforación central. La cantidad de electrones que pasan a través de la perforación se incrementa por la presencia de una segunda placa (cilindro de Wehnelt) cargada negativamente. El propósito de esta segunda placa metálica es concentrar los electrones emitidos por el filamento en un haz que pasa a lo largo del eje del cañón y a través de la perforación central del ánodo.

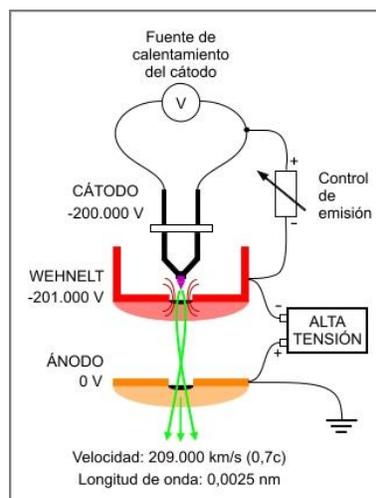


Figura 2: Esquema general de un microscopio electrónico

La misión del cañón de electrones, es producir un haz de electrones que circule en una dirección y una velocidad determinadas. La diferencia de potencial aplicada entre el filamento y el ánodo varía entre 40,000 y 100,000 V (40-100 kV) y a mayor diferencia de potencial, mayor es la energía de los electrones. Así mismo, el voltaje de aceleración determina la longitud de onda de los electrones.

Un campo magnético radialmente simétrico, tal como el producido por una bobina de alambre cuando es atravesada por una corriente, actúa como una lente y puede utilizarse para enfocar un haz electrónico. En la práctica, una lente electrónica consiste en una bobina hecha de unos millares de vueltas de hilo conductor por la que circula una corriente aproximada de 1 amperio. El campo magnético producido se concentra por medio de una carcasa de hierro dulce que contiene a la bobina.

Debido a que los ojos no son sensibles a los electrones, la imagen final es proyectada sobre una pantalla de visualización recubierta de un material fluorescente cuando es irradiado por electrones o sobre una placa fotográfica si la imagen debe ser registrada de forma permanente (Grimstone, 1981).

1.8.4.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

El microscopio electrónico de transmisión funciona al alto vacío y la imagen es dada por los electrones transmitidos a través de la muestra por lo que el grosor de la muestra debe ser menor a 100nm para obtener una buena resolución. Debido a la interacción de los electrones de alta energía, la muestra debe estar protegida con metales pesados para que soporten dicha interacción. Las muestras que vayan a ser analizadas deben cumplir los siguientes requisitos:

- No se pueden observar materiales vivos o que contengan agua por que el sistema funciona al alto vacío.
- La muestra se debe proteger contra la luz de los electrones
- La muestra debe tener un grosor adecuado para permitir que los electrones sean transmitidos y así poder obtener una buena resolución en la imagen (González Gallardo, Ruiz Venegas, & Hernández Baumgarten, 2003).

1.8.4.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

A pesar de tratarse de un instrumento distinto al MET convencional, ambos equipos tienen mucho en común. El MEB tiene la ventaja de que las muestras necesitan muy poca preparación y las técnicas utilizadas son similares a las empleadas en el MET. La mayoría de los MEB sólo pueden examinar superficies que sean conductoras eléctricas, cualquier objeto que resista el alto vacío puede ser observado, la muestra puede ser observada poniéndola directamente en el microscopio sin necesidad de cortarla en láminas finas por lo que puede tener un grosor de algunos centímetros. La mayor limitación que tiene el MEB, es la baja resolución y la imposibilidad de ver dentro de la muestra, todas las muestras deben ser anhidras para que resistan el vacío y puedan ser recubiertas con oro ionizado para hacerlas conductoras eléctricas. (González Gallardo, Ruiz Venegas, & Hernández Baumgarten, 2003)

1.8.5 Microscopía confocal

La microscopía confocal de barrido laser (CLSM por sus siglas en inglés), al igual que otras técnicas de fluorescencia, es una herramienta que a pesar de ser útil para la caracterización física de fármacos no es muy utilizada en la actualidad. La aplicación de técnicas de fluorescencia en los aspectos celulares y biomédicos de la liberación de los fármacos es extensa. En comparación la literatura que describa la caracterización física de sistemas farmacéuticos es menos extensa y a pesar de que provee ejemplos que ilustran el potencial y el alcance a futuro estas técnicas sólo se utilizan en casos aislados mientras que el uso de CLSM en el área biológica se ha convertido básicamente en rutina haciendo que esta técnica esté más avanzada en el área biológica. Sin embargo, el potencial para la formación de imágenes de alta resolución, el seccionamiento óptico no invasivo, reconstrucciones tridimensionales, en combinación con la sensibilidad, selectividad y versatilidad de las mediciones de fluorescencia, proporciona oportunidades excelentes para el sondeo y mejor entendimiento del comportamiento de los productos farmacéuticos.

La utilización de la CLSM tiene grandes ventajas como:

- Reducción en la difuminación de la imagen a causa de la dispersión de la luz
- Resolución incrementada
- Relación señal-interferencia mejorada
- Observación clara de objetos espesos y que dispersan la luz.

El microscopio confocal ha demostrado ser particularmente valioso para mejorar las imágenes de fluorescencia. Muchos microscopios confocales pueden ser utilizados en modo de reflexión confocal y fluorescencia además de hacer imágenes en transmisión óptica y, dependiendo de la fuente del láser y la óptica, puede ser capaz de hacer imágenes de tres fluoróforos diferentes simultáneamente. La fluorescencia procede de átomos o moléculas que absorben energía de la luz haciendo que los electrones se exciten a un nivel energético y vibraciones más alto para luego regresar a su estado basal al perder energía al emitir fotones. Este tipo de moléculas se llaman fluoróforos y poseen diferentes características espectrales debido a su diferente configuración electrónica lo que hace que cada fluoróforo sea sensible a un rango específico de longitudes de onda en respuesta a lo cual emite fluorescencia en longitudes de onda mayores (Pygall, Whetstone, Timmins, & Melia, 2007).

La microscopía confocal permite la realización de imágenes muy detalladas con respecto a la localización de nano sensores introducidos en las células y es esencial para el desarrollo de métodos de liberación intracelular.

Al combinar la microscopía confocal y la citometría de flujo, se pueden obtener información relevante para el desarrollo y la aplicación de nano sensores ya que ambas técnicas son idóneas para examinar a los nano sensores (Coupland, Fisher, E. Jones, & Aylott, 2008).

1.9 Optimización estadística

Una de las metas de este trabajo de tesis, fue optimizar la obtención de nanopartículas de composición híbrida y única a partir de quitosán y polietil cianoacrilato. La optimización del proceso de elaboración de las nanopartículas es importante ya que permite asegurar la obtención de estructuras con las mismas propiedades fisicoquímicas (por ejemplo el tamaño) de interés ya que consideran algunos factores influyentes durante su preparación. Con este conocimiento se puede elegir las condiciones ideales de preparación de acuerdo a específicas de interés que portarán las nanopartículas.

En este trabajo de tesis, las variables a controlar fueron:

- Velocidad de agitación.
- Tiempo de agitación para el etilcianoacrilato (ECA)
- Tiempo de agitación para el quitosán (CHI).
- La cantidad de tensoactivo (Pluronic F-68).
- Cantidad de tripolifosfato (TPP).

Una vez establecidos los valores, estos fueron vaciados en el programa estadístico Statgraphics Centurion XV como variables independientes (X) para determinar el efecto sobre el tamaño de partícula o variable dependiente (Y).

El diseño experimental de Screening sirvió para determinar las variables que más afectan a la variable de respuesta (tamaño). Cabe mencionar que en este trabajo, se tomaron en cuenta los datos obtenidos y se realizó un nuevo diseño de experimentos tomando como variables independientes aquellas que se determinó eran las más importantes pero utilizando tres niveles para la velocidad de agitación y la cantidad de tensoactivo, tomando un tiempo máximo de agitación para el etil cianoacrilato (60 minutos), un tiempo mínimo de agitación para el quitosán (20 minutos) y se eliminó el tripolifosfato.

1.10 Nanotoxicología

Considerando la variedad de aplicaciones en las Nanociencia y Nanotecnología, se han creado expectativas amplias y el impacto e importancia del progreso en diferentes áreas como la medicina, energía y medio ambiente; han orientado esfuerzos en diversos proyectos de investigación en el área de las Ciencias de la Salud que se apoyan en las Nanociencias y su uso. Al respecto, se sugiere que los sistemas nanoestructurados pudieran comprometer la función celular ejerciendo efectos tóxicos en los organismos expuestos a este tipo de estructuras.

La Nanotoxicología es un área de la nanotecnología que está tomando cada día más importancia y se refiere al estudio de las interacciones de las nanoestructuras con los sistemas biológicos enfatizando en la elucidación de las relaciones entre las propiedades físicas y químicas de las nanoestructuras con la inducción de respuestas biológicas tóxicas. Un entendimiento de la relación entre las propiedades físicas y químicas de las nanoestructuras así como el estudio de su comportamiento *in vivo* proveerá de bases en la evaluación de la respuesta tóxica asociada y de más importancia será el que llevará a modelos de predicción para evaluación toxicológica (Hillegass, Shukla, Lathrop, MacPherson, Fukagawa, & Mossman, 2010).

Los nanomateriales, al tener comúnmente un tamaño menor a 1 micra ($1 \times 10^{-6} \text{m}$) de diámetro, pueden ser inhalados y, dependiendo de su geometría, composición, tamaño y transporte o

durabilidad en el cuerpo, tienen la capacidad de causar efectos adversos a la salud humana, especialmente si son inhalados en grandes cantidades. Las pruebas en roedores son prohibitivas en términos de costos y tiempo. Por esta razón, es necesario contar con un panel de pruebas *in vitro* que incluyan cultivos celulares para citotoxicidad (metabolismo alterado, crecimiento disminuido, muerte celular por lisis o apoptosis), proliferación, genotoxicidad y expresión alterada de los genes. La mayoría de estas pruebas fueron estandarizadas utilizando minerales patógenos (asbesto y sílica) y partículas nanopatogénicas (perlas de vidrio o dióxido de titanio) como controles negativos. Los resultados de estas pruebas *in vitro* deben predecir si es necesario continuar las pruebas de los materiales elegidos con modelos de inhalación que simulen exposición fisiológica a materiales inhalados en animales. Para probar los efectos patógenos del asbesto y la sílica, la mayoría de las pruebas *in vitro* se realizaron en células de pulmón y pleura para evaluar citotoxicidad, proliferación y genotoxicidad (Hillegass, Shukla, Lathrop, MacPherson, Fukagawa, & Mossman, 2010).

Los sistemas de administración por medio de nanopartículas pueden ser modificados para que se concentren en un lugar u órgano en específico para mejorar la respuesta terapéutica. Sin embargo, las nanopartículas biomédicas y farmacéuticas tienen que satisfacer tamizados rigurosos de toxicidad para ser aprobados por las autoridades regulatorias para su uso. El requerimiento de proveer perfiles de biocompatibilidad aceptables ha llevado a un mayor interés en la investigación de la nanotoxicología. Las nanopartículas tienen propiedades fisicoquímicas únicas atribuidas a su gran área superficial en relación a su volumen, tamaño, forma y la estructura de su superficie. Estas propiedades pueden ser atractivas para aplicaciones biológicas, sin embargo también poseen riesgos potenciales para la salud humana y el medio ambiente (Loh, Yeoh, Saunders, & Lim, 2010).

A pesar de la costosa investigación dentro de las aplicaciones biomédicas y farmacéuticas de la aplicación de nanopartículas, existen pocos estudios sobre la toxicidad hepática que pueden ejercer las nanopartículas *in vitro* e *in vivo*. Estos datos son importantes debido a que las nanopartículas de quitosán circulantes encuentran el hígado como el órgano desintoxicante principal en el cuerpo humano. La preocupación sobre la citotoxicidad de las nanopartículas de quitosán no se limita únicamente a las nanopartículas que son inyectadas directamente en el torrente sanguíneo. Algunos estudios han establecido la capacidad de las nanopartículas de quitosán para modular la permeabilidad en epitelios absorbentes, haciendo posible que nanopartículas de quitosán suficientemente pequeñas puedan atravesar el tejido de la cavidad nasal o los sacos alveolares y entrar en la circulación sistémica (Loh, Yeoh, Saunders, & Lim, 2010).

1.10.1 Ensayos de citotoxicidad

Antes de valorar el efecto citotóxico de las nanopartículas u otros compuestos de interés en una determinada estirpe celular, es importante conocer como es la tasa de proliferación de las células para determinar las propiedades de crecimiento básicas en las células elegidas y el tiempo de exposición al xenobiótico de acuerdo al ciclo celular. Por lo general, las líneas celulares no malignas tienen fases de crecimiento lag, logarítmico y estacionario, en estas fases para el cultivo celular y de acuerdo a lo reportado los efectos inducidos por las nanopartículas son variables aún en las mismas concentraciones. Las curvas de crecimiento también ilustran el tiempo en el que la población de algún tipo de célula se duplica. La mayor parte del trabajo se realiza en células con 80-90% de confluencia que se parece a su arquitectura contigua en el tejido (Hillegass, Shukla, Lathrop, MacPherson, Fukagawa, & Mossman, 2010). En este trabajo de tesis se emplearon en los ensayos *in vitro*, células hepáticas AML-12 en confluencia.

1.10.1.1 Ensayo de viabilidad por biotransformación de sales de Tetrazolio (MTA)

MTA de corto tiempo son ensayos que no proveen información directa sobre el número total de células, pero mide la viabilidad de una población celular en relación a células control sin tratamiento. Las células son expuestas a los sistemas nanoparticulados después se adicionan sales amarillas de tetrazolio líquidas como MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)2H-tetrazolio) o MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). por 2 a 4 horas a 37°C. Durante este proceso, las células viables con actividad respiratoria mitocondrial activa bio reducen el MTS o el MTT en un producto insoluble de formazan vía deshidrogenasas succínicas mitocondriales, que es solubilizado subsecuentemente en dimetil sulfóxido (DMSO) o un detergente y es cuantificado en un espectrofotómetro de luz visible. Los datos se representan en absorbancia comparada con el grupo control (100% células vivas). Es importante mencionar que ya que mide la actividad respiratoria, las células que tienen un metabolismo lento deben ser utilizadas en números mayores. Este método, aun cuando es uno de los métodos de elección en diversos trabajos publicados, tiene desventajas tales como:

- Algunas líneas celulares humanas son ineficientes al procesar los reactivos de sales de tetrazolio.
- La utilización de DMSO para solubilizar el producto de formazan generado por la reducción de las sales de tetrazolio no solo alarga el protocolo, sino que también expone al personal de laboratorio y al equipo a cantidades de solvente potencialmente dañinas.

(Hillegass, Shukla, Lathrop, MacPherson, Fukagawa, & Mossman, 2010)

1.10.1.2 Viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular *in vitro*, se realizó, en este trabajo de tesis, la prueba de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Esta prueba se basa en la reducción metabólica del MTT (compuesto color amarillo) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en formazan (compuesto color azul) permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial en las células tratadas con las nanopartículas (Mosmann, 1983).

2. Justificación del proyecto

El campo de las nanopartículas poliméricas se está expandiendo rápidamente y cada vez tiene un papel más importante en un amplio espectro de áreas como electrónica, materiales conductores y sensores, medicina, biotecnología y tecnología para el control de la polución (Prasad Rao & Geckeler, 2011).

Las nanopartículas poliméricas ofrecen ventajas específicas sobre los liposomas incluyendo:

- El tamaño de partícula y las propiedades de la superficie de las nanopartículas son fácilmente manipulables para alcanzar una focalización tanto activa como pasiva después de una administración parenteral.

- Controlan y mantienen la liberación del fármaco durante el transporte y en el sitio de acción, alterando la distribución del principio activo en los órganos y la posterior eliminación de éste logrando un aumento en la eficacia terapéutica y una reducción en los efectos secundarios.

- La liberación controlada y las características de degradación pueden ser moduladas con la elección de los componentes de la matriz.

- El sistema puede ser utilizado para varias rutas de administración incluyendo la oral, nasal, parenteral, intra-ocular, etc.

A pesar de estas ventajas, las nanopartículas también tienen limitaciones. Su pequeño tamaño y gran superficie de contacto puede llevar a una agregación de las partículas dificultando su manejo en formas líquidas y secas (Mohanraj & Chen, 2006).

Como hemos mencionado existen reportes que indican que las nanopartículas de PECA (polietil cianoacrilato), se utilizan para encapsular de manera eficiente moléculas bioactivas controlando su liberación por un mecanismo de erosión. En términos de bioadhesión, varios autores han observado algunas evidencias de captura de nanopartículas de PECA por la mucosa intestinal. Sin embargo, la naturaleza hidrofóbica y los grupos aniónicos de las nanopartículas de PECA no los hacen, a priori, candidatos atractivos en el desarrollo de sistemas bioadhesivos. Consideramos que con algunas modificaciones de la superficie se podría mejorar, entre otras características, la bioadhesividad del sistema coloidal. Para ello elaboramos nanopartículas compuestas por núcleos de PECA y recubiertas con quitosan. Consideramos que el PECA es capaz de asociarse espontáneamente con polisacáridos como el quitosan y dar como resultado un núcleo hidrofóbico recubierto por un polisacárido hidrofílico. Estos sistemas podrán contar con la combinación de características bioactivas del PECA y /o las del quitosan y se pretende que sean inocuos y útiles como acarreadores coloidales de fármacos.

El obtener nanopartículas híbridas fabricadas a base de polietil cianoacrilato y quitosan puede representar la posibilidad de contar con sistemas de características fisicoquímicas adecuadas para considerarlas útiles en algún área del conocimiento y este trabajo además nos permitirá conocer si los sistemas de interés inducen citotoxicidad durante su exposición *in vitro* a células hepáticas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

-Optimización del método de elaboración de nanopartículas fabricadas a base de polietil cianoacrilato y quitosan

3.2 Objetivos particulares

-Determinar los efectos de las nanopartículas asociados a la viabilidad celular en células hepáticas de ratón (ATCC-AML12).

-Determinar mediante microscopía confocal la localización de las nanopartículas obtenidas en células hepáticas (células AML-12) y su relación con el tamaño de partícula y la dosis de exposición

4. Materiales y métodos

4.1 Materiales y reactivos

Tabla 3: Lista de materiales y reactivos

| Materiales y equipo | Reactivos |
|--|--|
| Vasos de precipitados de 100 mL | Agua destilada (Grado reactivo) |
| Micro pipeta de 5-50 µL | Ácido acético glacial (J.T. Baker) |
| Micro pipeta de 100-1000 µL | Hidróxido de sodio 1N |
| Pipeta graduada de 25mL | Medio de cultivo DMEM (Gibco) |
| Agitador Stir-Pack Laboratory mixer | Quitosan (Sigma-Aldrich) |
| Agitador magnético | Tripolifosfato (Sigma-Aldrich) |
| Perilla | Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich) |
| Potenciómetro | Etilcianoacrilato (Sigma-Aldrich) |
| Jeringas estériles | Formaldehído al 4% (J.T. Baker) |
| Membranas estériles de 0.45µm | MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (Sigma-Aldrich) |
| Matraz Kitazato | Células AML12 (ATCC® CRL-2254™) |
| Porta objetos | Isotiocianato de Fluoresceína (Sigma-Aldrich) |
| Cubre objetos | Yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) |
| Cajas Petri grandes | Esmalte de uñas |
| Cajas Petri pequeñas | Cloruro de Sodio (J.T. Baker) |
| Cajas de 6 pozos | Cloruro de Potasio (J.T. Baker) |
| Tubos falcon | Fosfato Dipotásico de Sodio (J.T. Baker) |
| Papel aluminio | Fosfato de Potasio Monobásico (J.T. Baker) |
| Sonicador | Tripsina (Corning) |
| Espectrofotómetro (Scientific Instruments) | Nonidet |
| Centrífuga | |
| Ultra centrífuga | |
| Lámpara de luz amarilla | |
| Campana de flujo laminar | |
| Campana de extracción | |
| Microscopio Confocal Olympus Fluoview | |

4.2 Tratamientos utilizados

Para el estudio de viabilidad celular se utilizaron las nanopartículas de los sistemas 1 y 3 del diseño experimental de optimización, ya que estos sistemas son en los que se obtuvo el mayor y el menor tamaño de partícula.

La prueba se realizó en placas de 6 pozos en las cuales se hicieron subcultivos celulares y estos se expusieron a dos dosis diferentes de nanopartículas de dos tamaños diferentes, ácido acético al 1% y a una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) durante 24 horas.

La prueba se realizó de la siguiente manera:

- Control negativo (Ácido acético al 1%) 3 pozos
- Control positivo (Peróxido de hidrógeno) 3 pozos
- Nanopartículas pequeñas dosis baja 3 pozos
- Nanopartículas pequeñas dosis alta 3 pozos
- Nanopartículas grandes dosis baja 3 pozos
- Nanopartículas grandes dosis alta 3 pozos
- Control (únicamente medio) 3 pozos
- Nonideth 3 pozos

A cada pozo se le agregaron 50µL de volumen total del tratamiento correspondiente. Para las dosis altas se colocaron 50µL del stock de nanopartículas provenientes de la suspensión fabricada mientras que para las dosis bajas se hizo una dilución 5:50µL del stock de nanopartículas.

4.3 Métodos

4.3.1 Preparación de los sistemas para el Screening

Para cada una de las variables se tomó un valor máximo y un valor mínimo, dichos valores se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 4: Factores y niveles a considerar en el Screening

| Factor | Niveles | |
|--|---------|------|
| | -1 | +1 |
| X₁= Tiempo de agitación de ECA [min] | 20 | 60 |
| X₂= Tiempo de agitación de CHI [min] | 20 | 60 |
| X₃= Cantidad de tensoactivo [%] | 0.3 | 1 |
| X₄= Cantidad de TPP [%] | 0 | 0.1 |
| X₅= Velocidad de agitación [rpm] | 570 | 1091 |
| Y= Tamaño de partícula (ηm) | N/A | N/A |

Tabla 5: Sistemas para el diseño experimental del Screening

| Sistema | Tiempo de ECA (min) | Tiempo de CHI (min) | Tensoactivo (% P/V) | TPP (% P/V) | Velocidad de agitación (rpm) |
|---------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------|------------------------------|
| 1 | 20 | 60 | 1.0 | 0.1 | 570 |
| 2 | 20 | 20 | 0.3 | 0.0 | 1091 |
| 3 | 20 | 60 | 0.3 | 0.0 | 570 |
| 4 | 60 | 60 | 1.0 | 0.1 | 1091 |
| 5 | 60 | 60 | 1.0 | 0.0 | 570 |
| 6 | 60 | 20 | 1.0 | 0.1 | 570 |
| 7 | 20 | 20 | 0.3 | 0.1 | 570 |
| 8 | 60 | 60 | 0.3 | 0.1 | 570 |
| 9 | 60 | 60 | 0.3 | 0.0 | 1091 |
| 10 | 20 | 20 | 1.0 | 0.0 | 570 |
| 11 | 20 | 20 | 1.0 | 0.1 | 1091 |
| 12 | 20 | 60 | 1.0 | 0.0 | 1091 |
| 13 | 60 | 20 | 0.3 | 0.1 | 1091 |
| 14 | 20 | 60 | 0.3 | 0.1 | 1091 |
| 15 | 60 | 20 | 1.0 | 0.0 | 1091 |
| 16 | 60 | 20 | 0.3 | 0.0 | 570 |

4.3.1 Preparación de los sistemas para el Screening

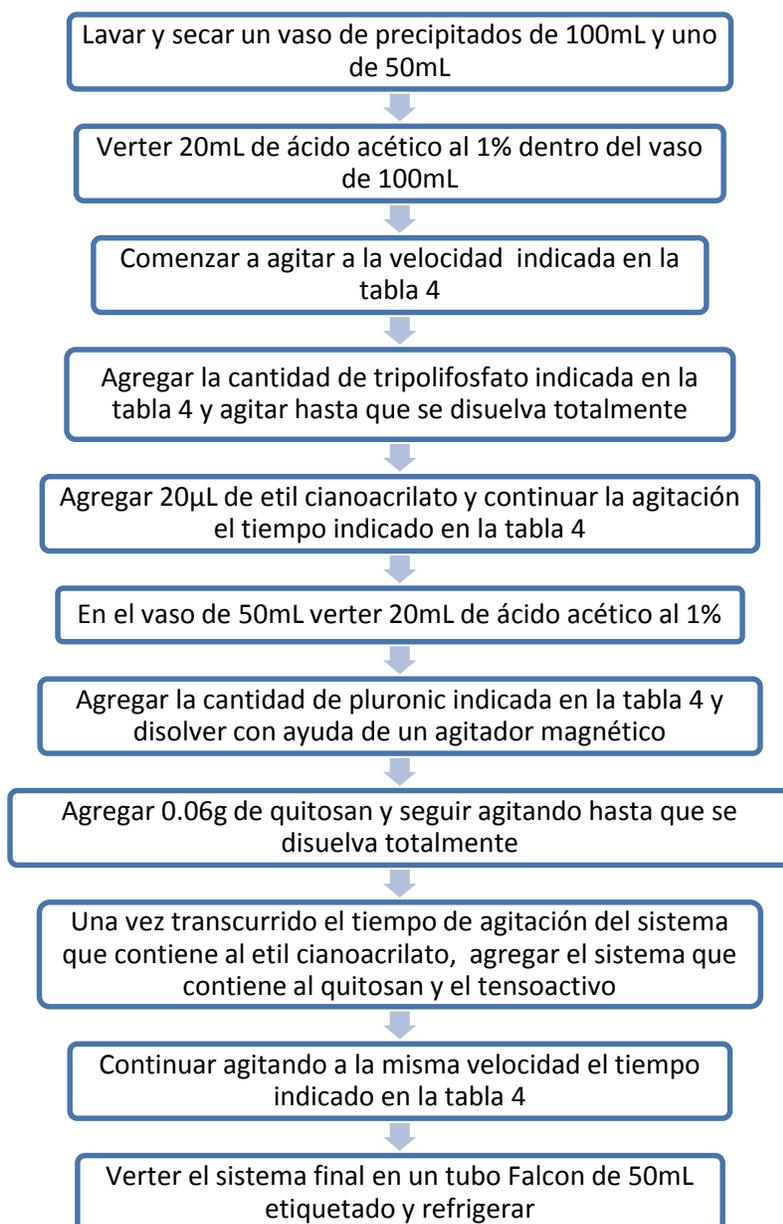


Figura 3: Preparación de nanopartículas para los sistemas de Screening

4.3.2 Preparación de los sistemas para el diseño experimental de optimización

Tabla 6: Sistemas para el diseño experimental de optimización.

| Sistema | Tempo de ECA (min) | Tiempo de CHI (min) | Tensoactivo (%) | Velocidad de agitación (rpm) |
|---------|--------------------|---------------------|-----------------|------------------------------|
| 1 | 60 | 20 | 0,7 | 343 |
| 2 | 60 | 20 | 0,7 | 570 |
| 3 | 60 | 20 | 0,7 | 805 |
| 4 | 60 | 20 | 1,0 | 343 |
| 5 | 60 | 20 | 1,0 | 570 |
| 6 | 60 | 20 | 1,0 | 805 |
| 7 | 60 | 20 | 1,3 | 343 |
| 8 | 60 | 20 | 1,3 | 570 |
| 9 | 60 | 20 | 1,3 | 805 |

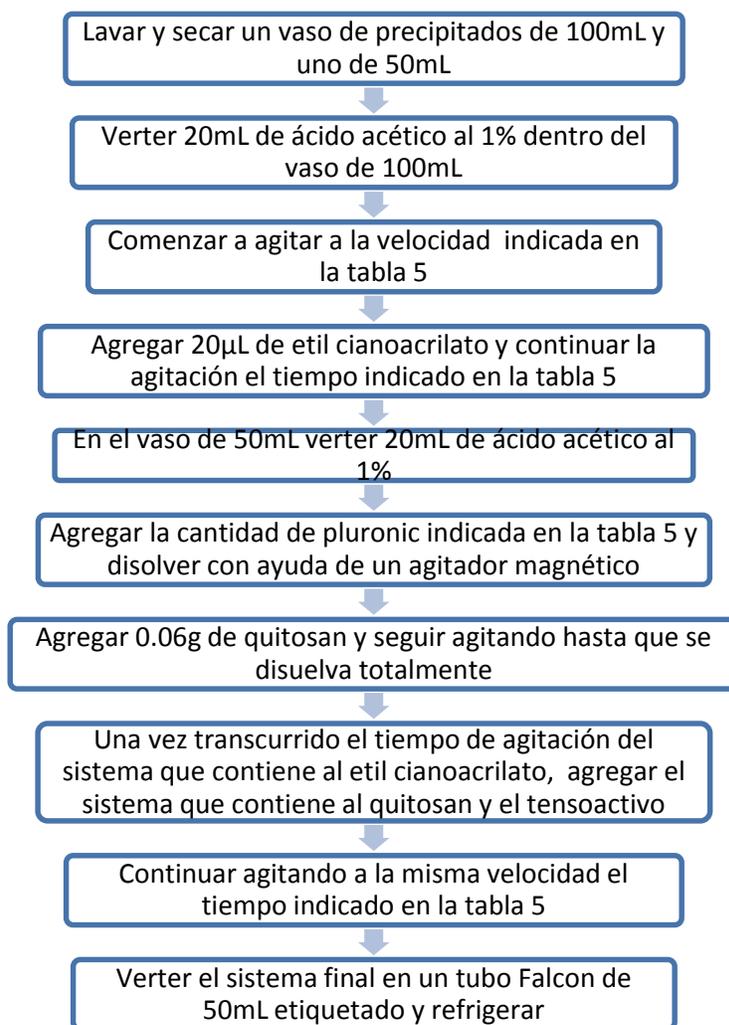


Figura 4: Preparación de nanopartículas para los sistemas de Optimización

4.3.3 Tripsinización

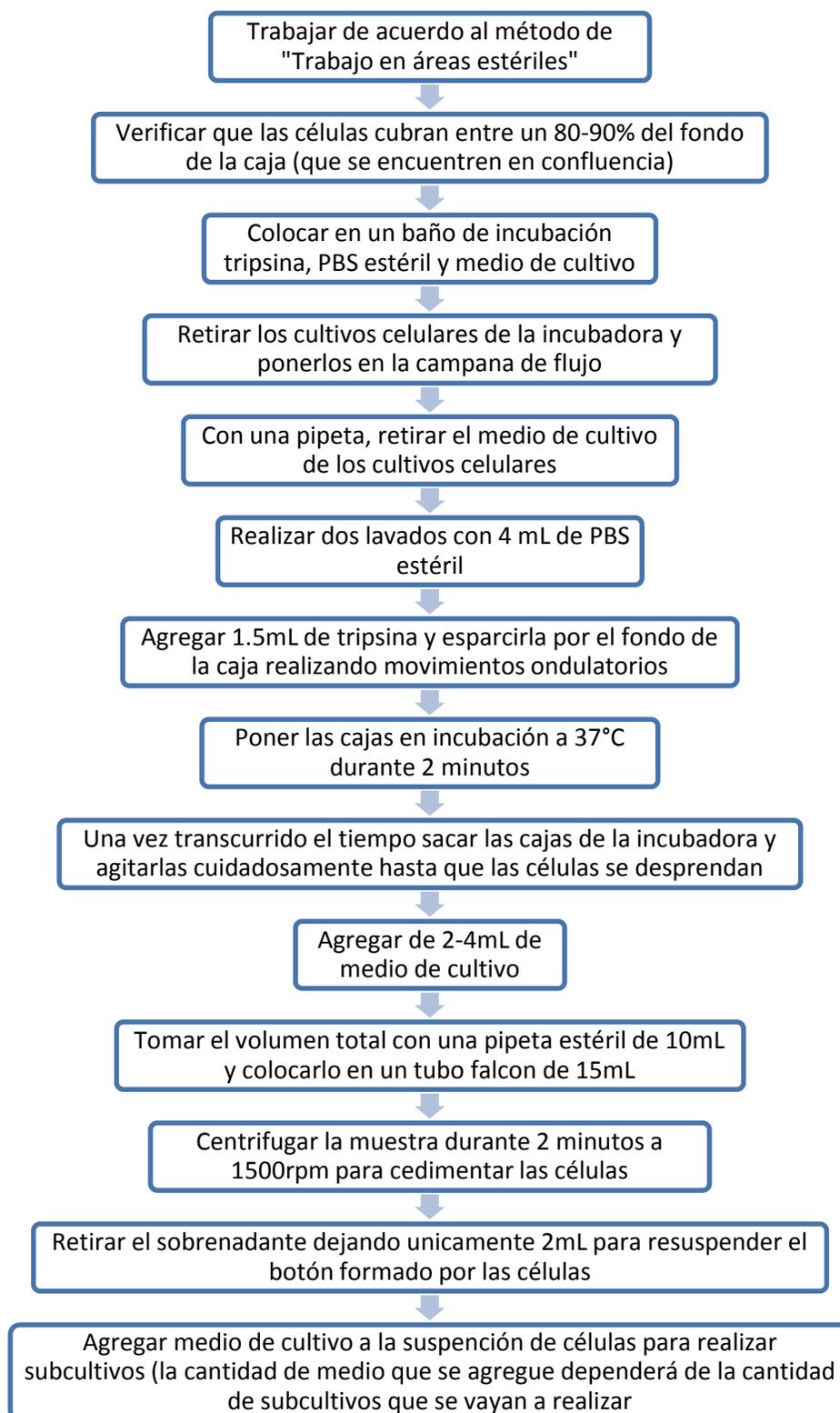


Figura 5: Proceso de tripsinización

4.3.4 Prueba de viabilidad celular (MTT)

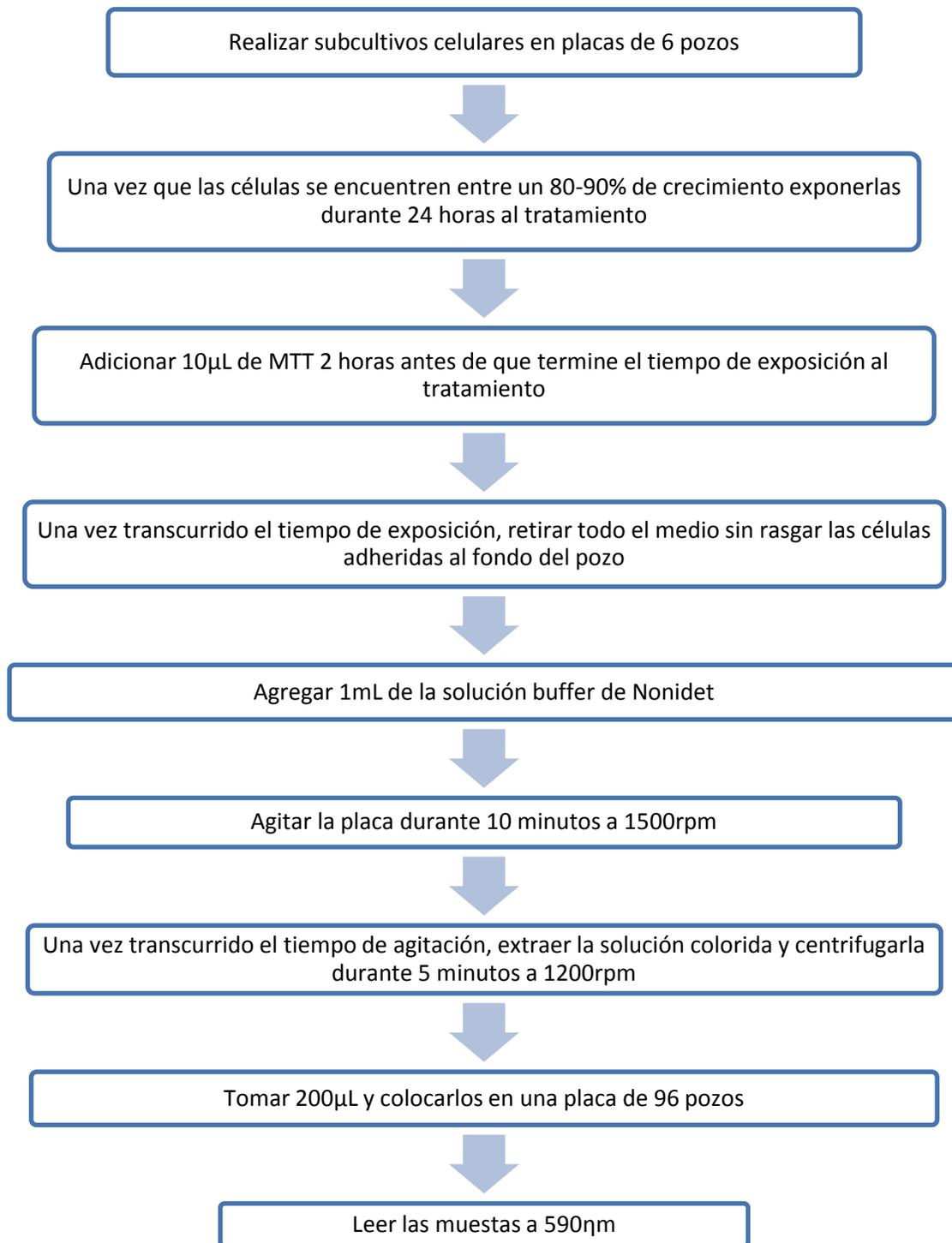


Figura 6: Prueba de viabilidad (MTT)

4.3.5 Microscopía confocal

4.3.5.1 Preparación de los sistemas para microscopía confocal

***TODO SE PREPARA EN OSCURIDAD**

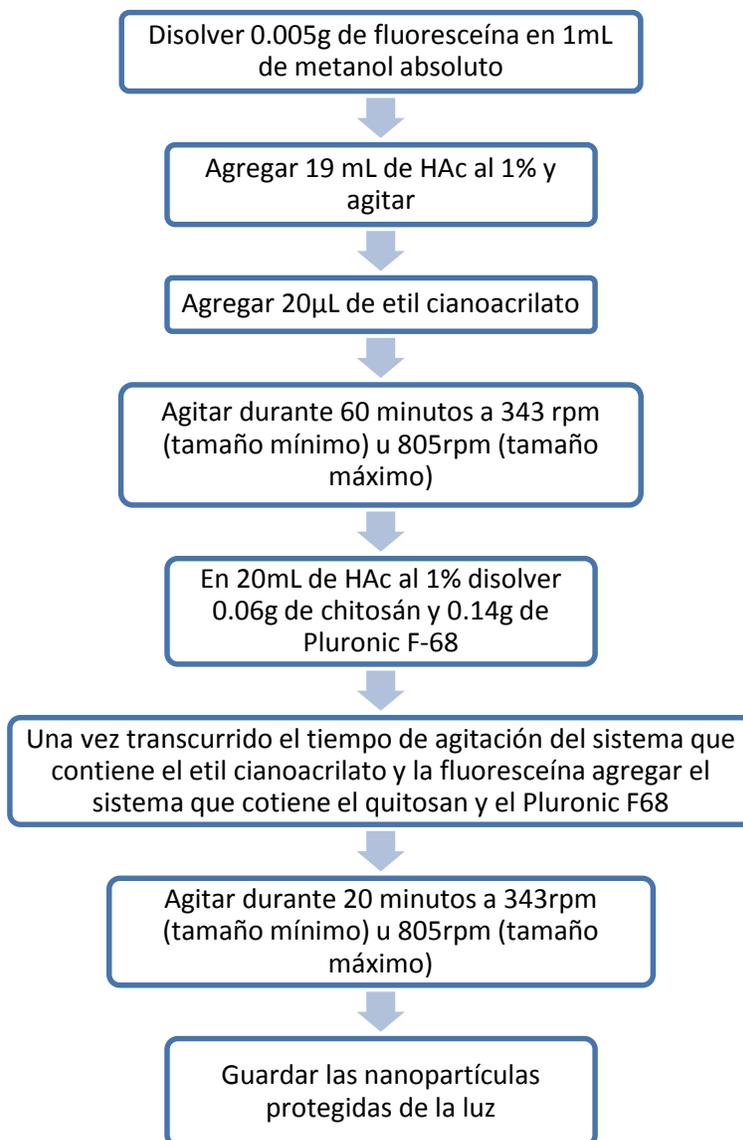


Figura 7: Preparación de los sistemas nanoparticulados para microscopía confocal

4.3.5.2 Centrifugación con glicerol

***A PARTIR DE LA CENTRIFUGACIÓN TODO DEBE HACERSE EN OSCURIDAD**

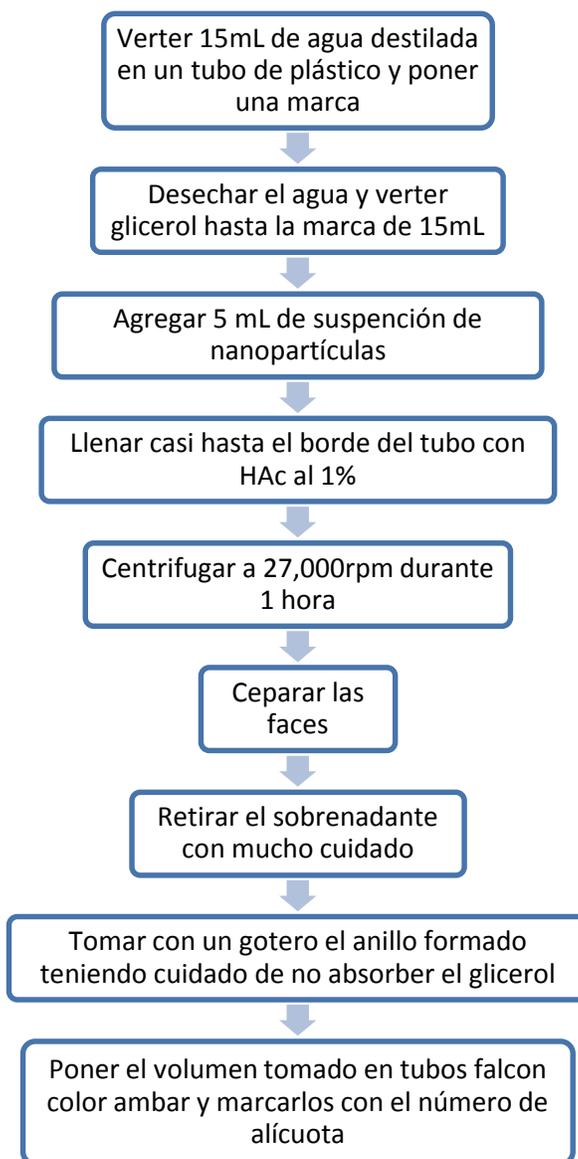


Figura 8: Centrifugación con glicerol

4.3.5.3 Montaje de las muestras para microscopía confocal

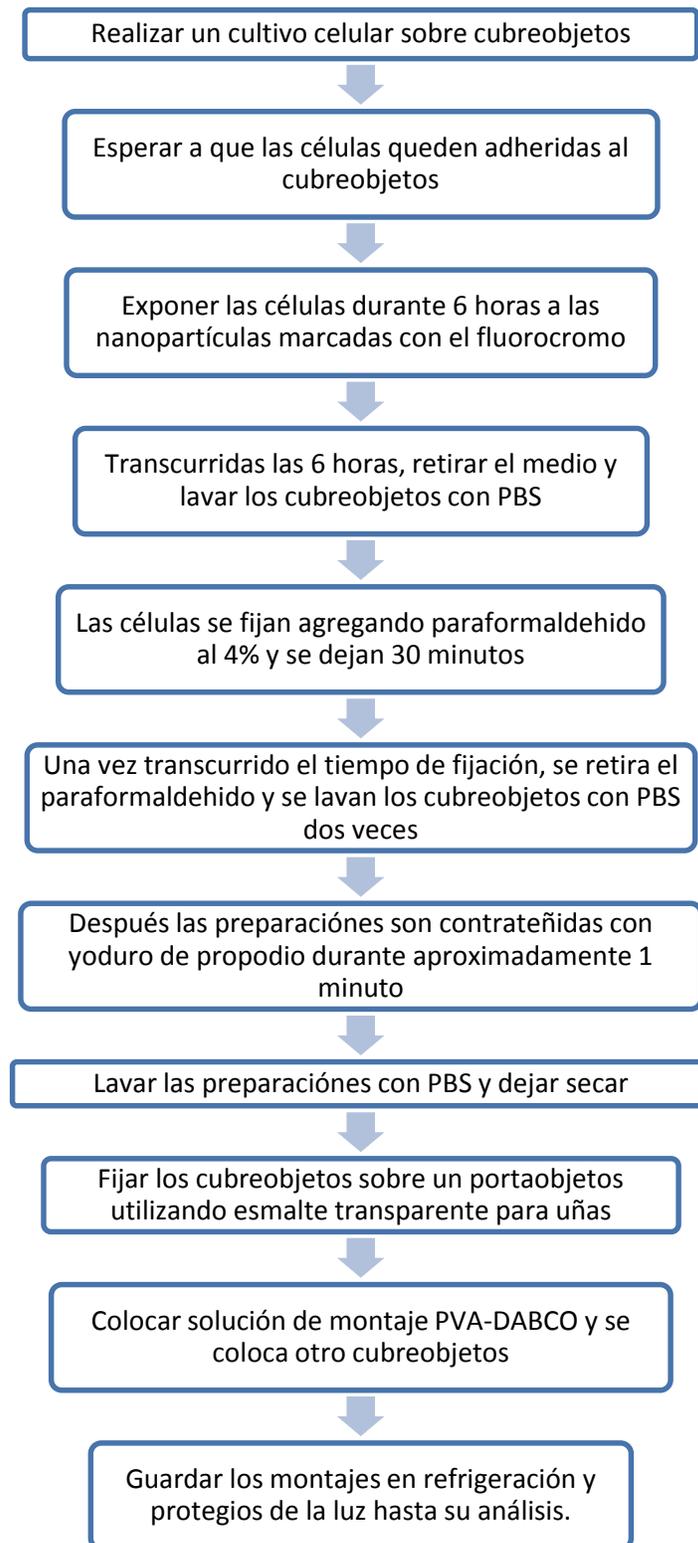


Figura 9: Montaje de las muestras

5. Resultados y Análisis de resultados:

5.1 Optimización estadística

Es necesario realizar una optimización estadística para determinar qué parámetros o combinación de estos afecta en mayor medida el tamaño de partícula y si éste efecto provoca que el tamaño de partícula aumente o disminuya. Es importante llevar a cabo una optimización estadística para poder determinar los parámetros ideales para obtener nanopartículas dentro de un rango de tamaño determinado según la función que se le quiera dar a estas nanopartículas.

5.1.1 Screening

Tabla 7: Sistemas del Screening y el tamaño de partícula obtenido para cada sistema

| Sistema | Tiempo de ECA (min) | Tiempo de CHI (min) | Tensoactivo (%) | TPP (%) | Velocidad de agitación (rpm) | Tamaño de partícula (nm) |
|---------|---------------------|---------------------|-----------------|---------|------------------------------|--------------------------|
| 1 | 20 | 60 | 1.0 | 0.1 | 570 | 1212 |
| 2 | 20 | 20 | 0.3 | 0.0 | 1091 | 2.18 |
| 3 | 20 | 60 | 0.3 | 0.0 | 570 | 24.21 |
| 4 | 60 | 60 | 1.0 | 0.1 | 1091 | 2166 |
| 5 | 60 | 60 | 1.0 | 0.0 | 570 | 5.645 |
| 6 | 60 | 20 | 1.0 | 0.1 | 570 | 13.7 |
| 7 | 20 | 20 | 0.3 | 0.1 | 570 | ----- |
| 8 | 60 | 60 | 0.3 | 0.1 | 570 | ----- |
| 9 | 60 | 60 | 0.3 | 0.0 | 1091 | 1.388 |
| 10 | 20 | 20 | 1.0 | 0.0 | 570 | 6.835 |
| 11 | 20 | 20 | 1.0 | 0.1 | 1091 | ----- |
| 12 | 20 | 60 | 1.0 | 0.0 | 1091 | 22.91 |
| 13 | 60 | 20 | 0.3 | 0.1 | 1091 | ----- |
| 14 | 20 | 60 | 0.3 | 0.1 | 1091 | ----- |
| 15 | 60 | 20 | 1.0 | 0.0 | 1091 | 7.988 |
| 16 | 60 | 20 | 0.3 | 0.0 | 570 | 11.76 |

Como se puede observar en la Figura 3:

- El aumento en la concentración de tripolifosfato, el tiempo de agitación del quitosán y la velocidad de agitación tienen un efecto positivo sobre el tamaño de partícula haciendo que este aumente.
- El aumento en la concentración de tensoactivo y el tiempo de agitación del etil cianoacrilato tienen un efecto negativo sobre el tamaño de partícula haciendo que este disminuya.
- Podemos observar que la variable que tuvo mayor efecto sobre el tamaño de partícula fue la concentración de tripolifosfato mientras que el tiempo de agitación del etil cianoacrilato y el quitosán tuvieron el menor efecto sobre el tamaño de partícula.
- La R^2 indica que el modelo ajustado explica el 99.99% de la variabilidad en el tamaño de partícula.

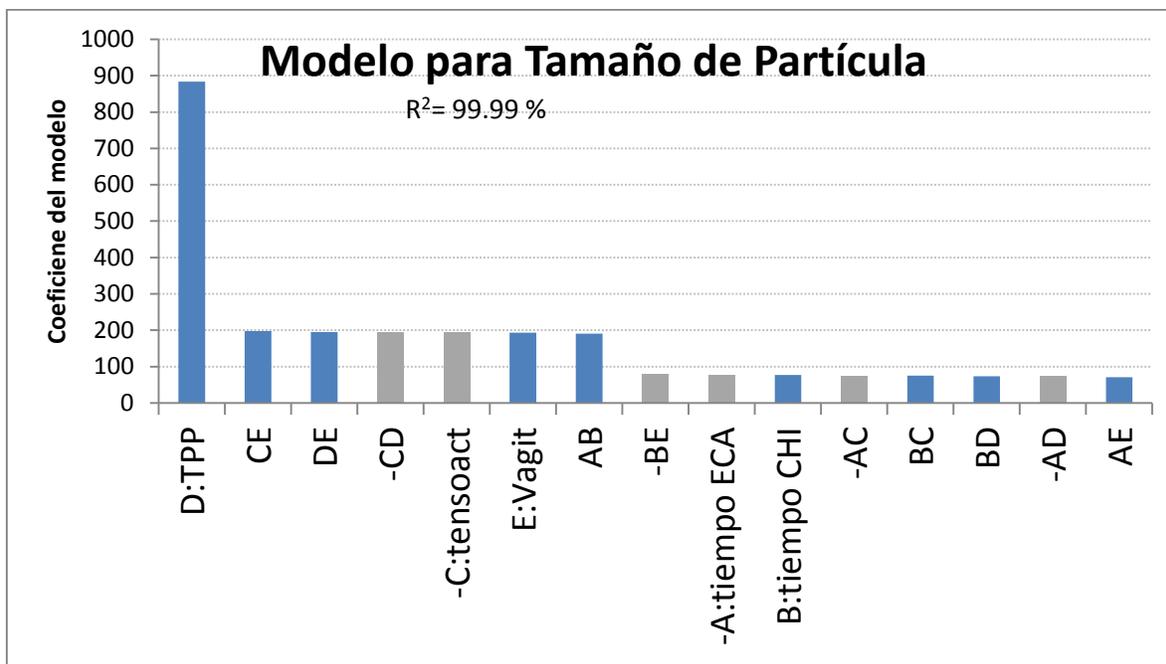


Figura 10: Modelo para Tamaño de Partícula del sistema de Screening Un efecto positivo (azul) indica que el tamaño de partícula aumenta, un efecto negativo (gris) indica que el tamaño de partícula disminuye

Tabla 8: Análisis de varianza para el tamaño de partícula (Screening)

| Source | Sum of Squares | Df | Mean square | F-Ratio | P-value |
|---------------|----------------|----|-------------|---------|---------|
| A:tiempo ECA | 201948. | 1 | 201948. | 363.80 | 0.0333 |
| B:tiempo CHI | 153901. | 1 | 153901. | 277.24 | 0.0382 |
| C:tensoact | 618190. | 1 | 618190. | 1113.63 | 0.0191 |
| D:TPP | 611416. | 1 | 611416. | 1101.43 | 0.0192 |
| AB | 583494. | 1 | 583494. | 1051.13 | 0.0196 |
| AC | 90174.2 | 1 | 90174.2 | 162.44 | 0.0498 |
| AD | 85403.5 | 1 | 85403.5 | 153.85 | 0.0512 |
| AE | 159432. | 1 | 159432. | 287.21 | 0.0375 |
| BC | 90054.5 | 1 | 90054.5 | 162.23 | 0.0499 |
| BD | 85984.0 | 1 | 85984.0 | 154.89 | 0.0510 |
| BE | 199012. | 1 | 199012. | 358.51 | 0.0336 |
| CD | 604565. | 1 | 604565. | 1089.09 | 0.0193 |
| CE | 622621. | 1 | 622621. | 1121.61 | 0.0190 |
| DE | 608475. | 1 | 608475. | 1096.13 | 0.0192 |
| Total error | 555.112 | 1 | 555.112 | | |
| Total (corr.) | 1.6831E7 | 15 | | | |

- El análisis de varianza indica la significancia de cada efecto comparando los cuadrados mínimos contra un estimado del error experimental. En este caso, 12 de los efectos tienen un valor de P menor a 0.05, indicando que estos son diferentes a cero con un nivel de confianza del 95.0%.

Tabla 9: Coeficientes de regresión para tamaño de partícula (Screening)

| <i>Coeficiente</i> | <i>Estimado</i> |
|--------------------|-----------------|
| Constant | 894.039 |
| A:tiempo ECA | -76.7278 |
| B:tiempo CHI | 76.4799 |
| C:tensoact | -193.903 |
| D:TPP | 883.673 |
| E:Vagit | 193.166 |
| AB | 190.967 |
| AC | -75.0726 |
| AD | -73.0597 |

Error relativo (%)= 0.39%

El aumento del tamaño de partícula en los sistemas que contienen el tripolifosfato, concuerda con los resultados obtenidos en un estudio realizado por (Fazil, y otros, 2012) donde se encontró que con un incremento en la concentración de quitosan o tripolifosfato el tamaño de partícula aumentó encontrando que la proporción óptima entre estas dos sustancias está entre 2.19/1 y 2.5/1 estando el quitosan siempre en mayor proporción que el tripolifosfato y llegando a tamaños por debajo de 200nm mientras que por arriba o por debajo de esta proporción se encontró una gran variación en el tamaño de partícula.

5.1.2 Diseño de Experimentos de Optimización

Tabla 10: Sistemas del diseño de experimentos y el tamaño de partícula obtenido para cada sistema.

| Sistema | Tempo de ECA (min) | Tiempo de CHI (min) | Tensoactivo (%) | Velocidad de agitación (rpm) | Tamaño de partícula (nm) |
|---------|--------------------|---------------------|-----------------|------------------------------|--------------------------|
| 1 | 60 | 20 | 0,7 | 343 | 51.3225 |
| 2 | 60 | 20 | 0,7 | 570 | 193.3691 |
| 3 | 60 | 20 | 0,7 | 805 | 435.1454 |
| 4 | 60 | 20 | 1,0 | 343 | 56.1998 |
| 5 | 60 | 20 | 1,0 | 570 | 54.9948 |
| 6 | 60 | 20 | 1,0 | 805 | 137.5312 |
| 7 | 60 | 20 | 1,3 | 343 | 242.9897 |
| 8 | 60 | 20 | 1,3 | 570 | 121.1233 |
| 9 | 60 | 20 | 1,3 | 805 | 45.3277 |

Tabla 11: Análisis de varianza para el tamaño de partícula (Optimización)

| Source | Sum of Squares | Df | Mean Square | F-Ratio | P-Value |
|----------------------|----------------|----|-------------|---------|---------------|
| AB | 84155.2 | 1 | 84155.2 | 12.49 | 0.0095 |
| Total error | 47172.0 | 7 | 6738.85 | | |
| Total (corr.) | 131327. | 8 | | | |

- El análisis de varianza indica la significancia de cada efecto comparando los cuadrados mínimos contra un estimado del error experimental. En el caso del modelo de Optimización, únicamente el efecto combinado de la velocidad de agitación y la cantidad de tensoactivo tuvieron un valor de P menor a 0.05, indicando que ese efecto combinado es diferente a cero con un nivel de confianza del 95%. Debido a que tanto el efecto de la velocidad de agitación y la cantidad de tensoactivo por si solos no tienen significancia, se eliminaron.

Con el modelo ajustado de Optimización, se obtuvo una $R^2=64.08\%$ lo que indica que la variación en el tamaño de partícula depende en un 64% del efecto combinado de la cantidad de tenso activo y la velocidad de agitación.

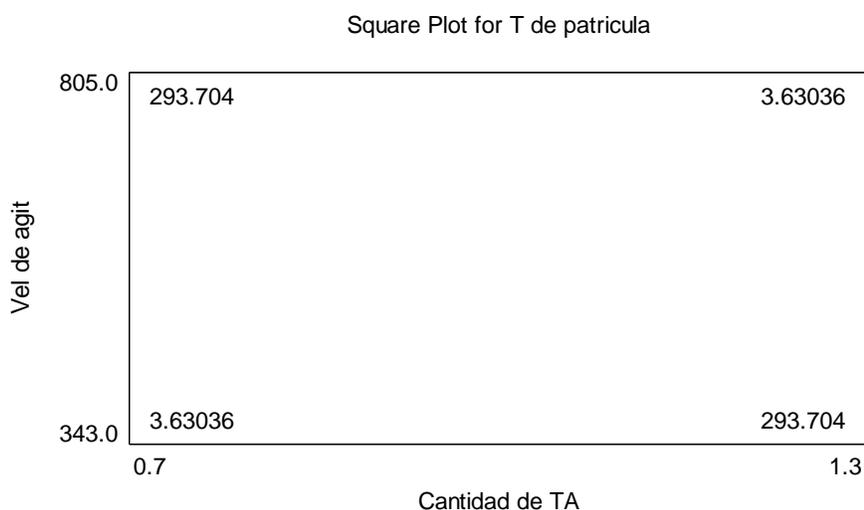


Figura 11: Diagrama de cuadrado para el Tamaño de partícula (Optimización)

En la figura 4, podemos observar que hay dos condiciones óptimas para obtener el menor tamaño de partícula. Una de estas condiciones es tener la menor velocidad de agitación y la cantidad menor de tensoactivo, mientras que la otra se encuentra al poner la cantidad mayor de tensoactivo con la velocidad mayor de agitación. Esto concuerda con los resultados reflejados en la tabla 10 para el tamaño de partícula donde se puede observar que en el sistema 1 (menor cantidad de tenso activo y menor velocidad de agitación) y en el sistema 9 (mayor cantidad de tensoactivo y mayor velocidad de agitación) se obtuvieron los menores tamaños de partícula.

Tabla 12: Coeficientes de regresión para tamaño de partícula (Optimización)

| <i>Coefficient</i> | <i>Estimate</i> |
|-------------------------|-----------------|
| Constant | -1052.65 |
| A:Cantidad de TA | 1201.31 |
| B:Vel de agit | 2.09288 |
| AB | -2.09288 |

Error Relativo= 32.5%

5.2 Viabilidad celular

Las nanopartículas de quitosán pueden exhibir diferentes perfiles citotóxicos dependiendo de las propiedades del material utilizado para sintetizar las nanopartículas, el tamaño de las nanopartículas y los tipos de células con las que interactúan. Se mostró que nanopartículas con un tamaño de 110-390nm preparadas con quitosán tienen un perfil citotóxico comparable con partículas de mayor tamaño del polímero, sin que la viabilidad celular se vea afectada significativamente en concentraciones menores a 740µg/mL mientras que células expuestas a nanopartículas de quitosán con un tamaño de 65nm demostraron mayor sensibilidad al quitosán. Esto se observa también en células hepáticas donde células HepG2 no se vieron afectadas al ser expuestas a nanopartículas de quitosán de un tamaño de 108±23nm en concentraciones de hasta 25µg/mL, mientras que la IC₅₀ de nanopartículas de quitosán con un tamaño de 40nm para líneas celulares BEL7402, después de 24 y 48 horas de exposición, fue de 15.01µg/ml y 6.19µg/ml respectivamente. (Loh, Yeoh, Saunders, & Lim, 2010). Estos resultados muestran que el quitosán es biocompatible tanto en nanopartículas como en partículas de mayor tamaño, mientras que la sensibilidad de las células aumenta conforme el tamaño de partícula disminuye.

En la gráfica 1, podemos observar que la viabilidad celular estimada mediante la capacidad de las células expuestas por biotransformar la sal de tetrazolio a formazán, disminuyó drásticamente (<70%) con la exposición de nanopartículas en dosis baja y de tamaño pequeño (DBI), esto puede deberse a una mayor sensibilidad de las células hepáticas expuestas por nanopartículas de tamaño menor o igual a 65nm en este caso. Este fenómeno no se presentó para la dosis alta de las mismas nanopartículas, esto pudo deberse al tamaño reducido de las nanopartículas y a su mayor cantidad por unidad de volumen las nanoestructuras pudieron haberse aglomerado provocando que en conjunto se comporten como nanopartículas de un mayor tamaño o que las células modifiquen la capacidad para incorporar a este tipo de nanopartículas sin modificar la capacidad óxido reductora de las células expuestas (viabilidad >70%). Gráfica 1.

Cuando las células hepáticas se expusieron a nanopartículas de tamaño máximo tanto para la dosis baja (DBII) y la dosis alta (DAII) podemos observar que la viabilidad celular fue mayor que la obtenida con el tratamiento DBI en donde la viabilidad celular estaba comprometida. Aún cuando las nanopartículas (DBII) y las (DAII), evidenciaron una menor capacidad biotransformadora de la sal de tetrazolio en comparación con el control negativo, (medio de dispersión de las nanopartículas, ácido acético 1%), las células se mantenían vivas.

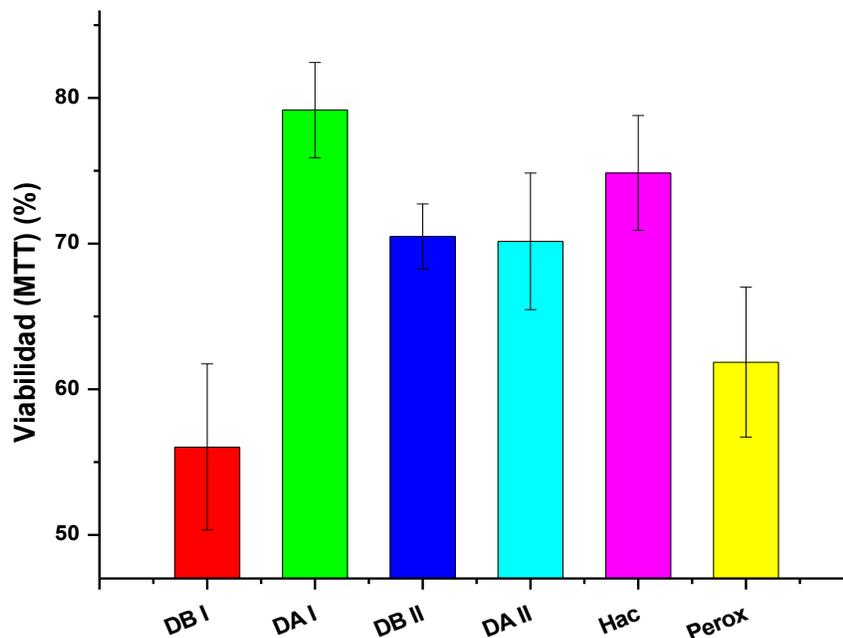
Esta mayor viabilidad celular con respecto al sistema DBI, puede ser debido a que las nanopartículas con un tamaño mayor a 110nm o cercano a 390nm tienen un perfil citotóxico comparable con el perfil presentado por partículas de quitosán de mayor tamaño..

El único sistema con una viabilidad celular mayor a la obtenida en las células expuestas al medio de dispersión fue el sistema de nanopartículas de tamaño mínimo y dosis alta (DAI), ≈80%. En ambos casos las células en estudio después de su exposición son viables.

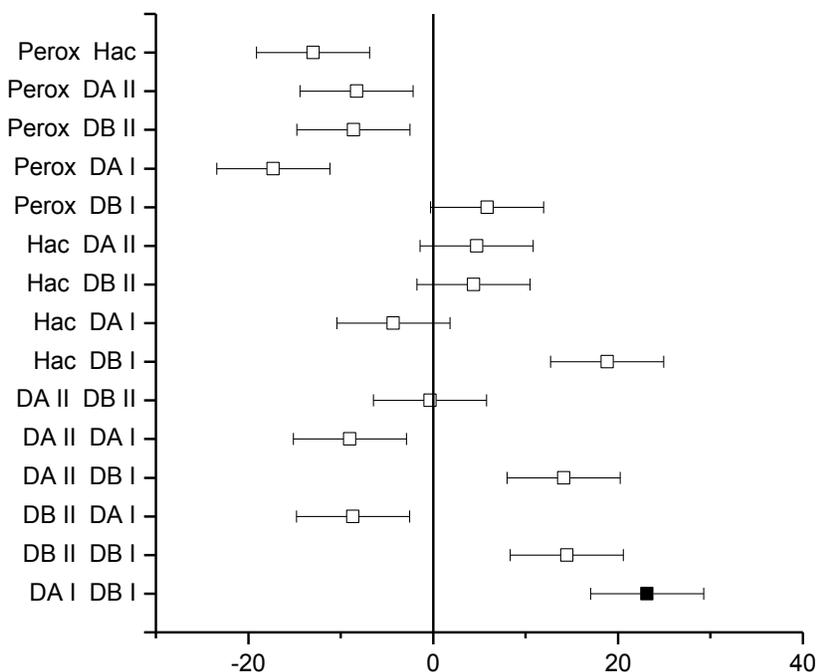
También se puede observar que en todos los tratamientos, con excepción del DB I, la viabilidad celular fue mayor (>70%) que en el caso del control positivo (peróxido) ≈65%. Lo que sugiere que no se compromete la viabilidad celular por estos sistemas en estudio. Estos resultados se confirmaron estadísticamente mediante análisis de varianza sin encontrar diferencias significativas en los resultados obtenidos con la excepción ya comentada (Gráfica 2)

En la gráfica 2, el análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente la prueba de Tukey, se analiza la existencia de diferencias significativas entre las medias. De no haber diferencias significativas entre las medias, se tomaría la hipótesis H₀=no existe diferencia significativa entre las medias, en caso de que exista diferencia significativa entre al menos dos de los tratamientos, se toma H₁= existe diferencia significativa entre al menos dos de los tratamientos. Al realizar el análisis, se encontró que existe diferencia significativa entre los tratamientos DB I y DB II, por lo que no se acepta H₀ ya que si existe diferencia significativa entre dos de las medias.

Gráfica 1: Resultados de la prueba de MTT para células hepáticas de ratón expuestas a dosis bajas y dosis altas de nanopartículas de dos tamaños diferentes, a ácido acético al 1% (control negativo) y peróxido (control positivo).



Gráfica 2: Análisis de ANOVA, 95% de confianza.



5.3 Microscopía confocal

Con el fin de conocer la localización de las nanopartículas hepáticas expuestas, se prepararon nanopartículas fluorescentes. Las células se montaron para el análisis de microscopía confocal. Las células empleadas expuestas a las nanopartículas para tal fin fueron células hepáticas AML-12 que se contratiñeron con yoduro de propidio para hacer la doble tinción.

En las figuras 12 a 14 podemos observar células hepáticas expuestas a las nanopartículas de tamaño mayor marcadas con yoduro de propidio y FITC. En la figura 12 podemos observar a las células hepáticas teñidas con Rodamina y en la figura 13 podemos observar las nanopartículas a las que fueron expuestas estas células con FITC. En la figura 14 tenemos iluminación de FITC y Rodamina lo que nos permite observar tanto a las células hepáticas como a las nanopartículas. En esta figura podemos observar que la mayor concentración de nanopartículas se encuentra sobre las células hepáticas haciendo que éstas se vean en diferentes tonalidades de rojo a anaranjado e incluso verde dependiendo de la concentración de nanopartículas que haya en cada punto.

En las figuras 15 a 18 podemos observar un acercamiento a una célula hepática expuesta a las nanopartículas de mayor tamaño nuevamente marcadas con yoduro de propidio y FITC. En la figura 16 vemos la célula contra teñida con yoduro de propidio y en la figura 17 podemos ver las nanopartículas a las que fue expuesta. En la figura 18 podemos ver de forma más clara que las nanopartículas se concentran en el área que ocupa la célula hepática cubriéndola casi por completo.

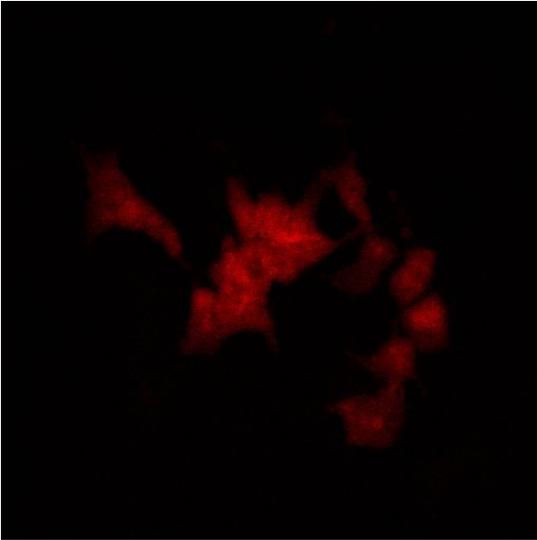


Figura 12: Células hepáticas contrateñidas con ioduro de propidio. (40x)

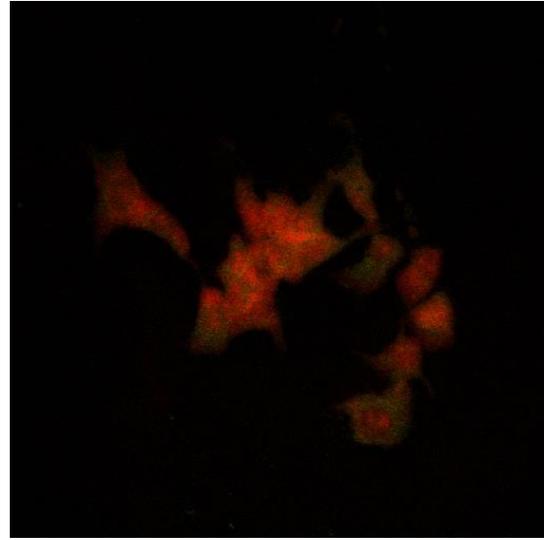


Figura 14: Co-localización de nanopartículas de tamaño mayor marcadas con FITC y la zona nuclear de las células hepáticas contrateñidas con ioduro de propidio (40x)

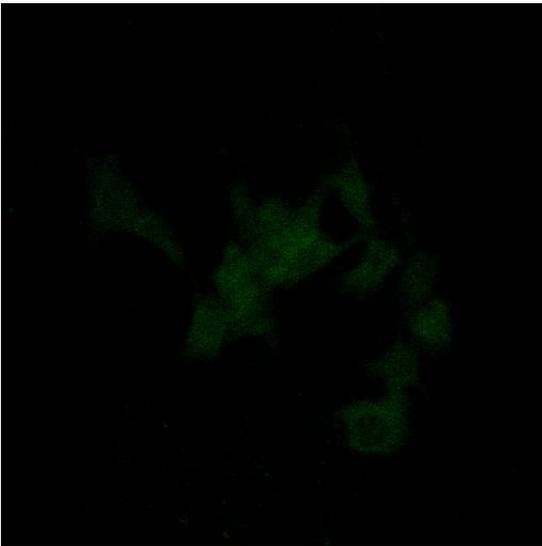


Figura 13: Localización de nanopartículas de tamaño mayor marcadas con FITC (40x)

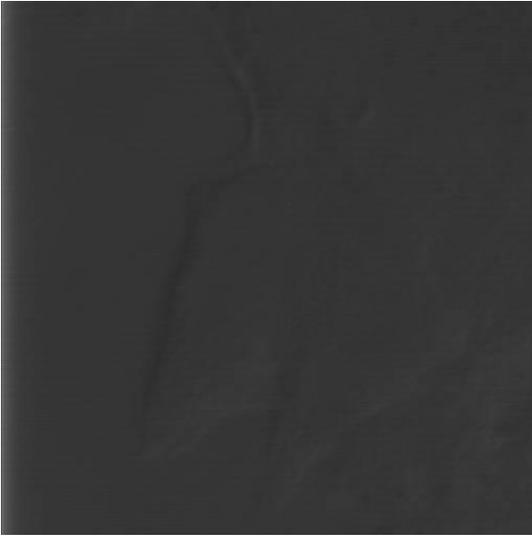


Figura 15: Célula hepática y nanopartículas de tamaño mayor observadas en contraste de fases (100x)

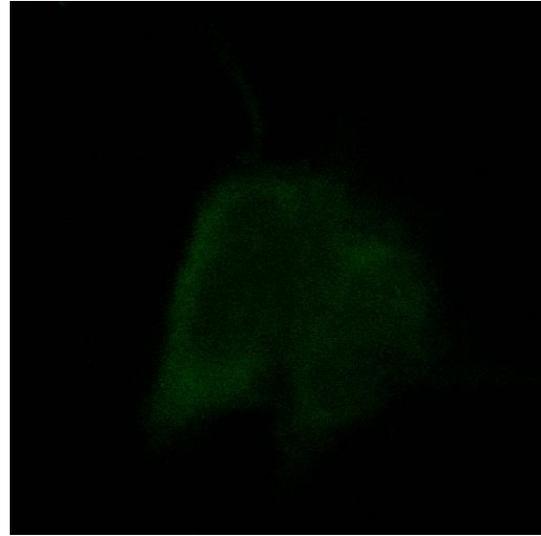


Figura 17: Localización de nanopartículas de tamaño mayor marcadas con FITC (100x)

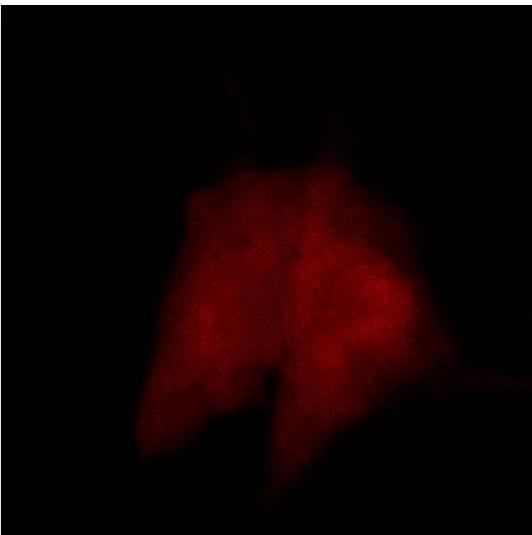


Figura 16: Célula hepática contrateñida con ioduro de propidio. (100x)

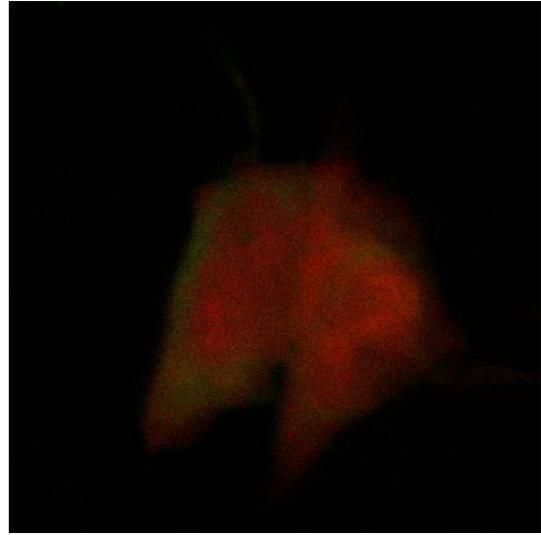


Figura 18: Co-localización de nanopartículas de tamaño mayor marcadas con FITC y la zona nuclear de la célula hepática contrateñida con ioduro de propidio (100x)

6. Conclusiones

- Durante el proceso de optimización, fue posible determinar el efecto de los factores estudiados en este trabajo (velocidad de agitación, tiempo de agitación para el etil cianoacrilato y el quitosán, porcentaje de tensoactivo y porcentaje de tripolifosfato) sobre el tamaño de las nanopartículas fabricadas a base de polietil cianoacrilato y quitosán.
- El tamaño de partícula aumenta de manera significativa en presencia de tripolifosfato
- El tamaño de partícula se reduce al aumentar el tiempo de agitación del etil cianoacrilato mientras que al aumentar el tiempo de agitación del quitosán el tamaño de partícula aumentó.
- Se estandarizaron las condiciones (tiempo de agitación de ECA: 60min, tiempo de agitación de CHI: 20 min, 0.7% de tensoactivo y velocidad de agitación: 343rpm) para obtener nanopartículas de PECA-CHI de un tamaño aproximado de $\approx 51.3225\eta\text{m}$ y condiciones (tiempo de agitación de ECA: 60min, tiempo de agitación de CHI: 20 min, 0.7% de tensoactivo y velocidad de agitación: 805rpm) para obtener nanopartículas de un tamaño aproximado de $\approx 435.1454\eta\text{m}$.
- Se encontró que las nanopartículas de menor tamaño ($\approx 51.3225\eta\text{m}$) utilizadas en dosis bajas afectan significativamente la viabilidad celular mientras que en dosis mayores la viabilidad celular prácticamente no se vio afectada.
- Las nanopartículas de tamaño mayor ($\approx 435.1454\eta\text{m}$), en cualquiera de las dosis probadas en este experimento, son menos citotóxicas para las células hepáticas. Estas mostraron una citotoxicidad menor a la que se presentó en células expuestas a las nanopartículas de menor tamaño ($\approx 51.3225\eta\text{m}$) y en dosis baja.
- Con el análisis de microscopía confocal se observó que, en el caso de las nanopartículas de tamaño promedio mayor ($\approx 435.1454\eta\text{m}$), las nanopartículas colocalizan con la zona nuclear de las células hepáticas.
- No fue posible observar con claridad mediante microscopía confocal la presencia de las nanopartículas de tamaño promedio menor ($\approx 51.3225\eta\text{m}$) dentro de las células hepáticas.

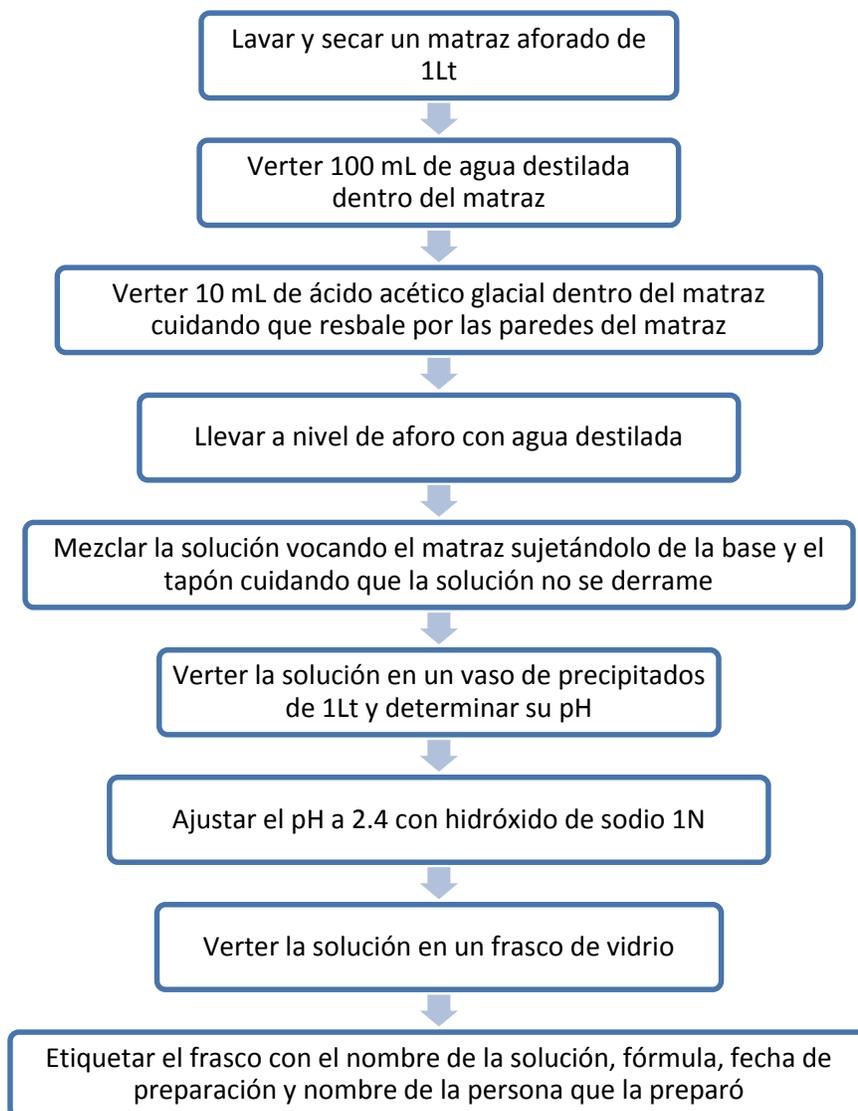
7. Referencias

- (s.f.). Recuperado el 7 de agosto de 2013, de Zeta Potential: A Complete Course in 5 Minutes: <http://www.zeta-meter.com/5min.pdf>
- Behan, N., Birkinshaw, C., & Clarke, N. (2001). Poly n-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerisation and particles formation. *Biomaterials*, 1335-1344.
- Bravo-Osuna, I., Vauthier, C., Farabollini, A., Palmieri, G. f., & Ponchel, G. (2007). Mucoadhesion mechanism of chitosan and thilated chitosan-poly(isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. *Biomaterials*, 2233-2243.
- Carreño-Gómez, B., & Duncan, R. (1997). Evaluation of the biological propoerties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *International journal of pharmaceutics*, 231-240.
- Ci. (s.f.).
- Coupland, P. G., Fisher, K. A., E. Jones, D. R., & Aylott, J. W. (2008). Internalisation of polymeric nanosensors in mesenchymal stem cells: Analysis by flow cytometry and confocal microscopy. *Journal of Controlled Release*, 115-120.
- Fazil, M., Md, S., Haque, S., Kumar, M., Baboota, S., Sahni, J. I., y otros. (2012). Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6-15.
- Geckeler, K., & Stirn, J. (1993). Polyreactionen-Mechanismen, Systematik, Relevanz. *Natur Wissenschaftenaufsätze*, 487-499.
- González Gallardo, S., Ruiz Venegas, M. R., & Hernández Baumgarten, E. M. (2003). *Guía de Microscopía Electrónica*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Grimstone, A. (1981). *El microscopio electrónico en Biología*. Barcelona: Omega.
- Guyalev, A. E., Gelperina, S. E., Skidan, I. N., Antropov, A. S., Kivman, G. Y., & Kreuter, J. (1999). Significant Transport of Doxorubicin into the Brain with Polysorbate 80-Coated Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 1564-1569.
- Hawkins, M. J., Soon-Shiong, P., & Desai, N. (2008). Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Advanced DRUG DELIVERY Reviews*, 876-885.
- He, P., Davis, s. S., & Illum, L. (1998). In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitoan microspheres. *International journal of pharmaceutics*, 75-88.
- Hillegass, J. M., Shukla, A., Lathrop, S. A., MacPherson, M. B., Fukagawa, N. K., & Mossman, B. T. (2010). Assesing nanotoxicity in cells in vitro. *NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH*, 219-231.
- Hoshino, Y., Urakami, T., Kodama, T., Koide, H., Oku, N., Okahata, Y., y otros. (2009). Design of Synthetic Polymer Nanoparticles that Capture and Neutraliza a Toxic Peptide. *Small*, 1562-1568.

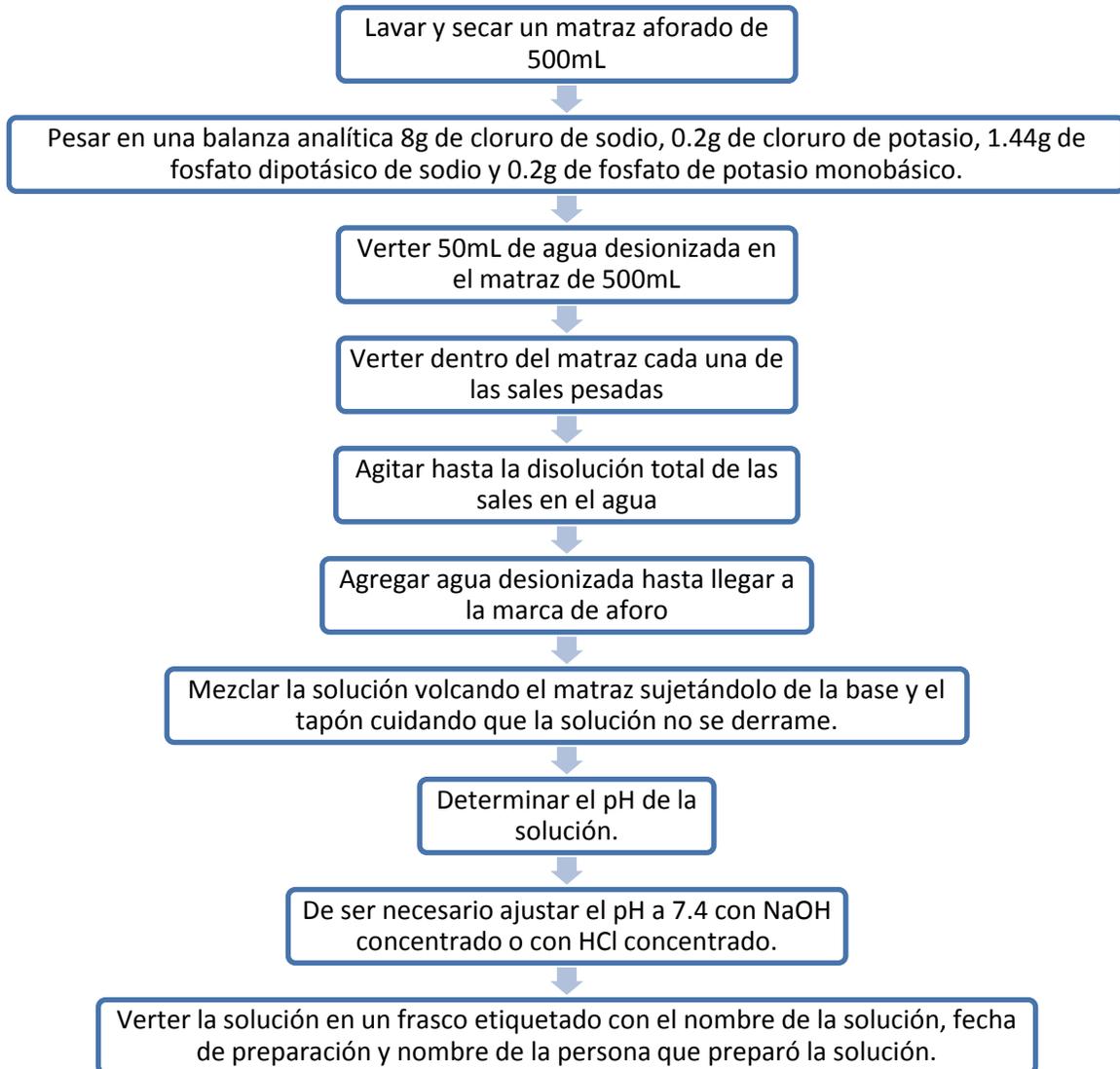
- Kattan, J., Droz, J.-P., Couvreur, P., Marino, J.-P., Botan-Laroze, A., Rougier, P., y otros. (1992). Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of doxorubicin carried by polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles. *Investigational New Drugs*, 191-199.
- Kreuter, J. (2007). Nanoparticles- a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 1-10.
- Kreuter, J. (2007). Nanoparticles-a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 1-10.
- Limouzin, C., Caviggia, A., Ganachaud, F., & Hémerly, P. (2003). Anionic Polymerization of n-Butyl Cyanoacrylate in Emulsion and Miniemulsion. *Macromolecules*, 667-674.
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., & Zhang, Z. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1650-1662.
- Loh, J. W., Yeoh, G., Saunders, M., & Lim, L.-Y. (2010). Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 148-157.
- Mehnert, W., & Mäder, K. (2001). Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications. *Advanced Drug delivery Reviews*, 165-196.
- Mohanraj, V., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles - A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 561-573.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 55-63.
- Prasad Rao, J., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*, 887-913.
- Pygall, S. R., Whetstone, J., Timmins, P., & Melia, C. D. (2007). Pharmaceutical applications of confocal laser scanning microscopy: The physical characterisation of pharmaceutical systems. *Advanced DRUG DELIVERY Reviews*, 1434-1452.
- Riddic, T. (1968). *Control of colloid stability through Zeta-Potential*. Wynnewood: Livingston Publishing Co.
- Rivero González, J. A. (2013). *Evaluación de la Citotoxicidad Inducida por Nanopartículas de quitosan y polietilcianoacrilato in vivo*. México: Tesis de licenciatura para la obtener el título de Q.F.B.
- Swarbrick, J., & Boylan, J. (2002). *Encyclopedia of Pharmaceutical technology*. New York: Marcel Dekker Incorporated.
- Vansnick, L., Couvreur, P., & Christiaens-Leyh, D. a. (1984). Molecular Weights of Free and Drug-Loaded Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 36-41.
- Vauthier, C., Dubernet, C., Fattal, E., Pinto-Alphandary, & Couvreur, P. (2003). Poly(alkylcyanoarilates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Advanced Drug delivery Reviews*, 519-548.

8. Anexos

8.1 Preparación de ácido acético al 1%

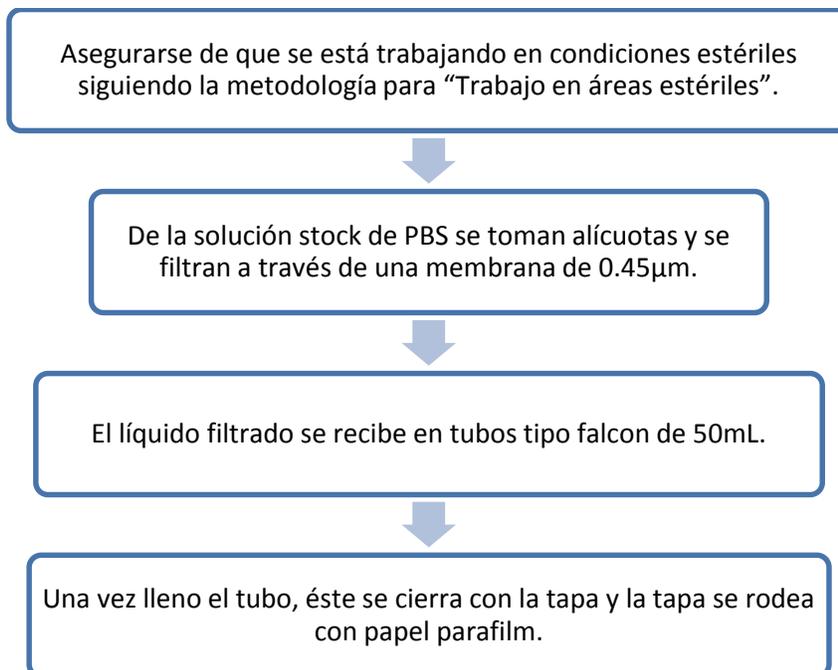


8.2 Preparación de PBS pH=7.4

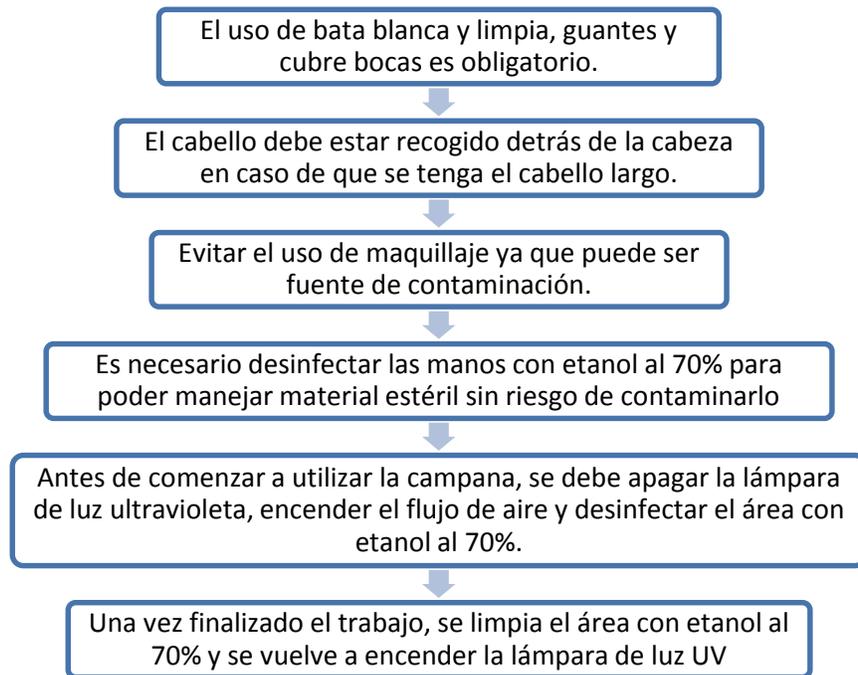


8.2.1 Esterilización del PBS

*Todos los pasos deben realizarse dentro de una campana de flujo laminar

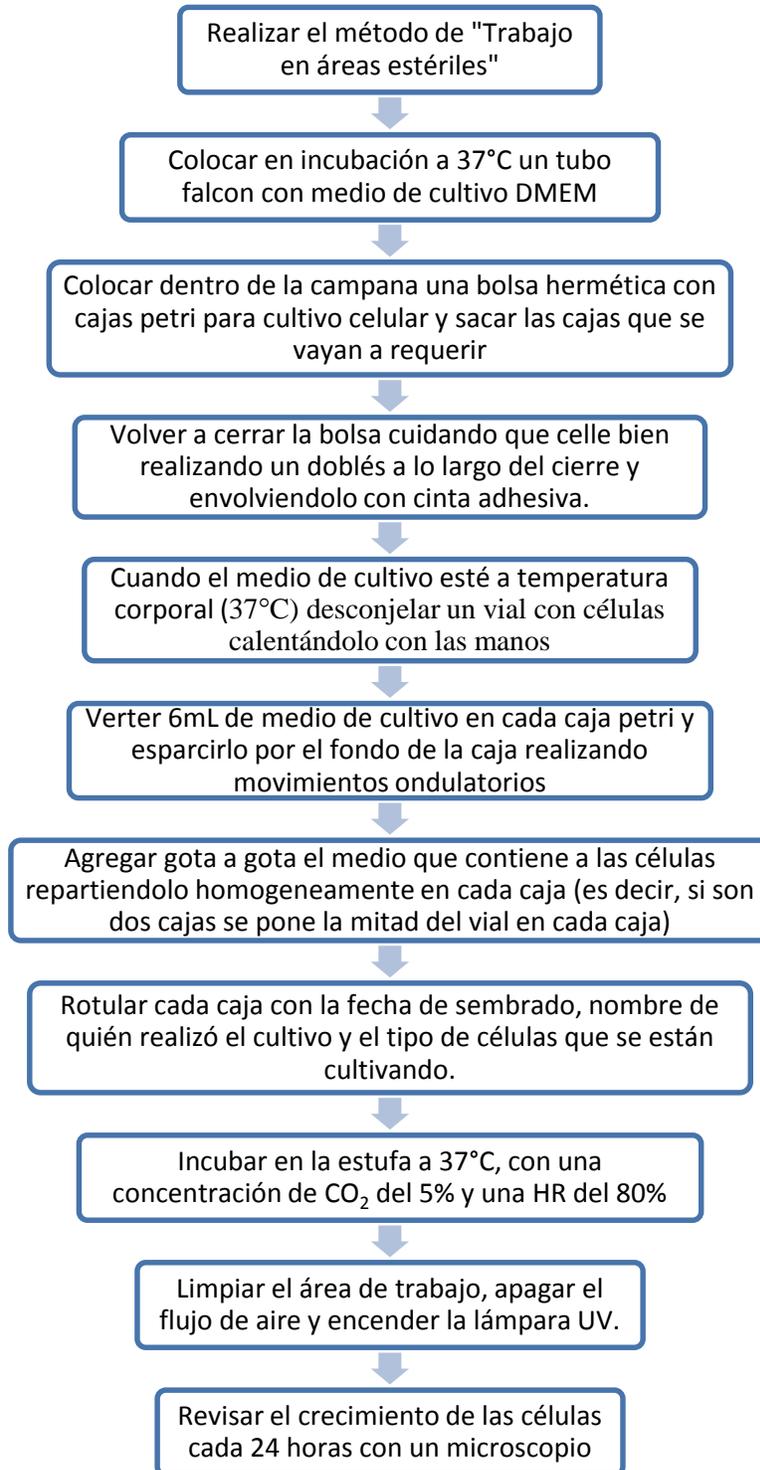


8.3 Trabajo en áreas estériles



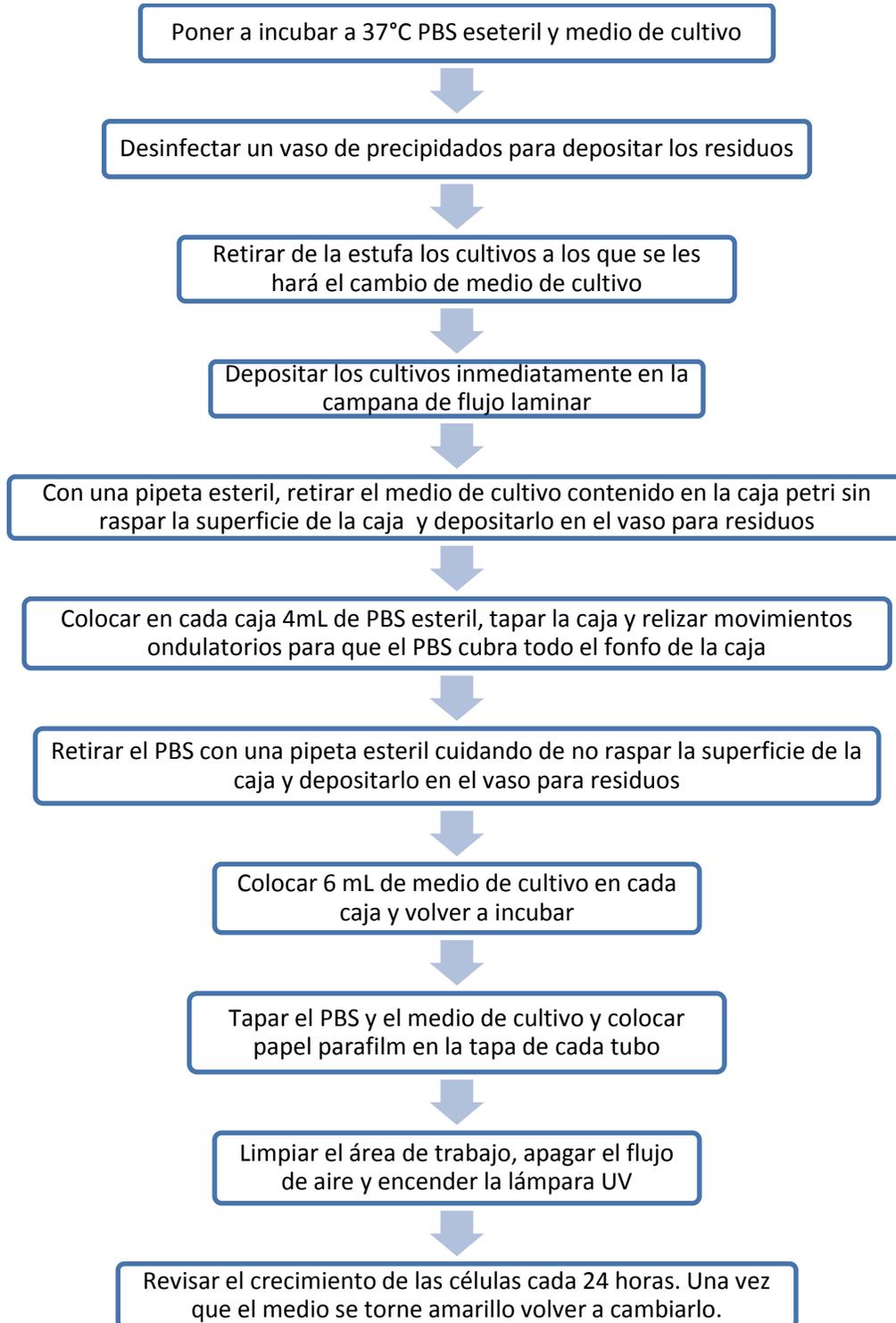
8.4 Cultivo celular

***TODO EL MATERIAL QUE VAYA A SER INTRODUCIDO A LA CAMPANA (CON EXCEPCION DE LOS CULTIVOS CELULARES) DEBE SER DESINFECTADO PREVIAMENTE CON ALCOHOL AL 70% PARA EVITAR CONTAMINACIONES.**



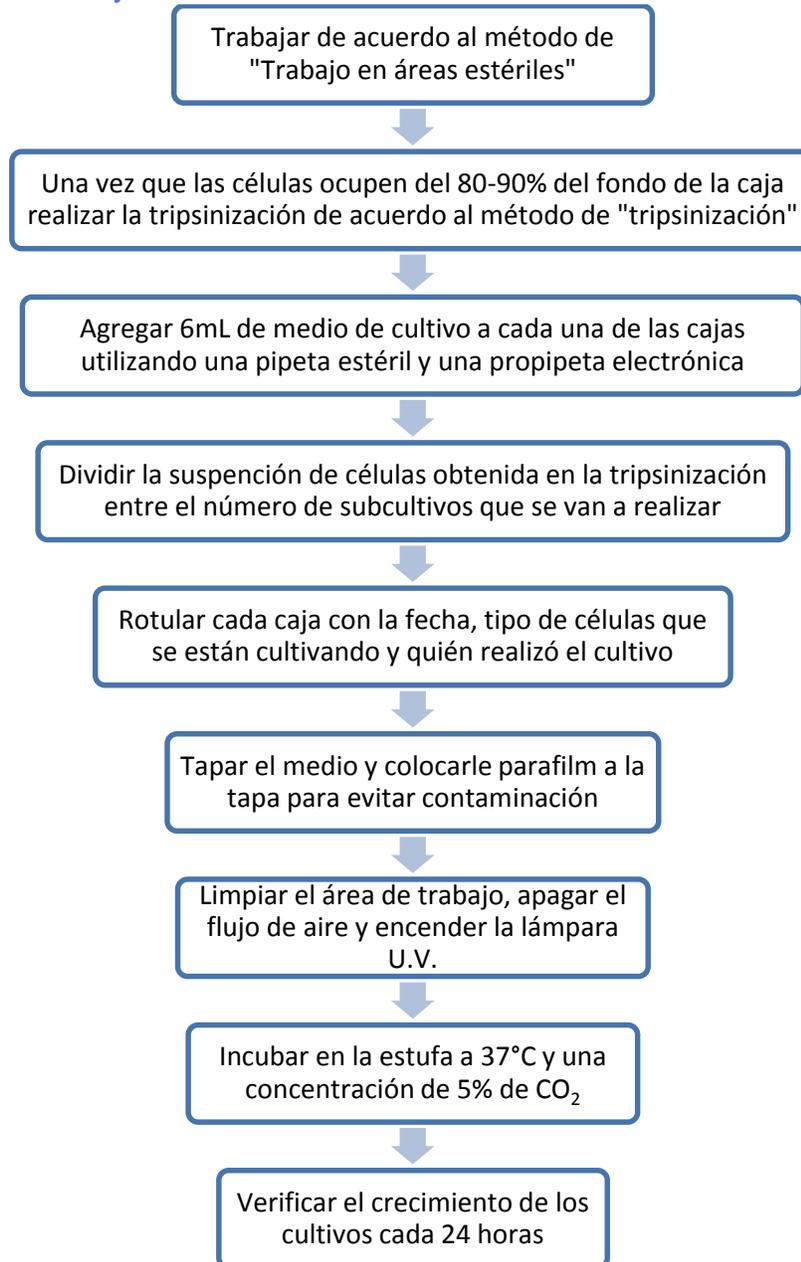
8.5 Cambio de medio de cultivo celular

***TODO EL MATERIAL QUE VAYA A SER INTRODUCIDO A LA CAMPANA (CON EXCEPCION DE LOS CULTIVOS CELULARES) DEBE SER DESINFECTADO PREVIAMENTE CON ALCOHOL AL 70% PARA EVITAR CONTAMINACIONES.**

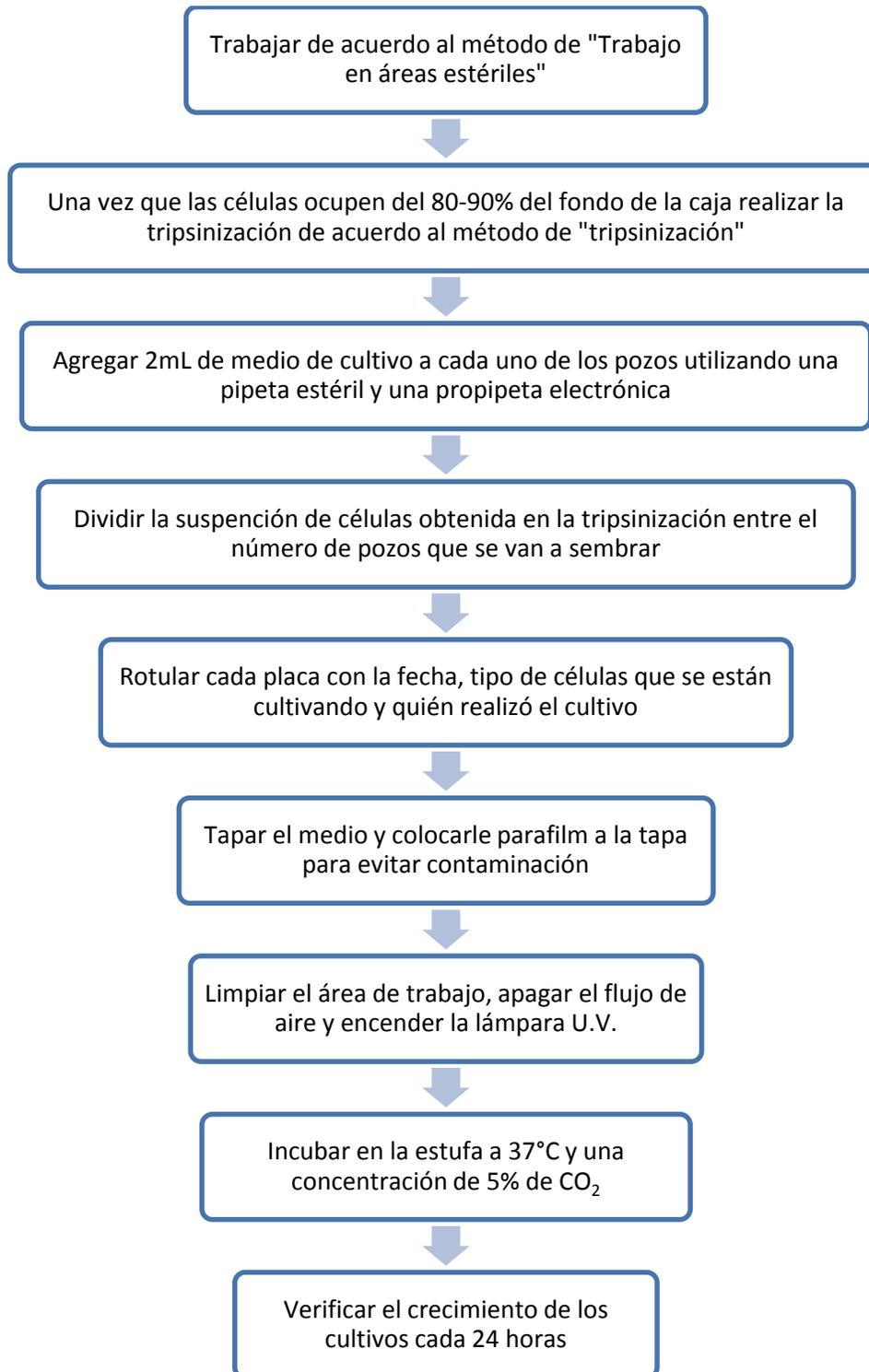


8.6 Subcultivos

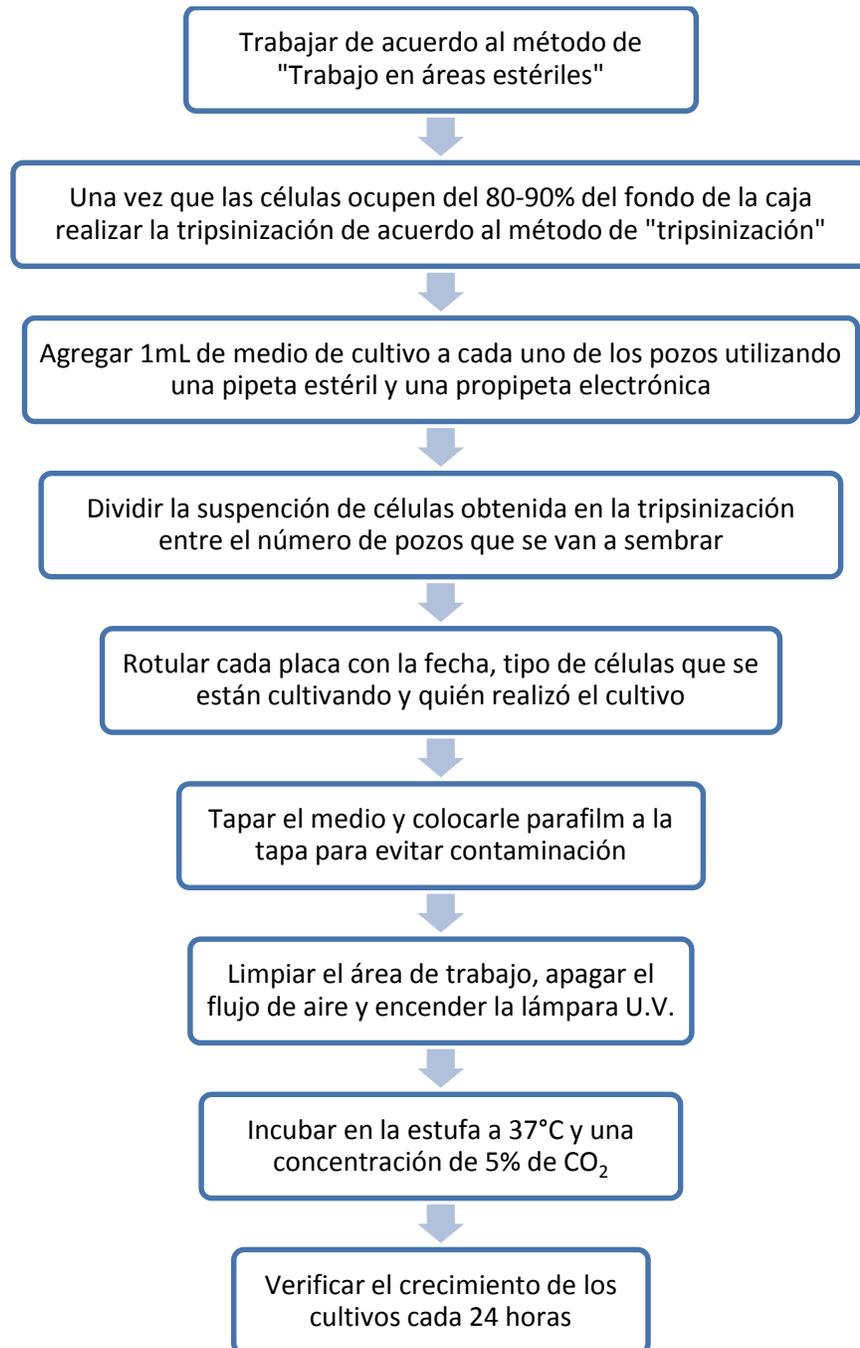
8.6.1 Subcultivos en cajas Petri



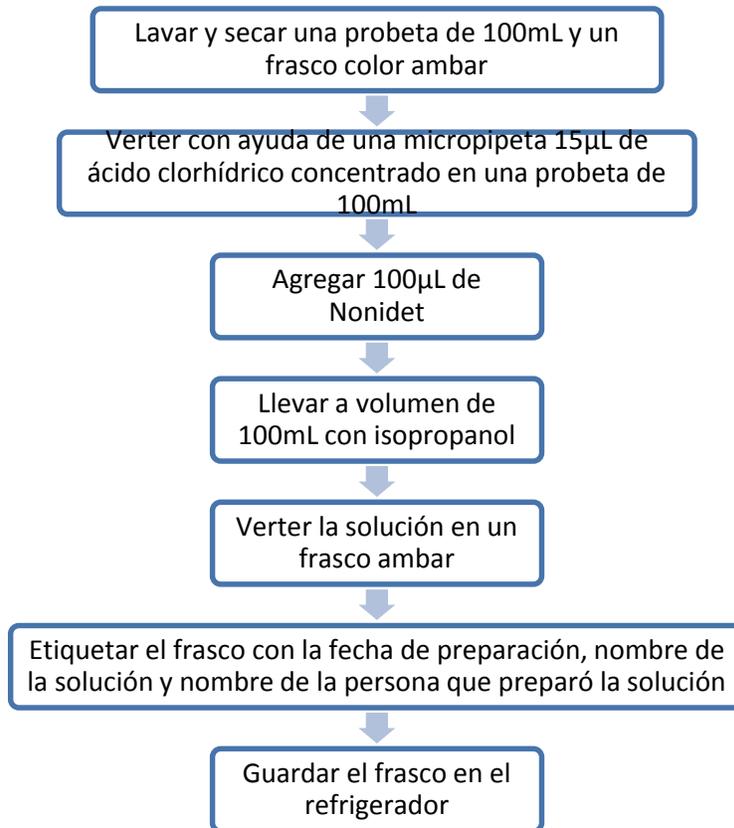
8.6.2 Subcultivos en placas de 6 pozos



8.6.3 Subcultivos en placas de 12 pozos



8.7 Preparación de buffer de Nonideth



8.8 Preparación de la solución de H₂O₂

