



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS CON ANTIOXIDANTES PARA USO
VETERINARIO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:
JOSÉ ÁNGEL RIVERO GONZÁLEZ

TUTOR:
DR. ROBERTO DÍAZ TORRES
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

EDO. DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Contenido

1. Introducción	1
Aflatoxina B1	1
Curcumina.....	3
Actividad antioxidante	7
Nanopartículas de ácido poliláctico co-glicólico (PLGA)	8
2. Objetivo general.....	13
Objetivos particulares.....	13
3. Hipótesis	14
4. Metodología	14
Elaboración de nanopartículas de PLGA y PLGA-PEG cargadas con curcumina.	14
Diseño experimental factorial de niveles mixtos para la optimización de la formulación	14
Determinación de la eficiencia de carga.	16
Caracterización de las Nanopartículas.....	17
Evaluación de la citotoxicidad y viabilidad celular	17
5. Resultados y discusión	23
Optimización de la formulación de NP-CURC utilizando un modelo factorial de niveles mixtos.	25
PLGA	26
PLGA-PEG.....	32
Morfología de nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.	39
Citotoxicidad	41
Viabilidad celular.....	41

GSH.....	46
TBARS.....	48
Actividad de la enzima catalasa (CAT).....	50
Actividad de la enzima glutatión reductasa (GR).....	51
Estudios de internalización de las NP-CURC en la célula.....	53
6. Conclusión.....	55
7. Referencias.....	56
8. Anexo - Análisis estadístico.....	60

Índice de Figuras

Figura 1 Derivados del dicinamoilmetano (componentes de la curcumina).	5
Figura 2 Isómero geométrico cis-trans del compuesto 1.....	5
Figura 3. Especies químicas del diferuloilmetano a diferentes valores de pH tomado de Tonnesen et al. (1985).	6

Índice de imágenes

Imagen 1 Micrografía electrónica de barrido de nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.....	40
Imagen 2 Micrografía electrónica de barrido de nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.	40
Imagen 3 Microscopía confocal de células HepG2 expuestas a nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina 0.2 μ M. Contratinción con Ioduro de propidio.	54
Imagen 4 Microscopía confocal de células HepG2 expuestas a nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina 20 μ M. Contratinción con Ioduro de propidio.	54

Índice de gráficos

Gráfico 1. Curva de barrido para curcumina 10 mg/mL en etanol 80%	23
Gráfico 2. Curva de calibración de curcumina en etanol 80%	24
Gráfico 3 Diagrama de Pareto de efecto de los factores sobre la carga de curcumina	27
Gráfico 4 Efactor principales de los factores sobre la carga de curcumina	27
Gráfico 5 Diagrama de superficie de respuesta para la carga de curcumina en nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.	28
Gráfico 6 Diagrama de cuadro para carga de curcumina en nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina	28
Gráfico 7 Diagrama de Pareto estandarizado para tamaño de partícula nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.	29
Gráfico 8 Diagrama de efectos principales de los factores sobre el tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.....	30
Gráfico 9 Diagrama de superficie de respuesta estimada para tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.	30
Gráfico 10 Diagrama de cuadro para tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina	31
Gráfico 11 Diagrama de Pareto estandarizado para la carga de curcumina de nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.....	32
Gráfico 12 Diagrama de efectos principales de los factores sobre la carga de curcumina en nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.	32
Gráfico 13 Superficie de respuesta estimada para carga de curcumina en nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.....	34
Gráfico 14 Diagrama de cuadro para la carga de curcumina en nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.	34
Gráfico 15 Diagrama de parteo estandarizado para tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.....	35
Gráfico 16 Diagrama de efectos principales de los factores sobre el tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.	36

Gráfico 17 Diagrama de superficie de respuesta estimada para el tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.	37
Gráfico 18 Diagrama de cuadro para tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.	37
Gráfico 19 Curva de viabilidad de células HepG2 a concentraciones de 0.2, 2 5 10 y 20 μ M de curcumina libre.	42
Gráfico 20 Viabilidad de línea celular HepG2 posterior a la exposición de AFB1 25 ng/mL por 4 h.	43
Gráfico 21 Viabilidad de la línea celular HepG2 posterior a la exposición por 4 h de curcumina libre y NP-CURC a diferentes concentraciones (0.2, 2, 5 y 10 μ M)	44
Gráfico 22 Grafico de medias y 95 % de Fisher LSD para la viabilidad en los diferentes tratamientos de curcumina posterior a una exposición con la mezcla de aflatoxinas B ₁ y B ₂	45
Gráfico 23 Cuantificación de GSH en células HepG2 con exposición a NP-CURC por 4h, posterior a una exposición con AFB1 25 ng/mL. Las letras representan diferencia estadística (P<0.05) significativa.	47
Gráfico 24 Cuantificación de TBARS en células HepG2 con exposición a NP-CURC por 4h, posterior a una exposición con AFB1 25 ng/mL. Las letras representan diferencia estadística (P<0.05) significativa.	49
Gráfico 25 Actividad de catalasa en células HepG2 expuestas a nanopartículas de PLGA y PLGA-PEG cargadas con curcumina y curcumina libre a diferentes concentraciones, posterior a una exposición de aflatoxinas B ₁ y B ₂ 25 ng/mL. Las letras representan diferencia estadística (P<0.05) significativa.....	51
Gráfico 26 Actividad de Glutati3n reductasa (GR) en células HepG2 expuestas a NP-CURC y curcumina libre a diferentes concentraciones (0.2, 2 y 20 μ M de curcumina) posterior a una exposición con AfB1 25 ng/mL. Las letras representan diferencia estadística (P<0.05) significativa.	53

1. Introducción

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios tóxicos derivados de los alimentos producidos durante el crecimiento de grupos fúngicos como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Estos hongos toxígenos son capaces de desarrollarse en una gran variedad de sustratos, pudiendo contaminar los alimentos cuando éstos son cultivados, procesados o almacenados en condiciones adecuadas que favorezcan su desarrollo [1,2].

La aflatoxina B₁ (AFB₁) es una potente micotoxina hepatotóxica y hepatocarcinogénica. La peroxidación lipídica y el daño oxidativo del ADN son las principales manifestaciones de la toxicidad inducida por la AFB₁ que podrían ser contrarrestados por los antioxidantes. Muchos componentes de las plantas, como la curcumina, han sido estudiados como protectores contra el daño hepático asociado con la peroxidación de lípidos como sucede en la toxicidad inducida por AFB₁. Estos hallazgos sugieren que la curcumina tiene un efecto hepatoprotector contra la lesión hepática inducida por AFB₁ [1]. Lamentablemente, se ha puesto de manifiesto que la baja solubilidad en agua y la biodisponibilidad oral limitada son los principales obstáculos en su desarrollo como un agente terapéutico para el cáncer y otras enfermedades crónicas. Tradicionalmente, la cúrcuma se administra por vía oral como una emulsión en aceite o leche, tal vez debido a la naturaleza hidrófoba de sus constituyentes bioactivos. La curcumina de hecho se ha demostrado que interactúa con los fosfolípidos, tensoactivos, proteínas y ciclodextrinas. Se ha tratado de mejorar la disponibilidad de la curcumina mediante varios métodos, incluyendo su incorporación en liposomas y en vesículas de fosfolípidos. Otra manera de resolver el problema de la falta de solubilidad en agua y la limitada biodisponibilidad, es la de la encapsulación en nanopartículas a base de polímeros [3].

Aflatoxina B₁

Las aflatoxinas son producidas por grupos fúngicos como *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Estas cepas son capaces de producir Aflatoxinas B₁, B₂, G₁

y G₂ [4]. Estos hongos se encuentran en muchos países, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales, donde las condiciones de temperatura y humedad son óptimas para el crecimiento de hongos y la producción de toxina.

La presencia de aflatoxinas se ha registrado indirectamente en muchos artículos desde el siglo pasado, donde se describían los mismos síntomas, especialmente en animales intoxicados, encontrando una relación con el consumo de alimentos en cierto estado de descomposición, pero no se conocía la causa exacta del problema. El estudio documentado de las aflatoxinas y la enfermedad causada por éstas comienza en los sesenta, muchos laboratorios enfocaron su atención en un brote de una enfermedad hepatotóxica en pavos y otros animales de corral (enfermedad X de los pavos) en Inglaterra. La enfermedad X de los pavos fue atribuida a la contaminación de harina de cacahuate contaminada con aflatoxinas [5].

La AFB₁ es el teratógeno, mutágeno y hepatocarcinógeno más potente en la familia de aflatoxinas, y está clasificado como un carcinógeno del grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, 1987). Por lo tanto, la eliminación o inactivación de este metabolito fúngico tóxico es una preocupación importante para los productores de alimentos y la industria pecuaria. Varias estrategias físicas, químicas y biológicas están disponibles para la inactivación de las aflatoxinas, aunque la irradiación UV se ha conocido durante muchos años como un método físico eficaz para la destrucción de las aflatoxinas debido a su fotosensibilidad, la naturaleza exacta de los productos de fotodegradación de las aflatoxinas siguen siendo desconocidos y si son o no sustancias inofensivas se ha convertido en una causa importante de aprehensión hacia este método de desintoxicación fotoquímica avanzada [6] ya que su toxicidad ha causado daños severos en la salud y en la economía alrededor de todo el globo.

La acumulación de aflatoxinas depende de las condiciones del medio ambiente. Antes de la cosecha y durante los periodos de sequía el riesgo para el desarrollo de aflatoxinas es más grande. Cuando la humedad está debajo del valor normal y la

temperatura es alta, el número de esporas en el aire de *Aspergillus* se incrementa, estas esporas infectan las cosechas a través de los insectos. Una vez infectada una planta, la producción de aflatoxinas se favorece durante la fase de poscosecha, la proliferación de hongos y producción de aflatoxinas puede exacerbarse en sitios calientes y húmedos de almacenamiento [7].

Estudios *in vitro* e *in vivo* indican que el daño celular por aflatoxinas se lleva a cabo por los radicales libres que se forman en la activación de la misma [8]. Estos radicales son compuestos altamente inestables, que reaccionan con el complejo lipídico de la membrana celular y causan la peroxidación de los lípidos. Determinación de enzimas oxidativas y los niveles de MDA que se incluyen entre los productos finales de la peroxidación se encuentran entre los métodos más utilizados para la determinación del estrés oxidativo [9].

La línea celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) ha sido ampliamente utilizada como un sistema modelo para evaluar los efectos tóxicos de diversas sustancias, especialmente para el estudio del hepatocarcinógeno más potente, AFB1. Se ha informado de que las células cultivadas muestran disminución de la supervivencia celular en presencia de AFB1, que podría estar relacionado con un daño del ADN causado por la toxina o el deterioro directo de las funciones de proteínas específicas, tales como la fosforilación de proteínas en la actividad de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos [6].

Curcumina

La curcumina es un polifenol derivado del rizoma de la *curcuma longa* [10]. Posee diversas propiedades antioxidantes, anti-cáncer y anti-inflamatorias entre otras. Además de la potente capacidad antioxidante de la curcumina, a pH neutro y ácido, sus mecanismos de acción incluyen la inhibición de varias vías de señalización celular en múltiples niveles, efectos sobre las enzimas celulares tales como la ciclooxigenasa y glutatión S-transferasas, inmuno-modulación y efectos sobre la angiogénesis y la adhesión célula-célula [11]. La curcumina tiene la capacidad de afectar a la transcripción de genes para inducir la apoptosis en modelos preclínicos,

por lo que es probable que sea de especial relevancia para la quimioprevención del cáncer y la quimioterapia en los pacientes [11].

La curcumina es un compuesto antioxidante fenólico natural de color amarillo, que fue extraído por primera vez por Vogel et al. [10]. La estructura de la curcumina fue elucidada y sintetizada por Milobedeska et al. [12] y Lampe et al. [13].

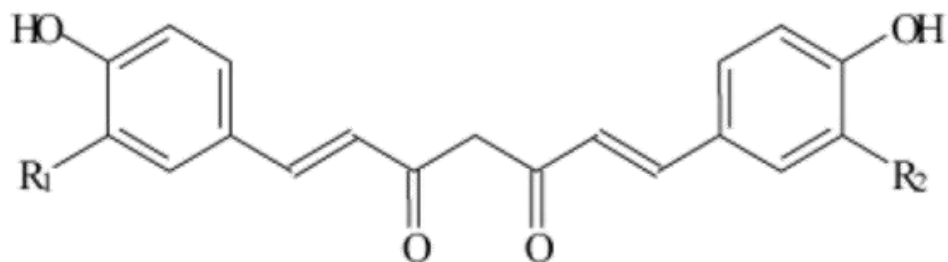
Curcuma spp contiene turmerina (un péptido soluble en agua), aceites esenciales (tales como turmerones, atlantones y zingibereno) y curcuminoides incluyendo la curcumina [1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil) -1,6-heptadieno-3, 5-diona]. Los curcuminoides se pueden definir como compuestos fenólicos derivados de las raíces de *curcuma spp.* (Zingiberaceae). La curcumina (diferuloilmetano) es un polifenol de bajo peso molecular, caracterizado químicamente por primera vez en 1910, este componente se considera generalmente como el más activo y comprende del 2-8% de la mayoría de las preparaciones de cúrcuma. La curcumina ha sido objeto de cientos de artículos publicados en las últimas tres décadas, el estudio de sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, quimiopreventivo del cáncer y con propiedades potencialmente quimioterapéuticas [11].

Los tres principales componentes colorantes de la curcumina que están presentes en varias proporciones son todos los derivados del dicinamoilmetano (Figura 1):

1) 1,7-Bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona = diferuloilmetano (Formula química: $C_{21}H_{20}O_6$: número C.A.S.: 458-37-7, peso molecular: 368)

2) 1-(4-Hidroxifenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona = p-hidroxicinnamoilferuloilmetano (Formula química: $C_{20}H_{18}O_5$: Número C.A.S.: 33171-16-3, peso molecular: 338 g/mol)

3) 1,7-Bis-(4-hidroxifenil)-hepta-1,6-dien-3,5-diona = p,p-dihidroxicinnamoilmetano (Formula química: $C_{19}H_{16}O_4$: número C.A.S.: 33171-05-0, peso molecular: 308 g/mol)



- 1) $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$
- 2) $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{H}$
- 3) $R_1 = R_2 = \text{H}$

Figura 1 Derivados del dicinamoilmetano (componentes de la curcumina).

Además de estos importantes componentes, se pueden aislar tres componentes menores que se presume son los isómeros geométricos de los compuestos 1-3 mencionados anteriormente. Uno de ellos se supone que es el isómero cis-trans geométrico del compuesto 1 (que tiene la configuración trans-trans) basado en su espectro de UV, menor punto de fusión y menor estabilidad en soluciones y en presencia de la luz en comparación con el compuesto 1 (Figura 2) [14].

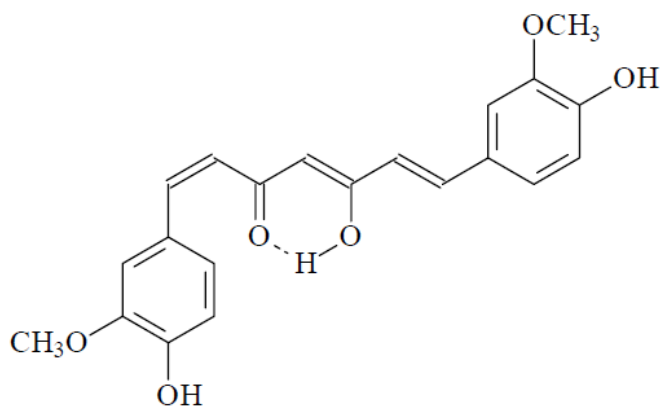


Figura 2 Isómero geométrico cis-trans del compuesto 1.

Propiedades fisicoquímicas

La curcumina es un pigmento liposoluble, prácticamente insoluble en agua a pH ácido y neutro, soluble en pH alcalino. Las preparaciones de curcumina soluble en

agua se pueden realizar mediante la incorporación en diversos sistemas micelares de tensoactivo (por ejemplo, dodecil sulfato de sodio, bromuro de cetilpiridinio, gelatina, polisacáridos, polietilenglicol, ciclodextrinas, etc). En solución estos componentes presentan una tautomería ceto-enol y, dependiendo del disolvente, más del 95% se encuentra en la forma enol.

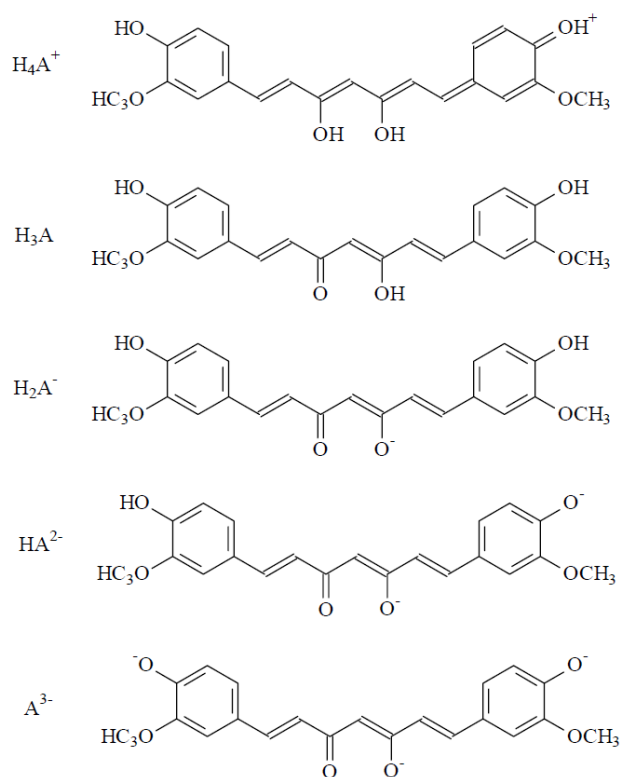


Figura 3. Especies químicas del diferuloilmetano a diferentes valores de pH tomado de Tonnesen et al. (1985).

Se ha estudiado la cinética de las reacciones de degradación por hidrólisis del compuesto 1 (diferuloilmetano) por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). A pH <1 las soluciones de diferuloilmetano tienen una coloración roja que indica la presencia de la forma protonada (H_3A^+). En el intervalo de pH de 1-7, la mayoría de las especies de diferuloilmetano se encuentran en forma neutra (H_3A). La solubilidad en agua es muy baja en este intervalo de pH y la solución es de color amarillo. A pH > 7.5 el color cambia a rojo. Los valores de pKa para la

disociación de los tres protones ácidos del compuesto 1 (formas H_2A^- , HA^{2-} y A^{3-}) son 7.8, 8.5 y 9.0, respectivamente [15](Figura 3).

Actividad antioxidante

La capacidad de la curcumina para neutralizar los carcinógenos químicos, como el superóxido, peróxido, radical óxido nítrico y radical hidroxilo constituye un tema de interés. Mientras que su mecanismo de acción se encuentra todavía en exploración, se propone que actúa a nivel de las vías metabólicas que implican la transcripción, el crecimiento celular, la apoptosis, etc. A pesar de estos blancos biológicos, la curcumina es prácticamente no citotóxica para las células humanas no cancerígenas, pero citotóxica para células cancerígenas. Esta inhibe la proliferación celular oncogena mediante el arresto del ciclo celular y la inducción de apoptosis [16].

La oxidación de la curcumina implica la transferencia de átomo de hidrogeno del radical β -alcoxil generado en el centro de su enlace heptadiona que sufre un reordenamiento molecular para formar el radical fenoxi. Por lo tanto, la presencia del grupo $-CH_2$ en el centro de la curcumina y grupos hidroxilo fenoxi en ambos de sus extremos son esenciales para la función antioxidante de la curcumina, por lo que este potencial de oxidación observado en la curcumina, característico para un típico radical fenoxi, proporciona una justificación para explicar las propiedades antioxidantes ampliamente apreciadas de la curcumina en comparación con los fenoles [16].

Sin embargo, la baja solubilidad en agua y la biodisponibilidad oral limitada son los principales obstáculos en su desarrollo como un agente terapéutico para el cáncer y otras enfermedades crónicas. En algunos estudios se han elaborado formulaciones de nanopartículas biodegradables cargadas con curcumina sobre la base de la técnica de la nanoprecipitación usando polímeros biodegradables y se probó su biodisponibilidad y los efectos sobre el crecimiento de las células. Se ha encontrado que la curcumina en nanopartículas tiene una mayor captación celular *in vitro* que la de la curcumina sin encapsular. También se encontró que las NP de curcumina tienen una mayor potencia en la inducción de la apoptosis en las células

tumorales. Una posible causa de la mayor actividad podría ser mayor captación celular de las NP de curcumina, demostrada en diferentes estudios [17].

Nanopartículas de ácido poliláctico co-glicólico (PLGA)

El sistema de administración es tan importante como el efecto terapéutico. Los nuevos sistemas de administración de fármacos han tenido un enorme impacto en la tecnología médica, mejorando la actividad de muchos fármacos, permitiendo el uso de nuevas terapias médicas. Los esfuerzos para miniaturizar los dispositivos de administración de fármacos prometen un sistema integrado que combina la nanotecnología con la molécula terapéutica para el tratamiento de varias enfermedades [18]. Para una liberación de fármaco eficiente, el rango de la nanoescala en las partículas es de vital importancia, debido a que este puede facilitar el incremento en la captación celular de fármaco, dirigido a células diana (un proceso que no es tan eficiente en formulaciones convencionales), esto a su vez, mejora la viabilidad de los compuestos terapéuticos [19].

Se han desarrollado sistemas poliméricos de liberación de fármaco que proveen una atractiva alternativa para los sistemas de liberación modificada de agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos se protegen dentro de estos sistemas de liberación ofreciendo una ventaja de administración de los fármacos a los tejidos en forma sostenida evitando la administración repetida del fármaco [18].

Se han realizado una gran cantidad de investigaciones sobre la administración de fármacos por medio de polímeros biodegradables desde su introducción como dispositivos quirúrgicos bioabsorbibles aproximadamente hace tres décadas. Entre todos los biomateriales, la aplicación del polímero biodegradable PLGA ha demostrado un enorme potencial como vehículo de administración de fármacos y como base para la ingeniería de tejidos. El PLGA comprende una familia de polímeros biodegradables aprobados por la FDA que son altamente biocompatibles y se han estudiado ampliamente como vehículos de administración para fármacos, proteínas y otras macromoléculas tales como el ADN, el ARN y los péptidos [1,3,4]. La literatura reciente ha mostrado que la degradación de PLGA puede ser empleado para sistemas de liberación sostenida de fármacos en dosis deseables por

implantación sin procedimientos quirúrgicos. Además, es posible ajustar las propiedades físicas globales de la matriz de polímero-fármaco mediante el control de los parámetros relevantes, tales como el peso molecular del polímero, la relación entre el ácido láctico y glicólico, además de la concentración del fármaco para conseguir una dosificación deseada y en un intervalo de tiempo, dependiendo del tipo de fármaco [20].

Ácido Poliláctico-co-glicólico (PLGA)

El poliéster PLGA es un co-polímero de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA). Es el mejor biomaterial definido disponible para la administración de fármacos con respecto a diseño y rendimiento. El ácido poli láctico contiene un carbono α asimétrico que se describe típicamente como la forma D o L en términos estereoquímicas clásicos y, a veces como R y la forma S, respectivamente. Las formas enantioméricas de polímero PLA son el ácido poli-D-láctico y ácido poli L-láctico (PLLA). El polímero PLGA es generalmente un acrónimo de poli ácido D, L-láctico-co-glicólico donde las formas D y L están en igual proporción [20].

Los co-polímeros de PLGA

La necesidad de mejores formulaciones de suministro que incorporan una variedad de medicamentos y métodos de administración se ha traducido en el desarrollo de diversos tipos de co-polímeros de bloque de poliésteres con polietilenglicol (PEG). Las cadenas de PEG se orientan hacia la fase acuosa externa en micelas, que rodea por lo tanto las especies encapsuladas. Esta capa de PEG actúa como una barrera y reduce las interacciones con moléculas extrañas por repulsión estérica, dando una mayor estabilidad de almacenamiento. Sin embargo, la adición de PEG al sistema también resulta en la reducción de la eficiencia de encapsulación de fármacos y proteínas, incluso con las técnicas de fabricación más adecuadas [20].

Aunque sus características químicas desfavorecen ciertas vías de administración, siendo la vía parenteral la más utilizada, se han realizado estudios de administración oral de fármaco hidrófobos encapsulados en NP de PLGA, en donde el tamaño de partícula se correlaciona directamente con el tiempo de circulación *in vivo*, donde

las partículas más pequeñas producen niveles sanguíneos prolongados. Además, se ha reportado que los valores del área bajo la curva (ABC) se ven mejorados con todas las formulaciones de nanopartículas en comparación con el fármaco puro, lo cual indica claramente que las nanopartículas de PLGA tienen un amplio papel en la administración oral de fármacos hidrófobos [21,22].

Propiedades fisicoquímicas

Con el fin de diseñar mejores dispositivos de administración controlada de fármacos, es esencial comprender las propiedades físicas, químicas y biológicas del PLGA. En general, el polímero PLA puede obtenerse en una forma altamente cristalina (PLLA) o completamente amorfa (PDLA), debido al desordenamiento de las cadenas poliméricas. El PGA no presenta ningún grupo lateral metilo y muestra una estructura altamente cristalina en contraste con el PLA. El PLGA puede ser procesado en casi todas las formas y tamaños, y puede encapsular teóricamente moléculas de cualquier tamaño. Es soluble en disolventes clorados, tetrahidrofurano, acetona y acetato de etilo. En agua, el PLGA se degrada por hidrólisis de sus enlaces éster. La presencia de grupos metilo laterales en el PLA lo hace más hidrofóbico que el PGA, por lo que los co-polímeros con mayor cantidad de ácido láctico, serán más hidrofóbicos por lo que absorberán menos agua y su degradación será más lenta [18].

Biodegradación y metabolismo del PLGA

La liberación del agente terapéutico de las nanopartículas ha mostrado ser bifásico, inicialmente se da por la difusión a través de la matriz del polímero y posteriormente por dos eventos que son: la difusión del agente terapéutico y la autodegradación de la matriz polimérica. El PLGA tiene varias ventajas sobre otros polímeros utilizados en la liberación del fármaco, incluyendo biodegradabilidad, biocompatibilidad, y está aprobado para el uso como acarreador de fármaco en humanos por la FDA. Los co-polímeros de PLGA se degradan en el organismo por escisión de los enlaces éster a ácido láctico y ácido glicólico. Estos monómeros son fácilmente metabolizados por el organismo por medio del ciclo de Krebs y eliminado como dióxido de carbono y agua [18].

El proceso de degradación del polímero, ambos *in vivo* e *in vitro*, se ven afectados por diversos factores, incluyendo el método de preparación; la presencia de compuestos de bajo peso molecular (monómeros, oligómeros, catalizadores); tamaño, forma y morfología; propiedades intrínsecas del polímero (peso molecular, estructura química, hidrofobicidad, cristalinidad y temperatura de transición vítrea del polímero); parámetros fisicoquímicos (pH, temperatura y fuerza iónica del medio); sitio de implantación y mecanismo de hidrólisis. La tasa de hidrólisis de la cadena del polímero depende solo de cambios significativos del pH, presencia de un catalizador y la temperatura. El comportamiento de degradación del sistema nanoparticulado depende de la hidrofiliidad del polímero, entre más hidrofílico sea al polímero, más rápida será su degradación [23].

El ácido láctico, más hidrofóbico que el ácido glicólico, hace de los co-polímeros PLGA ricos en lactato menos hidrofílicos, por lo que subsecuentemente reducen la velocidad del proceso de degradación. La temperatura de transición vítrea (T_g), es otro parámetro importante determinante en la fuerza física del sistema de liberación. El T_g del co-polímero PLGA disminuye conforme disminuye el peso molecular y el contenido de ácido láctico. El T_g del PLGA es de 45 a 50°C, el cual está por arriba de la temperatura fisiológica, proporcionándole al polímero la fuerza suficiente para ser formulado como un sistema de liberación de fármaco [18].

Datos en la literatura señalan que el tiempo de degradación *in vivo* para co-polímeros de ácido láctico y glicólico varían de unas pocas semanas a más de una año. El PLGA más utilizado es el que se encuentra en una proporción de 50:50 que tiene la tasa de degradación más rápida de los materiales D-L-láctido/glicólico, con una degradación de 50 a 60 días [18].

La erosión de bulto (interna) es la principal vía de degradación del PLGA. Esto ocurre por una escisión aleatoria de los enlaces éster de la estructura, siguiendo homogéneamente a través del sistema. Se ha propuesto un mecanismo de tres fases de degradación del PLGA. Inicialmente, se ha observado una disminución en el peso molecular del polímero, sin una pérdida de peso ni formación de monómeros formados por la escisión de la cadena polimérica. Esta fase es seguida por una

perdida en el peso molecular, además de una rápida pérdida de masa y la formación de productos monoméricos y oligoméricos. Finalmente se producen monómeros solubles a partir de los fragmentos oligoméricos, resultando en una completa degradación del polímero [18].

Toxicidad y biocompatibilidad de ácido poliláctico co-glicólico

La propiedad benéfica de la habilidad de las nanopartículas para ser captadas intracelularmente puede ser un tema que se debe considerar, dado que el rango de nanoescala de las nanopartículas les proporciona una única interacción con materiales biológicos como proteínas clave en las rutas biológicas, las cuales pueden resultar en efectos adversos [19]. Por lo que la toxicidad es un problema que debe ser considerado antes de la selección del material que será utilizado en las formulaciones farmacéuticas. El diseño y desarrollo de nanopartículas poliméricas cargadas con un agente terapéutico requiere el conocimiento de las respuestas celulares y de tejidos a los materiales de la formulación, las cuales determinan la biocompatibilidad del polímero. Hay dos factores principales que determinan la biocompatibilidad de un material: las reacciones del anfitrión inducidas por el material y la degradación del material en el cuerpo.

La evaluación de la biocompatibilidad de los sistemas de liberación de fármacos requiere un entendimiento de las respuestas de inflamación y curación frente a los materiales, debido a que la inflamación, cicatrización de heridas y respuestas a cuerpos extraños son consideradas componentes de la respuesta celular y tisular a la lesión. Los polímeros de PLGA tienen la ventaja de estar bien caracterizados y están siendo actualmente utilizados para sistemas de liberación de fármaco [18].

Los monómeros de D,L-lactado y glicolato poseen una baja toxicidad aguda, probablemente como consecuencia del rápido metabolismo, y sin presencia de efectos a largo plazo. Los productos de degradación del co-polímero PLGA se forman a una velocidad muy lenta por lo que no afectan la función celular normal. Estos polímeros han sido evaluados en su toxicidad y seguridad y actualmente se utilizan en humanos para suturas reabsorbibles, implantes óseos e implantes anticonceptivos [18].

La biocompatibilidad a largo plazo se ha demostrado por la ausencia de efectos adversos en la administración intravascular de nanopartículas de PLGA a tejido arterial en modelos de ratas y cerdos con restenosis crónica [24].

La biocompatibilidad de un polímero biodegradable es afectada por su composición química, peso molecular, cristalinidad y el medio en el cual se encuentra. El proceso de degradación, conduce finalmente, no solo a los productos de degradación, también a monómeros de degradación y aditivos. Las nanopartículas son rápidamente eliminadas de la circulación sistémica por el sistema retículo-endotelial (SER) posterior a la administración intravenosa. Dos importantes opsoninas (factores de complemento e inmunoglobulinas) se adhieren al polímero y facilitan su fagocitosis, seguida de una respuesta tisular inflamatoria [23]. Por lo que muchas investigaciones se han enfocado a la elaboración de nanopartículas como sistemas de liberación de fármaco que se mantengan por mayor tiempo en la circulación y sean biodisponibles.

Por lo anteriormente expuesto, el presente proyecto tiene como objetivo la elaboración y optimización de una formulación de nanopartículas con antioxidantes para uso veterinario, así como su evaluación en un modelo *in vitro* para determinar su efecto protector contra el estrés oxidativo inducido por aflatoxinas.

2. Objetivo general

Evaluar el efecto hepatoprotector *in vivo* de nanopartículas de PLGA y PLGA-PEG cargadas con curcumina, usando células HepG2 expuestas a AFB.

Objetivos particulares

Desarrollar e implementar un método de elaboración de nanopartículas a base de PLGA y PLGA-PEG cargadas con curcumina.

Determinar la eficiencia de carga de la curcumina en los sistemas elaborados.

Determinar el efecto hepatoprotector de las nanopartículas cargadas con curcumina sobre un modelo *in vitro* (línea celular HepG2) expuesto a AFB.

3. Hipótesis

La formulación de nanopartículas de curcumina con PLGA y PLGA-PEG mejorará el efecto hepatoprotector de la curcumina frente a la intoxicación inducida por AFB *in vivo*.

4. Metodología

Elaboración de nanopartículas de PLGA y PLGA-PEG cargadas con curcumina.

La elaboración de nanopartículas tanto de PLGA como de PLGA-PEG cargadas con curcumina (NP-CURC) se realizó mediante una técnica de nanoprecipitación modificada reportada por Amalendu P Ranjan et al. [25]. Se disolvieron 75 mg de PLGA o PLGA-PEG (*Sigma-Aldrich, láctico:glucónico (50:50), peso molecular: 30,000-60,000; Poli(etilenglicol) metil eter-block-poli(láctico-co-glucónico)*), PEG peso molecular promedio 5,000, PLGA peso molecular 55,000) y 3.8 mg de curcumina (*Sigma-Aldrich, Curcuma longa (Turmeric), polvo*) en 10 mL de acetona, esta solución se adicionó gota a gota a una solución de PVA (*Sigma-Aldrich, Poli (vinil alcohol)*) al 1% en agitación continua, una vez adicionada la solución orgánica, se mantuvo la agitación por 10 min. Posteriormente se evaporó el disolvente orgánico (acetona) en un rotavapor. La suspensión resultante se centrifugó a 40572 x g por 30 min, preparando un sistema que contenía 5 mL de glicerol, 20 mL de la suspensión de nanopartículas y 10 mL de agua desionizada, a 40572 x g por 1 h, una vez terminada la centrifugación, se separó el sobrenadante, y se colectaron los 5 mL próximos a la interfase y se conservaron a 4°C protegidos de la luz.

Diseño experimental factorial de niveles mixtos para la optimización de la formulación

La forma más eficiente para probar distintas variables al mismo tiempo requiere un diseño experimental sistemático y detallado. Esto elimina la necesidad de un gran número de corridas independientes cuando se utiliza el método clásico paso a paso. Algunas herramientas como el diseño de experimentos contribuyen a investigar la

relación entre las respuestas y los factores para determinar los factores de interés y así realizar la optimización de las formulaciones. Mediante la investigación bibliográfica se encontraron reportes que indican que variables tales como la cantidad de polímero de PLGA, concentración de curcumina y el volumen del disolvente orgánico son los principales factores que afectan el tamaño de partícula, distribución de tamaño, porcentaje de carga de fármaco y eficacia de carga de las nanopartículas de PLGA/CURC y PLGA-PEG/CURC [25,26,21].

Se utilizó un modelo factorial de niveles mixtos para optimizar estadísticamente los parámetros de formulación y evaluar los efectos principales, efectos de interacción y los efectos cuadráticos de los factores de formulación en el tamaño de partícula, la distribución del tamaño de PLGA-CURC e índice de polidispersión. Los detalles del diseño se muestran en la Tabla 1. Para cada factor, se seleccionó el rango experimental con base en la investigación bibliográfica y la viabilidad de la preparación de la NP-CURC en los valores extremos. El rango de valores de las variables fue: cantidad de PLGA (X1): 50-75 mg y la concentración de curcumina (X2) 3.75 - 7 mg. El diseño contenía 12 corridas (6 corridas por cada polímero) por triplicado, la matriz experimental se muestra en la Tabla 2, en la matriz, el tipo de polímero se codificó de la siguiente forma: PLGA = -1 y PLGA-PEG = 1. El propósito de las réplicas fue para estimar el error experimental y aumentar la precisión.

Tabla 1. Relación entre valores reales y codificados de las variables utilizadas en la formulación de Nanopartículas de curcumina (NP-CURC)

Factores de formulación	Niveles de variables codificadas		
	-1	0	1
X₁ = Cantidad de Polímero (mg)	50		75
X₂ = Curcumina (%)	5	10	15

Tabla 2 Matriz experimental utilizada para optimizar la formulación. La codificación del polímero corresponde a: PLGA (-1) y PLGA- PEG (1).

BLOQUE	Cantidad de Polímero	Curcumina	Polímero	BLOQUE
	mg	%		
1	62.5	5.0	-1.0	1
1	62.5	5.0	1.0	1
1	50.0	15.0	1.0	1
1	75.0	15.0	-1.0	1
1	50.0	15.0	-1.0	1
1	50.0	5.0	-1.0	1
1	62.5	15.0	-1.0	1
1	75.0	5.0	-1.0	1
1	75.0	5.0	1.0	1
1	50.0	5.0	1.0	1
1	62.5	15.0	1.0	1
1	75.0	15.0	1.0	1

Determinación de la eficiencia de carga.

La determinación de la carga de curcumina en la suspensión elaborada se realizó por espectrofotometría siguiendo un procedimiento reportado por Amalendu et al. [25], realizando previamente una curva de calibración con concentraciones de curcumina que iban de 0.5 a 7.5 µg/mL en una solución de etanol 80%. Para determinar la eficiencia de encapsulación, 2 mL de la suspensión de NP (tanto de PLGA como de PLGA-PEG cargadas con curcumina) se colocaron en viales a peso constante y se colocaron en una estufa a 50 °C por 24 h para permitir la evaporación de agua, posteriormente se pesó el sólido resultante, este se resuspendió en 2 mL de acetonitrilo, se puso en agitación suave por 4 h para permitir que la curcumina difunda hacia el disolvente, y se centrifugó a 40572 x g por 20 min, se separó el

sobrenadante y se diluyó 1:5 con etanol 80% y se realizó la estimación por espectrofotometría.

La eficiencia de encapsulación se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de carga (\%)} = \frac{(\text{Total Curcumina en NP})}{(\text{Conc inicial de curcumina})} \times 100$$

El porcentaje de carga de curcumina se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Carga curcumina (\%)} = \frac{\text{Contenido de curcumina}}{\text{Peso total de NP}} \times 100$$

Caracterización de las Nanopartículas

La caracterización de tamaño de partícula y potencial zeta se realizaron por dispersión de luz dinámica y electroforesis doppler con láser respectivamente, en el equipo Zetasizer de Malvern Instruments. En cuanto a la morfología se realizó por microscopia electrónica de barrido (MEB), colocando 100 µL de la suspensión de nanopartículas sobre un porta muestra con cinta conductiva y dejando en un desecador por 1 día para desecar la muestra.

Evaluación de la citotoxicidad y viabilidad celular

Modelo experimental

Para determinar el efecto hepatoprotector de las NP-CURC frente a la intoxicación inducida por AFB, se utilizó como modelo experimental la línea celular HepG2, debido a que la AFB1 es una micotoxina hepatotóxica.

Cultivo celular y esquema de exposición

Las células se mantuvieron en medio de cultivo Dulbecco's (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino y 2% de antibióticos (penicilina y estreptomicina) a 37 °C y 5% de CO₂.

Como se ha mencionado anteriormente, la curcumina puede cambiar la morfología de la superficie celular y conducir a un proceso pro-apoptótico, y este proceso se da dosis-dependiente [27,28], por lo que es necesario determinar la concentración de curcumina en la cual la viabilidad celular tenga un porcentaje adecuado para los estudios de citotoxicidad. Para este fin, la curcumina fue disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) y posteriormente diluida con medio de cultivo para ajustar las concentraciones deseadas. Las concentraciones finales de curcumina utilizadas fueron de 0.2 a 20 µM, la concentración final de DMSO en el cultivo no fue mayor a 0.1%, de igual manera los controles negativos (sin tratamiento alguno) contenían 0.1% de DMSO y fueron incluidos en todos los experimentos. Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos hasta llegar a confluencia mantenidas en medio de cultivo DMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino y 2% de antibiótico a 37 °C y 5% de CO₂. Inicialmente se realizó la exposición con AFB1 (25 ng/mL) por 4 h, posteriormente se realizó una segunda exposición con curcumina libre y encapsulada a las diferentes concentraciones por 4 h.

Viabilidad celular (MTT)

La viabilidad celular se determinó mediante el método espectrofotométrico reportado por Mosmann [29]. Dos horas antes de cumplir el tiempo de exposición antes descrito, se adicionaron 5 µL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a una concentración de 5 mg/mL. Una vez transcurrido el tiempo de exposición, se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 0.3 mL de un buffer de nonidet en isopropanol al 0.1% y se dejó en agitación suave por 20 min. Finalmente se retiró la solución y se determinó la viabilidad por espectrofotometría en un lector de placas de Elisa (MRC Scientific instruments, UT-2100C, Lector de microplacas).

Para determinar el daño generado por la intoxicación con AFB, se realizó la exposición con AFB mediante el método anteriormente descrito, a concentraciones de 5 a 35 ng/mL durante 4 horas y se determinó la viabilidad celular.

Una vez determinadas las concentraciones inhibitorias del 50% de viabilidad celular para AFB1 y la concentración de curcumina que nos permite tener un 80% de viabilidad celular, las cuales fueron de 25 μM y $<10 \mu\text{M}$ respectivamente, se realizó el estudio del efecto hepatoprotector tanto de la curcumina libre como de las NP-CURC.

Para determinar el efecto hepatoprotector sobre la viabilidad de células HepG2 expuestas a AFB1, se sembraron células en placas de 24 pozos, y se dejaron llegar a confluencia, posteriormente se realizó la exposición mediante la metodología anteriormente descrita con AFB1 con una concentración de 25 ng/mL en cada pozo por 4 h, una vez transcurrido el tiempo, se retiró el medio y se lavaron la células dos veces con PBS, posteriormente se adicionó medio fresco con concentraciones de curcumina libre que iban de 0.2 a 20 μM y de igual manera NP-CURC en las mismas concentraciones (tanto de PLGA como de PLGA-PEG), además de sistemas que contenían NP de PLGA y PLGA-PEG sin carga de curcumina, además de un control positivo (Ctrl (+)) que contenía AFB 25 ng/mL únicamente y un control negativo (Ctrl (-)) que contenía solo medio de cultivo, esto por 4h mas. Dos horas antes de terminar el tiempo de exposición se adicionaron 5 μL de MTT (5 mg/mL) a cada pozo y se dejaron en incubación hasta terminar el tiempo de exposición. Finalmente se determinó la Viabilidad celular mediante espectrofotometría a 430 nm.

Ensayo de lipoperoxidación

La lipoperoxidación fue determinada acorde al método de Buege y Aust [30]. Se realizó el mismo esquema de exposición antes mencionado, incluyendo los controles positivo y negativo. Una vez terminado el tiempo de exposición, se retiró el medio de cultivo de los pozos, se lavaron 2 veces con PBS frio y las células se cosecharon por raspado. La suspensión celular se centrifugó a 15966 x g por 10 min a 4°C, posteriormente se retiró el sobrenadante y el botón se resuspendió en 110 μL de PBS con inhibidor de proteasas (0.1% Tritón X-100, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 mM, EDTA 5 mM). La suspensión se sometió a sonicación (3 pulsos de 10 s, amplitud 97 MHz), de esta suspensión se tomaron 10 μL para determinación de proteínas. A 50 μL de la suspensión restante se añadieron

50 μL de ácido perclórico 2.5 % y se dejaron incubando a temperatura ambiente por 10 min, finalmente se centrifugaron a 15966 x g por 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se tomaron los 100 μL de esta solución y se colocaron en tubos Eppendorf, se adicionaron 100 μL de ácido tiobarbitúrico 0.68 %, se dejaron incubar a 90°C por 30 min, una vez transcurrido el tiempo, estas soluciones se colocaron en placas de 96 pozos y se cuantificaron en un lector de placas de Elisa a 412 nm (MRC Scientific instruments, UT-2100C, Lector de microplacas).

Cuantificación de GSH

La cuantificación de GSH también se realizó mediante un método espectrofotométrico acorde al método de Eyer y Podhradský [31]. Se realizó el mismo esquema de exposición antes mencionado incluyendo los controles positivo y negativo. Una vez terminado el tiempo de exposición, se retiró el medio de cultivo de los pozos, se lavaron 2 veces con PBS frío y las células se cosecharon por raspado. La suspensión celular se centrifugó a 15966 x g por 10 min a 4°C, posteriormente se retiró el sobrenadante y el botón se resuspendió en PBS con inhibidor de proteasas (0.1% Tritón X-100, PMSF 100 mM, EDTA 5 mM). La suspensión se sometió a sonicación (3 pulsos de 10 s, amplitud 97 MHz), de esta suspensión se tomaron 10 μL para la determinación de proteínas. A la suspensión restante se le añadieron 5 μL de ácido sulfosalicílico 5% y se dejaron incubando a temperatura ambiente por 10 min, finalmente se centrifugaron a 15966 x g por 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Finalmente se tomaron 50 μL de esta solución y se colocaron en un pozo de una microplaca de 96 pozos, se adicionaron 150 μL del buffer de reacción (PBS, DTNB 0.4×10^{-4} M, EDTA 6×10^{-3} M) y se cuantificaron en un lector de placas de Elisa a 405 nm (MRC Scientific instruments, UT-2100C, Lector de microplacas).

Actividad de la enzima catalasa (CAT)

La Actividad de catalasa se realizó en base al método reportado por Tadayuki Iwase et al. [32]. Se realizó una curva estándar utilizando catalasa de hígado bovino con concentraciones de 20 a 200 U/mL en PBS, en tubos de ensayo de 7 x 75 mm (Pyrex No 9820). Para la preparación de la muestra se utilizó la cantidad total de

células correspondiente a un pozo (placa de 6 pozos), las células se colectaron con tripsina, se centrifugaron a 15966 x g por 4 min, y se resuspendieron en 110 μ L de PBS, de estos se guardaron 10 μ L para cuantificación de proteínas. Una vez preparadas las concentraciones y/o la muestra (100 μ L), se adicionaron 100 μ L de una solución de Tritón X-100 1%, se agitaron suavemente y de incubaron a 37°C por 15 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 100 μ L de H₂O₂ 30% (a 37°C), y se incubaron de nuevo por 3 min a 37°C. Una vez transcurridos los 3 min se registró la altura de la espuma* desde la base del tubo, tomando una fotografía con una escala de referencia (regla) y se midieron los pixeles utilizando el programa JRuler Software para hacer la relación pixeles-mm de la altura de la espuma.

*La espuma es estable por aproximadamente 5 min.

Actividad de glutatión Reductasa

Se realizó el esquema de exposición antes mencionado, una vez terminado el tiempo de exposición, se retiró el medio de cultivo de los pozos, las células se lavaron 2 veces con PBS frío y las células fueron cosechadas por raspado. La determinación de la actividad de esta enzima se realizó acorde al método reportado por Carlberg et al. [33]. La suspensión celular se centrifugó a 15966 x g por 10 min a 4°C, posteriormente se retiró el sobrenadante y el botón se resuspendió en 110 μ L de buffer fosfato de potasio 0.02 M, 2 mM EDTA, pH=7 (PE), se homogenizó en vortex y se centrifugó de nuevo a 15966 x g por 15 min a 4°C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante en tubo Eppendorf® de 500 μ L (se tomaron 10 μ L para determinación de proteínas totales).

Para la lectura, la solución anterior se colocó en pozo de placa para ELISA, respetando el siguiente orden: 100 μ L de buffer de ensayo, entre 75 y 180 μ g de proteína total ajustando a 80 μ L con agua desionizada, 10 μ L de glutatión oxidado (GSSG) 20 mM y 10 μ L de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) 2mM*.

Se debe medir inmediatamente después de agregar el NADPH cuidando que las lecturas se realicen a temperatura de 30°C, y se siguió la disminución de absorbancia a $\lambda=340$ nm durante 5 minutos [34].

Para los cálculos se restaron los valores obtenidos del blanco menos los de la muestra, se graficaron y se utilizó la siguiente fórmula para determinar la actividad enzimática:

$$\text{Actividad GR } \frac{\text{mol}}{\text{min}} * \text{ml} = \frac{m}{\epsilon} * FD$$

Dónde:

m= es la pendiente

ϵ = coeficiente de absorción molar del NADH que es de 0.00378

FD= factor de dilución.

Microscopía confocal

Para realizar la microscopía confocal, se sembraron microcultivos, colocando 1 mL de suspensión celular en cubreobjetos rectangulares, se colocaron 5 mL de medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 2% de antibiótico, y se dejaron crecer por 24 h. Una vez transcurrido el tiempo, se retiró el medio de cultivo, se lavaron 2 veces con PBS frío y se realizó la exposición con NP-CURC en 1 mL de medio de cultivo por 6 h. Una vez terminado el tiempo de exposición, los microcultivos se lavaron 2 veces con PBS frío y se fijaron con paraformaldehído por 30 min, posteriormente se lavaron con PBS. Finalmente se realizó la tinción con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) por 5 min, se cubrió con medio de montaje de polivinil alcohol con DABCO®, esta preparación se colocó (con la cara que contenía DABCO hacia abajo) sobre un portaobjetos. Estos montajes se guardaron en oscuridad por 3 días antes de la observación.

La microscopía se realizó en el Instituto de Fisiología Celular en Ciudad Universitaria.

5. Resultados y discusión

Se realizó un barrido con una solución de curcumina 10 mg/mL en etanol 80%, para determinar la longitud de onda óptima para la cuantificación, en el Gráfico 1 se muestran los valores obtenidos, en donde se observa un pico máximo de absorbancia en la longitud de onda de 430 nm.

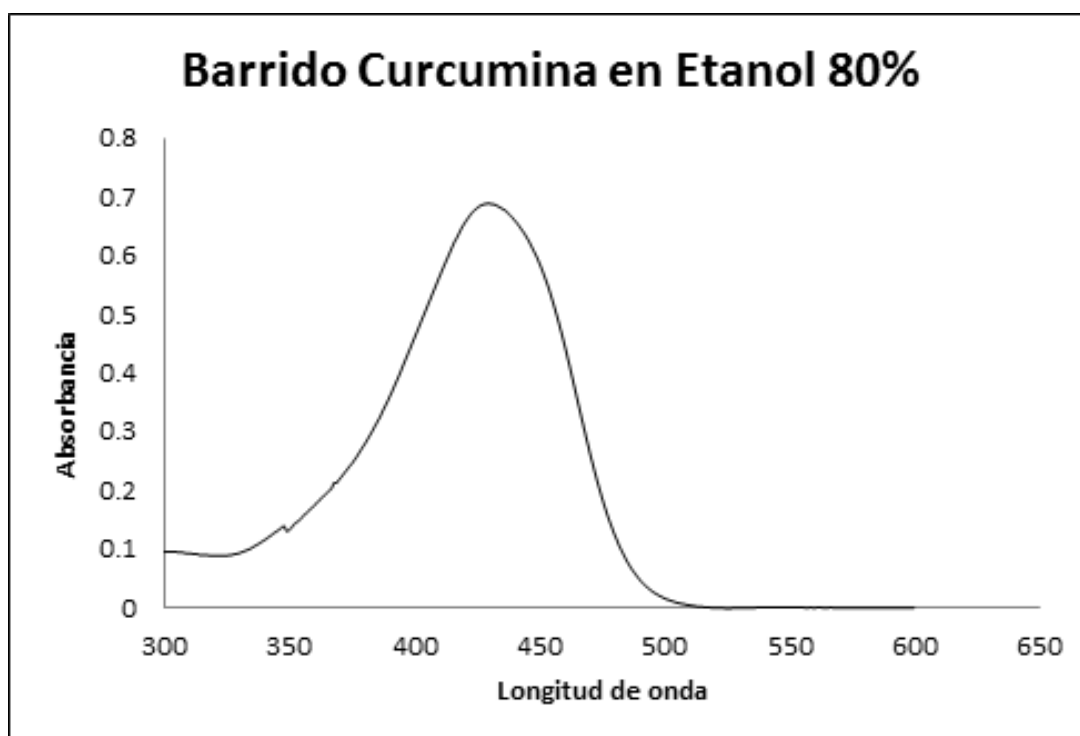


Gráfico 1. Curva de barrido para curcumina 10 mg/mL en etanol 80%

En cuanto a la curva de calibración, los resultados representan los valores obtenidos para la curva de calibración de curcumina elaborada, por triplicado. Las concentraciones de la curva abarcan de 0.5 a 6.5 $\mu\text{g/mL}$. La curva se realizó por triplicado, y el tratamiento estadístico consistió en una regresión simple y un análisis de varianza para determinar el coeficiente de correlación y la ecuación de modelo ajustado correspondiente al estudio.

Tabla 3. Valores de Absorbancia obtenidos para las curva de calibración de curcumina en etanol 80%.

Conc (μM)	Abs 1	Abs 2	Abs 3
1.36	0.0686	0.0691	0.0699
4.08	0.1916	0.1929	0.1946
6.80	0.3355	0.3624	0.3414
9.51	0.5042	0.504	0.5036
12.23	0.6201	0.6289	0.6196
14.94	0.7737	0.7838	0.7811
17.66	0.9043	0.9022	0.9039
20.38	1.0565	1.0661	1.0589

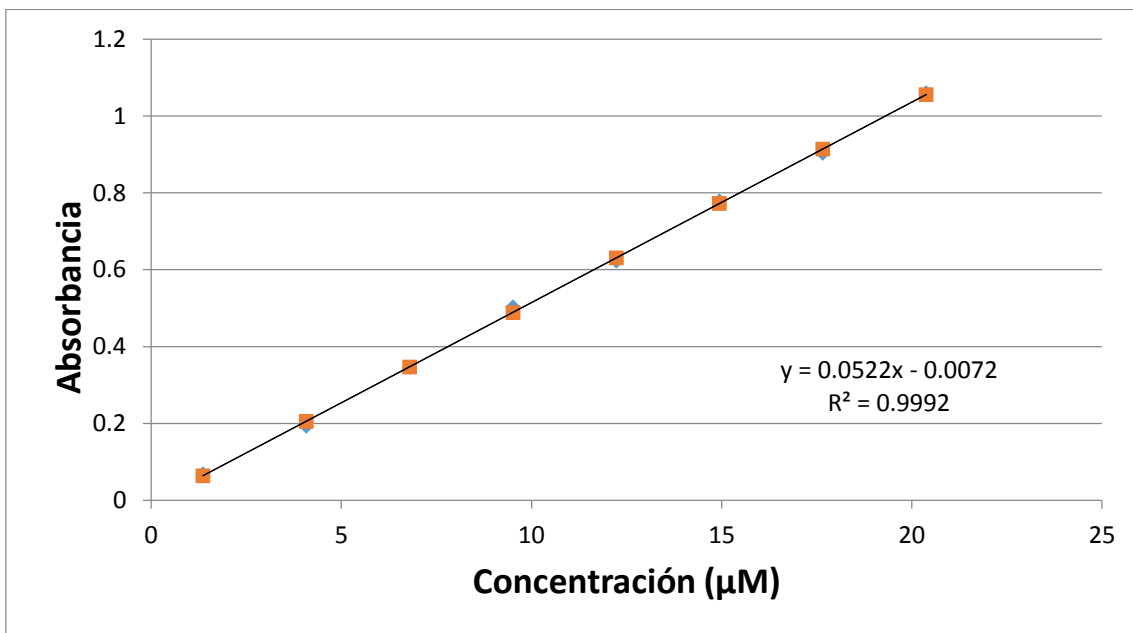


Gráfico 2. Curva de calibración de curcumina en etanol 80%.

Tabla 4. Análisis de varianza para el modelo ajustado en la cuantificación de curcumina.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	2.53279	1	2.53279	21955.71	0.0000
Residuo	0.0025379	22	0.000115359		
Total (Corr.)	2.53533	23			

Coefficiente de Correlación = 0.999499

R-cuadrada = 99.8999 por ciento

En el Gráfico 2 se muestra la curva de calibración de curcumina, junto con la ecuación del modelo ajustado, además del análisis estadístico (Tabla 4) en donde se observa que se obtuvo un coeficiente de correlación del 0.9994 y una R cuadrada que nos indica que el modelo ajustado explica 99.8999% de la variabilidad, por lo que la curva es adecuada para la cuantificación. Estos resultados denotan que el modelo utilizado es adecuado para la cuantificación de curcumina a diferentes concentraciones que van de 1.36 a 20.8 μM con una respuesta lineal.

Optimización de la formulación de NP-CURC utilizando un modelo factorial de niveles mixtos.

Los rangos de las variables de estudio se determinaron con base en la investigación bibliográfica y a estudios preliminares, determinando los factores y sus rangos. En la tabla 5 se muestran los resultados experimentales correspondientes las variables de tamaño de partícula (d.nm), Carga de curcumina (%) e Índice de polidispersión (Pdi). Estas respuestas fueron ajustadas individualmente a un modelo polinomial de segundo orden. Cada modelo obtenido fue validado por ANOVA. Con los mismos datos se elaboró un diagrama de superficie de respuesta de tres dimensiones para para cada respuesta para la optimización de la formulación NP-CURC. Estos tipos de gráficos son útiles en el estudio de los efectos de dos factores sobre la respuesta

de una sola vez, cuando el tercer factor se mantiene constante, que en este caso es el tipo de polímero.

Tabla 5. Resultados experimentales del diseño experimental correspondientes a las variables de estudio.

	PLGA/CURC	Conc Sistema	Carga de curcumina	Tamaño partícula	Índice de polidispersión	Potencial Z	Cantidad de polímero + CURC	Polímero
		(µg/mL)	(%)	(d.nm)		(mV)	(g/mL)	(mg/mL)
1	50 mg/5%	0.9	1.1	860.2	0.131	-0.16	0.174	173.283
2	50 mg/10%	3.8	3.1	886.4	0.114	-0.183	0.173	169.336
3	50 mg/15%	11.4	6.1	349.5	0.193	-0.31	0.215	203.714
4	75 mg/5%	9.9	15.8	253.8	0.214	-0.313	0.161	150.982
5	75 mg/10%	10.7	8.5	550.6	0.183	-0.151	0.161	149.820
6	75 mg/15%	11.3	6.0	447.8	0.206	-0.208	0.160	149.187
7	50 mg/5%	2.1	3.3	186.6	0.127	-0.637	0.244	242.116
8	50 mg/10%	2.0	1.6	193.6	0.098	-0.762	0.240	238.119
9	50 mg/15%	2.6	1.4	215.8	0.116	-0.964	0.181	178.212
10	75 mg/5%	2.3	3.7	192.3	0.119	-0.798	0.160	157.876
11	75 mg/10%	1.6	1.3	188.6	0.11	-1.3	0.330	328.036
12	75 mg/15%	2.2	1.1	189.4	0.115	-0.94	0.201	198.380

PLGA

Influencia de los factores de la formulación en la carga de curcumina

Se encontró en el modelo cuadrático ajustado que las variables de cantidad de polímero y la relación entre esta y el porcentaje de curcumina eran significativos con un valor de F de 34.71 (P value <0.05) y 28.27 (P value <0.05) respectivamente, lo que indica que la variable de respuesta y el conjunto de variables de formulación se relacionan significativamente. El alto valor de R cuadrada indicó que 97.05 de la variación de la carga de curcumina es explicada por la regresión sobre los factores de la formulación. La ecuación del modelo ajustado

Carga de curcumina

$$= -44.6003 + 3.4607 * \text{curcumina} + 0.8602 * \text{polímero} - 0.0592 * \text{curcumina} * \text{polímero}$$

Los Gráficos 3 y 4 muestran el diagrama de Pareto y diagrama de efectos principales, respectivamente, ilustrando estos efectos individuales y su interacción. Los rangos de resultados obtenidos muestran una alta variación, ya que el rango de respuesta desde el mínimo de 1.08 hasta el máximo con 15.80 % de carga. Los datos indican claramente que los valores de carga de curcumina son fuertemente dependientes de los factores elegidos.

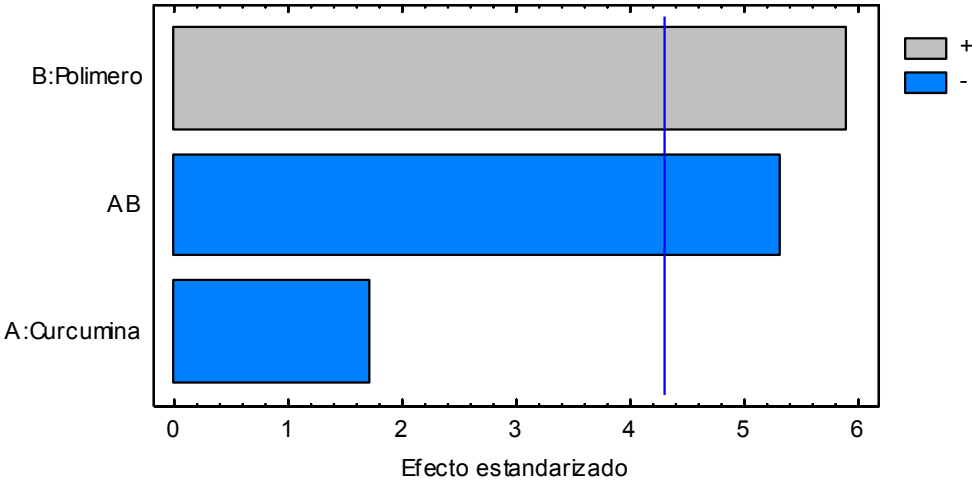


Gráfico 3 Diagrama de Pareto de efecto de los factores sobre la carga de curcumina

Gráfica de Efectos Principales para Carga curcumina

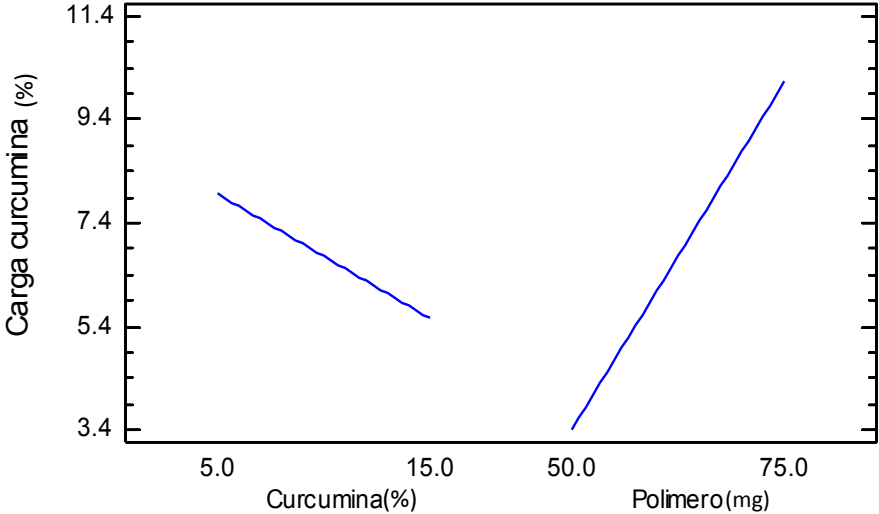


Gráfico 4 Efectos principales de los factores sobre la carga de curcumina

Mediante la ecuación obtenida del modelo ajustado, se realizó la optimización de la formulación en donde la meta es maximizar la carga de curcumina. Los Gráficos 5 y 6 muestran los diagramas obtenidos en el análisis. La tabla 6 muestra los valores de la optimización de carga de curcumina obteniendo valores de 75 mg del polímero y 3.5 mg de curcumina correspondiente al 5% en relación al polímero.

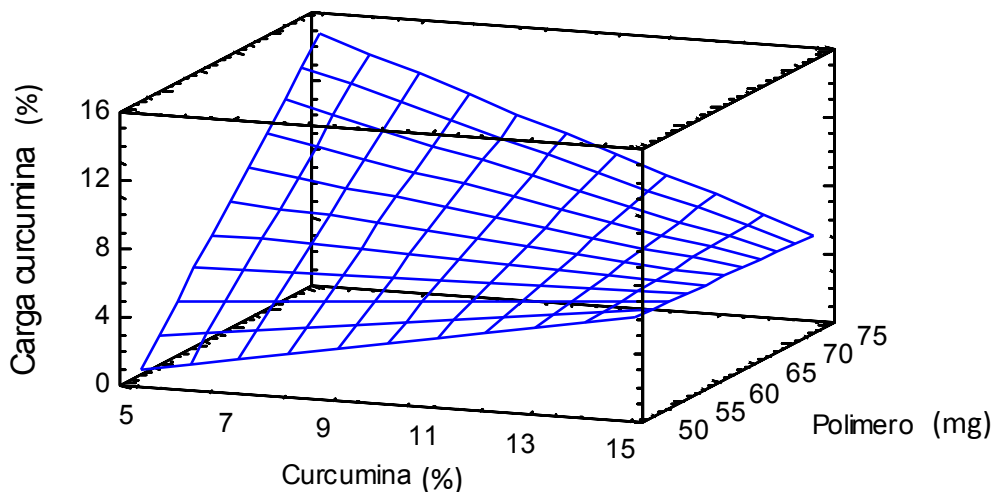


Gráfico 5 Diagrama de superficie de respuesta para la carga de curcumina en nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.

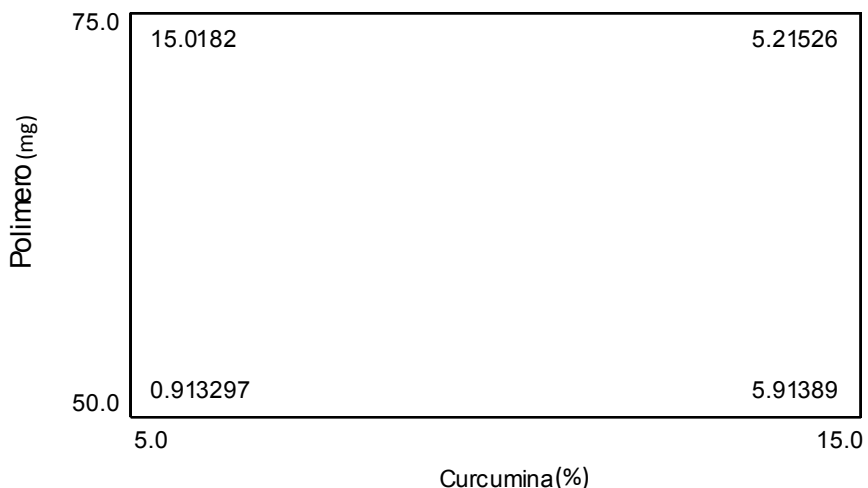


Gráfico 6 Diagrama de cuadro para carga de curcumina en nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.

Optimización de la respuesta

Meta: maximizar Carga curcumina

Valor óptimo teórico de carga de curcumina = 15.0182 %

Tabla 6 Valores óptimos para carga de curcumina para nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Curcumina (%)	5.0	15.0	5.0
Polímero (mg)	50.0	75.0	75.0

Influencia de los factores de la formulación en el tamaño de partícula de las suspensiones de PLGA cargadas con curcumina.

El tamaño de partícula es un factor crítico para el sistema de administración de fármacos basado en nanopartículas ya que es uno de los factores que controlan la cinética de liberación del fármaco. Generalmente, el tamaño de partícula más pequeño permite una velocidad de liberación más rápida.

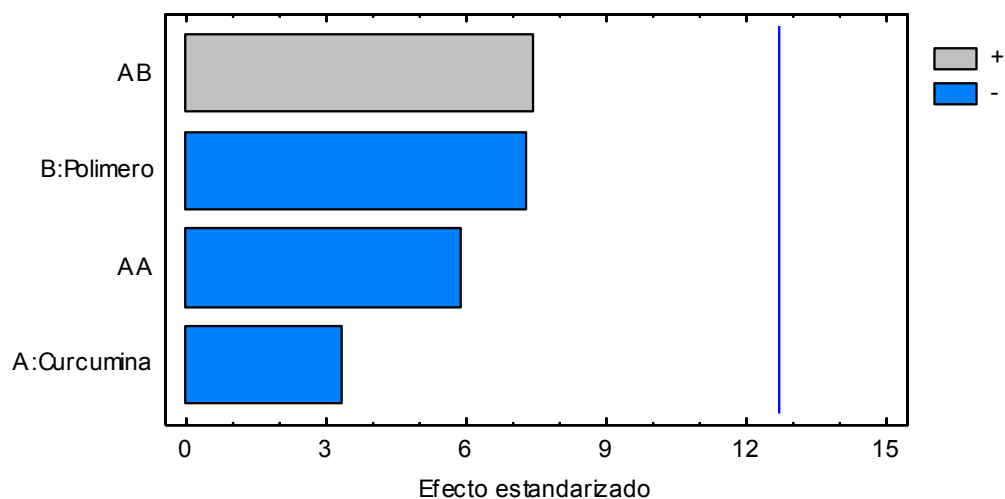


Gráfico 7 Diagrama de Pareto estandarizado para tamaño de partícula nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.

Los siguientes resultados describen la relación entre la carga de curcumina, la cantidad de PLGA y la concentración de curcumina. En cuanto al tamaño de partícula, los Gráficos 7 y 8 muestran efectos generados por los factores: cantidad de polímero y porcentaje de curcumina, en donde se observa que ninguno genera una diferencia estadísticamente significativa, es decir, ninguno de los factores de estudio afecta el tamaño de partícula.

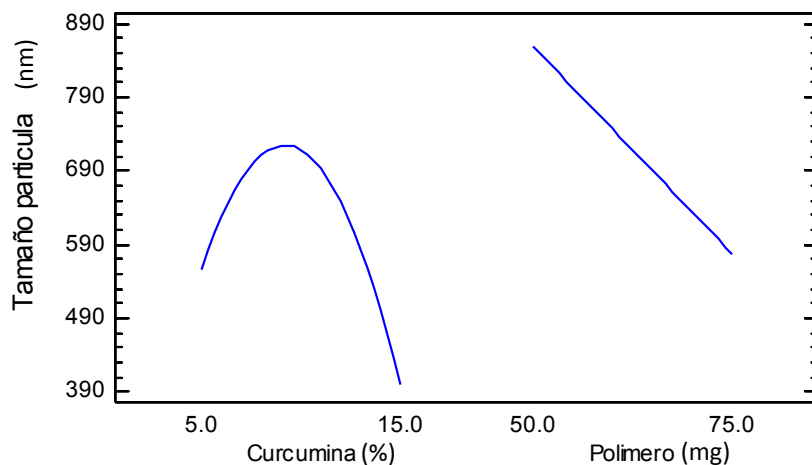


Gráfico 8 Diagrama de efectos principales de los factores sobre el tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.

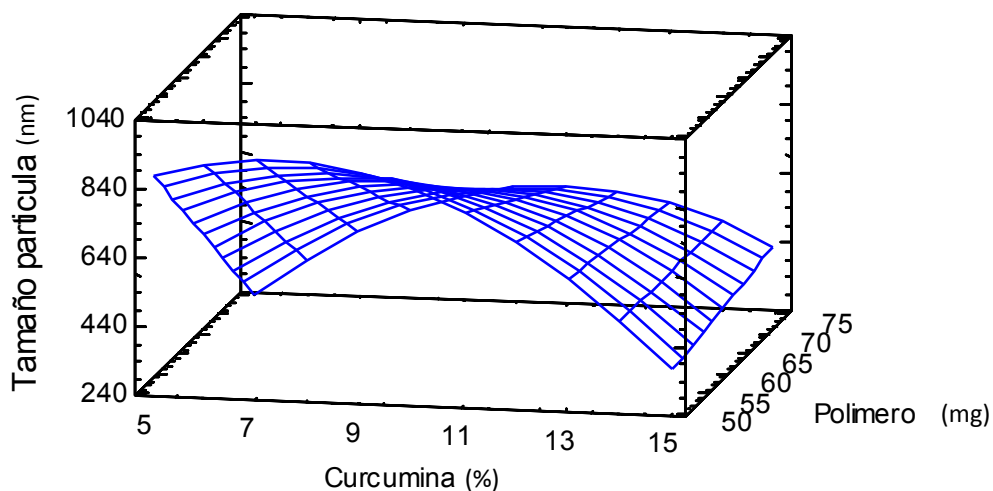


Gráfico 9 Diagrama de superficie de respuesta estimada para tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.

Los Gráficos 9 y 10 muestran los diagramas generados por los efectos principales de los factores de la formulación, mientras que la tabla 6 muestra los valores óptimos de los factores para minimizar el tamaño de partícula de los sistemas elaborados con PLGA.

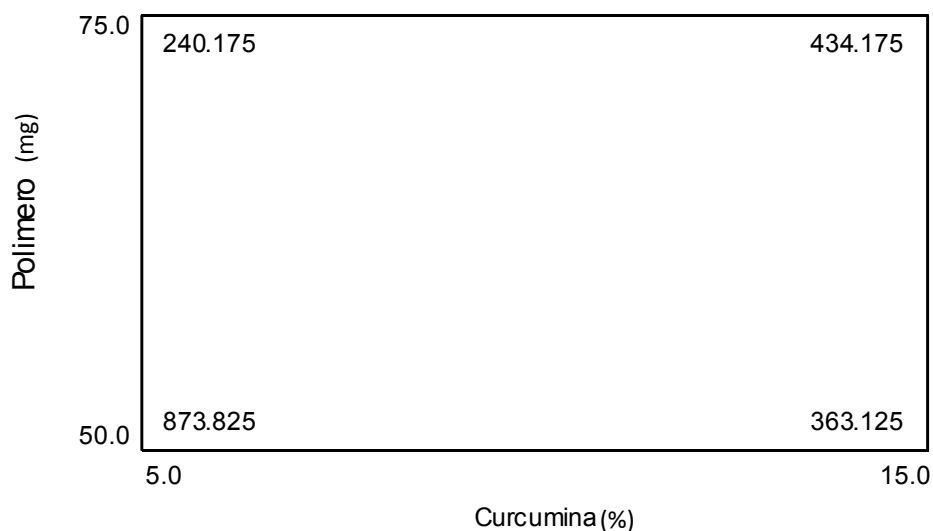


Gráfico 10 Diagrama de cuadro para tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.

Optimización de la respuesta.

Meta: minimizar tamaño partícula

Valor óptimo teórico= 240.17 nm

Tabla 7. Valores óptimos de los factores de la formulación de NP de PLGA para maximizar la carga de curcumina.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Curcumina (%)	5.0	15.0	5.0
Polímero (mg)	50.0	75.0	75.0

PLGA-PEG

Se realizó el mismo análisis estadístico para las NP de PLGA-PEG cargadas con curcumina, con el fin de optimizar la formulación, teniendo como objetivo el tener la mejor proporción entre carga de curcumina y tamaño de partícula.

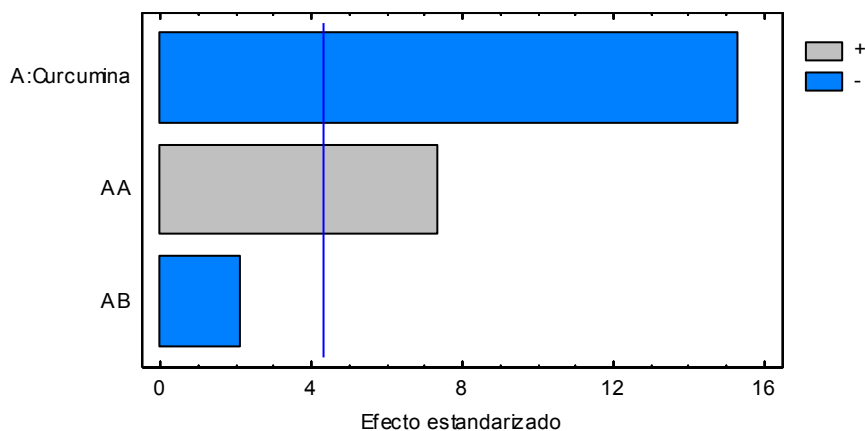


Gráfico 11 Diagrama de Pareto estandarizado para la carga de curcumina de nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.

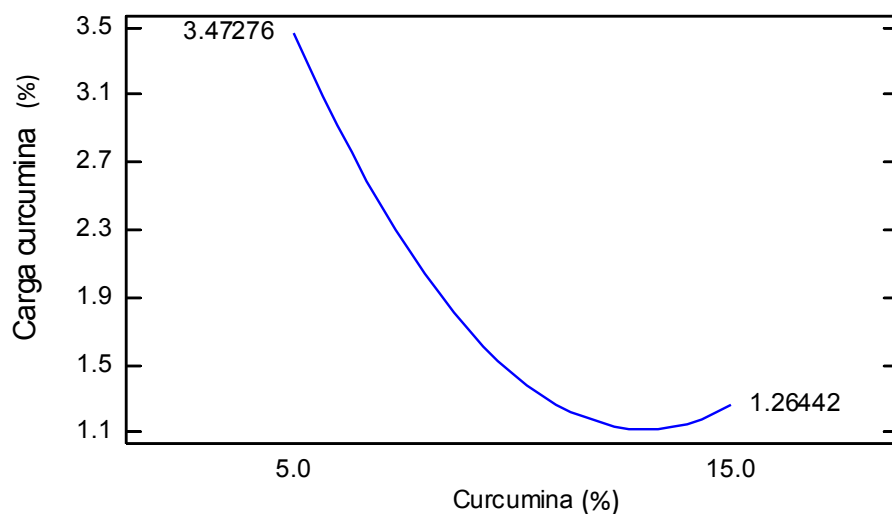


Gráfico 12 Diagrama de efectos principales de los factores sobre la carga de curcumina en nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.

En el caso de las NP de PLGA-PEG el porcentaje de curcumina si afecta la carga de curcumina, siendo este el único factor que genera un efecto estadísticamente

significativo, esto se puede observar en el Gráfico 11, que es un diagrama de Pareto, el cual muestra los efectos principales de los factores, al igual que el Gráfico 12 que también muestra solamente los efectos producidos por el porcentaje de curcumina en la formulación.

Para optimizar esta respuesta se obtuvo la ecuación del modelo ajustado, siendo la siguiente ecuación:

Carga curcumina (%)

$$= 5.78974 - 0.800882 * \text{Curcumina} + 0.0246366 * \text{Polímero} + 0.0367013 * \text{Curcumina}^2 - 0.00246366 * \text{Curcumina} * \text{Polímero}$$

Optimización de la respuesta.

Mediante esta ecuación se calcularon los valores óptimos de los factores para aumentar la carga de curcumina, los cuales se muestran en la Tabla 7, los cuales fueron de 75 mg de PLGA-PEG y un porcentaje de curcumina del 5 % respecto al polímero.

Meta: maximizar carga de curcumina

Valor óptimo teórico = 3.62674 %

Tabla 8 Valores óptimos para maximizar carga de curcumina en nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Curcumina (%)	5.0	15.0	5.0
Polímero (mg)	50.0	75.0	75.0

Esto lo podemos corroborar observando los Gráficos 13 y 14 en donde se muestra que en 75 mg de polímero y 5 % de curcumina referente al polímero, se alcanza la mayor carga posible, sin embargo este resultado no tiene gran diferencia con el nivel más bajo de polímero (correspondiente a 50 mg).

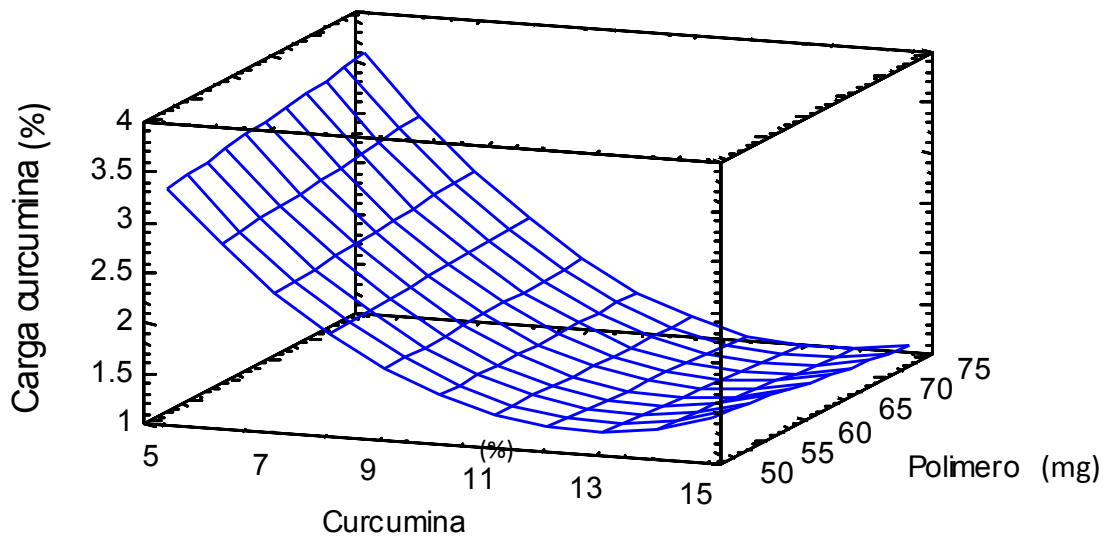


Gráfico 13 Superficie de respuesta estimada para carga de curcumina en nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.



Gráfico 14 Diagrama de cuadro para la carga de curcumina en nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.

En cuanto al tamaño de partícula, observamos en los gráficos 15 y 16 que ninguno de los factores genera un efecto estadísticamente significativo, y aunque se realizó

el estudio de optimización, en donde los resultados se muestran en la tabla 8 con valores de cantidad de polímero y porcentaje de curcumina de 50 mg y 5 % respectivamente, estos no afectan de manera significativa, por lo que se optó por utilizar los valores de optimización de la carga de curcumina con la finalidad de tener la mejor proporción entre carga de curcumina y tamaño de partícula.

Influencia de los factores de la formulación en el tamaño de partícula de las nanopartículas de PLGA-PEG.

En los Gráficos 15 y 16 se observan los diagramas de Pareto y de efectos principales de los factores sobre el tamaño de partícula de las NP-CURC de PLGA-PEG respectivamente, en estos se observa que al ir aumentando la cantidad de curcumina, el tamaño de partícula aumenta de 185 nm a 214 nm (Gráficos 17 y 18); por otro lado, la cantidad de polímero agregado es inversamente proporcional al tamaño de partícula; sin embargo, ninguno de estos factores o la interacción entre estos genera un efecto estadísticamente significativo sobre la respuesta.

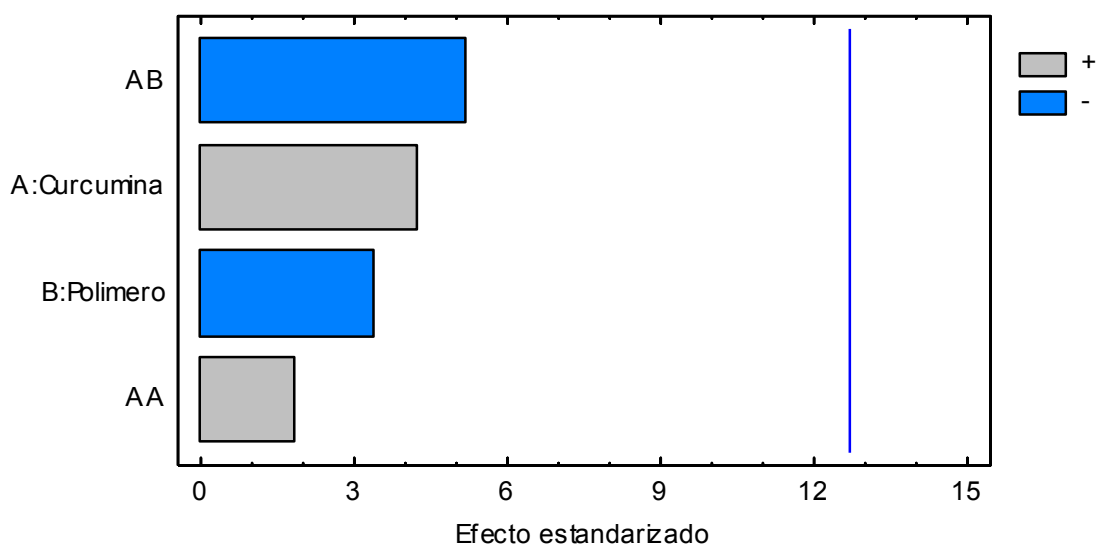


Gráfico 15 Diagrama de parteo estandarizado para tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.

Esto puede ser explicado por el polímero utilizado (PLGA-PEG), en donde el PEG al generar una capa exterior, disminuye la interacción con otras partículas o compuestos en el medio, por lo que al formarse la nanopartícula, la capa de PEG impide por efecto estérico la aglomeración y fusión entre las nanopartículas ya formadas otorgando esta estabilidad [20].

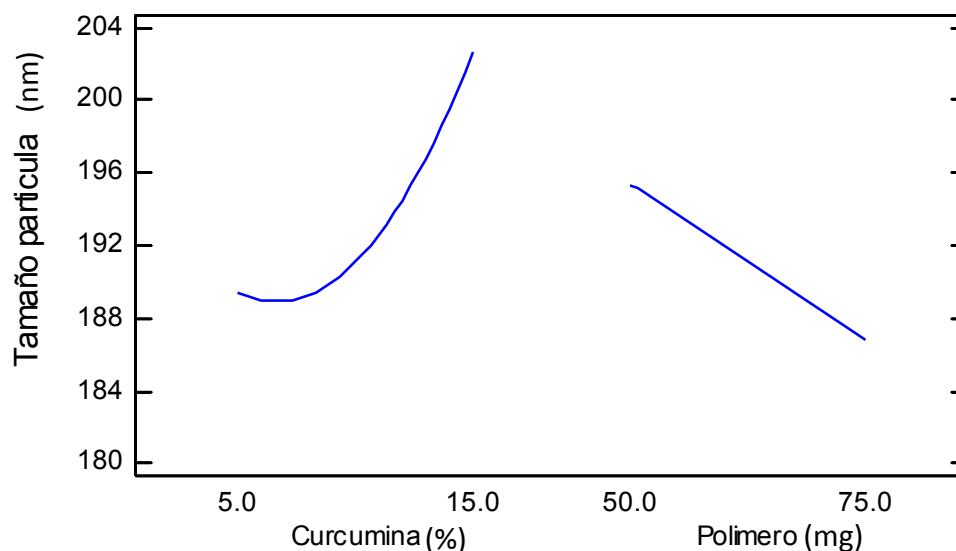


Gráfico 16 Diagrama de efectos principales de los factores sobre el tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.

A pesar de que los factores de estudio en el diagrama de Pareto estandarizado no generan un efecto estadísticamente significativo, en el gráfico de superficie de respuesta estimado para estos factores (Gráfico 17), se observa que al disminuir la cantidad de curcumina, es posible reducir el tamaño de partícula, de igual forma lo podemos observar en el diagrama de cuadro correspondiente a estos factores (Gráfico 18).

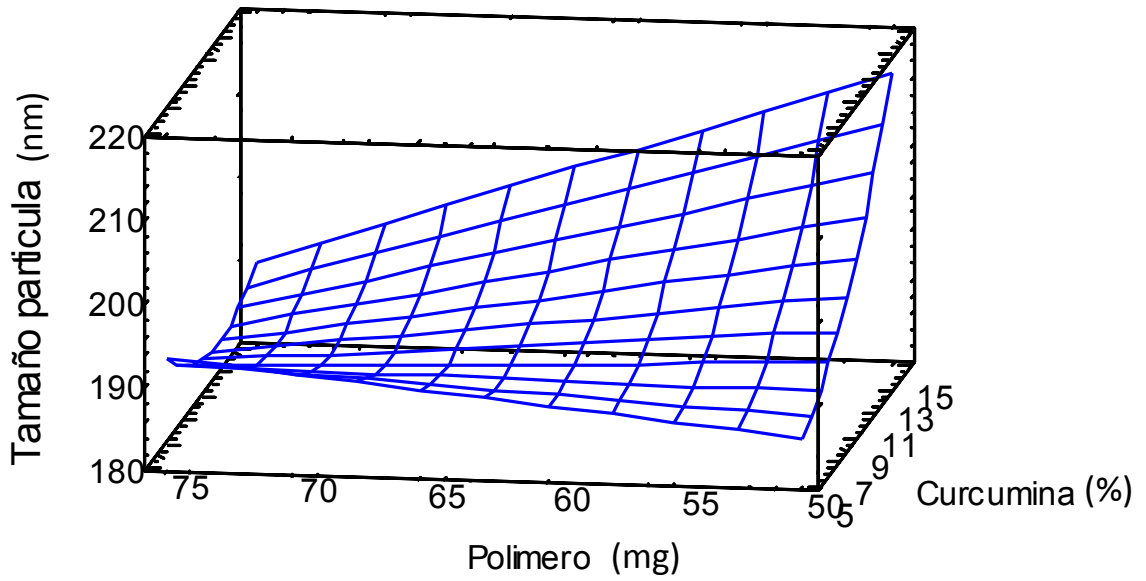


Gráfico 17 Diagrama de superficie de respuesta estimada para el tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.

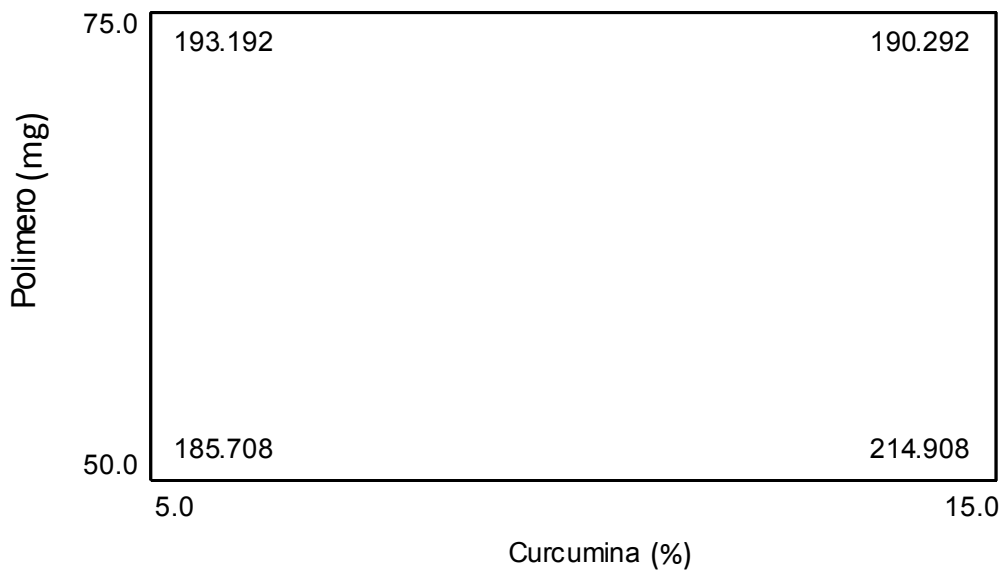


Gráfico 18 Diagrama de cuadro para tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.

Optimizar Respuesta

Mediante el modelo experimental, fue posible determinar las proporciones óptimas de la formulación para reducir el tamaño de partícula, resultando en la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{Tamaño de partícula (nm)} \\ = 138.817 + 5.4 * \text{Curcumina} + 0.941333 * \text{Polímero} + 0.197 \\ * \text{Curcumina}^2 - 0.1284 * \text{Curcumina} * \text{Polímero} \end{aligned}$$

Meta: minimizar el tamaño de partícula

Valor óptimo teórico = 185.708 nm

Tabla 9. Valores óptimos de la formulación para disminuir el tamaño de partícula de nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Curcumina	5.0	15.0	5.0
Polímero	50.0	75.0	50.0

Al observar los resultados de carga de curcumina obtenidos para PLGA y PLGA-PEG, se observó que las NP de PLGA, a pesar de tener un mayor tamaño, tienen un menor porcentaje de encapsulamiento, esta eficiencia de encapsulación en PLGA se puede atribuir a varios factores. En primer lugar, tanto para PLGA como PLGA-PEG, la naturaleza hidrófoba de las moléculas de PLGA hace que sea relativamente fácil de atrapar la curcumina en el PLGA hidrófobo. En segundo lugar, la naturaleza hidrófoba de la curcumina, que resulta en una migración mínima del fármaco a la fase acuosa externa durante el proceso de formación [25], sin embargo, en las NP-CURC de PLGA-PEG las cadenas de PEG se orientan hacia la fase acuosa externa, que rodea por lo tanto las especies encapsuladas. Esta capa de PEG actúa como una barrera y reduce las interacciones con moléculas extrañas por

repulsión estérica además de otorgarle una característica hidrofílica, por lo que una vez formada la nanopartícula, estas cadenas de PEG le otorgarán una mayor estabilidad, disminuyendo la interacción con la curcumina evitando la migración de esta hacia el exterior, otorgándole una mayor estabilidad de almacenamiento [20].

Con base a el análisis realizado, se fabricaron nanopartículas de PLGA y PLGA-PEG cargadas con curcumina, concentrando la suspensión de nanopartículas por centrifugación a 15966 x g por 30 min, preparando un sistema que contenía 5 mL de glicerol, 20 mL de la suspensión de nanopartículas y 10 mL de agua desionizada, a 40572 x g por 30 min, una vez terminada la centrifugación, se separó el sobrenadante, y se colectaron los 5 mL próximos a la interfase y se conservaron a 4°C protegidos de la luz. Posteriormente se realizó la caracterización. La Tabla 10 muestra los resultados de las nanopartículas obtenidas mediante las condiciones óptimas obtenidas con el análisis estadístico.

Tabla 10. Resultados de la caracterización de las nanopartículas de PLGA y PLGA-PEG cargadas con curcumina, fabricadas con las condiciones optimizadas.

Polímero	Polímero (mg)	Curcumina (mg)	Carga de curcumina (%)	Tamaño de partícula (nm)	Pdl	Potencial z (mv)
PLGA	75	5	78.7	250.5	0.09	-1.46
PLGA-PEG	50	5	178.2	232.9	0.24	-1.625

Morfología de nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.

Las micrografías fueron tomadas en la Unidad Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4.

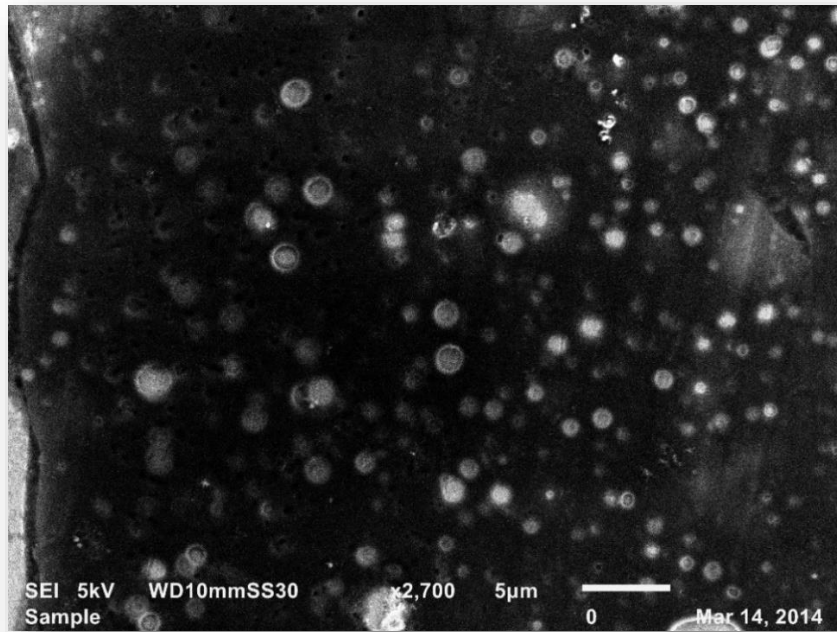


Imagen 1 Micrografía electrónica de barrido de nanopartículas de PLGA cargadas con curcumina.

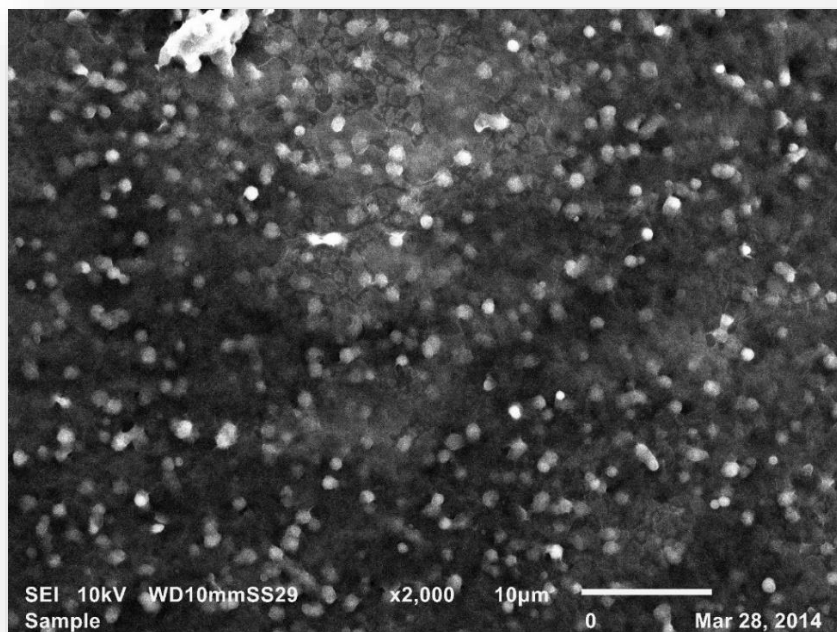


Imagen 2 Micrografía electrónica de barrido de nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina.

En las micrografías de microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas de PLGA y PLGA-PEG (Figura 1 y2) podemos observar nanopartículas esféricas con una distribución de tamaño uniforme para NP de ambos polímeros utilizados, obteniendo índices de polidispersión (Pdi) de 0.95 y 0.171 respectivamente, esto nos indica que el ancho de la distribución de los tamaños de partícula presentes en la suspensión es muy bajo, es decir, el tamaño de partícula en la suspensión es homogéneo en su mayoría.

Citotoxicidad

Viabilidad celular

A continuación se muestran los resultados de la curva de viabilidad realizada para diferentes concentraciones de curcumina en suspensión, en donde se puede observar que disminución en la viabilidad celular generada por la curcumina es dosis-dependiente, obteniendo valores del 67.66% de viabilidad a concentraciones de 20 μM ; sin embargo, a concentraciones por debajo de 10 μM la viabilidad resulta por encima del 80%, por lo que estas concentraciones resultan adecuadas para los estudios posteriores de citotoxicidad. Esta disminución se debe a que la curcumina no solo inhibe el crecimiento de las células tumorales, sin producir efecto citotóxicos en células sanas, además produce un efecto en la inducción de la apoptosis celular, siendo este un efecto con una relación dosis-dependiente. Se ha reportado que la curcumina puede dañar la membrana de las células, afectando la homeostasis celular y la función celular, incluyendo la concentración libre de Ca^{2+} intracelular y el potencial de la membrana mitocondrial [27], por lo que los datos son congruentes en esta disminución en la viabilidad celular post-tratamiento. Con base a los resultados, se determinó que concentraciones menores a 10 μM no producían una disminución en la viabilidad celular por debajo del 80%, por lo que fueron las concentraciones utilizadas en los tratamientos con NP-CURC.

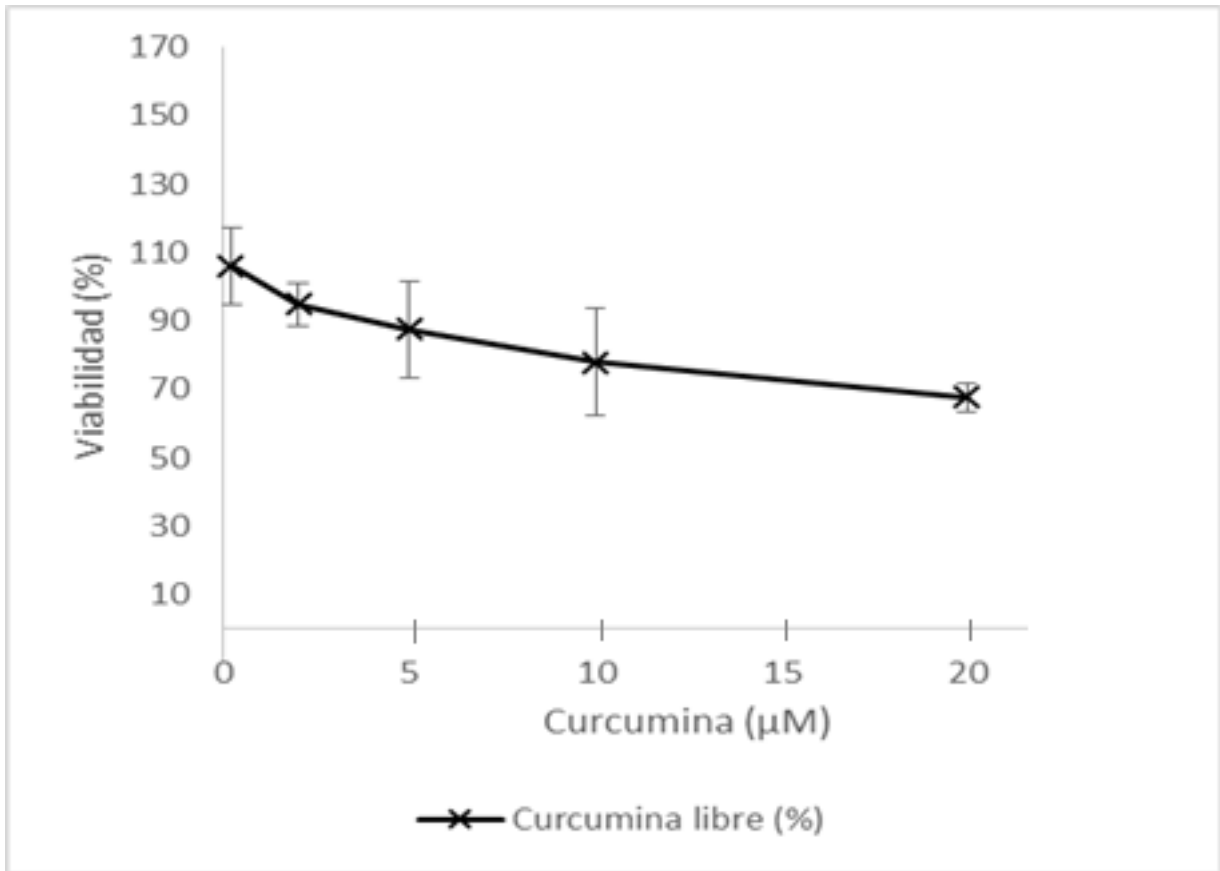


Gráfico 19 Curva de viabilidad de células HepG2 a concentraciones de 0.2, 2 5 10 y 20 µM de curcumina libre.

El Gráfico 19 muestra la disminución en la viabilidad celular resultante después de la exposición de células HepG2 con una mezcla de Aflatoxinas B₁ y B₂ a una concentración 25 ng/mL por un tiempo de 4 h. La toxicidad de AFB₁ es evidenciada desde la concentración de 10 ng/mL, y genera una disminución de la viabilidad celular bastante considerable a concentraciones de 25 ng/mL obteniendo valores por debajo del 50 %, por lo que se consideró esta última concentración como la adecuada para realizar los estudios y evidenciar la toxicidad y el efecto hepatoprotector de la curcumina.

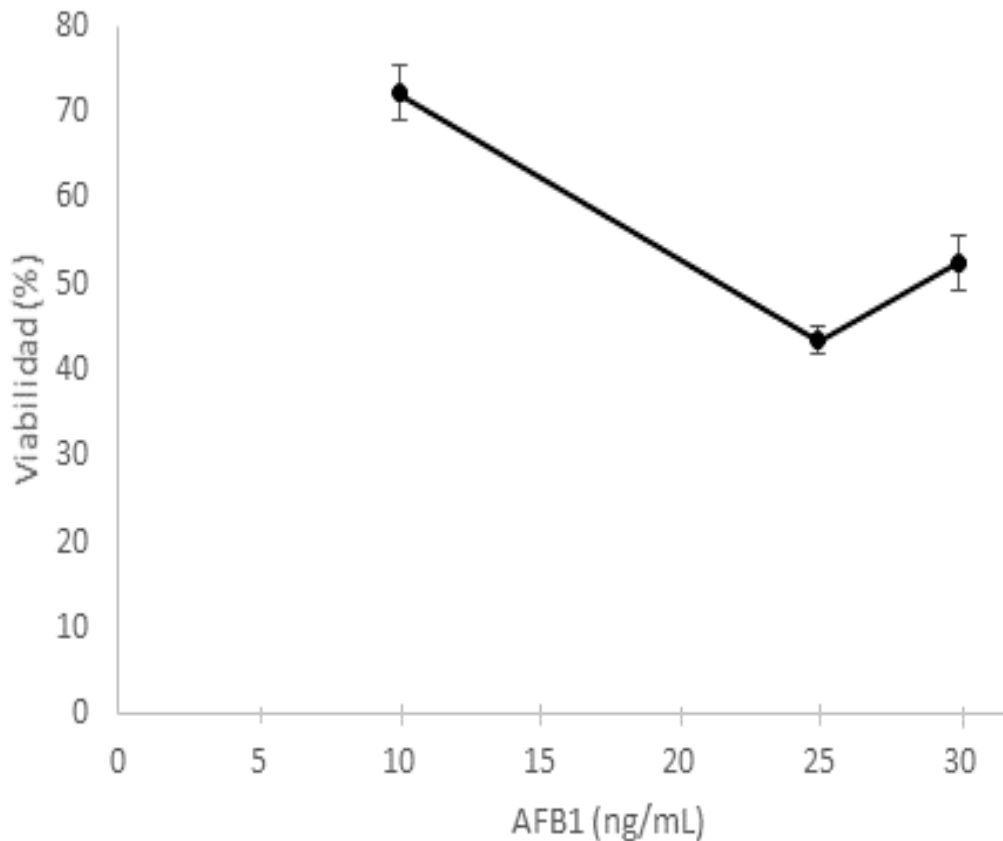


Gráfico 20 Viabilidad de línea celular HepG2 posterior a la exposición de AFB1 25 ng/mL por 4 h.

Como se puede observar en el gráfico 20, la concentración de la mezcla de aflatoxinas B₁ y B₂ adecuada para evidenciar su toxicidad es de 25 ng/mL. Esta disminución en la viabilidad celular se debe a la citotoxicidad producida por la AFB₁, que entre los principales efectos son: la generación de radicales libres los cuales pueden interactuar con la membrana lipídica y causar peroxidación de los lípidos de membrana [9]; el otro gran efecto tóxico corresponde a la genotoxicidad generado por la formación de aductos, en el cual después de la bioactivación por el citocromo P450, se genera la AFB₁-8,9-epóxido la cual puede formar aductos con la guanina en el material genético [35,4].

El Gráfico 21 muestra los resultados de la exposición de células HepG2 frente a una exposición de Aflatoxina B₁ y B₂ a una concentración de 25 ng/mL por 4 h, y una

exposición posterior de curcumina libre y NP-CURC a concentraciones de 0.2, 2, 5 y 10 μM en donde se muestran valores de viabilidad superiores al 100% en los referentes a las NP-CURC, tanto de PLGA como de PLGA-PEG, complementando dicho estudio, se realizó un análisis de varianza para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamiento con curcumina en suspensión y NP-CURC.

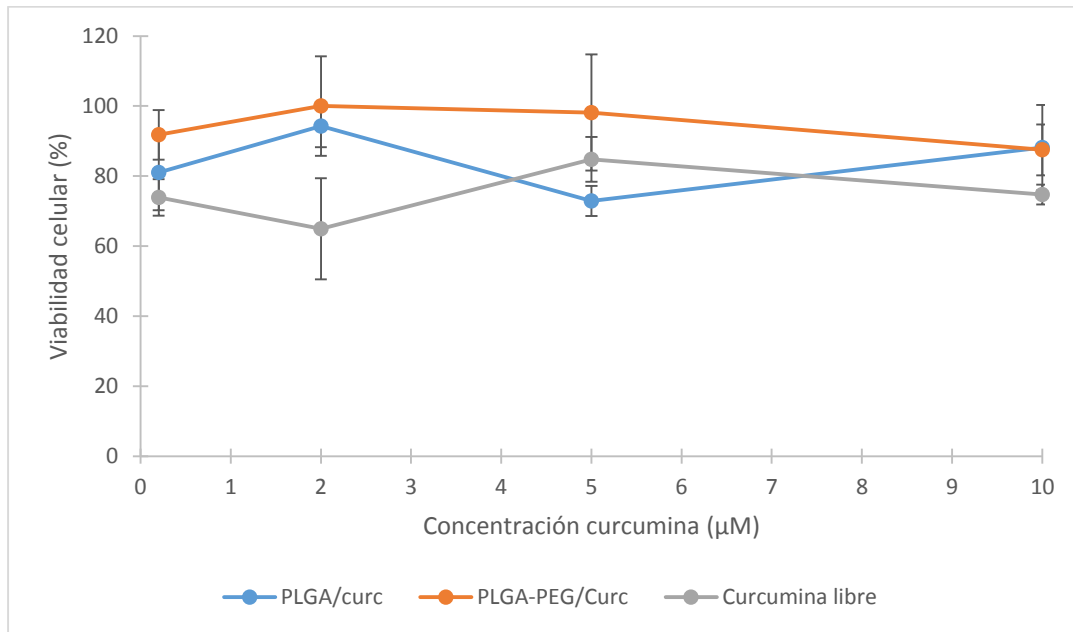


Gráfico 21 Viabilidad de la línea celular HepG2 posterior a la exposición por 4 h de curcumina libre y NP-CURC a diferentes concentraciones (0.2, 2, 5 y 10 μM)

El gráfico 22 muestra las medias de los tratamientos estudiados, en donde se observa que si existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de viabilidad celular de los tratamientos de curcumina libre y los tratamientos con NP-CURC, esto tanto para las nanopartículas de PLGA como para las de PLGA-PEG

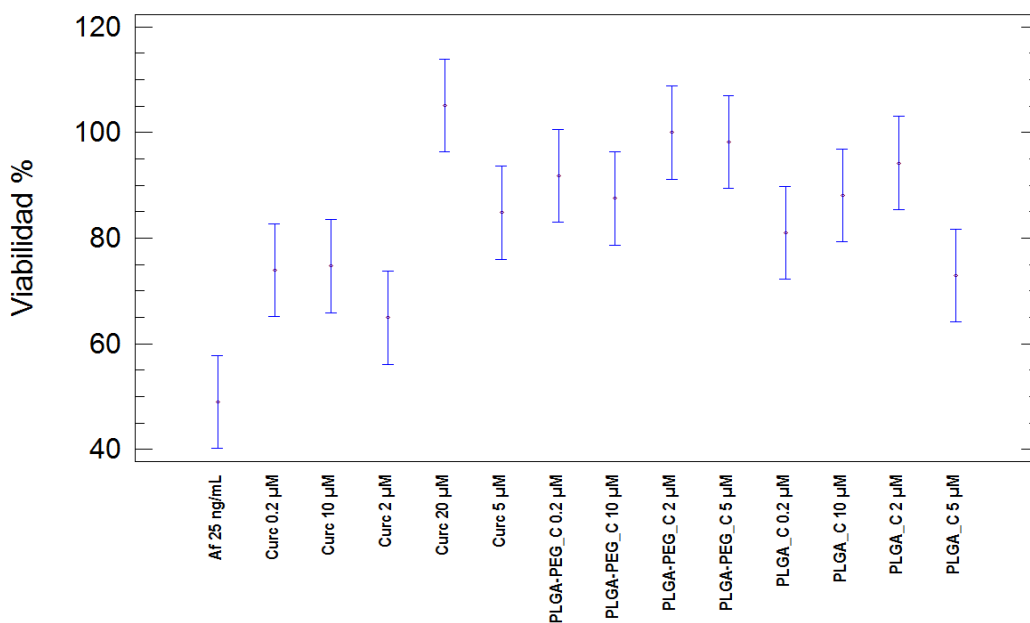


Gráfico 22 Gráfico de medias y 95 % de Fisher LSD para la viabilidad en los diferentes tratamientos de curcumina posterior a una exposición con la mezcla de aflatoxinas B₁ y B₂.

En los Gráficos 21 y 22 se observa que existe una diferencia estadística significativa entre los tratamientos con curcumina libre y NP-CURC, denotando esas diferencias desde las concentraciones de 0.2 µM correspondientes a NP-CURC sobre las de curcumina libre, aumentando la viabilidad celular, incluso sobre el tratamiento de mayor concentración de curcumina libre. El Gráfico 22 muestra las medias de los resultados de viabilidad para los tratamientos que tienen diferencias estadísticamente significativas, sobresaliendo el tratamiento expuesto únicamente con las mezcla de aflatoxinas B₁ y B₂, obteniendo valores muy por debajo de los tratamientos con curcumina, estos resultados muestran claramente el efecto hepatoprotector de la curcumina sobre la intoxicación con la micotoxina en estudio. Sin embargo, debido a que la disminución en la viabilidad celular generada tanto por la curcumina como por la AFB₁ se deben a procesos totalmente distintos, es necesario realizar estudios complementarios para definir de manera más acertada el efecto hepatoprotector de la curcumina sobre la intoxicación por AFB₁.

GSH

En la Tabla 11 se observan los resultados obtenidos para la cuantificación de GSH en células HepG2 tratadas. El análisis estadístico muestra diferencias estadísticas significativas entre el control positivo y los tratamientos a concentraciones de 2 y 20 μM , tanto para curcumina libre como para las nanopartículas cargadas con curcumina (tanto de PLGA como de PLGA-PEG). En el Gráfico 23 se muestra una tendencia en la que la cantidad de GSH presente en la muestra aumenta de manera significativa a la concentración de curcumina libre y encapsulada en las NP de PLGA y PLGA-PEG a concentraciones de 2 μM en adelante, esto sin mostrar cambios significativos en los tratamientos con nanopartículas (tanto de PLGA como de PLGA-PEG) sin carga frente al control (+).

Tabla 11. Determinación de GSH \pm ESM en células HepG2 expuestas a NP-CURC a diferentes concentraciones, posterior a una exposición con la mezcla de Aflatoxinas B₁ y B₂ 25 ng/mL.

Tratamiento	GSH (nmol/mg proteína)
Ctrl (-)	3.13 \pm 0.29
Ctrl (+)	2.54 \pm 0.69
Curc 0.2 μM	3.21 \pm 0.36
Curc 2 μM	5.08 \pm 0.37
Curc 20 μM	4.97 \pm 0.21
PLGA 0.2 μM	2.85 \pm 0.35
PLGA 2 μM	5.08 \pm 0.37
PLGA 20 μM	4.98 \pm 0.22
PLGA-PEG 0.2 μM	2.85 \pm 0.35
PLGA-PEG 2 μM	4.95 \pm 1.22
PLGA-PEG 20 μM	4.48 \pm 0.70
PLGA	4.56 \pm 1.35
PLGA-PEG	6.07 \pm 1.17

Esto es consistente con estudios realizados anteriormente por Pou Kuan Leong et. al [36] en donde se realizó la exposición de células AML12 a curcumina, encontrando un aumento en los niveles de GSH, aunado a una disminución de lipoperoxidación. El mayor efecto de la curcumina sobre la estimulación de la producción de GSH puede estar relacionado con su capacidad para inducir directamente una disociación de la proteína Keap 1, un represor de Nrf2, con una inducción sinérgica resultante de la respuesta antioxidante glutatión con especies reactivas de oxígeno [36].

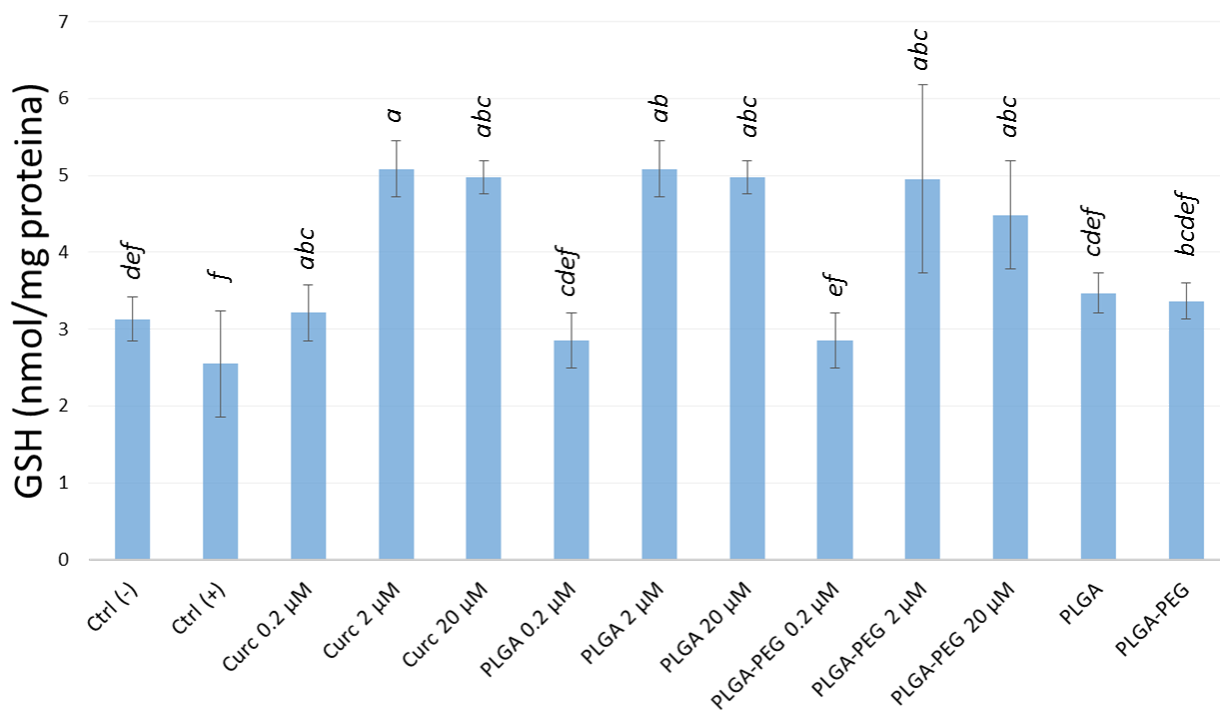


Gráfico 23 Cuantificación de GSH en células HepG2 con exposición a NP-CURC por 4h, posterior a una exposición con AFB1 25 ng/mL. Las letras representan diferencia estadística ($P < 0.05$) significativa.

TBARS

En la Tabla 12 observamos los valores obtenidos para la cuantificación de TBARS en células HepG2 expuestas a NP-CURC y curcumina libre por 4 h a diferentes concentraciones (0.2, 2, 20 μM), posterior a una exposición con AFB1 ng/mL.

Tabla 12. Cuantificación de TBARS en células HepG2 expuestas a nanopartículas de PLGA y PLGA-PEG cargadas con curcumina y curcumina libre por 4 h, posterior a una exposición con la mezcla de aflatoxinas B₁ y B₂ 25 ng/mL.

Tratamiento	TBARS ($\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ Prot)
Ctrl (-)	0.036 \pm 0.003
Ctrl (+)	0.057 \pm 0.004
Curc 0.2 μM	0.031 \pm 0.002
Curc 2 μM	0.036 \pm 0.003
Curc 20 μM	0.051 \pm 0.010
PLGA 0.2 μM	0.060 \pm 0.004
PLGA 2 μM	0.048 \pm 0.004
PLGA 20 μM	0.050 \pm 0.003
PLGA-PEG 0.2 μM	0.056 \pm 0.009
PLGA-PEG 2 μM	0.043 \pm 0.001
PLGA-PEG 20 μM	0.036 \pm 0.004

Como se pueden observar en los resultados, en los grupos tratados con curcumina, los niveles de TBARS disminuyeron mostrando niveles menores en los grupos tratados con curcumina libre, además los grupos tratados con PLGA y PLGA-PEG cargadas con curcumina a una concentración de 0.2 μM y el control positivo (AFB1 25 ng/mL) son los únicos que presentaron diferencia significativa mostrando niveles de TBARS mayores al control negativo.

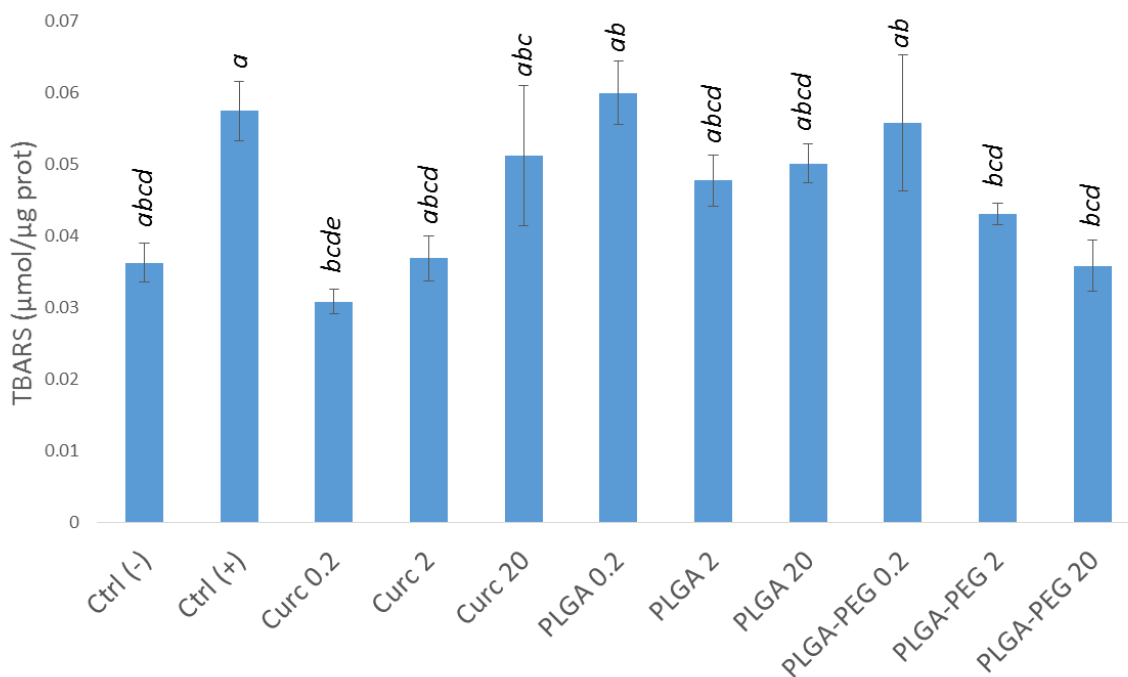


Gráfico 24 Cuantificación de TBARS en células HepG2 con exposición a NP-CURC por 4h, posterior a una exposición con AFB1 25 ng/mL. Las letras representan diferencia estadística ($P < 0.05$) significativa.

Estos resultados son consistentes con los resultados de GSH, ya que al aumentar los niveles de GSH, estos contrarrestan el estrés oxidativo inducido por la exposición a la mezcla de aflatoxinas B₁ y B₂ [36]. Los valores altos de TBARS obtenidos en los grupos tratados con NP-CURC a una concentración de 0.2 μM pueden ser explicados por la liberación lenta de la curcumina encapsulada, ya que el polímero (PLGA o PLGA-PEG) tiene que erosionarse e ir liberando lentamente la curcumina, a diferencia de la curcumina libre la cual se encuentra a disposición de la células para realizar su efecto antioxidante, así la curcumina encapsulada en menor concentración podría no alcanzar una concentración efectiva.

Actividad de la enzima catalasa (CAT)

En la Tabla 13 se observan los resultados de la actividad de la enzima catalasa de las células HepG2 expuestas a los diferentes tratamientos. Como se puede observar en el gráfico 25, la exposición con la mezcla de aflatoxinas B₁ y B₂ reduce la actividad de esta enzima, lo cual es consistente con los valores de TBARS encontrados ya que genera que ciertas especies reactivas de oxígeno producidas por la intoxicación con la micotoxina de estudio, como el H₂O₂, contribuyan al estrés oxidativo; sin embargo, los tratamientos con curcumina (curcumina libre y en nanopartículas cargadas), logran recuperar los niveles de la actividad de catalasa a excepción de las concentraciones más bajas de curcumina encapsulada con PLGA, estas mejorías en la capacidad antioxidante se deben a que la curcumina interactúa con los radicales libres, inhibe iones metálicos quelantes y enzimas oxidantes, restaurando el estado antioxidante de la célula [1].

Tabla 13 Actividad de catalasa en células HepG2 expuestas a nanopartículas de PLGA y PLGA-PEG cargadas con curcumina y curcumina libre posterior a una exposición de Aflatoxinas B₁ y B₂ 25 ng/mL.

Tratamiento	Actividad CAT (U)
Ctrl (-)	131.32 ± 2.38
Ctrl (+)	71.35 ± 1.31
CURC 0.2 µM	106.37 ± 19.31
CURC 2 µM	169.57 ± 8.78
CURC 20 µM	130.30 ± 6.12
PLGA 0.2 µM	75.60 ± 15.97
PLGA 2 µM	67.45 ± 1.70
PLGA 20 µM	143.99 ± 13.38
PLGA-PEG 0.2 µM	157.04 ± 17.06
PLGA-PEG 2 µM	134.62 ± 20.74
PLGA-PEG 20 µM	122.87 ± 3.51

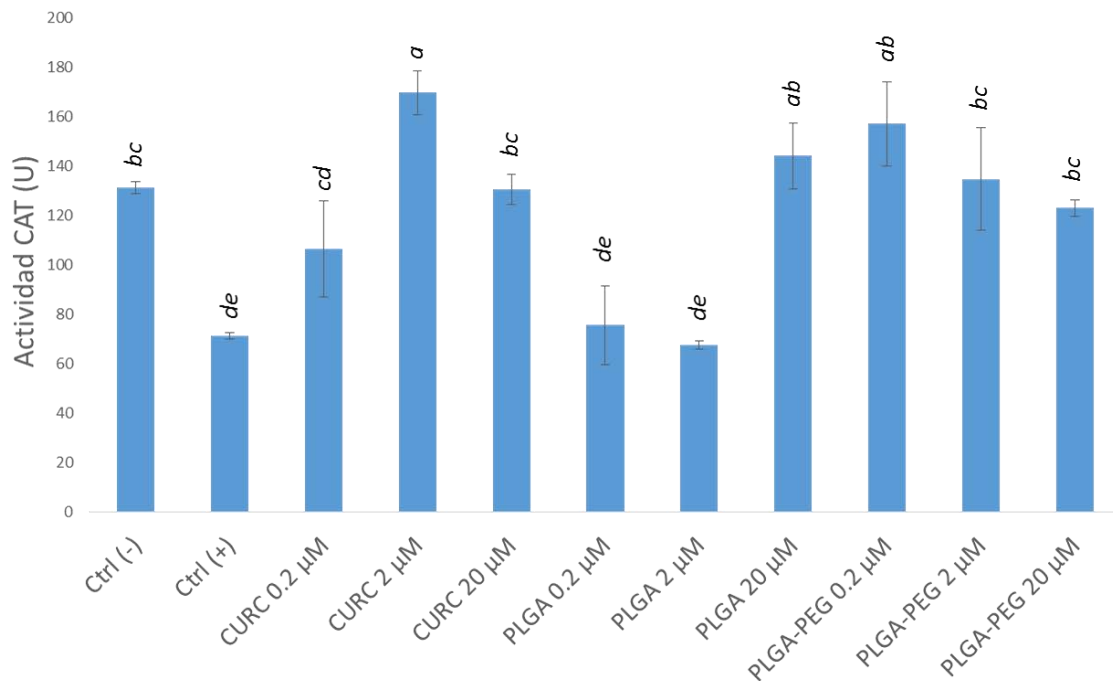


Gráfico 25 Actividad de catalasa en células HepG2 expuestas a nanopartículas de PLGA y PLGA-PEG cargadas con curcumina y curcumina libre a diferentes concentraciones, posterior a una exposición de aflatoxinas B₁ y B₂ 25 ng/mL. Las letras representan diferencia estadística (P<0.05) significativa.

Actividad de la enzima glutatión reductasa (GR)

En la Tabla 14 se presentan los resultados de la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) de células HepG2 expuestas a una mezcla de aflatoxinas B₁ y B₂ a una concentración de 25 ng/mL. Como se observa en el gráfico 26, no se presentó diferencia alguna en los valores de la actividad de esta enzima, incluso no hubo diferencia estadística significativa entre los valores del control positivo con respecto al control negativo, a excepción del tratamiento con PLGA-PEG/CURC 20 μM el cual obtuvo valores inferiores en relación al control positivo y negativo. Aunque se parecía una tendencia a disminuir la actividad de esta enzima cuando se aumenta la concentración de curcumina, estatísticamente no se presentan diferencias

significativas suficientes para relacionar el efecto de la micotoxina en estudio así como la enzima sobre la actividad de esta enzima.

Tabla 14. Actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) en células HepG2 expuestas a nanopartículas de PLGA y PLGA-PEG cargadas con curcumina y curcumina libre a diferentes concentraciones (0.2, 2 y 20 μ M de curcumina) posterior a una exposición con Aflatoxinas B₁ y B₂ 25 ng/mL.

Tratamiento	Actividad GR (U)
Ctrl (-)	16.60 \pm 1.68
Ctrl (+)	17.48 \pm 1.04
PLGA 0.2	15.74 \pm 1.73
PLGA 2	17.57 \pm 2.05
PLGA 20	15.57 \pm 1.34
PLGA-PEG 0.2	14.55 \pm 0.20
PLGA-PEG 2	12.76 \pm 1.92
PLGA-PEG 20	12.80 \pm 0.63
CURC 0.2	14.23 \pm 2.25
CURC 2	13.88 \pm 2.43
CURC 20	16.42 \pm 3.16

Con base en estos resultados, podemos inferir que la actividad de esta enzima no se ve afectada por la presencia de la curcumina o la aflatoxina B₁, aunque si se muestra una tendencia en la disminución de esta actividad *in vitro*, por lo que el efecto antioxidante puede darse por la captación de especies oxidantes por parte de la curcumina, así como la sobreexpresión de GSH y actividad de catalasa [37,36].

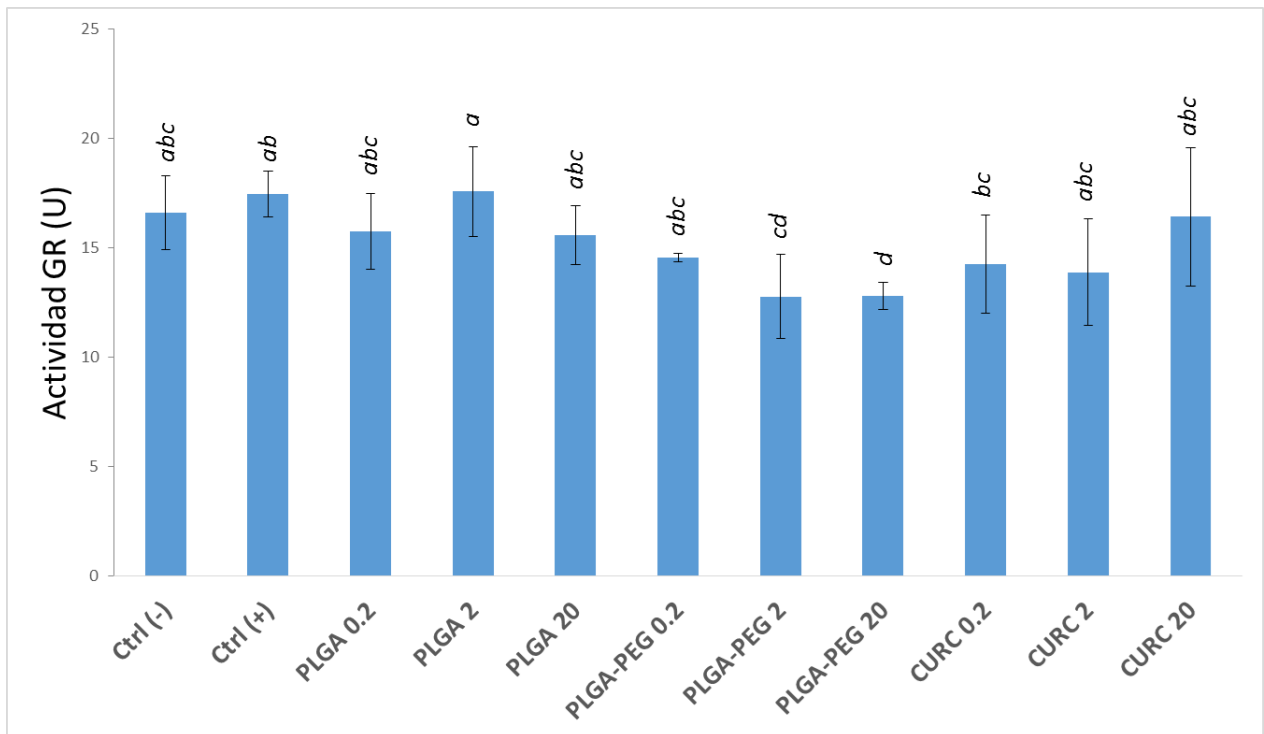


Gráfico 26 Actividad de Glutación reductasa (GR) en células HepG2 expuestas a NP-CURC y curcumina libre a diferentes concentraciones (0.2, 2 y 20 μ M de curcumina) posterior a una exposición con AfB1 25 ng/mL. Las letras representan diferencia estadística ($P < 0.05$) significativa.

Estudios de internalización de las NP-CURC en la célula.

Se realizó un estudio de microscopia confocal de células expuestas a nanopartículas de PLGA y PLGA.PEG cargadas con curcumina, en específico de NP de PLGA-PEG ya que estas son las que presentaron los mejores resultados tanto en el efecto hepatoprotector como en la carga y tamaño de partícula. Las imágenes 3 y 4 muestran los resultados.

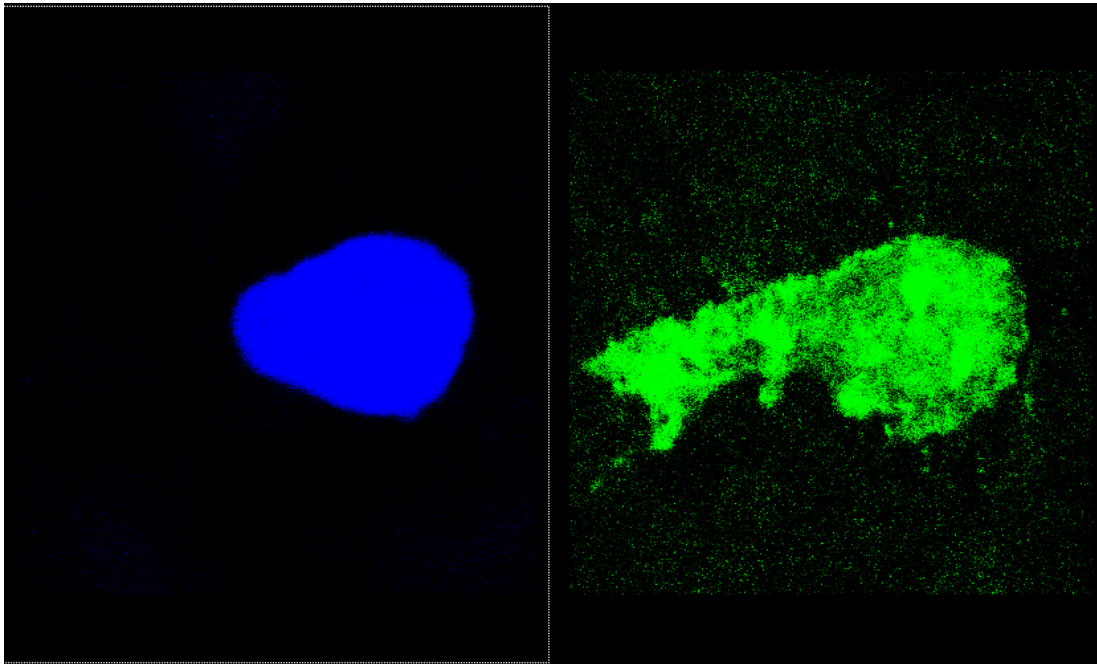


Imagen 3 Microscopía confocal de células HepG2 expuestas a nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina 0.2 μ M. Contraintinción con Ioduro de propidio.

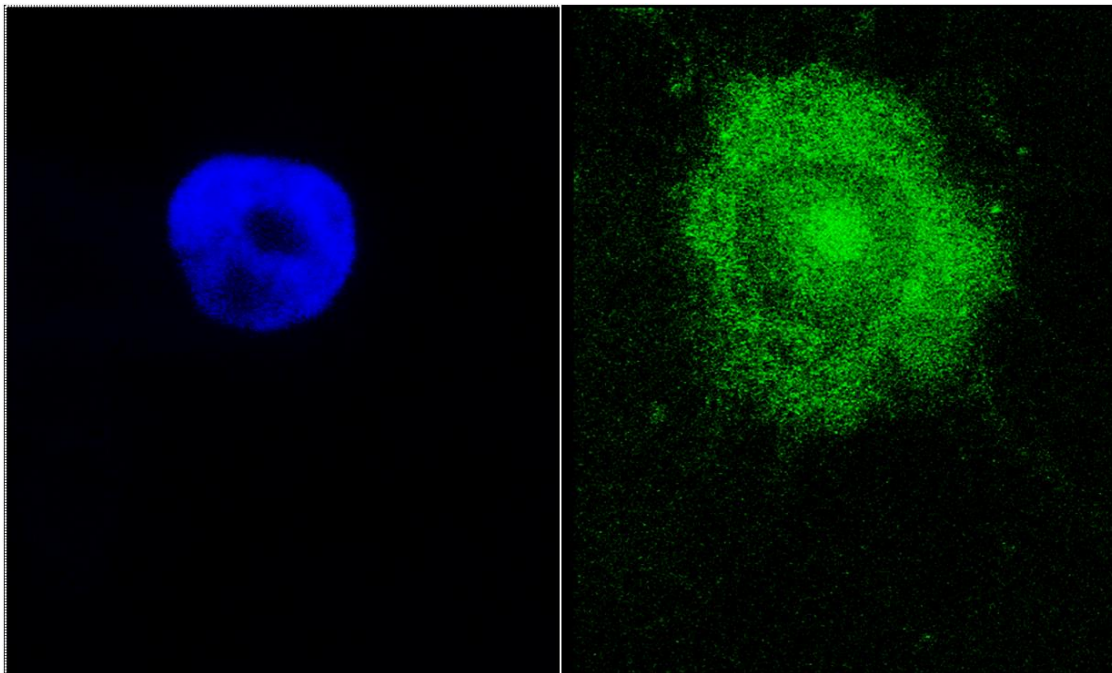


Imagen 4 Microscopía confocal de células HepG2 expuestas a nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina 20 μ M. Contraintinción con Ioduro de propidio.

En las imágenes de microscopía confocal, tanto en la concentración de nanopartículas de PLGA-PEG cargadas con curcumina a concentraciones tanto de 0.2 como de 20 μM , las nanopartículas penetran a la célula, incluso hasta el núcleo. Se sabe que las NP de PLGA se internalizan en células a través de pinocitosis y también a través de endocitosis mediada por clatrina. Las NP de PLGA escapan rápidamente los endolisosomas y entran en el citoplasma dentro de los primeros 10 min de incubación. Esto facilita las interacciones de las nanopartículas con las membranas vesiculares que conducen a la desestabilización transitoria y localizada de la membrana que da como resultado el escape de las nanopartículas en el citosol [38], una vez ahí éstas se internalizan hasta el núcleo por un proceso que aún no ha sido explicado; sin embargo, el organismo detecta partículas hidrófobas como agentes externos, por lo que son reconocidas por el sistema inmune. Debido a esto se ha utilizado además el polímero PLGA en bloque con polietilenglicol, ya que las nanopartículas con polietilenglicol en la superficie no son reconocidas por el sistema inmune, lo que les daría mayor tiempo de vida en circulación [38].

6. Conclusión.

Se fabricaron nanopartículas de PLGA y PLGA-PEG cargadas con curcumina y se realizó la optimización del método de fabricación, obteniendo nanopartículas de PLGA y PLGA-PEG con cargas de curcumina de 78.7 y 178.2 μM respectivamente, así como un tamaño de 250.5 nm para nanopartículas de PLGA y 232.9 nm para nanopartículas de PLGA-PEG. Los índices de polidispersión obtenidos fueron de 0.09 y 0.24 respectivamente.

Se evaluó el efecto hepatoprotector antioxidante en células HepG2 expuestas a una mezcla de aflatoxinas B₁ y B₂, encontrando que las nanopartículas de curcumina tienen la capacidad de contrarrestar el estrés oxidativo inducido por aflatoxina B₁, incrementando los niveles de las enzimas antioxidantes como GSH y catalasa, y disminuyendo niveles de especies reactivas al oxígeno. Estos resultados sugieren que la curcumina cargada en las nanopartículas puede modular efectos celulares asociados al estrés oxidativo *in vitro*.

7. Referencias

- [1] El-Agamy D.S. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B1-induced liver injury in rats. *Archives of Toxicology*. 2010; 84: p. 389–396.
- [2] Fengyuan Wang, G. S. Protective effects of sodium selenite against aflatoxin B1-induced oxidative stress and apoptosis in broiler spleen. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2013; 10: p. 2834–2844.
- [3] J. Shaikh, D. A. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009; 37: p. 223–230.
- [4] Leanne L. Bedard, T. E. Aflatoxin B1 induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters*. 2006; 241: p. 174-183.
- [5] K. Sargeant, A. S. Toxicity associated with Certain Samples of Groundnuts. *Nature*. 1961; 192: p. 1096 - 1097.
- [6] Ruijie Liu, Q. J. In vitro toxicity of aflatoxin B1 and its photodegradation products in HepG2 cells. *Journal of Applied Toxicology*. 2010; 32: p. 276-281.
- [7] Chona O. M. Importancia y efectos de la aflatoxina en los seres humanos. *medUNAB*. 1999; 2: p. 124-129.
- [8] Shen HM, S. C. Aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1994 Julio; 127(1): p. 145-150.
- [9] Gokhan Eraslan, M. A. The effects of aflatoxins on oxidative stress in broiler chickens. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2005; 29: p. 701-707.
- [10] Bharat B. Aggarwal, I. D. Curcumin - biological and medicinal properties. In P.N. Ravindran KNBaKS. *Turmeric: the genus curcuma*; 206. p. 297-368.
- [11] R.A. Sharma, A. G. Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer*. 2005; 41: p. 1955–1968.

- [12] Milobedeska J, K. V. Structure of curcumin. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. 1910; 43: p. 2163-70.
- [13] Lampe V, M. J. Studien über curcumin. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*. 1913; 46: p. 2235-40.
- [14] Shatadal Ghosh, S. B. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food and Chemical Toxicology*. 2015; 83: p. 111-124.
- [15] H.H. Tonnesen, J. K. Studies of curcumin and curcuminoids: VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002; 244: p. 402-404.
- [16] Niki S. Jha, S. M. Antioxidant activity and electrochemical elucidation of the enigmatic redox behavior of curcumin and its structurally modified analogues. *Electrochimica Acta*. 2015; 151: p. 574–583.
- [17] Ornachuma Naksuriya, S. O. Curcumin nanoformulations: A review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment. *Biomaterials*. 2014; 35: p. 3365-3383.
- [18] Indu Bala, S.H. PLGA Nanoparticles in drug delivery: The state of the art. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2004; 21: p. 387-422.
- [19] Boitumelo Semete, L. B. In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology, and medicine*. 2010; 6: p. 662-671.
- [20] Hirenkumar K. Makadia, S. J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*. 2011; 3(3): p. 1377-1397.
- [21] D.K. Sahana, G. M. PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: Influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008; 97(4).

- [22] Zhi Min Wu, L. L. Novel preparation of PLGA/HP55 nanoparticles for oral insulin delivery. *Nanoscale Research Letters*. 2012; 7(1): p. 299.
- [23] Jian-Ming Lü, X. W. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. *National Institutes of Health Public Access*. 2009; 9: p. 325–341.
- [24] Luis A. Guzman, V. L. Local intraluminal infusion of biodegradable polymeric nanoparticles: A novel approach for prolonged drug delivery after balloon angioplasty. *Circulation*. 1996; 94: p. 1441-1448.
- [25] Amalendu P. Ranjan, A. M. Scale up, optimization and stability analysis of curcumin C3 complex-loaded nanoparticles for cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*. 2012; 10: p. 10-38.
- [26] Murali M. Yallapu, B. K. Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010; 351: p. 19-29.
- [27] Mu Wang, Y. R. Curcumin induced HepG2 cell apoptosis-associated mitochondrial membrane potential and intracellular free Ca²⁺ concentration. *European Journal of Pharmacology*. 2011; 650: p. 41-47.
- [28] Tathagata Choudhuri, S. P. Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(20): p. 41-47.
- [29] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65: p. 55-63.
- [30] John Buege, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. 1978; 52: p. 302-10.
- [31] Peter Eyer, P. D. Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*. 1986; 153: p. 57-66.

- [32] Tadayuki Iwase, A. T. A simple assay for measuring catalase activity: A visual approach. *Scientific Reports*. 2013; 3: p. 1-4.
- [33] Carlberg I., M. B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. 1985; 113: p. 113, 484-490.
- [34] R.S. Esworthy, F. C. *Current Protocols in Toxicology California*: John Wiley and Sons, Inc.; 2001.
- [35] José R. Urrego, G. J. Aflatoxinas: Mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia*. 2006; 54(2): p. 108-116.
- [36] Pou Kuan Leong, P. Y. Prooxidant-Induced glutathione antioxidant response in vitro and in vivo: A comparative study between schisandrin B and curcumin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2012; 35(4): p. 464–472.
- [37] Preetha Anand, H. B. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochemical Pharmacology*. 2010;: p. 330–338.
- [38] Fabienne Danhier, E. A. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 2012; 161(2): p. 505–522.

8. Anexo - Análisis estadístico

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS FABRICADAS

NP de PLGA cargadas con curcumina

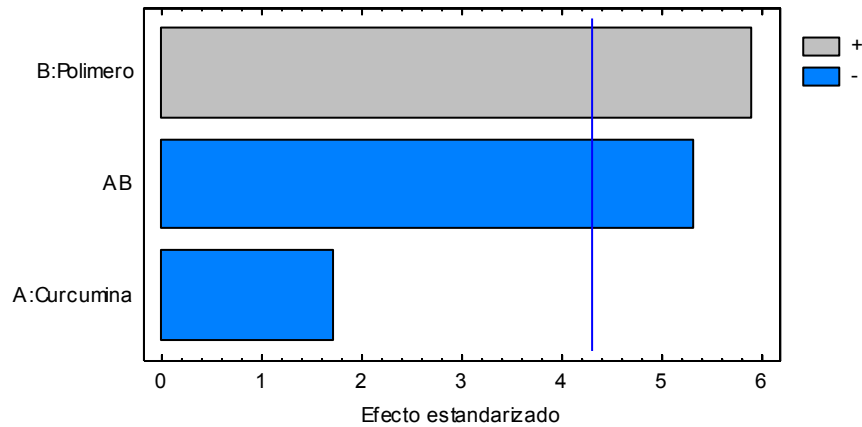
Carga de curcumina

Efectos estimados para carga curcumina (%)

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	6.76516	0.568893	
A:Curcumina	-2.40117	1.3935	1.0
B:Polimero	6.70313	1.13779	1.0
AB	-7.40176	1.3935	1.0

Errores estándar basados en el error total con 2 g.l.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Carga curcumina



Análisis de Varianza para Carga curcumina

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Curcumina	5.76562	1	5.76562	2.97	0.2270
B:Polimero	67.398	1	67.398	34.71	0.0276
AB	54.7861	1	54.7861	28.21	0.0337
Error total	3.88367	2	1.94183		
Total (corr.)	131.833	5			

R-cuadrada = 97.0541 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 92.6353 por ciento

Error estándar del est. = 1.3935

Error absoluto medio = 0.637254

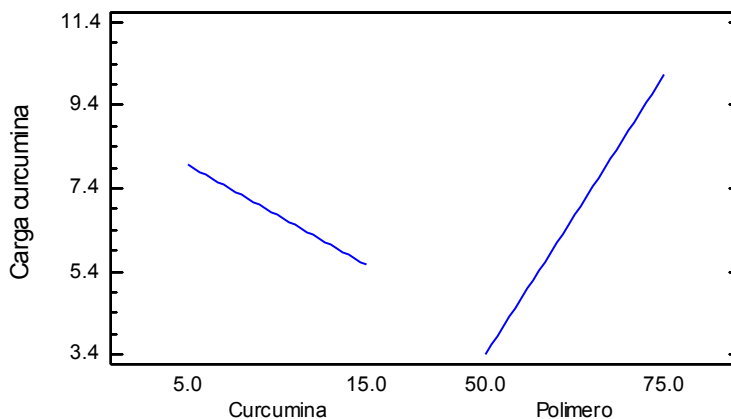
Estadístico Durbin-Watson = 1.69613 (P=0.2836)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.0686031

En este caso, 2 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 97.0541% de la variabilidad en Carga curcumina.

Gráfica de Efectos Principales para Carga curcumina



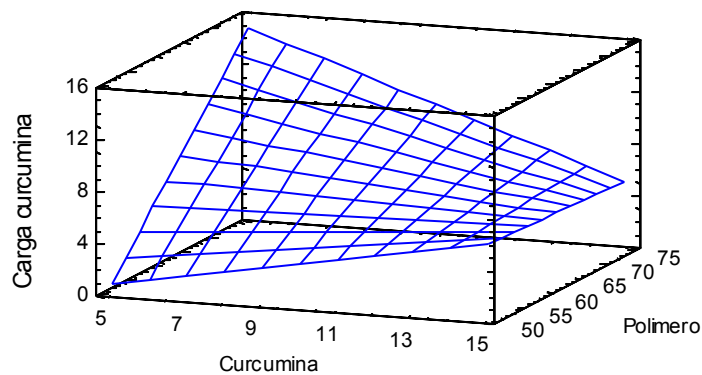
Coefficiente de regresión para carga curcumina

Coefficiente	Estimado
constante	-44.6003
A:Curcumina	3.46077
B:Polimero	0.860267
AB	-0.0592141

Ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Carga curcumina} = -44.6003 + 3.46077 * \text{Curcumina} + 0.860267 * \text{Polímero} - 0.0592141 * \text{Curcumina} * \text{Polímero}$$

Superficie de Respuesta Estimada



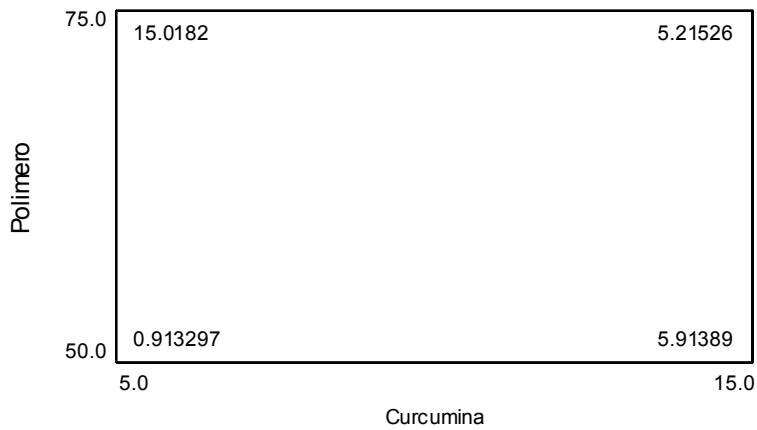
Optimizar Respuesta

Meta: maximizar Carga curcumina

Valor óptimo = 15.0182

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Curcumina	5.0	15.0	5.0
Polímero	50.0	75.0	75.0

Gráfica de Cuadro para Carga curcumina



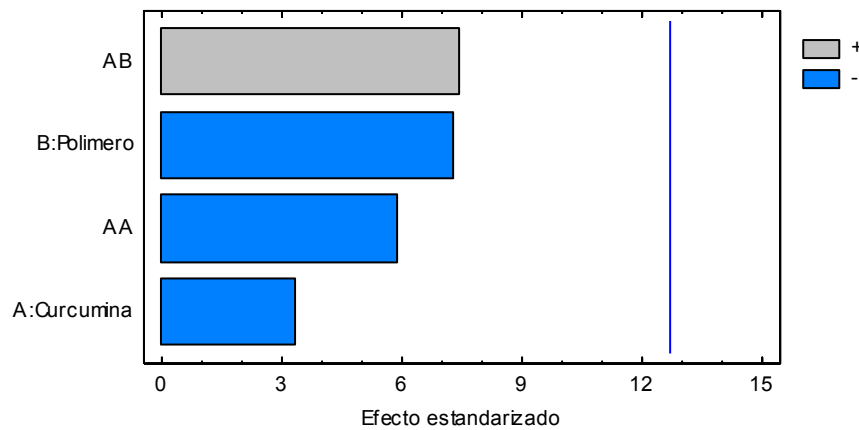
Tamaño de partícula

Efectos estimados para tamaño partícula (nm)

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	718.5	33.3743	
A:Curcumina	-158.35	47.1984	1.0
B:Polimero	-281.3	38.5373	1.0
AA	-481.35	81.75	1.0
AB	352.35	47.1984	1.0

Errores estándar basados en el error total con 1 g.l.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Tamaño partícula



Análisis de Varianza para Tamaño partícula

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Curcumina	25074.7	1	25074.7	11.26	0.1844
B:Polimero	118695.	1	118695.	53.28	0.0867
AA	77232.6	1	77232.6	34.67	0.1071
AB	124151.	1	124151.	55.73	0.0848
Error total	2227.69	1	2227.69		
Total (corr.)	347380.	5			

R-cuadrada = 99.3587 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 96.7936 porciento

Error estándar del est. = 47.1984

Error absoluto medio = 18.1667

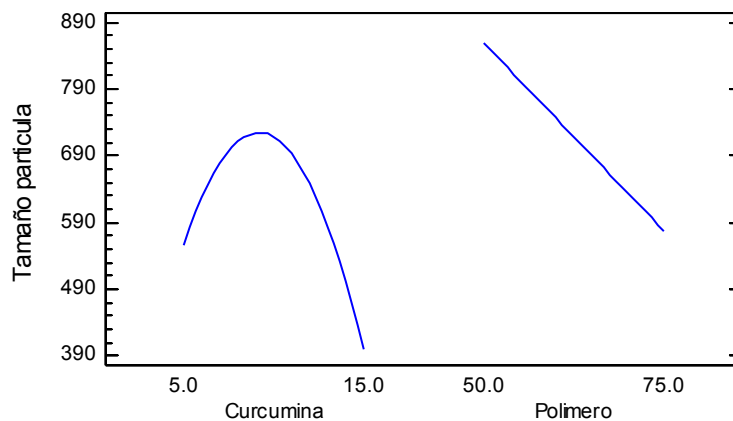
Estadístico Durbin-Watson = 2.16667

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.166667

En tabla se muestra que 0 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99.3587% de la variabilidad en Tamaño partícula.

Gráfica de Efectos Principales para Tamaño partícula



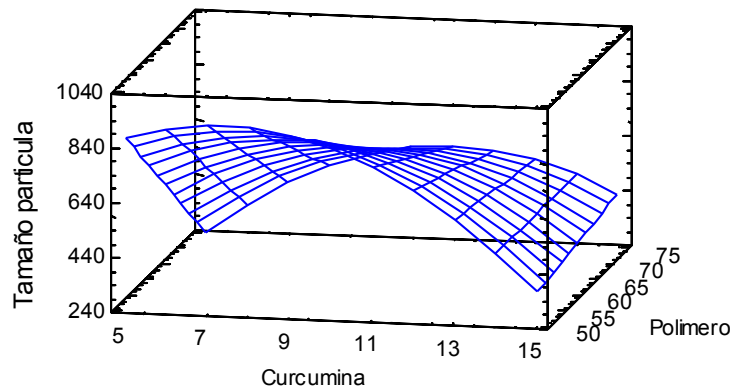
Coefficiente de regresión para tamaño partícula

Coefficiente	Estimado
constante	2379.15
A:Curcumina	0.53
B:Polimero	-39.44
AA	-9.627
AB	2.8188

Ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Tamaño partícula} = 2379.15 + 0.53 * \text{Curcumina} - 39.44 * \text{Polímero} - 9.627 * \text{Curcumina}^2 + 2.8188 * \text{Curcumina} * \text{Polímero}$$

Superficie de Respuesta Estimada



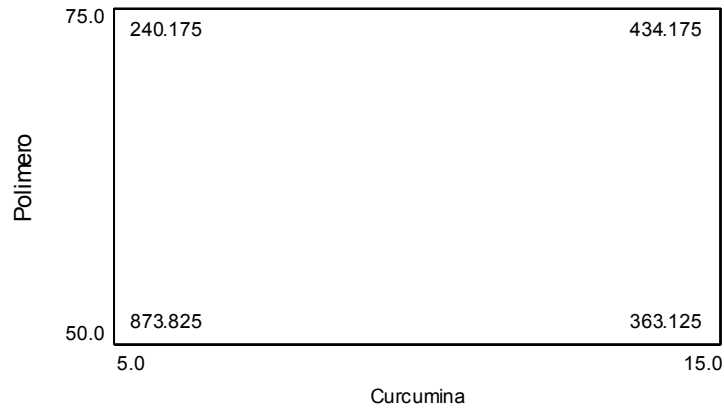
Optimizar Respuesta

Meta: minimizar Tamaño partícula

Valor óptimo = 240.175

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Curcumina	5.0	15.0	5.0
Polímero	50.0	75.0	75.0

Gráfica de Cuadro para Tamaño partícula



NP de PLGA-PEG cargadas con curcumina

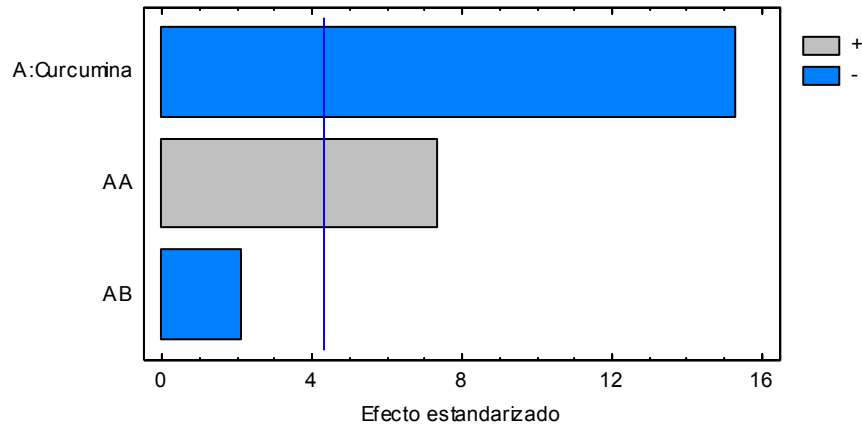
Carga de curcumina

Efectos estimados para Carga curcumina (%)

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	1.45105	0.101878	
A:Curcumina	-2.20834	0.144077	1.0
AA	1.83507	0.249549	1.0
AB	-0.307958	0.144077	1.0

Errores estándar basados en el error total con 2 g.l.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Carga curcumina



Análisis de Varianza para Carga curcumina

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Curcumina	4.87676	1	4.87676	234.93	0.0042
AA	1.12249	1	1.12249	54.07	0.0180
AB	0.0948379	1	0.0948379	4.57	0.1660
Error total	0.0415164	2	0.0207582		
Total (corr.)	6.13561	5			

R-cuadrada = 99.3234 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98.3084 por ciento

Error estándar del est. = 0.144077

Error absoluto medio = 0.0700094

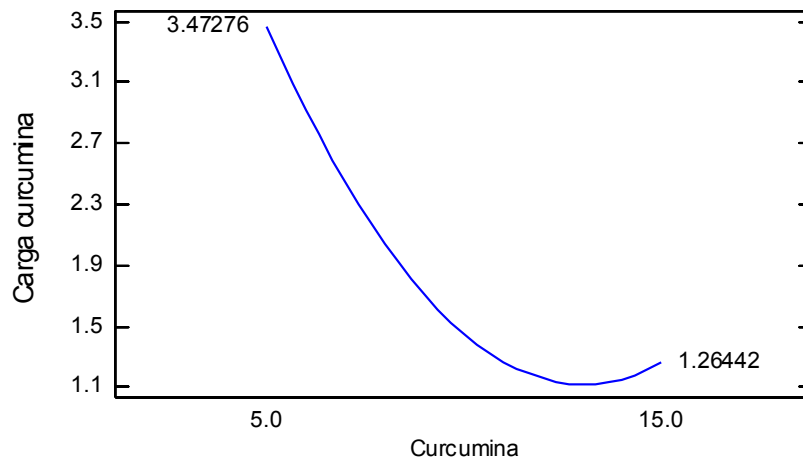
Estadístico Durbin-Watson = 2.43748 (P=0.2699)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.253972

En el análisis se muestra que 2 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99.3234% de la variabilidad en Carga curcumina.

Gráfica de Efectos Principales para Carga curcumina



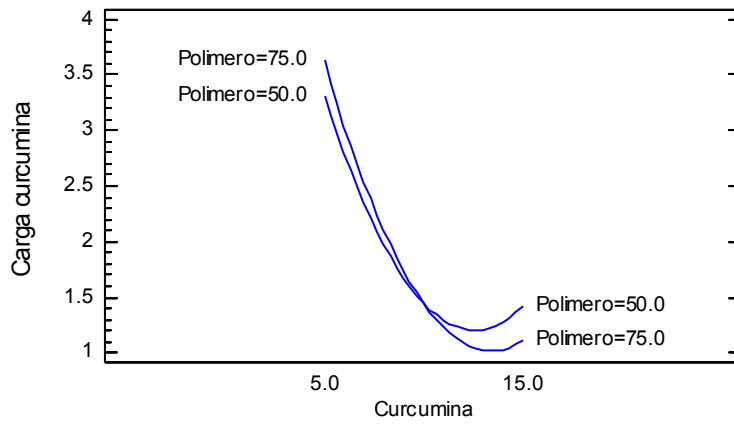
Coefficiente de regresión para carga curcumina

Coefficiente	Estimado
constante	5.78974
A:Curcumina	-0.800882
B:Polimero	0.0246366
AA	0.0367013
AB	-0.00246366

Ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Carga curcumina} = 5.78974 - 0.800882 * \text{Curcumina} + 0.0246366 * \text{Polímero} + 0.0367013 * \text{Curcumina}^2 - 0.00246366 * \text{Curcumina} * \text{Polímero}$$

Gráfica de Interacción para Carga curcumina



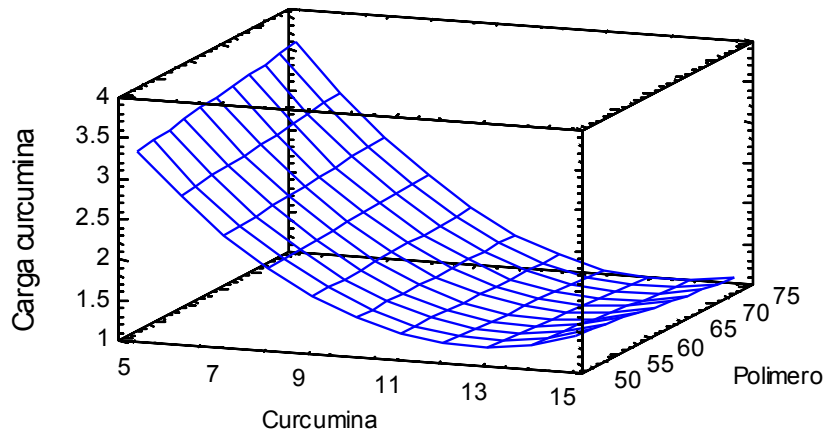
Optimizar respuesta

Meta: maximizar carga curcumina

Valor óptimo = 3.62674

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Curcumina	5.0	15.0	5.0
Polímero	50.0	75.0	75.0

Superficie de Respuesta Estimada



Gráfica de Cuadro para Carga curcumina



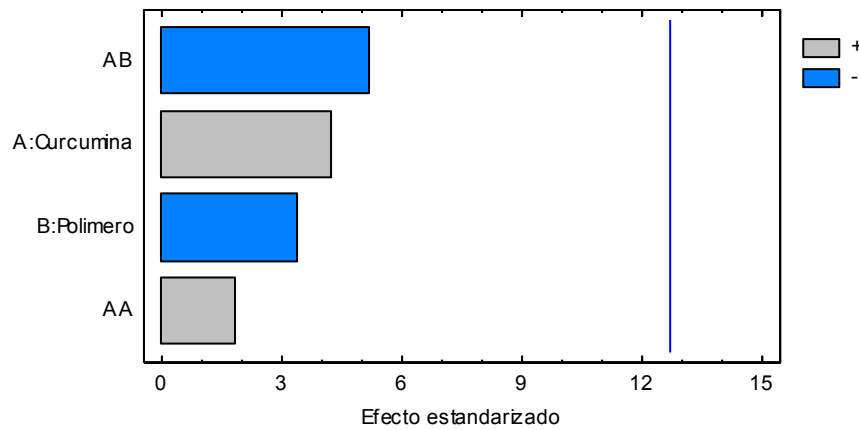
Tamaño de partícula

Efectos estimados para Tamaño partícula (nm)

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	191.1	2.18413	
A:Curcumina	13.15	3.08882	1.0
B:Polimero	-8.56667	2.52201	1.0
AA	9.85	5.35	1.0
AB	-16.05	3.08882	1.0

Errores estándar basados en el error total con 1 g.l.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Tamaño partícula



Análisis de Varianza para tamaño partícula

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Curcumina	172.923	1	172.923	18.12	0.1469
B:Polimero	110.082	1	110.082	11.54	0.1823
AA	32.3408	1	32.3408	3.39	0.3168
AB	257.603	1	257.603	27.00	0.1210
Error total	9.54083	1	9.54083		
Total (corr.)	582.488	5			

R-cuadrada = 98.3621 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 91.8103 por ciento
 Error estándar del est. = 3.08882
 Error absoluto medio = 1.18889
 Estadístico Durbin-Watson = 2.16667
 Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.16667

En este caso, 0 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 98.3621% de la variabilidad en Tamaño partícula.

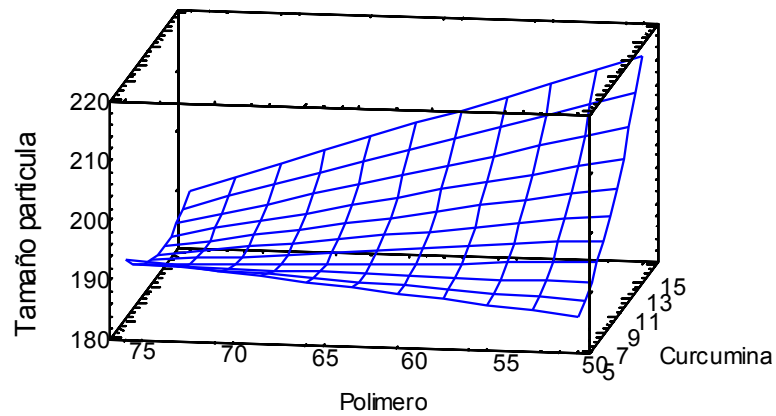
Coefficiente de regresión para tamaño partícula

Coefficiente	Estimado
constante	138.817
A:Curcumina	5.4
B:Polimero	0.941333
AA	0.197
AB	-0.1284

Ecuación del modelo ajustado:

$$\text{Tamaño partícula} = 138.817 + 5.4 * \text{Curcumina} + 0.941333 * \text{Polímero} + 0.197 * \text{Curcumina}^2 - 0.1284 * \text{Curcumina} * \text{Polímero}$$

Superficie de Respuesta Estimada



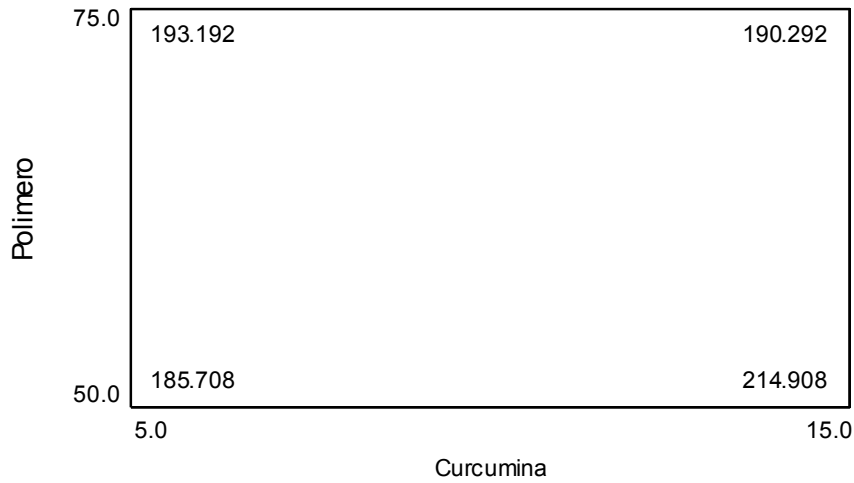
Optimizar respuesta

Meta: minimizar tamaño partícula

Valor óptimo = 185.708

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Curcumina	5.0	15.0	5.0
Polímero	50.0	75.0	50.0

Gráfica de Cuadro para Tamaño partícula



ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LAS LOS ENSAYOS SOBRE CELULAS HEPG2 EXPUESTAS A NANOPARTICULAS CARGADAS CON CURCUMINA Y AFLATOXINAS

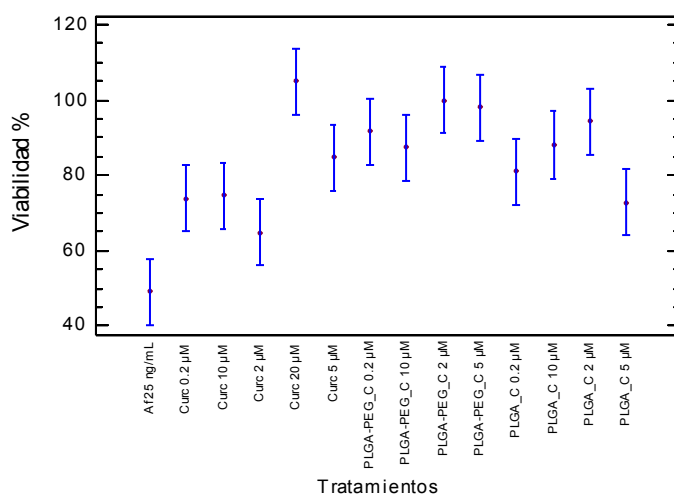
Análisis estadístico para el ensayo de viabilidad celular con los diferentes tratamientos.

Tabla ANOVA para porcentaje de viabilidad celular por tratamientos

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8995.44	13	691.957	6.25	0.0000
Intra grupos	3102.24	28	110.794		
Total (Corr.)	12097.7	41			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del porcentaje de la viabilidad celular entre un nivel de tratamientos y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de múltiple rangos para el porcentaje de viabilidad celular por tratamientos

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Af 25 ng/mL	3	49.0114	X
Curc 2 µM	3	64.9324	XX
PLGA_C 5 µM	3	72.9167	XX
Curc 0.2 µM	3	73.8814	XX
Curc 10 µM	3	74.7138	XXX
PLGA_C 0.2 µM	3	81.0049	XXXX
Curc 5 µM	3	84.8075	XXXXX
PLGA-PEG_C 10 µM	3	87.513	XXXXXX
PLGA_C 10 µM	3	88.1127	XXXXXX
PLGA-PEG_C 0.2 µM	3	91.7892	XXXXX
PLGA_C 2 µM	3	94.2402	XXX
PLGA-PEG_C 5 µM	3	98.1618	XXX
PLGA-PEG_C 2 µM	3	100.0	XX
Curc 20 µM	3	105.099	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Af 25 ng/mL - Curc 0.2 µM	*	-24.8699	17.6048
Af 25 ng/mL - Curc 10 µM	*	-25.7024	17.6048
Af 25 ng/mL - Curc 2 µM		-15.9209	17.6048
Af 25 ng/mL - Curc 20 µM	*	-56.0874	17.6048
Af 25 ng/mL - Curc 5 µM	*	-35.796	17.6048
Af 25 ng/mL - PLGA-PEG_C 0.2 µM	*	-42.7778	17.6048
Af 25 ng/mL - PLGA-PEG_C 10 µM	*	-38.5016	17.6048
Af 25 ng/mL - PLGA-PEG_C 2 µM	*	-50.9886	17.6048
Af 25 ng/mL - PLGA-PEG_C 5 µM	*	-49.1503	17.6048
Af 25 ng/mL - PLGA_C 0.2 µM	*	-31.9935	17.6048
Af 25 ng/mL - PLGA_C 10 µM	*	-39.1013	17.6048
Af 25 ng/mL - PLGA_C 2 µM	*	-45.2287	17.6048
Af 25 ng/mL - PLGA_C 5 µM	*	-23.9052	17.6048
Curc 0.2 µM - Curc 10 µM		-0.832466	17.6048
Curc 0.2 µM - Curc 2 µM		8.94901	17.6048
Curc 0.2 µM - Curc 20 µM	*	-31.2175	17.6048
Curc 0.2 µM - Curc 5 µM		-10.9261	17.6048
Curc 0.2 µM - PLGA-PEG_C 0.2 µM	*	-17.9078	17.6048

Curc 0.2 µM - PLGA-PEG_C 10 µM		-13.6316	17.6048
Curc 0.2 µM - PLGA-PEG_C 2 µM	*	-26.1186	17.6048
Curc 0.2 µM - PLGA-PEG_C 5 µM	*	-24.2804	17.6048
Curc 0.2 µM - PLGA_C 0.2 µM		-7.12353	17.6048
Curc 0.2 µM - PLGA_C 10 µM		-14.2314	17.6048
Curc 0.2 µM - PLGA_C 2 µM	*	-20.3588	17.6048
Curc 0.2 µM - PLGA_C 5 µM		0.964707	17.6048
Curc 10 µM - Curc 2 µM		9.78148	17.6048
Curc 10 µM - Curc 20 µM	*	-30.385	17.6048
Curc 10 µM - Curc 5 µM		-10.0937	17.6048
Curc 10 µM - PLGA-PEG_C 0.2 µM		-17.0754	17.6048
Curc 10 µM - PLGA-PEG_C 10 µM		-12.7992	17.6048
Curc 10 µM - PLGA-PEG_C 2 µM	*	-25.2862	17.6048
Curc 10 µM - PLGA-PEG_C 5 µM	*	-23.4479	17.6048
Curc 10 µM - PLGA_C 0.2 µM		-6.29106	17.6048
Curc 10 µM - PLGA_C 10 µM		-13.3989	17.6048
Curc 10 µM - PLGA_C 2 µM	*	-19.5264	17.6048
Curc 10 µM - PLGA_C 5 µM		1.79717	17.6048
Curc 2 µM - Curc 20 µM	*	-40.1665	17.6048
Curc 2 µM - Curc 5 µM	*	-19.8751	17.6048
Curc 2 µM - PLGA-PEG_C 0.2 µM	*	-26.8569	17.6048
Curc 2 µM - PLGA-PEG_C 10 µM	*	-22.5806	17.6048
Curc 2 µM - PLGA-PEG_C 2 µM	*	-35.0676	17.6048
Curc 2 µM - PLGA-PEG_C 5 µM	*	-33.2294	17.6048
Curc 2 µM - PLGA_C 0.2 µM		-16.0725	17.6048
Curc 2 µM - PLGA_C 10 µM	*	-23.1804	17.6048
Curc 2 µM - PLGA_C 2 µM	*	-29.3078	17.6048
Curc 2 µM - PLGA_C 5 µM		-7.9843	17.6048
Curc 20 µM - Curc 5 µM	*	20.2914	17.6048
Curc 20 µM - PLGA-PEG_C 0.2 µM		13.3096	17.6048
Curc 20 µM - PLGA-PEG_C 10 µM		17.5858	17.6048
Curc 20 µM - PLGA-PEG_C 2 µM		5.09886	17.6048
Curc 20 µM - PLGA-PEG_C 5 µM		6.93709	17.6048
Curc 20 µM - PLGA_C 0.2 µM	*	24.094	17.6048
Curc 20 µM - PLGA_C 10 µM		16.9861	17.6048
Curc 20 µM - PLGA_C 2 µM		10.8587	17.6048
Curc 20 µM - PLGA_C 5 µM	*	32.1822	17.6048
Curc 5 µM - PLGA-PEG_C 0.2 µM		-6.98172	17.6048
Curc 5 µM - PLGA-PEG_C 10 µM		-2.70552	17.6048
Curc 5 µM - PLGA-PEG_C 2 µM		-15.1925	17.6048
Curc 5 µM - PLGA-PEG_C 5 µM		-13.3543	17.6048
Curc 5 µM - PLGA_C 0.2 µM		3.80259	17.6048
Curc 5 µM - PLGA_C 10 µM		-3.30525	17.6048
Curc 5 µM - PLGA_C 2 µM		-9.4327	17.6048
Curc 5 µM - PLGA_C 5 µM		11.8908	17.6048
PLGA-PEG_C 0.2 µM - PLGA-PEG_C 10 µM		4.27621	17.6048
PLGA-PEG_C 0.2 µM - PLGA-PEG_C 2 µM		-8.21078	17.6048
PLGA-PEG_C 0.2 µM - PLGA-PEG_C 5 µM		-6.37255	17.6048
PLGA-PEG_C 0.2 µM - PLGA_C 0.2 µM		10.7843	17.6048
PLGA-PEG_C 0.2 µM - PLGA_C 10 µM		3.67647	17.6048
PLGA-PEG_C 0.2 µM - PLGA_C 2 µM		-2.45098	17.6048
PLGA-PEG_C 0.2 µM - PLGA_C 5 µM	*	18.8725	17.6048
PLGA-PEG_C 10 µM - PLGA-PEG_C 2 µM		-12.487	17.6048
PLGA-PEG_C 10 µM - PLGA-PEG_C 5 µM		-10.6488	17.6048
PLGA-PEG_C 10 µM - PLGA_C 0.2 µM		6.50811	17.6048
PLGA-PEG_C 10 µM - PLGA_C 10 µM		-0.599738	17.6048
PLGA-PEG_C 10 µM - PLGA_C 2 µM		-6.72719	17.6048
PLGA-PEG_C 10 µM - PLGA_C 5 µM		14.5963	17.6048

PLGA-PEG_C 2 µM - PLGA-PEG_C 5 µM		1.83824	17.6048
PLGA-PEG_C 2 µM - PLGA_C 0.2 µM	*	18.9951	17.6048
PLGA-PEG_C 2 µM - PLGA_C 10 µM		11.8873	17.6048
PLGA-PEG_C 2 µM - PLGA_C 2 µM		5.7598	17.6048
PLGA-PEG_C 2 µM - PLGA_C 5 µM	*	27.0833	17.6048
PLGA-PEG_C 5 µM - PLGA_C 0.2 µM		17.1569	17.6048
PLGA-PEG_C 5 µM - PLGA_C 10 µM		10.049	17.6048
PLGA-PEG_C 5 µM - PLGA_C 2 µM		3.92157	17.6048
PLGA-PEG_C 5 µM - PLGA_C 5 µM	*	25.2451	17.6048
PLGA_C 0.2 µM - PLGA_C 10 µM		-7.10784	17.6048
PLGA_C 0.2 µM - PLGA_C 2 µM		-13.2353	17.6048
PLGA_C 0.2 µM - PLGA_C 5 µM		8.08824	17.6048
PLGA_C 10 µM - PLGA_C 2 µM		-6.12745	17.6048
PLGA_C 10 µM - PLGA_C 5 µM		15.1961	17.6048
PLGA_C 2 µM - PLGA_C 5 µM	*	21.3235	17.6048

* indica una diferencia significativa.

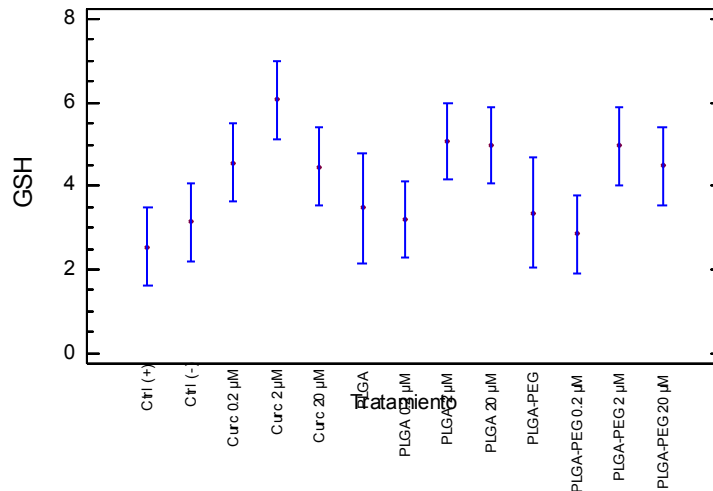
Análisis estadístico para la cuantificación de GSH en células expuestas a los diferentes tratamientos.

Tabla ANOVA para la cuantificación de GSH por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	51.9014	12	4.32512	2.61	0.0135
Intra grupos	58.0392	35	1.65826		
Total (Corr.)	109.941	47			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los valores de GSH entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de múltiple rangos para la cuantificación de GSH por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Ctrl (+)	4	2.54644	X
PLGA-PEG 0.2 µM	4	2.85294	XX
Ctrl (-)	4	3.13014	XXX
PLGA 0.2 µM	4	3.21318	XXXX
PLGA-PEG	2	3.36162	XXXXXX

PLGA	2	3.46971	XXXXXX
Curc 20 µM	4	4.463	XXXXXX
PLGA-PEG 20 µM	4	4.48495	XXXXXX
Curc 0.2 µM	4	4.56044	XXXXXX
PLGA-PEG 2 µM	4	4.95357	XXXX
PLGA 20 µM	4	4.97875	XXX
PLGA 2 µM	4	5.08337	XX
Curc 2 µM	4	6.0682	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Ctrl (+) - Ctrl (-)		-0.583702	1.84855
Ctrl (+) - Curc 0.2 µM	*	-2.014	1.84855
Ctrl (+) - Curc 2 µM	*	-3.52176	1.84855
Ctrl (+) - Curc 20 µM	*	-1.91657	1.84855
Ctrl (+) - PLGA		-0.923275	2.26401
Ctrl (+) - PLGA 0.2 µM		-0.66674	1.84855
Ctrl (+) - PLGA 2 µM	*	-2.53693	1.84855
Ctrl (+) - PLGA 20 µM	*	-2.43231	1.84855
Ctrl (+) - PLGA-PEG		-0.815181	2.26401
Ctrl (+) - PLGA-PEG 0.2 µM		-0.306501	1.84855
Ctrl (+) - PLGA-PEG 2 µM	*	-2.40714	1.84855
Ctrl (+) - PLGA-PEG 20 µM	*	-1.93852	1.84855
Ctrl (-) - Curc 0.2 µM		-1.4303	1.84855
Ctrl (-) - Curc 2 µM	*	-2.93806	1.84855
Ctrl (-) - Curc 20 µM		-1.33287	1.84855
Ctrl (-) - PLGA		-0.339573	2.26401
Ctrl (-) - PLGA 0.2 µM		-0.0830383	1.84855
Ctrl (-) - PLGA 2 µM	*	-1.95323	1.84855
Ctrl (-) - PLGA 20 µM	*	-1.84861	1.84855
Ctrl (-) - PLGA-PEG		-0.231479	2.26401
Ctrl (-) - PLGA-PEG 0.2 µM		0.277201	1.84855
Ctrl (-) - PLGA-PEG 2 µM		-1.82344	1.84855
Ctrl (-) - PLGA-PEG 20 µM		-1.35482	1.84855
Curc 0.2 µM - Curc 2 µM		-1.50776	1.84855
Curc 0.2 µM - Curc 20 µM		0.0974341	1.84855
Curc 0.2 µM - PLGA		1.09073	2.26401
Curc 0.2 µM - PLGA 0.2 µM		1.34726	1.84855
Curc 0.2 µM - PLGA 2 µM		-0.522928	1.84855
Curc 0.2 µM - PLGA 20 µM		-0.418312	1.84855
Curc 0.2 µM - PLGA-PEG		1.19882	2.26401
Curc 0.2 µM - PLGA-PEG 0.2 µM		1.7075	1.84855
Curc 0.2 µM - PLGA-PEG 2 µM		-0.393136	1.84855
Curc 0.2 µM - PLGA-PEG 20 µM		0.0754836	1.84855
Curc 2 µM - Curc 20 µM		1.6052	1.84855
Curc 2 µM - PLGA	*	2.59849	2.26401
Curc 2 µM - PLGA 0.2 µM	*	2.85502	1.84855
Curc 2 µM - PLGA 2 µM		0.984834	1.84855
Curc 2 µM - PLGA 20 µM		1.08945	1.84855
Curc 2 µM - PLGA-PEG	*	2.70658	2.26401
Curc 2 µM - PLGA-PEG 0.2 µM	*	3.21526	1.84855
Curc 2 µM - PLGA-PEG 2 µM		1.11463	1.84855
Curc 2 µM - PLGA-PEG 20 µM		1.58325	1.84855
Curc 20 µM - PLGA		0.993293	2.26401
Curc 20 µM - PLGA 0.2 µM		1.24983	1.84855
Curc 20 µM - PLGA 2 µM		-0.620362	1.84855
Curc 20 µM - PLGA 20 µM		-0.515746	1.84855
Curc 20 µM - PLGA-PEG		1.10139	2.26401
Curc 20 µM - PLGA-PEG 0.2 µM		1.61007	1.84855

Curc 20 µM - PLGA-PEG 2 µM		-0.49057	1.84855
Curc 20 µM - PLGA-PEG 20 µM		-0.0219505	1.84855
PLGA - PLGA 0.2 µM		0.256534	2.26401
PLGA - PLGA 2 µM		-1.61366	2.26401
PLGA - PLGA 20 µM		-1.50904	2.26401
PLGA - PLGA-PEG		0.108094	2.61425
PLGA - PLGA-PEG 0.2 µM		0.616773	2.26401
PLGA - PLGA-PEG 2 µM		-1.48386	2.26401
PLGA - PLGA-PEG 20 µM		-1.01524	2.26401
PLGA 0.2 µM - PLGA 2 µM	*	-1.87019	1.84855
PLGA 0.2 µM - PLGA 20 µM		-1.76557	1.84855
PLGA 0.2 µM - PLGA-PEG		-0.148441	2.26401
PLGA 0.2 µM - PLGA-PEG 0.2 µM		0.360239	1.84855
PLGA 0.2 µM - PLGA-PEG 2 µM		-1.7404	1.84855
PLGA 0.2 µM - PLGA-PEG 20 µM		-1.27178	1.84855
PLGA 2 µM - PLGA 20 µM		0.104616	1.84855
PLGA 2 µM - PLGA-PEG		1.72175	2.26401
PLGA 2 µM - PLGA-PEG 0.2 µM	*	2.23043	1.84855
PLGA 2 µM - PLGA-PEG 2 µM		0.129792	1.84855
PLGA 2 µM - PLGA-PEG 20 µM		0.598412	1.84855
PLGA 20 µM - PLGA-PEG		1.61713	2.26401
PLGA 20 µM - PLGA-PEG 0.2 µM	*	2.12581	1.84855
PLGA 20 µM - PLGA-PEG 2 µM		0.0251757	1.84855
PLGA 20 µM - PLGA-PEG 20 µM		0.493795	1.84855
PLGA-PEG - PLGA-PEG 0.2 µM		0.508679	2.26401
PLGA-PEG - PLGA-PEG 2 µM		-1.59196	2.26401
PLGA-PEG - PLGA-PEG 20 µM		-1.12334	2.26401
PLGA-PEG 0.2 µM - PLGA-PEG 2 µM	*	-2.10064	1.84855
PLGA-PEG 0.2 µM - PLGA-PEG 20 µM		-1.63202	1.84855
PLGA-PEG 2 µM - PLGA-PEG 20 µM		0.468619	1.84855

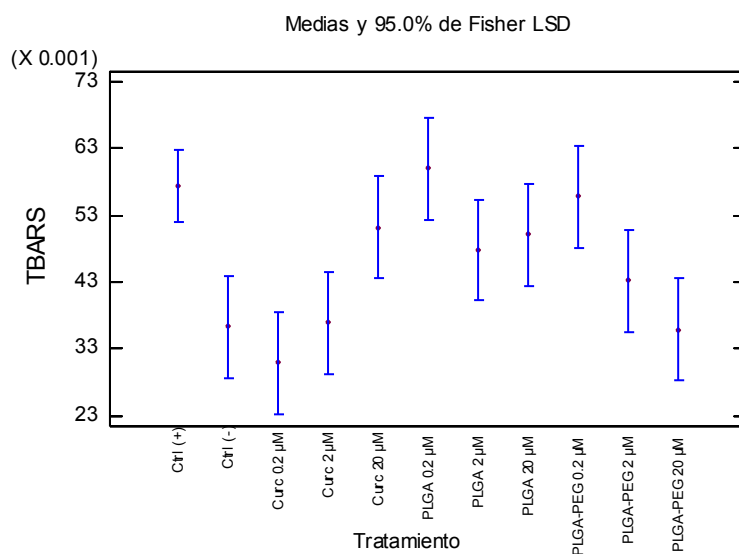
* indica una diferencia significativa.

Análisis estadístico para el ensayo de TBARS en células expuestas a los diferentes tratamientos.

Tabla ANOVA para el ensayo de TBARS por tratamiento

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.00333515	10	0.000333515	4.04	0.0022
Intra grupos	0.0020662	25	0.000082648		
Total (Corr.)	0.00540135	35			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de los valores de TBARS entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.



Pruebas de múltiple rangos para el ensayo de TBARS por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Curc 0.2 μM	3	0.0308992	X
PLGA-PEG 20 μM	3	0.0358569	XX
Ctrl (-)	3	0.0363062	XXX
Curc 2 μM	3	0.0369634	XXX
PLGA-PEG 2 μM	3	0.0431661	XXXX
PLGA 2 μM	3	0.0478143	XXXX
PLGA 20 μM	3	0.0501484	XXXX
Curc 20 μM	3	0.0512554	XXXX
PLGA-PEG 0.2 μM	3	0.0558615	XX
Ctrl (+)	6	0.0575188	X
PLGA 0.2 μM	3	0.0600406	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Ctrl (+) - Ctrl (-)	*	0.0212126	0.0132395
Ctrl (+) - Curc 0.2 μM	*	0.0266195	0.0132395
Ctrl (+) - Curc 2 μM	*	0.0205554	0.0132395
Ctrl (+) - Curc 20 μM		0.00626335	0.0132395
Ctrl (+) - PLGA 0.2 μM		-0.00252185	0.0132395
Ctrl (+) - PLGA 2 μM		0.00970452	0.0132395
Ctrl (+) - PLGA 20 μM		0.00737034	0.0132395
Ctrl (+) - PLGA-PEG 0.2 μM		0.00165724	0.0132395
Ctrl (+) - PLGA-PEG 2 μM	*	0.0143527	0.0132395
Ctrl (+) - PLGA-PEG 20 μM	*	0.0216619	0.0132395
Ctrl (-) - Curc 0.2 μM		0.00540698	0.0152877
Ctrl (-) - Curc 2 μM		-0.000657137	0.0152877
Ctrl (-) - Curc 20 μM		-0.0149492	0.0152877
Ctrl (-) - PLGA 0.2 μM	*	-0.0237344	0.0152877
Ctrl (-) - PLGA 2 μM		-0.011508	0.0152877
Ctrl (-) - PLGA 20 μM		-0.0138422	0.0152877
Ctrl (-) - PLGA-PEG 0.2 μM	*	-0.0195553	0.0152877
Ctrl (-) - PLGA-PEG 2 μM		-0.00685984	0.0152877
Ctrl (-) - PLGA-PEG 20 μM		0.000449354	0.0152877
Curc 0.2 μM - Curc 2 μM		-0.00606412	0.0152877

Curc 0.2 µM - Curc 20 µM	*	-0.0203562	0.0152877
Curc 0.2 µM - PLGA 0.2 µM	*	-0.0291414	0.0152877
Curc 0.2 µM - PLGA 2 µM	*	-0.016915	0.0152877
Curc 0.2 µM - PLGA 20 µM	*	-0.0192492	0.0152877
Curc 0.2 µM - PLGA-PEG 0.2 µM	*	-0.0249623	0.0152877
Curc 0.2 µM - PLGA-PEG 2 µM		-0.0122668	0.0152877
Curc 0.2 µM - PLGA-PEG 20 µM		-0.00495763	0.0152877
Curc 2 µM - Curc 20 µM		-0.0142921	0.0152877
Curc 2 µM - PLGA 0.2 µM	*	-0.0230773	0.0152877
Curc 2 µM - PLGA 2 µM		-0.0108509	0.0152877
Curc 2 µM - PLGA 20 µM		-0.0131851	0.0152877
Curc 2 µM - PLGA-PEG 0.2 µM	*	-0.0188982	0.0152877
Curc 2 µM - PLGA-PEG 2 µM		-0.0062027	0.0152877
Curc 2 µM - PLGA-PEG 20 µM		0.00110649	0.0152877
Curc 20 µM - PLGA 0.2 µM		-0.0087852	0.0152877
Curc 20 µM - PLGA 2 µM		0.00344117	0.0152877
Curc 20 µM - PLGA 20 µM		0.00110699	0.0152877
Curc 20 µM - PLGA-PEG 0.2 µM		-0.00460611	0.0152877
Curc 20 µM - PLGA-PEG 2 µM		0.00808936	0.0152877
Curc 20 µM - PLGA-PEG 20 µM	*	0.0153986	0.0152877
PLGA 0.2 µM - PLGA 2 µM		0.0122264	0.0152877
PLGA 0.2 µM - PLGA 20 µM		0.00989219	0.0152877
PLGA 0.2 µM - PLGA-PEG 0.2 µM		0.00417909	0.0152877
PLGA 0.2 µM - PLGA-PEG 2 µM	*	0.0168746	0.0152877
PLGA 0.2 µM - PLGA-PEG 20 µM	*	0.0241838	0.0152877
PLGA 2 µM - PLGA 20 µM		-0.00233418	0.0152877
PLGA 2 µM - PLGA-PEG 0.2 µM		-0.00804728	0.0152877
PLGA 2 µM - PLGA-PEG 2 µM		0.00464819	0.0152877
PLGA 2 µM - PLGA-PEG 20 µM		0.0119574	0.0152877
PLGA 20 µM - PLGA-PEG 0.2 µM		-0.0057131	0.0152877
PLGA 20 µM - PLGA-PEG 2 µM		0.00698238	0.0152877
PLGA 20 µM - PLGA-PEG 20 µM		0.0142916	0.0152877
PLGA-PEG 0.2 µM - PLGA-PEG 2 µM		0.0126955	0.0152877
PLGA-PEG 0.2 µM - PLGA-PEG 20 µM	*	0.0200047	0.0152877
PLGA-PEG 2 µM - PLGA-PEG 20 µM		0.00730919	0.0152877

* indica una diferencia significativa.

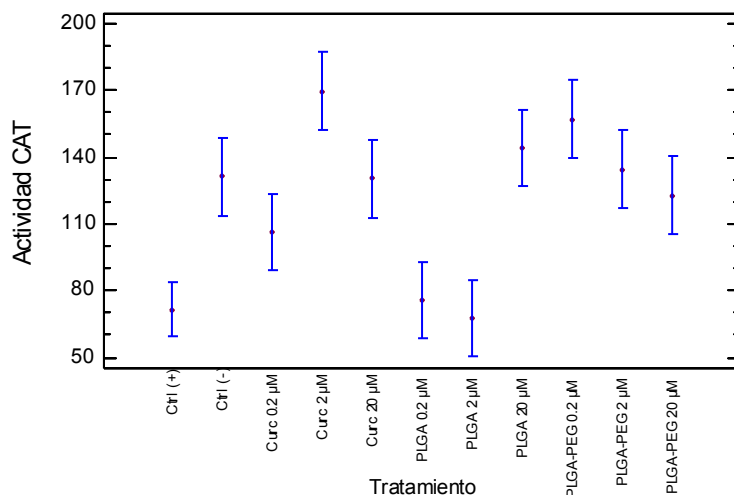
Análisis estadístico para la actividad de la enzima catalasa en células expuestas a los diferentes tratamientos.

Tabla ANOVA para actividad de la enzima CAT por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	28460.4	13	2846.04	11.05	0.0001
Intra grupos	3348.35	28	257.566		
Total (Corr.)	31808.7	41			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de actividad de la enzima CAT entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de múltiple rangos para la actividad de la enzima CAT por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PLGA 2 µM	3	67.4473	X
Ctrl (+)	3	71.3545	X
PLGA 0.2 µM	3	75.6015	XX
Curc 0.2 µM	3	106.372	XX
PLGA-PEG 20 µM	3	122.873	XX
Curc 20 µM	3	130.303	XX
Ctrl (-)	3	131.322	XX
PLGA-PEG 2 µM	3	134.62	XX
PLGA 20 µM	3	143.989	XX
PLGA-PEG 0.2 µM	3	157.038	XX
Curc 2 µM	3	169.567	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Ctrl (+) - Ctrl (-)	*	-59.9674	30.0264
Ctrl (+) - Curc 0.2 µM	*	-35.0178	30.0264
Ctrl (+) - Curc 2 µM	*	-98.213	30.0264
Ctrl (+) - Curc 20 µM	*	-58.9482	30.0264
Ctrl (+) - PLGA 0.2 µM		-4.24699	30.0264
Ctrl (+) - PLGA 2 µM		3.90723	30.0264
Ctrl (+) - PLGA 20 µM	*	-72.6342	30.0264
Ctrl (+) - PLGA-PEG 0.2 µM	*	-85.6835	30.0264
Ctrl (+) - PLGA-PEG 2 µM	*	-63.2655	30.0264
Ctrl (+) - PLGA-PEG 20 µM	*	-51.5188	30.0264
Ctrl (-) - Curc 0.2 µM		24.9496	34.6715
Ctrl (-) - Curc 2 µM	*	-38.2455	34.6715
Ctrl (-) - Curc 20 µM		1.01928	34.6715
Ctrl (-) - PLGA 0.2 µM	*	55.7205	34.6715
Ctrl (-) - PLGA 2 µM	*	63.8747	34.6715
Ctrl (-) - PLGA 20 µM		-12.6668	34.6715
Ctrl (-) - PLGA-PEG 0.2 µM		-25.7161	34.6715
Ctrl (-) - PLGA-PEG 2 µM		-3.2981	34.6715
Ctrl (-) - PLGA-PEG 20 µM		8.44867	34.6715
Curc 0.2 µM - Curc 2 µM	*	-63.1951	34.6715
Curc 0.2 µM - Curc 20 µM		-23.9303	34.6715

Curc 0.2 µM - PLGA 0.2 µM		30.7708	34.6715
Curc 0.2 µM - PLGA 2 µM	*	38.925	34.6715
Curc 0.2 µM - PLGA 20 µM	*	-37.6164	34.6715
Curc 0.2 µM - PLGA-PEG 0.2 µM	*	-50.6657	34.6715
Curc 0.2 µM - PLGA-PEG 2 µM		-28.2477	34.6715
Curc 0.2 µM - PLGA-PEG 20 µM		-16.501	34.6715
Curc 2 µM - Curc 20 µM	*	39.2648	34.6715
Curc 2 µM - PLGA 0.2 µM	*	93.966	34.6715
Curc 2 µM - PLGA 2 µM	*	102.12	34.6715
Curc 2 µM - PLGA 20 µM		25.5787	34.6715
Curc 2 µM - PLGA-PEG 0.2 µM		12.5294	34.6715
Curc 2 µM - PLGA-PEG 2 µM	*	34.9474	34.6715
Curc 2 µM - PLGA-PEG 20 µM	*	46.6942	34.6715
Curc 20 µM - PLGA 0.2 µM	*	54.7012	34.6715
Curc 20 µM - PLGA 2 µM	*	62.8554	34.6715
Curc 20 µM - PLGA 20 µM		-13.6861	34.6715
Curc 20 µM - PLGA-PEG 0.2 µM		-26.7354	34.6715
Curc 20 µM - PLGA-PEG 2 µM		-4.31738	34.6715
Curc 20 µM - PLGA-PEG 20 µM		7.42939	34.6715
PLGA 0.2 µM - PLGA 2 µM		8.15421	34.6715
PLGA 0.2 µM - PLGA 20 µM	*	-68.3873	34.6715
PLGA 0.2 µM - PLGA-PEG 0.2 µM	*	-81.4365	34.6715
PLGA 0.2 µM - PLGA-PEG 2 µM	*	-59.0186	34.6715
PLGA 0.2 µM - PLGA-PEG 20 µM	*	-47.2718	34.6715
PLGA 2 µM - PLGA 20 µM	*	-76.5415	34.6715
PLGA 2 µM - PLGA-PEG 0.2 µM	*	-89.5907	34.6715
PLGA 2 µM - PLGA-PEG 2 µM	*	-67.1728	34.6715
PLGA 2 µM - PLGA-PEG 20 µM	*	-55.426	34.6715
PLGA 20 µM - PLGA-PEG 0.2 µM		-13.0493	34.6715
PLGA 20 µM - PLGA-PEG 2 µM		9.36871	34.6715
PLGA 20 µM - PLGA-PEG 20 µM		21.1155	34.6715
PLGA-PEG 0.2 µM - PLGA-PEG 2 µM		22.418	34.6715
PLGA-PEG 0.2 µM - PLGA-PEG 20 µM		34.1648	34.6715
PLGA-PEG 2 µM - PLGA-PEG 20 µM		11.7468	34.6715

* indica una diferencia significativa.

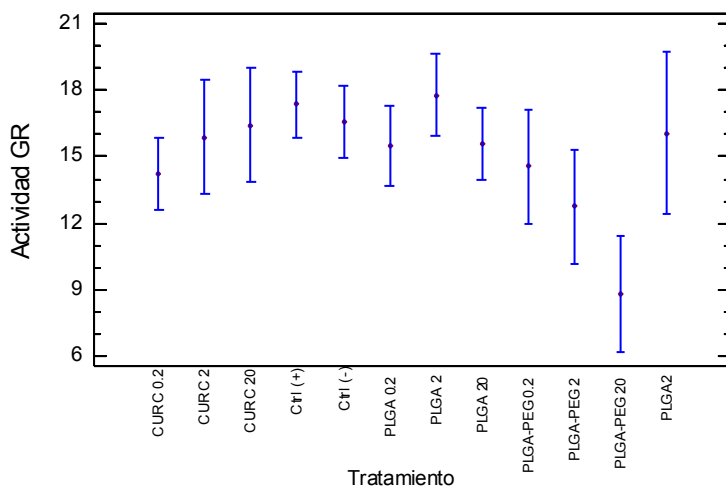
Análisis estadístico para la actividad de la enzima glutación reductasa (GR) en células expuestas a los diferentes tratamientos.

Tabla ANOVA para la actividad de la enzima GR por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	162.892	11	14.8084	2.34	0.0337
Intra grupos	176.823	28	6.31512		
Total (Corr.)	339.716	39			

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la actividad de la enzima GR entre un nivel de tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de múltiple rangos para la actividad de la enzima GR por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PLGA-PEG 20	2	8.83	X
PLGA-PEG 2	2	12.765	XX
CURC 0.2	5	14.234	XX
PLGA-PEG 0.2	2	14.55	XXX
PLGA 0.2	4	15.5075	XXX
PLGA 20	5	15.574	XXX
CURC 2	2	15.865	XXX
PLGA2	1	16.07	XXX
CURC 20	2	16.425	XXX
Ctrl (-)	5	16.598	XXX
Ctrl (+)	6	17.3383	XX
PLGA 2	4	17.77	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
CURC 0.2 - CURC 2		-1.631	4.30682
CURC 0.2 - CURC 20		-2.191	4.30682
CURC 0.2 - Ctrl (+)		-3.10433	3.11705
CURC 0.2 - Ctrl (-)		-2.364	3.25565
CURC 0.2 - PLGA 0.2		-1.2735	3.45314
CURC 0.2 - PLGA 2	*	-3.536	3.45314
CURC 0.2 - PLGA 20		-1.34	3.25565
CURC 0.2 - PLGA-PEG 0.2		-0.316	4.30682
CURC 0.2 - PLGA-PEG 2		1.469	4.30682
CURC 0.2 - PLGA-PEG 20	*	5.404	4.30682
CURC 0.2 - PLGA2		-1.836	5.63895
CURC 2 - CURC 20		-0.56	5.14764
CURC 2 - Ctrl (+)		-1.47333	4.20303
CURC 2 - Ctrl (-)		-0.733	4.30682
CURC 2 - PLGA 0.2		0.3575	4.45798
CURC 2 - PLGA 2		-1.905	4.45798
CURC 2 - PLGA 20		0.291	4.30682
CURC 2 - PLGA-PEG 0.2		1.315	5.14764
CURC 2 - PLGA-PEG 2		3.1	5.14764
CURC 2 - PLGA-PEG 20	*	7.035	5.14764

CURC 2 - PLGA2		-0.205	6.30454
CURC 20 - Ctrl (+)		-0.913333	4.20303
CURC 20 - Ctrl (-)		-0.173	4.30682
CURC 20 - PLGA 0.2		0.9175	4.45798
CURC 20 - PLGA 2		-1.345	4.45798
CURC 20 - PLGA 20		0.851	4.30682
CURC 20 - PLGA-PEG 0.2		1.875	5.14764
CURC 20 - PLGA-PEG 2		3.66	5.14764
CURC 20 - PLGA-PEG 20	*	7.595	5.14764
CURC 20 - PLGA2		0.355	6.30454
Ctrl (+) - Ctrl (-)		0.740333	3.11705
Ctrl (+) - PLGA 0.2		1.83083	3.32278
Ctrl (+) - PLGA 2		-0.431667	3.32278
Ctrl (+) - PLGA 20		1.76433	3.11705
Ctrl (+) - PLGA-PEG 0.2		2.78833	4.20303
Ctrl (+) - PLGA-PEG 2	*	4.57333	4.20303
Ctrl (+) - PLGA-PEG 20	*	8.50833	4.20303
Ctrl (+) - PLGA2		1.26833	5.56008
Ctrl (-) - PLGA 0.2		1.0905	3.45314
Ctrl (-) - PLGA 2		-1.172	3.45314
Ctrl (-) - PLGA 20		1.024	3.25565
Ctrl (-) - PLGA-PEG 0.2		2.048	4.30682
Ctrl (-) - PLGA-PEG 2		3.833	4.30682
Ctrl (-) - PLGA-PEG 20	*	7.768	4.30682
Ctrl (-) - PLGA2		0.528	5.63895
PLGA 0.2 - PLGA 2		-2.2625	3.63993
PLGA 0.2 - PLGA 20		-0.0665	3.45314
PLGA 0.2 - PLGA-PEG 0.2		0.9575	4.45798
PLGA 0.2 - PLGA-PEG 2		2.7425	4.45798
PLGA 0.2 - PLGA-PEG 20	*	6.6775	4.45798
PLGA 0.2 - PLGA2		-0.5625	5.75523
PLGA 2 - PLGA 20		2.196	3.45314
PLGA 2 - PLGA-PEG 0.2		3.22	4.45798
PLGA 2 - PLGA-PEG 2	*	5.005	4.45798
PLGA 2 - PLGA-PEG 20	*	8.94	4.45798
PLGA 2 - PLGA2		1.7	5.75523
PLGA 20 - PLGA-PEG 0.2		1.024	4.30682
PLGA 20 - PLGA-PEG 2		2.809	4.30682
PLGA 20 - PLGA-PEG 20	*	6.744	4.30682
PLGA 20 - PLGA2		-0.496	5.63895
PLGA-PEG 0.2 - PLGA-PEG 2		1.785	5.14764
PLGA-PEG 0.2 - PLGA-PEG 20	*	5.72	5.14764
PLGA-PEG 0.2 - PLGA2		-1.52	6.30454
PLGA-PEG 2 - PLGA-PEG 20		3.935	5.14764
PLGA-PEG 2 - PLGA2		-3.305	6.30454
PLGA-PEG 20 - PLGA2	*	-7.24	6.30454

* indica una diferencia significativa.