



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE NUEVOS
MEDICAMENTOS PARA ENFERMEDADES
NEURODEGENERATIVAS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

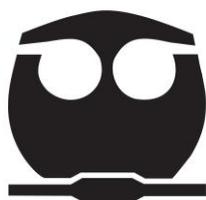
P R E S E N T A:

BRENDA ANAHÍ MEJÍA CONTRERAS

**ASESOR DE TESIS :
GERARDO LEYVA GÓMEZ**

**SUPERVISOR TÉCNICO :
MARÍA LUISA DEL PRADO AUDELO**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ENRIQUE AMADOR GONZÁLEZ

VOCAL: MARÍA GUADALUPE LEMUS BARAJAS

SECRETARIO: GERARDO LEYVA GÓMEZ

1er. SUPLENTE: MARÍA DEL ROSARIO LÓPEZ GARCÍA

2do. SUPLENTE: AURORA ANAIS ZURITA CRUZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 307, segundo piso del edificio F, Facultad de Química. Circuito Exterior S/N, Coyoacán, Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, CDMX.

ASESOR DEL TEMA:

GERARDO LEYVA GÓMEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

MARÍA LUISA DEL PRADO AUDELO

SUSTENTANTE:

BRENDA ANAHÍ MEJÍA CONTRERAS

Financiamiento

En nombre de los doctores María Luisa Del Prado Audelo y Gerardo Leyva Gómez, me permito extender también un profundo agradecimiento hacia la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (Becas Posdoctorales, PAPIIT TA 200318) y a CONACYT (A1-S-15759) por la colaboración brindada a nuestro proyecto de investigación, ya que gracias a ello pudimos cumplir con las actividades propuestas.

Índice

1. Lista de abreviaturas y signos.....	7
2. Lista de tablas.....	10
3. Lista de figuras.....	11
4. Resumen.....	14
5. Marco teórico.....	19
5.1 Enfermedades neurodegenerativas.....	19
5.1.1 Enfermedad de Alzheimer.....	19
5.1.2 Enfermedad de Parkinson.....	21
5.1.3 Tratamientos farmacológicos.....	23
5.2 Barrera hematoencefálica.....	24
5.3 Especies reactivas de oxígeno.....	26
5.3.1 Estrés oxidativo.....	28
5.4 Curcumina.....	28
5.5 Nanotecnología.....	31
5.5.1 Nanopartículas.....	31
5.5.2 Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas.....	32
5.5.2.1 Procedimientos en dos etapas basados en emulsificación.....	37
5.5.2.1.1 Emulsificación- evaporación de disolvente.....	39
5.5.2.1.2 Emulsificación-difusión del disolvente.....	40
5.5.2.1.3 Salting-out.....	43
5.5.2.2 Procedimientos de un paso.....	45
5.5.2.2.1 Método de nanoprecipitación.....	45
5.5.2.2.2 Diálisis.....	49
5.5.2.2.3 Tecnología de fluidos supercríticos.....	51
5.6 Poli- ϵ -caprolactona.....	54
5.7 Tipos de fuerzas presentes en las dispersiones.....	55
5.7.1 Fuerzas de interacción molecular	55
5.7.2 Fuerzas electrostáticas: formación de la doble capa.....	56
5.7.3 Fuerzas de atracción y repulsión combinadas.....	57
5.8 Estabilizantes.....	59

5.8.1	Tipos de estabilización.....	60
5.8.1.1	Estabilización electrostática.....	60
5.8.1.2	Estabilización por impedimento estérico.....	62
5.8.1.2.1	Pluronic®	63
5.8.1.2.1.1	Pluronic® F68.....	64
6.	Justificación.....	66
7.	Objetivos.....	67
7.1	Objetivo general.....	67
7.2	Objetivo particular.....	67
8.	Hipótesis.....	68
9.	Material y metodología.....	69
9.1	Obtención de nanopartículas de poli-ε-caprolactona cargadas con curcumina usando Pluronic® F-68 como estabilizante.....	69
9.1.1	Obtención de nanopartículas mediante el método de emulsificación-difusión.....	69
9.1.1.1	Saturación de fases.....	69
9.1.1.2	Preparación del estabilizante.....	69
9.1.1.3	Preparación del polímero.....	70
9.1.1.4	Emulsificación.....	70
9.1.1.5	Difusión.....	70
9.1.1.6	Evaporación del disolvente.....	70
9.1.1.7	Purificación.....	73
9.1.1.8	Liofilización.....	73
9.2	Caracterización fisicoquímica.....	73
9.2.1	Tamaño de partícula y medición del potencial zeta.....	73
9.2.2	Caracterización morfológica.....	74
9.2.3	Análisis de las interacciones químicas.....	74
9.2.4	Propiedades térmicas.....	75
9.2.4.1	Análisis Termogravimétrico (TGA)	75
9.2.4.2	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	75
9.2.5	Eficiencia de Encapsulación y carga del fármaco en las NPs.....	75

9.2.6	Liberación <i>in vitro</i> de curcumina.....	76
9.3	Caracterización biológica.....	77
9.3.1	Cultivo celular.....	77
9.3.2	Citotoxicidad <i>in vitro</i> de las NPs.....	78
9.3.3	Captación celular de las NPs de Curcumina-PCL/F68.....	79
10	Resultados y discusión.....	80
10.1	Caracterización fisicoquímica.....	80
10.1.1	Tamaño de partícula y medición del potencial zeta.....	80
10.1.2	Caracterización morfológica.....	85
10.1.3	Análisis de las interacciones químicas.....	86
10.1.3.1	Propiedades térmicas.....	88
10.1.3.2	Análisis Termogravimétrico (TGA)	88
10.1.3.3	Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)	90
10.1.4	Eficiencia de Encapsulación y carga del fármaco en las NPs.....	92
10.1.5	Liberación <i>in vitro</i> de curcumina.....	93
10.2	Caracterización biológica.....	97
10.2.1	Citotoxicidad <i>in vitro</i> de las NPs.....	97
10.2.2	Captación celular de las NPs.....	99
11	Conclusiones.....	105
12	Referencias.....	107
13	Anexos.....	127
13.1	Validación del método analítico de cuantificación de Curcumina.....	127
13.2	Ajuste de los datos obtenidos en el perfil de liberación <i>in vitro</i> de Curcumina.....	131

1. Lista de abreviaturas y signos

$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
α -syn	α -sinucleína
μm	Micrómetros
ρ	Densidad
A β	Proteínas amiloides beta
ABC	Transportadores de salida dependientes de ATP
AcOEt	Acetato de Etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica, por sus siglas en inglés
ATP	Adenosin trifosfato, por sus siglas en inglés
BHE	Barrera hematoencefálica
CAT	Catalasa
CMC	Concentración micelar crítica
CO ₂	Dióxido de carbono
Da	Daltons
DL	Carga de fármaco, por sus siglas en inglés
DLS	Dispersión dinámica de la luz, por sus siglas en inglés
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetría diferencial del barrido, por sus siglas en inglés
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Eficiencia de Encapsulación
EP	Enfermedad de Parkinson
FAS	Fase Acuosa Saturada
FBS	Suero Fetal Bovino
FDA	Administración de alimentos y medicamentos, por sus siglas en inglés
FOS	Fase Orgánica Saturada

FTIR	Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier, por sus siglas en inglés
g	Gramo (unidad de masa)
GAS	Proceso antidisolvente de gases
Gpx	Glutación peroxidasa
GVU	Unidad gliovascular
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
h	Horas (unidad de tiempo)
L-dopa	Levodopa
min	Minutos (unidad de tiempo)
mg	Miligramos (unidad de masa)
ml	Mililitros (unidad de volumen)
mm	Milímetros
MIO-M1	Línea celular glial humana de Müller
MTT	3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazolio
MWCO	Corte de peso molecular, por sus siglas en inglés
m/v	Relación masa/volumen
M3-PALS	Dispersión de luz para análisis de fase, por sus siglas en inglés
nm	Nanómetro
NPs	Nanopartículas
OW	Emulsión aceite en agua, por sus siglas en inglés
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OH [•]	Radical hidroxilo
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
P _c	Presión crítica
PCL	Poli-ε-caprolactona
PDI	Índice de Polidispersión
P-gp	Glicoproteína P
PGSS	Procesos de solución saturada de gas

PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PEO	Óxido de etileno
PPO	Óxido de propileno
RESS	Rápida expansión de las soluciones supercríticas
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SAS	Proceso de antisolventes supercríticos
scCO ₂	Dióxido de carbono supercrítico
SH-SY5Y	Línea celular de neuroblastoma humano
SCF	Fluidos supercríticos, por sus siglas en inglés
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido dismutasa
T _c	Temperatura crítica
TGA	Análisis Termogravimétrico, por sus siglas en inglés
T _m	Temperatura de fusión, por sus siglas en inglés
UV	Ultravioleta
Vol/vol	Relación volumen/volumen
W/O	Emulsión agua en aceite, por sus siglas en inglés

2. Lista de tablas

Tabla 1	Mortalidad quinquenal por enfermedad de Alzheimer en México, 1980-2014, según edad y sexo. (Celis-De la Rosa et al., 2017).
Tabla 2	Incidencia general y anual de la Enfermedad de Parkinson en subgrupos por género y edad (Rodríguez-Violante, Velásquez-Pérez, & Cervantes-Arriaga, 2019).
Tabla 3	Ejemplos de métodos preparativos, polímeros y encapsulantes (Pinto Reis, Neufeld, Ribeiro, & Veiga, 2006).
Tabla 4	Nanopartículas poliméricas: ventajas generales y desventajas de los métodos de preparación (Pinto Reis et al., 2006).
Tabla 5	Propiedades fisicoquímicas de la poli- ϵ -caprolactona (Mondal, Griffith, & Venkatraman, 2016b).
Tabla 6	Características de NPs de PCL/F68 y NPs de Curcumina-PCL/F68.
Tabla 7	Eventos térmicos.
Tabla 8	Modelado matemático de los perfiles de liberación.
Tabla 9	Datos de absorbancia obtenidos para la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, medidos a una longitud de onda $\lambda = 420 \text{ nm}$.
Tabla 10	Datos de absorbancia obtenidos para la concentración de 3 $\mu\text{g/ml}$, medidos a una longitud de onda $\lambda = 420 \text{ nm}$.
Tabla 11	Datos de absorbancia obtenidos para la concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$, medidos a una longitud de onda $\lambda = 420 \text{ nm}$.
Tabla 12	Datos de absorbancia obtenidos para la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$, medidos a una longitud de onda $\lambda = 420 \text{ nm}$.
Tabla 13	Datos de absorbancia obtenidos para la concentración de 6 $\mu\text{g/ml}$, medidos a una longitud de onda $\lambda = 420 \text{ nm}$.
Tabla 14	Parámetros de validación para la cuantificación de curcumina.
Tabla 15	Evaluación de precisión y exactitud como método de control de calidad interno.

3. Lista de figuras

Figura 1	Estructura anatómica de la barrera hematoencefálica.
Figura 2	Tipos de transporte a través de la barrera hematoencefálica.
Figura 3	Ejemplos de especies reactivas de oxígeno. La reducción consecutiva de oxígeno mediante la adición de electrones provoca la formación de una variedad de ROS, que incluyen superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($\cdot OH$), ion hidroxilo (OH^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El punto azul indica un electrón desapareado.
Figura 4	Estructura molecular de la curcumina.
Figura 5	Esquema de los métodos de obtención de nanopartículas más comunes.
Figura 6	Diagrama del método de emulsificación- evaporación del disolvente para la obtención de nanopartículas. Modificado de (Crucho & Barros, 2017).
Figura 7	Diagrama del método de emulsificación-difusión para la obtención de nanopartículas. Modificado de (David Quintanar-Guerrero, de la Luz Zambrano-Zaragoza, Gutierrez-Cortez, & Mendoza-Munoz, 2012).
Figura 8	Diagrama del método de salting-out para la obtención de nanopartículas. Modificado de (Crucho & Barros, 2017).
Figura 9	Diagrama del método de nanoprecipitación para la obtención de nanopartículas. Modificado de (Crucho & Barros, 2017).
Figura 10	Diagrama del método de diálisis para la obtención de nanopartículas. Modificado de (Crucho & Barros, 2017).
Figura 11	Estructura molecular de la poli- ϵ -caprolactona.
Figura 12	Formación de la doble capa eléctrica.
Figura 13	Efecto de las energías de atracción y repulsión en la estabilidad de las partículas coloidales.
Figura 14	Estabilización electrostática de partículas coloidales.
Figura 15	Estructura de la familia plurónica de copolímeros tribloque.

Figura 16	Esquema del método de obtención de nanopartículas mediante el método de emulsificación-difusión.
Figura 17	Nanopartícula de poli-ε-caprolactona cargada con curcumina y estabilizada con Pluronic® F68.
Figura 18	Características físicas de las nanopartículas. A) Nanopartículas de PCL/F68 en suspensión; B) Nanopartículas de PCL/F68 liofilizadas; C) Nanopartículas de Curcumina-PCL/F68 en suspensión; D) Nanopartículas de Curcumina-PCL/F68 liofilizadas; E) Gráfico representativo de la distribución de tamaño de las nanopartículas de Curcumina-PCL/F68 después de centrifugación medido por dispersión de luz.
Figura 19	Imágenes topográficas de nanopartículas de Curcumina-PCL/F68 obtenidas por AFM. Puede observarse una forma esférica en las nanopartículas.
Figura 20	Espectros FTIR de PCL (a), Pluronic® F68 (b), Curcumina (c), D-(+)-Trehalosa Deshidratada (d), Nanopartículas de PLC/F68 (e), y Nanopartículas de Curcumina-PCL/F68 (f).
Figura 21	Termograma TGA de PCL (a), Pluronic® F68 (b), curcumina (c), D-(+)-Trehalosa Deshidratada (d), Nanopartículas de PLC/F68 (e), y Nanopartículas de Curcumina-PCL/F68 (f).
Figura 22	Perfil de liberación de la curcumina. Se evaluó curcumina libre y curcumina atrapada en Nanopartículas de Curcumina-PCL/F68 en PBS (0.1 M) a 37 °C.
Figura 23	Evaluación de citotoxicidad de las Nanopartículas de PCL/F68 y de Curcumina-PCL/F68 a las 24 y 96 h con las células MIO-MI.
Figura 24	Evaluación de citotoxicidad de las nanopartículas de PCL/F68 y de Curcumina-PCL/F68 a las 24 y 96 h con las células SH-SY5Y.
Figura 25	Captación celular después de 1 y 5 h en las células MIO-MI evaluado por fluorescencia. A y B, Nanopartículas de PCL/F68 con Cumarina como control positivo. C y D, nanopartículas de Curcumina-PCL/F68 como sistema de interés. E y F, curcumina libre. El núcleo celular

	teñido con DAPI se observa en azul. La autofluorescencia de las nanopartículas se observa en verde. Las muestras se observaron a 63X.
Figura 26	Captación celular después de 5 h de nanopartículas de PCL/F68 (A y B), y después de 1 h de nanopartículas de Cur-PCL/F68 (C y D). Las flechas blancas muestran la presencia de nanopartículas dentro del núcleo de la célula. Las muestras se observaron a 63X.
Figura 27	Ajuste de los datos obtenidos en el método analítico de cuantificación de Curcumina.
Figura 28	Ajuste de los datos obtenidos en el perfil de liberación <i>in vitro</i> de Curcumina al modelo de Orden Cero.
Figura 29	Ajuste de los datos obtenidos en el perfil de liberación <i>in vitro</i> de Curcumina al modelo de Higuchi.
Figura 30	Ajuste de los datos obtenidos en el perfil de liberación <i>in vitro</i> de Curcumina al modelo de Korsmeyer-Peppas.

4. Resumen

Las enfermedades neurodegenerativas son un término colectivo para un grupo heterogéneo de trastornos que son incurables y se caracterizan por pérdida progresiva de poblaciones de células neuronales específicas.

La Enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo que provoca la muerte de las células nerviosas del cerebro ocasionado por la acumulación de proteínas mal plegadas, alteraciones en los procesos inflamatorios y daño por estrés oxidativo.

La Enfermedad de Parkinson es un trastorno del movimiento producido por la pérdida de neuronas monoaminérgicas del tronco cerebral y se caracteriza por la presencia de agregados de proteínas.

Se piensa que el estrés oxidativo es el factor principal en el progreso de complicaciones de las enfermedades neurodegenerativas. Hasta el momento no se dispone de ningún tratamiento que permita prevenir o erradicar ninguna enfermedad neurodegenerativa.

Uno de los principales obstáculos para el desarrollo de una terapia eficaz para estas enfermedades es que el suministro de fármacos al cerebro se ve significativamente obstaculizado por la barrera hematoencefálica. La barrera hematoencefálica es una barrera especializada que protege el Sistema Nervioso Central de toxinas, fluctuaciones metabólicas y también de materiales extraños.

Recientemente, en el ámbito farmacológico la curcumina ha sido objeto de investigación para diversas aplicaciones neuronales. La curcumina es el componente bioactivo de color amarillo de la cúrcuma, el rizoma en polvo de *Cúrcuma longa*. Se ha reportado que posee propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antineoplásicas y antioxidantes. La mayoría de las actividades biológicas de la curcumina están directamente asociadas con su actividad antioxidante. Es por eso que la curcumina podría interceptar los radicales libres y minimizar daños, ya que se ha demostrado que es un potente eliminador de una variedad de Sustancias Reactivas de Oxígeno. A pesar de sus diversas actividades biológicas, la curcumina se ha

utilizado rara vez en aplicaciones clínicas debido a sus propiedades intrínsecas, incluida la escasa solubilidad en la fase acuosa, la rápida degradación y la baja biodisponibilidad oral. Se ha encontrado que, utilizando la nanotecnología para encapsular dicho fármaco, algunas de sus características se pueden modificar, logrando una mayor solubilidad y biodisponibilidad, aumentando así sus posibles aplicaciones terapéuticas.

Las nanopartículas son sistemas adecuados para la administración de fármacos al cerebro debido a la posibilidad de modularlos en términos de forma, tamaño, hidrofobicidad, recubrimiento, química y carga superficial. Las nanopartículas poliméricas son partículas coloidales submicrónicas y están compuestas de fármaco y polímero.

La poli- ϵ -caprolactona es un polímero biodegradable y biocompatible, que ocupa una posición única, ya que al mismo tiempo que es biodegradable y miscible con una variedad de polímeros, cristaliza muy fácilmente. Además, es de baja toxicidad y tiene una gran permeabilidad. Aunque la poli- ϵ -caprolactona se ha utilizado ampliamente en el campo farmacéutico, su característica hidrofóbica conduce a una rápida eliminación del cuerpo, así como a una baja estabilidad de las nanopartículas en el agua.

El uso de estabilizantes en la formulación de nanopartículas es necesario para prevenir la aglomeración. Pluronic® F68 es otro excipiente versátil y extremadamente atractivo aprobado por la FDA que se ha utilizado en el desarrollo de sistemas de portadores basados en nanopartículas. Además de mejorar significativamente la solubilidad de los compuestos poco solubles, Pluronic® F68 también presenta actividad inhibitoria de las bombas de eflujo en la barrera hematoencefálica y un efecto neuroprotector (Batrakova & Kabanov, 2008), además de que ha demostrado también la capacidad de inhibir la glicoproteína P, la cual actúa como mecanismo de transporte de fármacos localizado (M. L. Del Prado-Audelo et al., 2019).

El presente trabajo destaca cómo los obstáculos anteriormente mencionados acerca de los ineficaces tratamientos que existen hoy en día para las enfermedades neurodegenerativas, el restringido transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica y las propiedades

intrínsecas que presenta la curcumina, pueden ser superados por la ciencia de los polímeros y la nanotecnología.

Teniendo en cuenta las ventajas potenciales asociadas con las nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona mencionadas anteriormente y Pluronic[®] F68, se desarrolló un sistema nanotransportador de liberación controlada a base de poli- ϵ -caprolactona estabilizado con Pluronic[®] F68 (PCL/F68) para que por medio de éste se pueda administrar un fármaco con limitantes en la farmacocinética como las que presenta la curcumina para así aprovechar sus múltiples actividades terapéuticas y al mismo tiempo tomar ventaja del tamaño de dicho transportador para dirigirlo a una zona de difícil acceso como lo es el cerebro.

Las nanopartículas de PCL/F68 combinan las ventajas de la poli- ϵ -caprolactona y Pluronic[®] F68 en un solo sistema, logrando así una liberación prolongada y una mayor captación celular, lo que aumenta la posibilidad de atravesar la barrera hematoencefálica, ser dirigidas y localizadas hacia la zona de mayor interés que es el cerebro, evitar el eflujo por parte de la glicoproteína P, favorecer las propiedades de la curcumina y reducir la dosis de fármaco, así como los efectos adversos.

Para estos propósitos, se elaboraron nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona cargadas con curcumina, utilizando Pluronic[®] F68 como estabilizante, mediante el método de emulsificación-difusión.

En la caracterización fisicoquímica se evaluó el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad por medio de dispersión dinámica de la luz; y el potencial zeta fue analizado mediante Velocimetría de Láser Doppler, obteniendo un tamaño de partícula promedio de 149 ± 2.2 nm y un potencial zeta de -7.78 mV.

La caracterización morfológica de las nanopartículas y el análisis del tamaño de superficie se llevó acabo con Microscopía de Fuerza Atómica y se demostró una superficie esférica y sin aglomeraciones.

Se realizó un análisis de las interacciones químicas a través de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier y no se observó modificación de la estructura química de las nanopartículas después del ensayo.

Se llevó a cabo un análisis de las propiedades térmicas empleando Calorimetría Diferencial de Barrido, en donde no fue posible identificar el pico de fusión de la curcumina en el sistema de nanopartículas de Curcumina-PCL/F68, lo cual podría deberse a la exitosa encapsulación de la curcumina en las nanopartículas o a que ésta se encuentra dispersa a nivel molecular. Así mismo, se evaluaron muestras por medio de un analizador termogravimétrico de alta resolución, encontrando que las nanopartículas comienzan a perder peso cerca de los 250 °C y se degradaron por completo aproximadamente a los 310 °C.

La Eficiencia de Encapsulación y Carga de Fármaco de las nanopartículas se determinó mediante espectrofotometría UV-Vis a 420 nm con base en una curva de calibración, obteniendo una Eficiencia de Encapsulación del 96%, evidenciando la efectividad del método empleado y la Carga de Fármaco fue de 4.9%.

Se realizó también un ensayo de liberación *in vitro* de curcumina de las nanopartículas comparando contra el perfil de disolución de una dispersión acuosa del fármaco y se encontró que la liberación de la curcumina de las nanopartículas fue significativamente más lenta que la de la curcumina libre, evidenciando un sistema de liberación modificada.

Para la caracterización biológica, se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de las nanopartículas empleando el kit de proliferación celular I utilizando las líneas celulares MIO-M1 y SH-SY5Y. La presencia de las nanopartículas no afectó a la viabilidad de estas células dentro del intervalo de concentración analizado (3.75 µg/ml, 30 µg/ml, 125 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml).

Finalmente, la captación celular *in vitro* fue analizada a través de fluorescencia y se evidenció un alto grado de internalización celular.

De acuerdo con el tamaño de partícula obtenido y a las características fisicoquímicas y biológicas que se han evaluado, se puede pensar que las nanopartículas de poli-ε-caprolactona cargadas con curcumina podrían atravesar la barrera hematoencefálica para llegar al cerebro y podrían ser utilizadas como un tratamiento para enfermedades neurodegenerativas.

5. Marco teórico.

5.1 Enfermedades neurodegenerativas.

Las enfermedades neurodegenerativas son un término colectivo para un grupo heterogéneo de trastornos que son incurables (Huq et al., 2018), se caracterizan por la pérdida progresiva de poblaciones de células neuronales específicas, se asocian con agregados de proteínas (Larumbe, 2001), y frecuentemente están acompañadas por muerte neuronal, desaparición de cuerpos celulares neuronales, patología neuronal y proliferación glial. Las neuronas son muy vulnerables a las lesiones y normalmente no se dividen ni se reemplazan directamente, lo que hace que la reparación del daño sea lenta (Golpich et al., 2017, Satu et al., 2018). Dicha pérdida neuronal se refleja en la aparición de disfuncionalidades; de hecho, la clasificación de algunas enfermedades degenerativas se establece en función de las manifestaciones clínicas con las que se presentan, pudiendo entonces distinguirse aquellas que lo hacen fundamentalmente con un síndrome demencial, alteraciones en los procesos de memoria y lenguaje, siendo la enfermedad de Alzheimer (EA) el más claro exponente; y las que se manifiestan fundamentalmente con trastornos del movimiento y la postura, como es el caso de la enfermedad de Parkinson (EP).

5.1.1 Enfermedad de Alzheimer.

Entre las enfermedades neurodegenerativas, las demencias cobran gran importancia actualmente debido a que con los nuevos avances en la medicina ha aumentado la esperanza de vida, incrementando la población de la tercera edad, y con esto, ha habido un aumento de personas diagnosticadas con EA. Según estadísticas, 47.5 millones de personas en todo el mundo padecen demencia, y se diagnostican 7.7 millones de casos nuevos cada año, siendo la EA la causa más común de demencia, contribuyendo al 60-70% de los casos (OMS, 2016).

La EA, un trastorno neurodegenerativo que provoca la muerte de las células nerviosas del cerebro, se manifiesta principalmente por pérdida de memoria, así como por el deterioro de otras capacidades mentales, causadas por la neurodegeneración progresiva en la zona del cerebro basal anterior y en el hipocampo. Esta neurodegeneración es ocasionada por la acumulación de proteínas mal plegadas, alteraciones en los procesos inflamatorios y daño por estrés oxidativo (Romano, Nissen, Del, Paredes, & Carlos, 2007).

Por lo general, comienza paulatinamente y sus primeros síntomas pueden atribuirse a la vejez o al olvido común. A medida en que avanza la enfermedad, las capacidades cognitivas empiezan a deteriorarse, y pueden surgir modificaciones de la personalidad, así como conductas problemáticas. En sus etapas avanzadas, la EA conduce a la demencia y finalmente a la muerte (Gómez, D., 2018).

En México se cuenta con información epidemiológica heterogénea sobre la frecuencia de demencias: la Encuesta Nacional de Salud y Envejecimiento en México reporta 3.3 %, y la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 7.9 %. Se reconoce una incidencia anual de 27.3 por cada 1000 adultos mayores (Celis-De la Rosa et al., 2017).

El World Alzheimer Report estimó que en el 2015 había poco más de 800,000 personas con demencia en México, de las cuales las mujeres (64 %) son las que mayormente sufren este padecimiento ya que, en general, tienen una vida más larga (Álvarez-Cisneros et al., 2017).

Siguiendo con datos estadísticos en México, en la Tabla 1 se exponen las tasas de mortalidad por intervalos de 5 años durante el periodo de estudio, estratificadas según edad y sexo; como se puede observar, hay un incremento en las tasas de mortalidad a mayor edad en ambos sexos, pero especialmente en las mujeres.

Tabla 1. Mortalidad quinquenal por enfermedad de Alzheimer en México, 1980-2014, según edad y sexo (Celis-De la Rosa et al., 2017).

Grupos de edad (años)	Tasas estandarizadas por cada 100 000 habitantes según quinquenio			
	1980-1984	1990-1994	2000-2004	2010-2014
Mujeres				
40-59	0.00	0.10	0.13	0.12
60-69	0.02	0.68	1.84	1.72
70-79	0.12	3.69	11.52	12.81

≥80	0.13	7.28	46.38	65.12
Hombres				
40-59	0.01	0.08	0.12	0.11
60-69	0.04	0.61	1.61	1.70
70-79	0.03	2.76	9.52	10.03
≥80	0.51	7.85	30.69	43.66
Población general				
40-59	0.01	0.09	0.12	0.11
60-69	0.03	0.64	1.73	1.69
70-79	0.08	3.29	10.58	11.36
≥80	0.29	7.53	39.52	55.02

5.1.2 Enfermedad de Parkinson.

La EP es un trastorno del movimiento que fue descrito en 1817 por James Parkinson en su texto "*Un ensayo sobre la parálisis agitante*" (Parkinson, 2002). Durante el desarrollo de la EP, segunda enfermedad neurológica más común, las células neuronales en el cerebro que producen dopamina en la sustancia negra se ven afectadas (Poewe et al., 2017, Moni et al., 2018). Es un trastorno neurodegenerativo progresivo que afecta, aproximadamente, al 1 % de las personas mayores de 60 años; es producido por la pérdida de neuronas monoaminérgicas del tronco cerebral, principalmente de las neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriatal, y se caracteriza por la presencia de agregados proteicos compuestos principalmente por la proteína α -sinucleína (α -syn, por sus siglas en inglés), denominados cuerpos de Lewy (Fernández, 2012).

Clínicamente, la EP se caracteriza por la presencia de temblor de reposo, rigidez (aumento del tono muscular), bradicinesia (movimiento lento) y alteración de reflejos posturales y de la marcha (Gómez, D., 2018). La EP se presenta como una patología crónica, de larga duración, irreversible y con una sintomatología que empeora con el tiempo.

En la Revista Mexicana de Neurociencia se publicó un estudio en el que se analizó el índice de morbilidad anual de la Enfermedad de Parkinson en los años 2014-2017 (Rodríguez-Violante et al., 2019). En éste, se reportó que el número total de nuevos casos en el periodo comprendido entre 2014 y 2017 fue de 28,457.

La proporción de incidencia para cada intervalo fue de 0.04 %. En general, la tasa de incidencia en el periodo de 2014-2017 fue de 37.92 por cada 100,000 habitantes. La Tabla 2 resume la incidencia anual y la tasa de incidencia por género y grupo de edad.

Tabla 2. Incidencia general y anual de la Enfermedad de Parkinson en subgrupos por género y edad (Rodríguez-Violante et al., 2019).

Incidencia	2014	2015	2016	2017
General				
Casos de incidencia	5057	7273	8009	8118
Tasa de incidencia	6.74	9.52	10.30	10.26
Por género				
Hombres				
Casos de incidencia	2666	3848	4168	4232
Tasa de incidencia	7.47	10.60	11.28	11.27
Mujeres				
Casos de incidencia	2391	3425	3841	3886
Tasa de incidencia	6.08	8.54	9.41	9.36
Por grupo de edad				
20-24				
Casos de incidencia	20	30	18	22
Tasa de incidencia	0.19	0.28	0.17	0.22
25-44				
Casos de incidencia	149	233	137	151
Tasa de incidencia	0.42	0.65	0.38	0.42

45-49				
Casos de incidencia	158	233	261	293
Tasa de incidencia	2.28	3.27	3.57	3.92
50-59				
Casos de incidencia	635	958	1038	1070
Tasa de incidencia	6.04	8.83	9.27	9.26
60-64				
Casos de incidencia	672	962	992	1058
Tasa de incidencia	18.28	25.12	24.89	25.56
≥65				
Casos de incidencia	3407	4834	5550	5496
Tasa de incidencia	42.63	58.55	65.20	62.23

A pesar de las investigaciones realizadas en torno a esta enfermedad, en la actualidad se desconocen las causas que la desencadenan. Sin embargo, se encuentra ligada tanto al envejecimiento, como a factores genéticos y ambientales.

5.1.3 Tratamientos farmacológicos.

Muchos trastornos neurodegenerativos son relacionados con la edad y representan una creciente carga de salud para las poblaciones que envejecen y hasta el momento no se dispone de ningún tratamiento que permita prevenir o erradicar ninguna enfermedad neurodegenerativa.

Los tratamientos actuales son básicamente sintomáticos, es decir, mitigan los síntomas o aumentan la actividad de las neuronas restantes, mas no evitan la progresión subyacente de la enfermedad, por lo que son incapaces de restaurar la calidad de vida y detener o mejorar el daño (por ejemplo, la levodopa (L-dopa) para el tratamiento de la EP o los inhibidores de la acetilcolinesterasa para el tratamiento de la EA).

La EA y la EP, las dos enfermedades neurodegenerativas más comunes, se encuentran entre los mayores desafíos mundiales de salud pública que enfrenta nuestra generación. Existen dos obstáculos principales para el desarrollo de una terapia eficaz para estas enfermedades

neurodegenerativas. En primer lugar, su etiología que sigue siendo enigmática, y la causa exacta de su aparición aún no está revelada. En segundo lugar, el suministro de fármacos al cerebro se ve significativamente obstaculizado por la barrera hematoencefálica (BHE) (M. Huang & Gu, 2019).

5.2 Barrera hematoencefálica.

La BHE es una barrera especializada que protege el Sistema Nervioso Central (SNC) de toxinas, fluctuaciones metabólicas y también de materiales extraños (Figura 1) (Pang et al., 2008, Malcor et al., 2012). Sólo las moléculas muy pequeñas (<400 Da) y lipofílicas pueden difundirse a través de la BHE, por lo que ésta mantiene un tipo de intercambio tejido-endotelio altamente especializado. La comunicación a través de la BHE está gestionada por la unidad gliovascular (GVU, por sus siglas en inglés) con roles establecidos para astrocitos, pericitos y células perivasculares. La compleja estructura BHE/GVU mantiene la homeostasis cerebral, controlando el transporte de moléculas, iones y células al tejido cerebral (Rubin & Staddon, 1999).

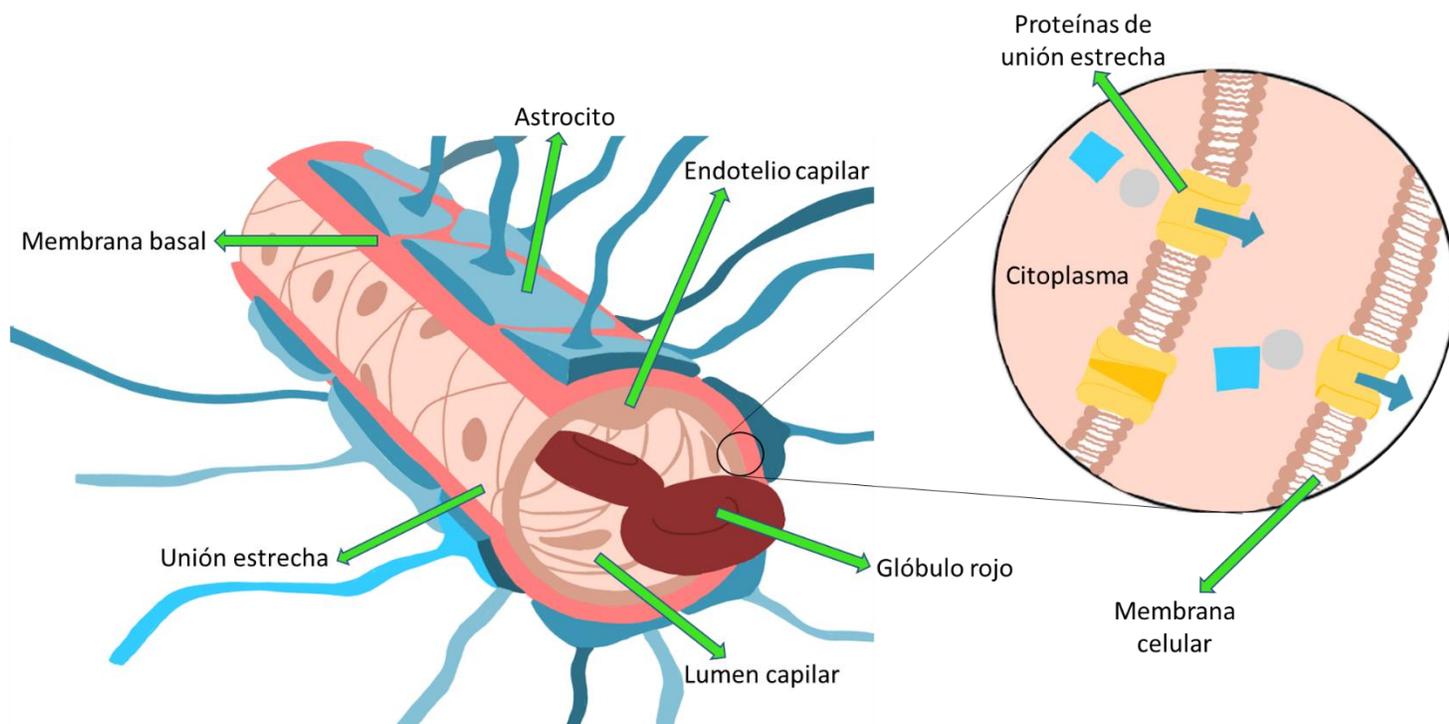


Figura 1. Estructura anatómica de la barrera hematoencefálica.

Las células endoteliales están dotadas de mecanismos de salida eficientes y muy específicos, como las proteínas resistentes a múltiples fármacos y los sistemas de transporte (Figura 2) (Gupta, Garg, Tanmay, & Arora, 2015). La expresión de diferentes transportadores en la BHE, como los receptores de transferrina, los receptores de insulina, los receptores de lipoproteínas y los transportadores de salida dependientes de ATP (ABC, por sus siglas en inglés) como la glicoproteína-P (P-gp, por sus siglas en inglés), podrían ayudar en la internalización o impedir la entrada de las moléculas (Blanco, Shen, & Ferrari, 2015a).

La P-gp es una proteína expresada en la membrana luminal de las células endoteliales del cerebro. Es considerada el principal sistema de eflujo para expulsar fármacos del cerebro ya que tiene muchos fármacos como sustrato, además de que su transporte activo es muy selectivo en la BHE. La expresión de la P-gp se considera un obstáculo en el tratamiento de las enfermedades del SNC, ya que limita el acceso de los fármacos al cerebro (Newman, Pan, Short, & Nicolazzo, 2017), por lo tanto el bloqueo o inactivación de esta glicoproteína sería esencial para permitir el paso de fármacos hacia el cerebro en un tratamiento de las enfermedades del SNC como lo son las enfermedades neurodegenerativas.

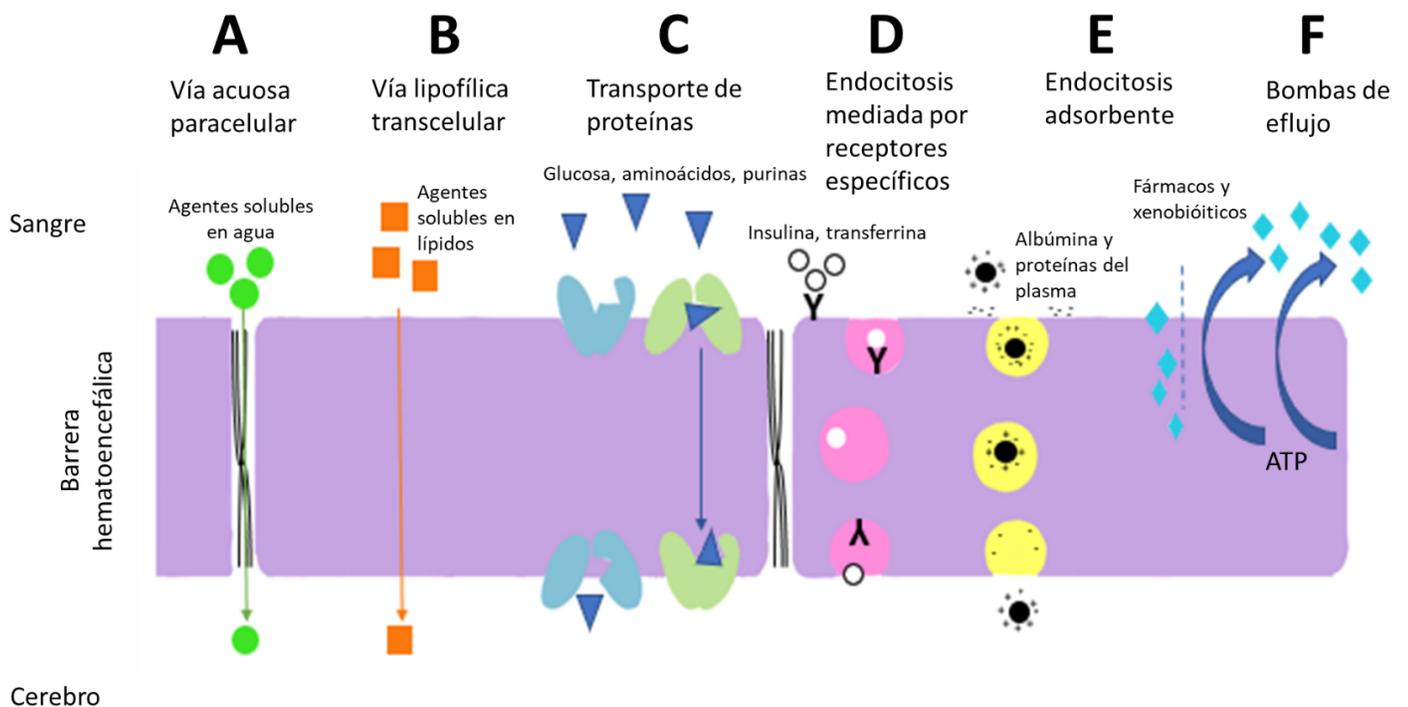


Figura 2. Tipos de transporte a través de la barrera hematoencefálica.

Los medicamentos actualmente disponibles para el tratamiento de la neurodegeneración tienen una eficacia clínica muy reducida. Se sabe que se necesitan alternativas de administración de medicamentos para tratar el SNC, mismos que deben ser, idealmente, moléculas pequeñas, lipofílicas y compactas. Debido a que cada vez se conoce mejor la cascada de acontecimientos que provocan la muerte por apoptosis (muerte celular programada) y sus desencadenantes, es plausible diseñar estrategias terapéuticas (nuevos medicamentos) que impidan o frenen la apoptosis, empleando factores antioxidantes, antiinflamatorios, inhibidores de la apoptosis, moduladores de los neurotransmisores citotóxicos, etc.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que uno de los principales factores en el progreso de complicaciones de las enfermedades neurodegenerativas es el estrés oxidativo, mismo que es ocasionado por el desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), y el sistema antioxidante de un organismo. Debido a que hoy en día no se cuenta con un tratamiento eficaz para dichas enfermedades, se piensa que un tratamiento con actividad antioxidante que evite la presencia desproporcionada de ROS podría tener potencial aplicación para las enfermedades neurodegenerativas.

5.3 Especies Reactivas de Oxígeno

El oxígeno es una molécula esencial para la producción de energía química (ATP) en todas las células; sin embargo, también se transforma a menudo en formas altamente reactivas: ROS, mismas que son muy tóxicas para las células (Haryuna, Munir, Maria, & Bashiruddin, 2017), debido a los electrones desapareados que tiene en su capa externa.

Las ROS, que incluyen radicales libres como los radicales de anión superóxido (O_2^-), radicales hidroxilo ($\bullet OH$), ion hidroxilo (OH^-) y especies de radicales no libres como H_2O_2 y oxígeno singlete (1O_2) y se esquematizan en la Figura 3, son moléculas que contienen uno o más electrones no emparejados, se forman en el metabolismo celular aeróbico y se producen continuamente durante los eventos fisiológicos normales; son altamente reactivas y pueden unirse a varias moléculas causando, en última instancia, daño a los ácidos nucleicos, proteínas y membranas lipídicas (Gülçin, 2006).

Sin embargo, son eliminadas por mecanismos de defensa antioxidante. Hay un equilibrio entre la generación y la inactivación de ROS por el sistema antioxidante en los organismos. Cuando se produce un desequilibrio entre los sistemas oxidantes y los sistemas de defensa, a favor de los oxidantes, se produce estrés oxidativo, es decir, hay modificación oxidativa en una membrana celular o moléculas intracelulares (Samarghandian, Azimi-Nezhad, Farkhondeh, & Samini, 2017).

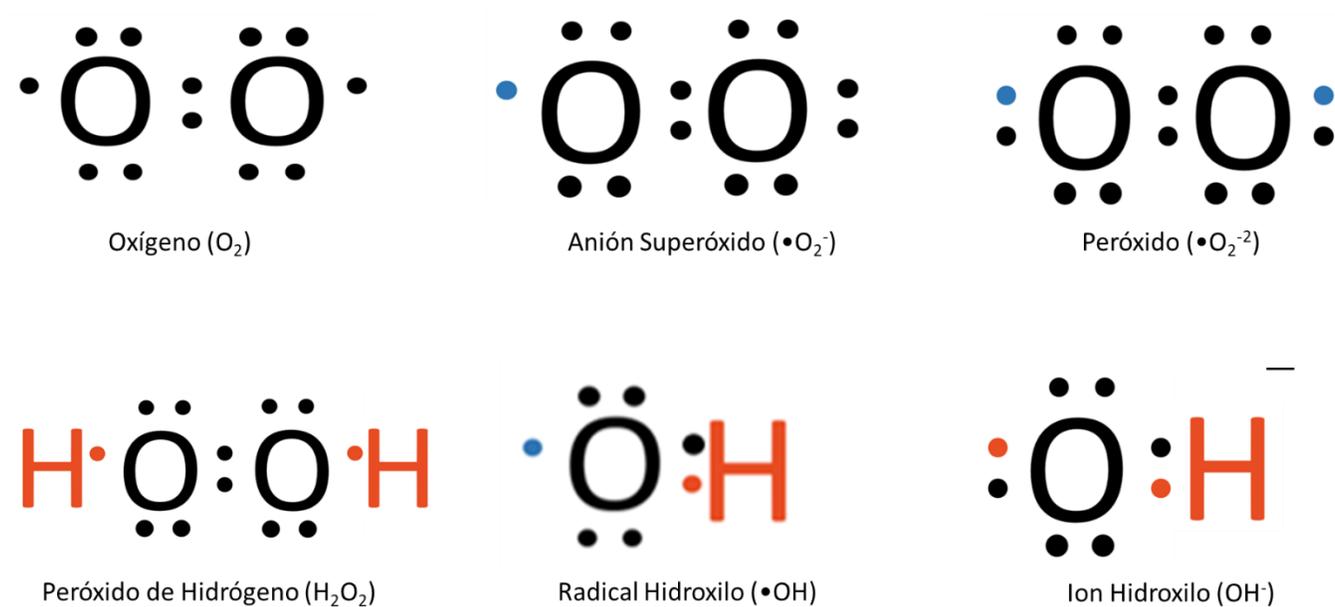


Figura 3. Ejemplos de especies reactivas de oxígeno. La reducción consecutiva de oxígeno mediante la adición de electrones provoca la formación de una variedad de ROS, que incluyen superóxido (O_2^-), radical hidroxilo ($\cdot OH$), ion hidroxilo (OH^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Los radicales libres en exceso causan daño oxidativo a las biomoléculas celulares como son proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en varios tejidos, debido a que ocasionan disfunciones metabólicas severas, tales como la pérdida de la integridad celular, la función enzimática, la estabilidad genómica, entre otras.

Se piensa que el estrés oxidativo es el factor principal en el progreso de complicaciones patológicas crónicas, tales como cáncer, aterosclerosis, y enfermedades neurodegenerativas.

5.3.1 Estrés Oxidativo

Como se mencionó, el estrés oxidativo es una condición de desequilibrio entre la producción de ROS y las defensas antioxidantes, lo que resulta en una acumulación excesiva de ROS. El estrés oxidativo puede inducir daño a la membrana celular por la peroxidación lipídica, cambios en la estructura y función de las proteínas, daño estructural al ADN y disfunción mitocondrial, que aceleran el proceso de envejecimiento y el desarrollo de trastornos neurodegenerativos (Kim, Kim, Rhie, & Yoon, 2015).

Una característica común de las enfermedades neurodegenerativas antes mencionadas es la extensa evidencia de estrés oxidativo, el cual podría ser responsable de la disfunción o muerte de las células neuronales que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad.

Por lo tanto, el desarrollo de estrategias antioxidantes puede ayudar a retardar o minimizar el daño oxidativo. Varios antioxidantes naturales están disponibles para eliminar los radicales libres, prevenir el daño oxidativo y retrasar el progreso de muchas enfermedades crónicas, así como la peroxidación lipídica, y pueden existir en antioxidantes enzimáticos como la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (Gpx). Además, hay antioxidantes derivados de alimentos como las vitaminas A, C y E, y los carotenoides. (Aladag et al., 2009).

En particular, los antioxidantes polifenólicos se encuentran entre los compuestos naturales más empleados para proteger los componentes celulares, ya que muestran propiedades neuroprotectoras en modelos preclínicos de la EA y la EP (Langasco et al., 2019). Un polifenol muy conocido debido a sus propiedades antioxidantes es la curcumina.

5.4 Curcumina

La curcumina es el componente bioactivo de color amarillo de la cúrcuma, el rizoma en polvo de *Cúrcuma longa*. Es un polifenol de bajo peso molecular, tiene la fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_6$ y su estructura química se representa en la Figura 4.

Estructuralmente, la molécula de curcumina tiene tres entidades químicas: dos sistemas de anillos aromáticos que contienen grupos o-metoxifenólicos unidos por un espaciador de siete carbonos que consiste en un resto de β -dicetona α , β -insaturado. Por lo tanto, el grupo diceto presenta tautomerismo ceto-enol, lo que significa que la curcumina puede existir en equilibrio entre el ceto y el tautómero enol (María L. Del Prado-Audelo et al., 2019).

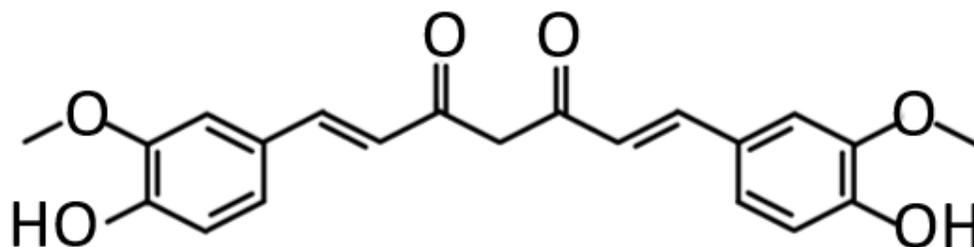


Figura 4. Estructura molecular de la curcumina.

La curcumina es una molécula relativamente hidrófoba, fácilmente soluble en solventes orgánicos como etanol, metanol o Dimetilsulfóxido (DMSO). Sus propiedades fotofísicas dependen en gran medida de las características del disolvente (polaridad, propiedades de donación o aceptación de enlaces de Hidrógeno y pH) (Cozzolino et al., 2019).

Generalmente, este fármaco muestra una banda de absorción a una longitud de onda de 420 nm y un gran desplazamiento de Stokes, con emisión de fluorescencia en la región de 450-550 nm del espectro. Además de poseer baja toxicidad, se ha reportado que la curcumina se degrada rápidamente a pH alcalino o fisiológico y que presenta fotodegradación, particularmente bajo radiación con luz UV (Cozzolino et al., 2019).

Tiene beneficios potenciales para la salud humana debido a sus efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, antiobesidad y diabetes, antitumorales y anticancerosos (Anderson et al., 2003, Maheshwari et al., 2006, Sharma et al., 2005). La mayoría de las actividades biológicas de la curcumina están directamente asociadas con su actividad antioxidante. Priyadarsini et al. describieron la fuerte actividad antioxidante de la curcumina tanto *in vivo* como *in vitro* (Priyadarsini et al., 2003), volviéndose dicha propiedad una de las

aplicaciones más importantes y con alto valor farmacéutico (Stoica et al., 2018, Shen, Jiang, & Ji, 2018).

La curcumina se ha asociado con neurogénesis, sinaptogénesis y mejoría en la cognición (Dong et al., 2012), lo que puede deberse a la promoción de sus diversos factores neurotróficos. Las neuronas son particularmente vulnerables al daño por oxidación debido a que éste es capaz de iniciar alteraciones en su estructura y función. La presencia de radicales libres promueve la modificación química de los lípidos y las proteínas, lo que puede resultar en daño mitocondrial y el inicio de la apoptosis neuronal (Stoica et al., 2018). El efecto antioxidante de la curcumina podría interceptar los radicales libres y minimizar todos estos daños, ya que se ha demostrado que es un potente eliminador de una variedad de ROS que incluyen radicales aniónicos superóxido, radicales hidroxilo (Reddy & Lokesh, 1994) y radicales dióxido de nitrógeno (Unnikrishnan & Rao, 1995). Adicionalmente, se ha reportado que la curcumina inhibe la peroxidación de lípidos en diferentes modelos animales (Reddy & Lokesh, 1994).

Además, este compuesto posee la capacidad de eliminar focos anormales de proteínas amiloides beta ($A\beta$), tau y poli-Q mediante la inducción de autofagia, reduciendo así la agregación anormal de proteínas y la formación de ovillos neurofibrilares, catalogándose también como un agente neuroprotector (Zendedel, Butler, Atkin, & Sahebkar, 2018). Thiyagarajan y Sharma exhibieron que en un modelo de rata con isquemia cerebral focal, la curcumina ofreció una neuroprotección significativa mediante la inhibición de la peroxidación lipídica, el aumento de las enzimas de defensa antioxidantes endógenas y la reducción de la formación de peroxinitrito (Thiyagarajan & Sharma, 2004). Por lo que, en los últimos años, este fármaco ha sido considerado como un tratamiento potencial para múltiples trastornos neurodegenerativos, como la EA, la EP, el Huntington, las ataxias espinocerebelosas y las enfermedades priónicas (Maiti & Dunbar, 2018).

A pesar de sus muchas actividades biológicas, la curcumina se ha utilizado rara vez en aplicaciones clínicas debido a sus propiedades intrínsecas, incluida la escasa solubilidad en la fase acuosa, la rápida degradación y la baja biodisponibilidad oral; ya que éstas representan un obstáculo para la exitosa aplicación de este fármaco en la terapéutica (Yallapu et al., 2014,

Aggarwal & Harikumar, 2009, Chen et al., 2017). Además, como se mencionó anteriormente, el transporte de fármacos a través de la BHE es muy limitado.

Investigaciones recientes han establecido varios enfoques para mejorar la biodisponibilidad y aumentar la concentración plasmática, así como mejorar los procesos de permeabilidad celular de la curcumina. Se ha encontrado que, utilizando la nanotecnología para encapsular dicho fármaco, algunas de sus características se pueden modificar, logrando una mayor biodisponibilidad y solubilidad, aumentando así sus posibles aplicaciones terapéuticas (Ghalandarlaki, Alizadeh, & Ashkani-Esfahani, 2014).

5.5 Nanotecnología

La nanotecnología se puede definir como la ciencia e ingeniería involucradas en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos cuya organización funcional más pequeña está en la escala nanométrica (1-1000 nm) (Saini, Saini, & Sharma, 2010). Es un campo que está cambiando potencialmente la forma de tratar enfermedades, debido a que, por medio de sistemas sofisticados, se pueden administrar fármacos con limitantes farmacocinéticas, como la curcumina, en regiones inaccesibles como el cerebro, proporcionando protección a los agentes terapéuticos y, al mismo tiempo, distribuyéndolos de manera eficiente en las áreas dañadas.

5.5.1 Nanopartículas.

Las nanopartículas (NPs) son portadores coloidales que pueden tener un origen natural o sintético y pueden variar de 1 a 1000 nm de tamaño. Pueden diseñarse para interactuar con células y tejidos a nivel molecular con un alto grado de integración entre la tecnología y los sistemas biológicos, con la ventaja de que al manipularse fármacos y otros materiales a escala nanométrica, se pueden favorecer propiedades fundamentales y la bioactividad de los materiales (Saini et al., 2010).

La composición de las nanopartículas puede variar. Los materiales de origen pueden ser de índole biológica, como fosfolípidos, lípidos, ácido láctico, dextrano, quitosano, o pueden tener composición química de sustancias orgánicas o inorgánicas, tales como polímeros, carbono,

sílice y metales (De Jong & Borm, 2008). De acuerdo a sus aplicaciones en la liberación controlada de los fármacos, su capacidad para dirigirse a determinados órganos/tejidos, como portadores de ADN en la terapia génica y su capacidad para administrar proteínas, péptidos y genes a través de una vía de administración peroral (Lanza, Langer, & Vacanti, 2007, Langer, 1999) las NPs poliméricas han atraído una atención considerable y ha habido un gran interés en el desarrollo de éstas como dispositivos eficaces de administración de fármaco.

Las NPs poliméricas se definen como partículas coloidales submicrónicas y generalmente están compuestas de fármaco y polímero (Tavares et al., 2016). Por medio de ellas es posible administrar el fármaco de manera efectiva en un sitio específico y, por lo tanto, aumentar el beneficio terapéutico, al tiempo que se minimizan los efectos secundarios (Soppimath, Aminabhavi, Kulkarni, & Rudzinski, 2001). También es factible promover la protección de los medicamentos, así como evitar la eliminación del cuerpo, lo que resulta en una vida media más larga. Además, estos nanotransportadores pueden reducir la distribución del fármaco a través de tejidos sanos (Lepeltier, Bourgaux, & Couvreur, 2014, Blanco, Shen, & Ferrari, 2015), promover la liberación controlada, reducir los eventos adversos, aumentar la eficacia terapéutica y la seguridad, así como superar las barreras fisiológicas (Tavares et al., 2016, Lepeltier, Bourgaux, & Couvreur, 2014) y evitar las bombas de eflujo (Blanco et al., 2015a).

5.5.2 Métodos de preparación de nanopartículas poliméricas.

Las nanopartículas poliméricas han sido sintetizadas por diferentes métodos dependiendo las particularidades que se desean para su aplicación tales como las propiedades físicas y químicas, así como las características fisicoquímicas del fármaco (A. Nasir, A. Kausar, A. Younus, 2015). Teniendo en cuenta las necesidades que se pretendan satisfacer, es posible elegir el método de elaboración más adecuado para obtener NPs con las particularidades deseadas.

Se han desarrollado varios métodos de preparación, como se muestra en la Figura 5, éstos se pueden dividir en dos grupos principalmente: aquellos basados en la polimerización de monómeros y aquellos que aprovechan los polímeros preformados (J. Allouche, 2013). Estos

métodos pueden clasificarse adicionalmente en dos categorías: procedimientos de dos pasos que involucran la preparación de un sistema de emulsificación seguido por la formación de nanopartículas en el segundo paso del proceso, y procedimientos de una etapa donde la emulsificación no es necesaria para la formación de nanopartículas (Crucho & Barros, 2017).

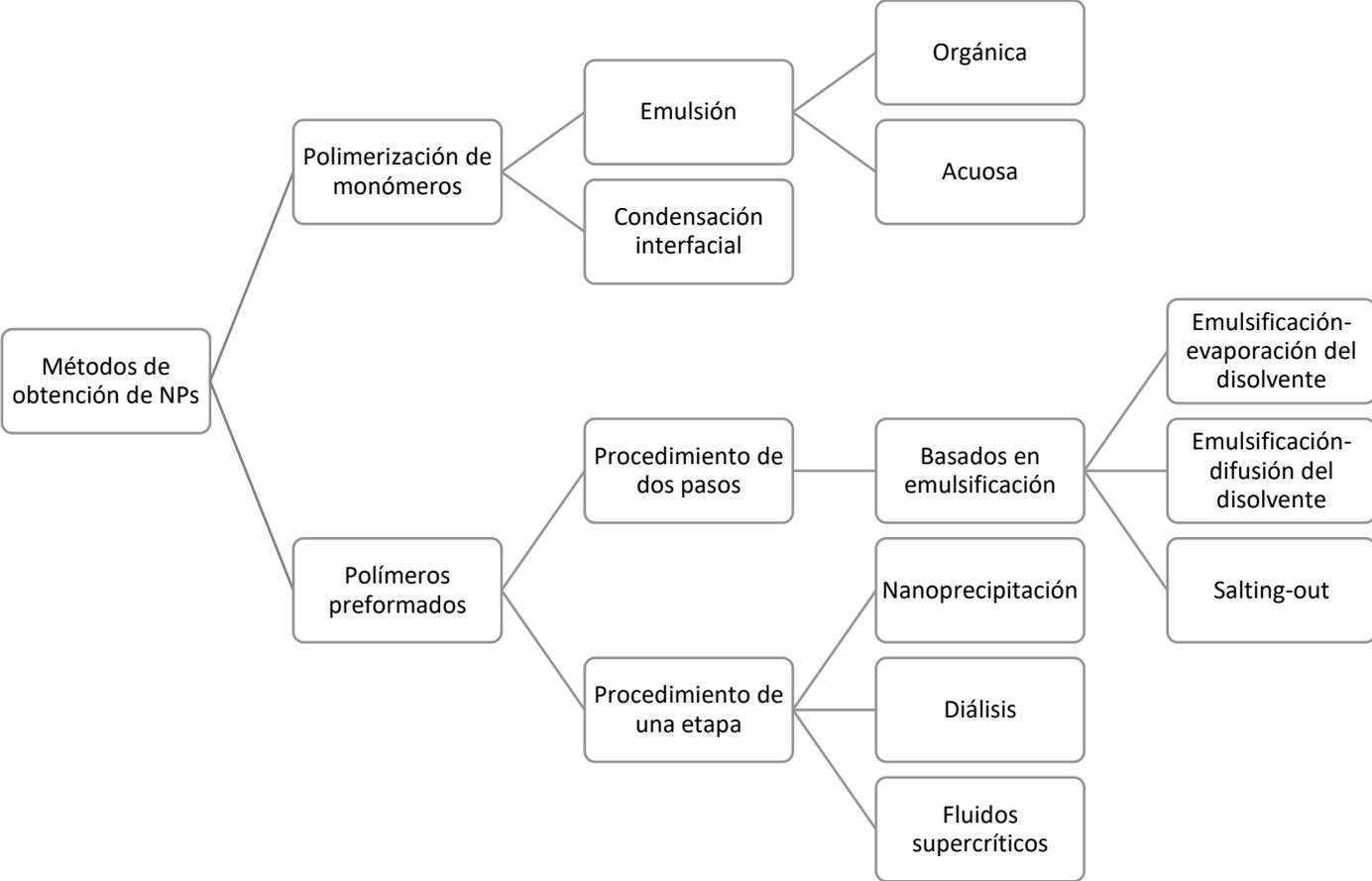


Figura 5. Esquema de los métodos de obtención de nanopartículas más comunes.

En la Tabla 3 se desglosan los métodos más importantes de preparación de nanopartículas, así como los encapsulantes empleados y los tamaños aproximados de partículas resultantes.

Tabla 3. Ejemplos de métodos preparativos, polímeros y encapsulantes (Pinto Reis et al., 2006).

Polímero	Encapsulante	Tamaño (nm)	Referencia
Nanopartículas obtenidas por polimerización de monómeros			
Polimerización en emulsión			
Fase acuosa continua			
Polimetacrilato de metilo)	Antígeno de la gripe	130	(Kreuter, Mauler, Gruschkau, & Speiser, 1976)
Copolímeros de poli (metacrilato de metilo)	Doxorrubicina	300	(Rolland, Gibassier, Sado, & Le verge, 1986)
Poli (metilcianoacrilato)	Vinblastina	200–300	(Couvreur et al., 1980)
Poli (etilcianoacrilato)	Insulina	<500	(Radwan & Aboul-Enein, 2002)
Poli (butilcianoacrilato)	Progesterona	250	(Li, Wood, Kreuter, Harmia, & Robinson, 1986)
Poli (isobutilcianoacrilato)	Ampicilina	40-80	(Seijo, Fattal, Roblot-Treupel, & Couvreur, 1990)
	Anticuerpos	120	(Kubiak, Manil, & Couvreur, 1988)
	hGRF	140-170	(Grangier, Puygrenier, Gautier, & Couvreur, 1991)
Poli (acrilato de hexilo)	Vincamina	200	(Maincent, Le Verge, Sado, Couvreur, & Devissaguet, 1986)
Poli (isohexil cianoacrilato)	Ampicilina	30-80	(Seijo et al., 1990)
	Doxorrubicina	300	(Némati et al., 1996)

Poli (malonato de dialquilmetilideno)	Primaquina	<1000	(Mbela, Poupaert, & Dumont, 1992)
Fase orgánica continua			
Poliacrilamida	Enzimas	<1000	(Ekman & Sjöholm, 1978)
Poli (metilcianoacrilato)	Triamcinolona	500	(Krause, Schwarz, & Rohdewald, 1986)
	Fluoresceína	800-1000	(El-Samaligy, Rohdewald, & Mahmoud, 1986)
	Pilocarpina	300–600	(Harmia-Pulkkinen, Tuomi, & Kristoffersson, 1989)
Otros polímeros: poli (etilcianoacrilato), poli (butilcianoacrilato), poli (estireno), poli (vinilpiridina) y poli (acroleína)			
Condensación interfacial			
Poli (etilcianoacrilato)	Insulina	~ 151	(Watnasirichaikul, Davies, Rades, & Tucker, 2000)
Poli (isobutilcianoacrilato)	Indometacina	220-240	(Gürsoy et al., 1989; (Ammoury, Fessi, Devissaguet, Dubrasquet, & Benita, 1991)
	Darodipina	150	(Hubert et al., 1991)
	Insulina	150–300	(Damge, Michel, Aprahamian, & Couvreur, 1988)
	Calcitonina	<1000	(Lowe & Temple, 1994)
	Octreotida	260	(Damgé, Vonderscher, Marbach, & Pinget, 1997)
Poli (isohexil cianoacrilato)	Ftalocianinas	180	(Lenaerts et al., 1995)
Otros polímeros: poliamidas, poli (fenilésteres) y poliuretanos.			
Nanopartículas obtenidas de polímeros preformados			

Nanopartículas preparadas con polímero preformado sintético/semisintético			
Emulsificación-evaporación del disolvente			
Ácido poliláctico	Testosterona	<1000	(Gurny, Peppas, Harrington, & Banker, 1981)
	Albúmina	100 ó 120	(Landry, Bazile, Spenlehauer, Veillard, & Kreuter, 1996)
	Toxoide tetánico	150	(Tobío, Gref, Sánchez, Langer, & Alonso, 1998)
	Loperamida	~ 300	(Ueda, Iwara, & Kreuter, 1998; Ueda & Kreuter, 1997)
Poli (ácido láctico) - copolímero de poli (ácido glicólico)	ADN	~ 100	(Prabha, Zhou, Panyam, & Labhasetwar, 2002)
	Ciclosporina A	~ 300	(Sánchez, Vila-Jato, & Alonso, 1993)
Otros polímeros: poli (ϵ -caprolactona) y poli (β -hidroxibutirato)			
Emulsificación/difusión del disolvente			
Poli (ácido láctico) - copolímero de poli (ácido glicólico)	p-THPP	117-118	(Konan, Berton, Gurny, & Allémann, 2003)
	Doxorrubicina	<1000	(Yoo, Oh, Lee, & Park, 1999)
Ácido poliláctico	p-THPP	125	(Konan et al., 2003)
	ADN	<300	(Perez et al., 2001)
Otro polímero: Poli (ϵ -caprolactona)			
Salting-out			
Ácido poliláctico	Savoxepina	<1000	(Allémann, Leroux, Gurny, & Doelker, 1993)
Otros polímeros: poli (alquilmacrilato) y etilcelulosa			

En los métodos de polimerización, los monómeros se polimerizan para formar el polímero de encapsulación. Este proceso puede llevarse a cabo de dos maneras, ya sea utilizando técnicas de polimerización en emulsión (que a su vez puede ser orgánica o acuosa) o polimerización interfacial, también conocida como condensación interfacial (J.P. Rao, K.E. Geckeler, 2011; C. Pinto Reis, R.J. Neufeld, A.J. Ribeiro, F. Veiga, 2006). Existe una desventaja en la utilización de dichos métodos de polimerización ya que durante la polimerización de los monómeros se pueden generar subproductos no biocompatibles y debido a que los residuos tóxicos, como los monómeros y los iniciadores, pueden persistir, se requiere un extenso trabajo de purificación para obtener un producto farmacéuticamente aceptable.

Otro método para desencadenar la polimerización es empleando por radicales libres o luz UV, pero con esto se imposibilita la adición de proteínas o péptidos durante la polimerización (P.R. Lockman, R.J. Mumper, M.A. Khan, D.D. Allen, 2002).

Teniendo en cuenta las limitaciones de las técnicas de polimerización, se describirán los métodos que involucran polímeros preformados, ya que con las técnicas de obtención con polímeros preformados muchas de las desventajas involucradas en el método de polimerización pueden evitarse.

5.5.2.1 Procedimientos en dos etapas basados en emulsificación.

Los sistemas de administración coloidal basados en emulsificación se utilizan ampliamente en la industria farmacéutica y de alimentos para encapsular, proteger y suministrar componentes bioactivos (Crucho & Barros, 2017).

Una emulsión es una dispersión de una fase líquida en otra fase total o parcialmente inmisible en forma de glóbulos, mediante el uso de moléculas activas en la superficie anfílicas (tensoactivos) que reducen la tensión interfacial entre los dos líquidos para lograr la estabilidad. Las emulsiones pueden clasificarse según su composición (aceite, agua, tensoactivos) o morfología (T.G. Mason, J.N. Wilking, C.B. Chang, S.M. Graves, 2006).

En general, las emulsiones pueden ser de los tipos aceite en agua (O/W, por sus siglas en inglés) o agua en aceite (W/O, por sus siglas en inglés) dependiendo de si el aceite se dispersa como glóbulos en agua, o *viceversa*. También, se pueden obtener sistemas más complejos, tales como agua en aceite en agua (W/O/W).

Dependiendo del tamaño del glóbulo, la emulsión formada se puede clasificar en dos categorías principales: nanoemulsiones, y macroemulsiones (T.G. Mason, J.N. Wilking, C. B. Chang, S. M. Graves, 2006).

Particularmente, las nanoemulsiones tienen propiedades físicas interesantes. Por ejemplo, parecen ser visiblemente diferentes y exhiben transparencia óptica ya que los glóbulos son mucho más pequeñas que las longitudes de onda ópticas (Crucho & Barros, 2017). Cabe mencionar que las nanoemulsiones no se forman espontáneamente, se debe aplicar un esfuerzo cortante externo para que los glóbulos se rompan en otros más pequeños.

Las mini y macroemulsiones y las nanoemulsiones pueden estar compuestas por tres componentes simples (aceite, agua y tensoactivos) y tienen muchas similitudes estructurales; aunque lo pareciera, la diferencia distintiva entre las categorías de emulsiones no es de composición, sino de termodinámica: las microemulsiones son termodinámicamente estables, mientras que las nanoemulsiones no lo son (D.J. McClements, 2012).

En los métodos de emulsificación-eliminación de disolvente en dos etapas, la solución orgánica de polímero se emulsiona en una fase acuosa. Se pueden usar técnicas de emulsificación de baja y alta energía para producir los pequeños glóbulos y, en consecuencia, nanopartículas (J. Allouche, 2013).

En el método de emulsificación, el paso de formación de glóbulos es fundamental porque determina el tamaño y la distribución del tamaño de las NPs resultantes. La precipitación de polímeros en glóbulos preformados se logra eliminando el disolvente orgánico mediante diferentes métodos, como la evaporación del disolvente, la difusión rápida después de la dilución o el salting-out (Crucho & Barros, 2017).

Una similitud entre estas técnicas es el proceso de encapsulación del fármaco, en donde generalmente el principio activo se agrega en la solución de polímero previo a la emulsificación.

5.5.2.1.1 Emulsificación- evaporación de disolvente.

El proceso de emulsificación- evaporación de disolvente fue el primer método desarrollado para preparar NPs a partir de un polímero preformado (Vanderhoff, J. W.; El Asser, M. S., 1979). Para este método, el polímero se disuelve primero en un disolvente volátil. Inicialmente, el diclorometano y el cloroformo eran los disolventes más ampliamente utilizados. Sin embargo, debido a su toxicidad, dichos disolventes volátiles fueron reemplazados por acetato de etilo, ya que éste presenta un mejor perfil toxicológico y, por lo tanto, es más adecuado para aplicaciones biomédicas (C. Vauthier, K. Bouchemal, 2009).

La solución orgánica resultante se emulsiona en la fase acuosa y la mezcla obtenida de ambas fases se procesa típicamente usando un tensoactivo y homogeneización de alta velocidad o ultrasonido, produciendo una dispersión de glóbulos.

Posteriormente, se evapora el disolvente polimérico y de este modo se forma una suspensión de NPs, misma que se deja difundir a través de la fase continua de la emulsión (C. Vauthier, K. Bouchemal, 2009).

Luego, el disolvente se evapora por agitación magnética continua a temperatura ambiente o bajo presión, lo que se traduce en un proceso lento. Después de que el disolvente se ha evaporado, las NPs solidificadas pueden lavarse y recuperarse por centrifugación, seguido de liofilización para un almacenamiento a largo plazo (W. Abdelwahed, G. Degobert, S. Stainmesse, H. Fessi, 2006). El método completo se ejemplifica en la Figura 6.

El método de emulsificación y posterior evaporación del disolvente se ha aplicado ampliamente para preparar NPs poliméricas con las características deseadas ajustando diferentes parámetros experimentales (Crucho & Barros, 2017).

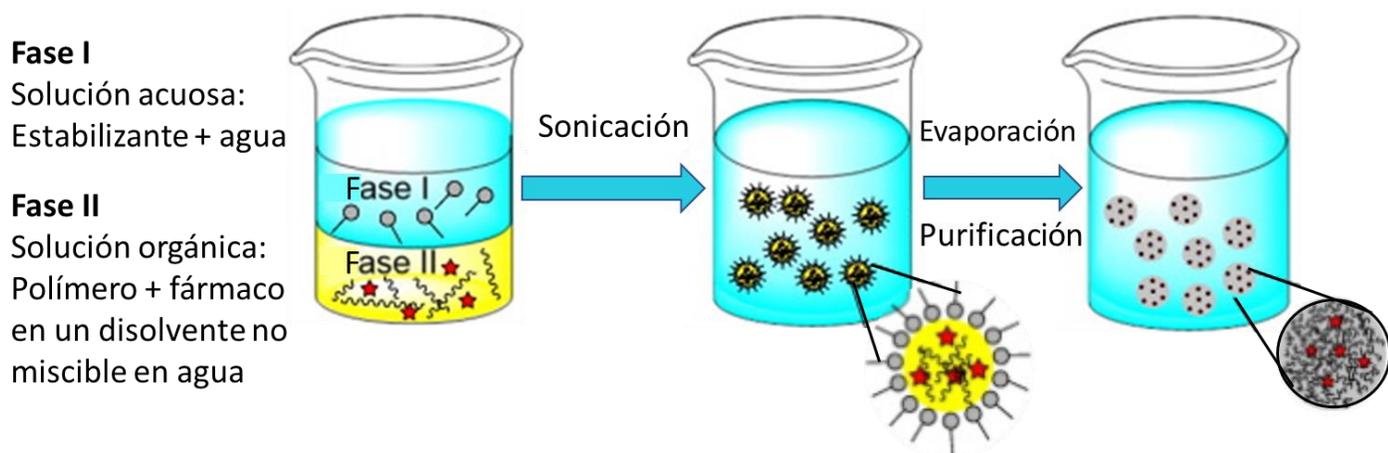


Figura 6. Diagrama del método de emulsificación- evaporación del disolvente para la obtención de nanopartículas. Modificado de (Crucho & Barros, 2017).

Durante la última década, los métodos para la preparación de emulsiones con glóbulos a nanoescala se han desarrollado considerablemente debido a la mejora tecnológica de los dispositivos de emulsificación, lo que ha impulsado el desarrollo de la técnica de evaporación de disolventes. Aunque este método es simple y versátil, solo se puede aplicar principalmente a fármacos liposolubles, además requiere mucho tiempo y también existe la posibilidad de coalescencia de nanopartículas durante la evaporación (Crucho & Barros, 2017). Para la producción a gran escala, se prefieren los métodos alternativos que requieren baja energía en la homogeneización, como el método de composición de inversión de fase (C. Fornaguera, N. Feiner-Gracia, G. Calderó, M.J. García-Celma, C. Solans, 2015).

5.5.2.1.2 Emulsificación-Difusión del disolvente.

El método de emulsificación-difusión de disolvente fue introducido por primera vez por Leroux et al. (J.C. Leroux, E. Allémann, E. Doelker, R. Gurny, 1995), consiste en la formación de una emulsión O/W convencional entre un disolvente parcialmente miscible con agua que contiene el polímero y el medicamento, y una solución acuosa que contiene un tensoactivo, como se muestra en la Figura 7.

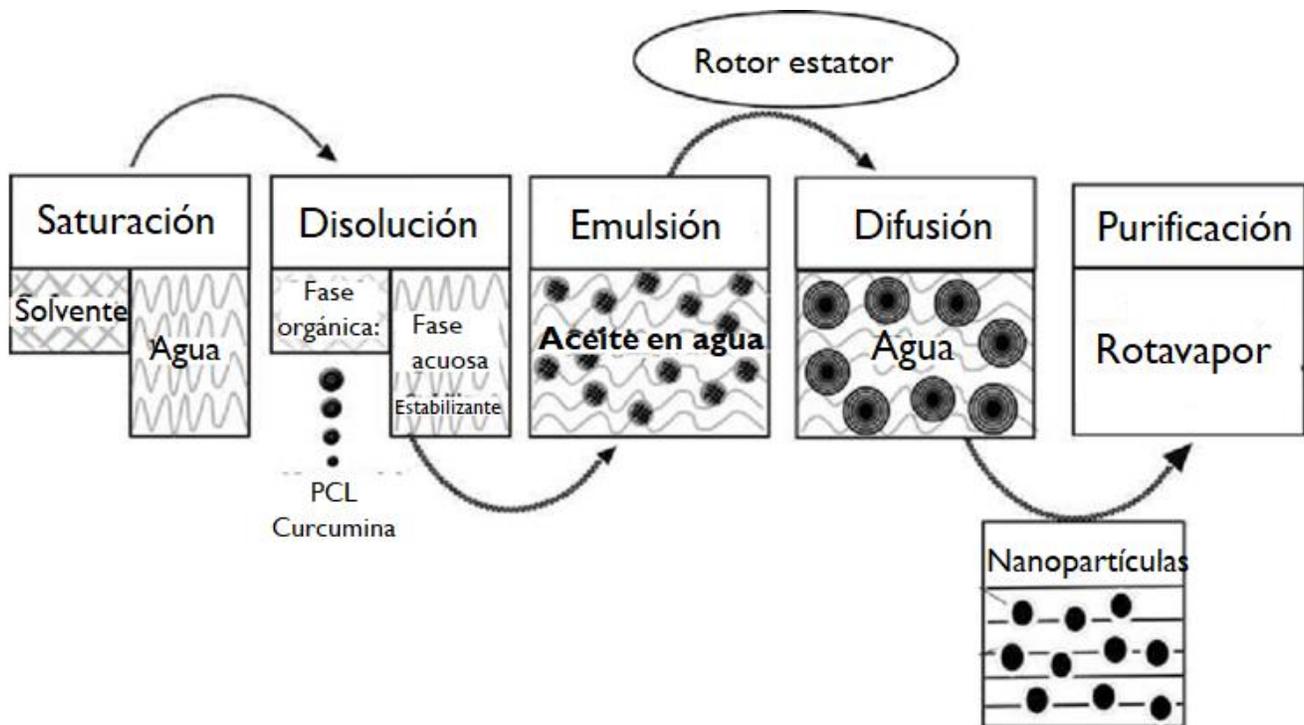


Figura 7. Diagrama del método de emulsificación-difusión para la obtención de nanopartículas. Modificado de (David Quintanar-Guerrero et al., 2012).

Para el éxito de este método, el solvente orgánico en el que se disuelve el polímero se satura con agua a temperatura ambiente para garantizar el equilibrio termodinámico inicial de ambos líquidos.

Posteriormente, se hace una dilución con una gran cantidad de agua lo cual induce la difusión del disolvente desde los glóbulos dispersos hacia la fase externa, dando como resultado la formación de partículas coloidales.

Dicho proceso de difusión es más suave que la evaporación directa del disolvente orgánico de los pequeños glóbulos.

En contraste con los métodos basados en la evaporación del disolvente, en esta técnica el tamaño del glóbulo disminuye repentinamente en una escala de tiempo de milisegundos durante la difusión del disolvente (D. Moinard-Chécot, Y. Chevalier, S. Briançon, L. Beney, H. Fessi, 2008).

En general, las nanoesferas se producen mediante este método, pero las nanocápsulas se pueden obtener simplemente agregando una pequeña cantidad de aceite en la fase orgánica.

Finalmente, dependiendo de su punto de ebullición, el disolvente puede eliminarse por evaporación o filtración.

Varios parámetros de formulación pueden afectar el tamaño de las NPs obtenidas por difusión de disolvente. Por ejemplo, se ha demostrado que la mayoría de las propiedades de las nanocápsulas se determinan en la etapa de emulsificación (D. Moinard-Chécot, Y. Chevalier, S. Briancon, L. Beney, H. Fessi, 2008).

Guinebretière et al. observaron que el tamaño final de las nanocápsulas está influenciado por la concentración de aceite en la fase orgánica, el volumen del disolvente en la emulsión y la naturaleza y la concentración del tensoactivo (S. Guinebretière, S. Briancon, J. Lieto, C. Mayer, H. Fessi, 2002). Además, el espesor de la nanocápsula se vinculó a la concentración de polímero en la fase orgánica.

Quintanar-Guerrero et al. evidenciaron que las altas concentraciones de polímero conducen a tamaños de partículas más grandes con un aumento en el índice de polidispersidad (D. Quintanar-Guerrero, H. Fessi, E. Alléman, E. Doelker, 1996). Por otro lado, se encontró que un aumento en la velocidad de agitación y en la concentración de tensoactivo reducía moderadamente el tamaño de las NPs poliméricas.

También se ha observado que un aumento de la cantidad de tensoactivo resulta en una disminución del tamaño de partícula promedio. Aunque parece que, por encima de algún nivel, ya no es posible una reducción significativa del tamaño, ya que el exceso de tensoactivo permanece en la fase continua y no desempeña un papel significativo en la emulsificación (T. Trimaille, C. Pichot, A. Elaïssari, S. Briancon, T. Delari, 2003; S. Surassmo, S. G. Min, P. Bejrapha, M. J. Choi, 2010).

Los parámetros experimentales relacionados con la etapa de difusión del disolvente no parecen afectar el tamaño de las partículas (C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, 2011). La difusión de disolventes libres está garantizada siempre que se cumpla la condición de solubilidad del disolvente orgánico (Crucho & Barros, 2017).

Solamente se debe tener en cuenta que un menor volumen puede dificultar la difusión del disolvente debido al efecto barrera del agente estabilizante en el glóbulo de emulsión (Crucho & Barros, 2017).

También, se ha observado que el tamaño de partícula disminuye a medida que aumenta la temperatura del agua de dilución (H.-Y. Kwon, J.-Y. Lee, S.-W. Choi, Y. Jang, J.-H. Kim, 2001). En este caso, la reducción de la viscosidad de la fase externa promueve la difusión del disolvente y, por consiguiente, una disminución en el tamaño de las partículas (Crucho & Barros, 2017).

La técnica de emulsificación-difusión presenta claras ventajas, tales como altos rendimientos, facilidad de ampliación, no necesita homogeneizadores o ultrasonidos de alta presión, reproducibilidad de lote a lote y, en general, buenas eficiencias de encapsulación (D. Quintanar-Guerrero, E. Alléman, E. Doelker, H. Fessi, 1997). Sin embargo, también hay algunas desventajas, por ejemplo, los altos volúmenes de agua que se eliminarán de la suspensión y la posible filtración de medicamentos solubles en agua a la fase externa durante la etapa de emulsificación (Crucho & Barros, 2017).

5.5.2.1.3 Salting-out

El procedimiento de emulsificación-difusión descrito se puede considerar como una modificación del método de salting-out, mismo que se esquematiza en la Figura 8 (H. Ibrahim, C. Bindchaedler, E. Doelker, P. Buri, R. Gurny, 1992).

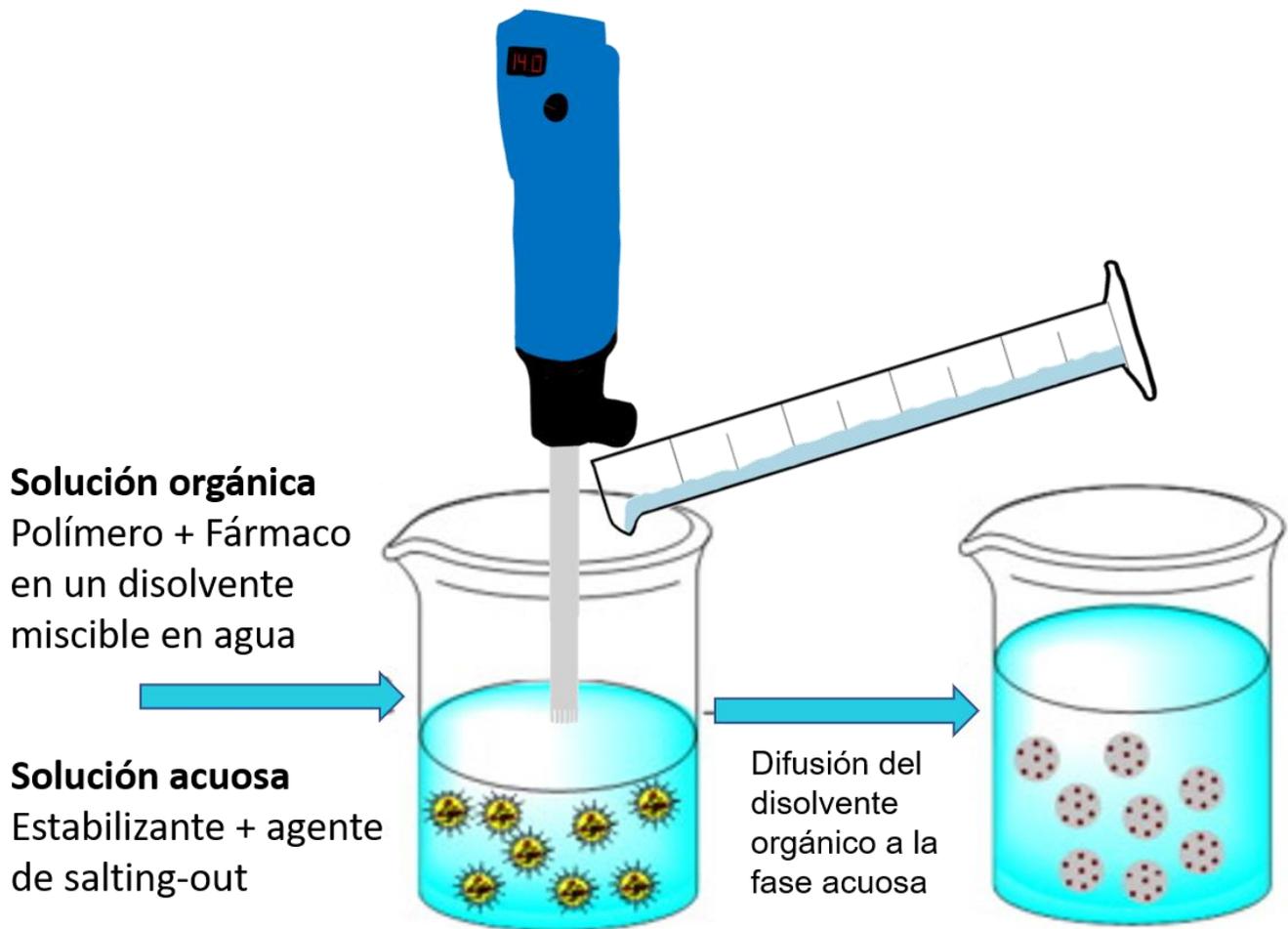


Figura 8. Diagrama del método de salting-out para la obtención de nanopartículas. Modificado de (Crucho & Barros, 2017).

La principal diferencia proviene de la composición de la emulsión que se formula a partir de un disolvente de polímero miscible con agua como la acetona y un gel acuoso que contiene el agente de salting-out y un estabilizador coloidal.

La emulsificación se logra debido a un efecto Ouzo, sin emplear ningún esfuerzo cortante (F. Ganachaud, J.L. Katz, 2005). La miscibilidad de la acetona y el agua se reduce saturando la fase acuosa, lo que permite la formación de una emulsión O/W a partir de las fases de otro modo miscibles (Crucho & Barros, 2017).

Se obtiene un efecto de salting-out mediante la dilución de la emulsión O/W formada con un exceso de agua para promover la difusión de acetona en la fase acuosa, lo que conduce a la precipitación del polímero disuelto en los glóbulos emulsionados (Crucho & Barros, 2017). El disolvente de polímero restante y el agente salino se eliminan mediante filtración de flujo cruzado (Y.N. Konan, R. Gurny, E. Allémann, 2002).

La condición de completa miscibilidad entre el disolvente orgánico y el agua no es esencial, pero simplifica el proceso de ejecución (H. Ibrahim, C. Bindchaedler, E. Doelker, P. Buri, R. Gurny, 1992). Si no es el caso, existe la necesidad de una mayor proporción de volumen de agua/disolvente durante la formación de las nanopartículas.

Las NPs poliméricas se han preparado con éxito mediante el empleo del método de salting-out con varios polímeros, disolventes y agentes de salificación. La única condición que debe cumplirse es la necesidad de un sistema de dos fases en presencia del agente de salting-out (Crucho & Barros, 2017).

Las principales ventajas del método de salting-out es la eliminación de disolventes clorados, que son peligrosos para el medio ambiente y para los sistemas fisiológicos. Las mayores desventajas son la aplicación exclusiva en la encapsulación de fármacos lipófilos y la necesidad de pasos de purificación intensivos debido al uso de sales (Crucho & Barros, 2017).

5.5.2.2 Procedimientos de un paso

5.5.2.2.1 Método de nanoprecipitación

El método de nanoprecipitación, también llamado desplazamiento de disolvente fue desarrollado por primera vez por Fessi et al. (H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, 1989).

El principio básico de esta técnica se basa en la deposición interfacial de un polímero después del desplazamiento del disolvente orgánico de una solución lipofílica a la fase acuosa.

El polímero se disuelve en un disolvente miscible en agua de polaridad intermedia y esta solución se agrega a una solución acuosa en un sólo paso, por etapas, gota a gota o mediante una velocidad de adición controlada (C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, 2011). El esquema general del proceso de obtención se ejemplifica en la Figura 9.

Debido a la difusión espontánea de la solución de polímero en la fase acuosa, las nanopartículas se forman instantáneamente en un intento por evitar las moléculas de agua (Crucho & Barros, 2017).

Este proceso parece estar gobernado por el efecto Marangoni, en donde una disminución en la tensión interfacial entre las dos fases aumenta el área de superficie debido a la rápida difusión y conduce a la formación de pequeños glóbulos de disolvente orgánico (C.V. Sternling, L.E. Scriven, 1959).

A medida que el disolvente se difunde a partir de los pequeños glóbulos, el polímero precipita en forma de nanocápsulas o nanoesferas. En general, la fase orgánica se agrega a la fase acuosa, pero el procedimiento también podría revertirse sin comprometer la formación de nanopartículas (Crucho & Barros, 2017).

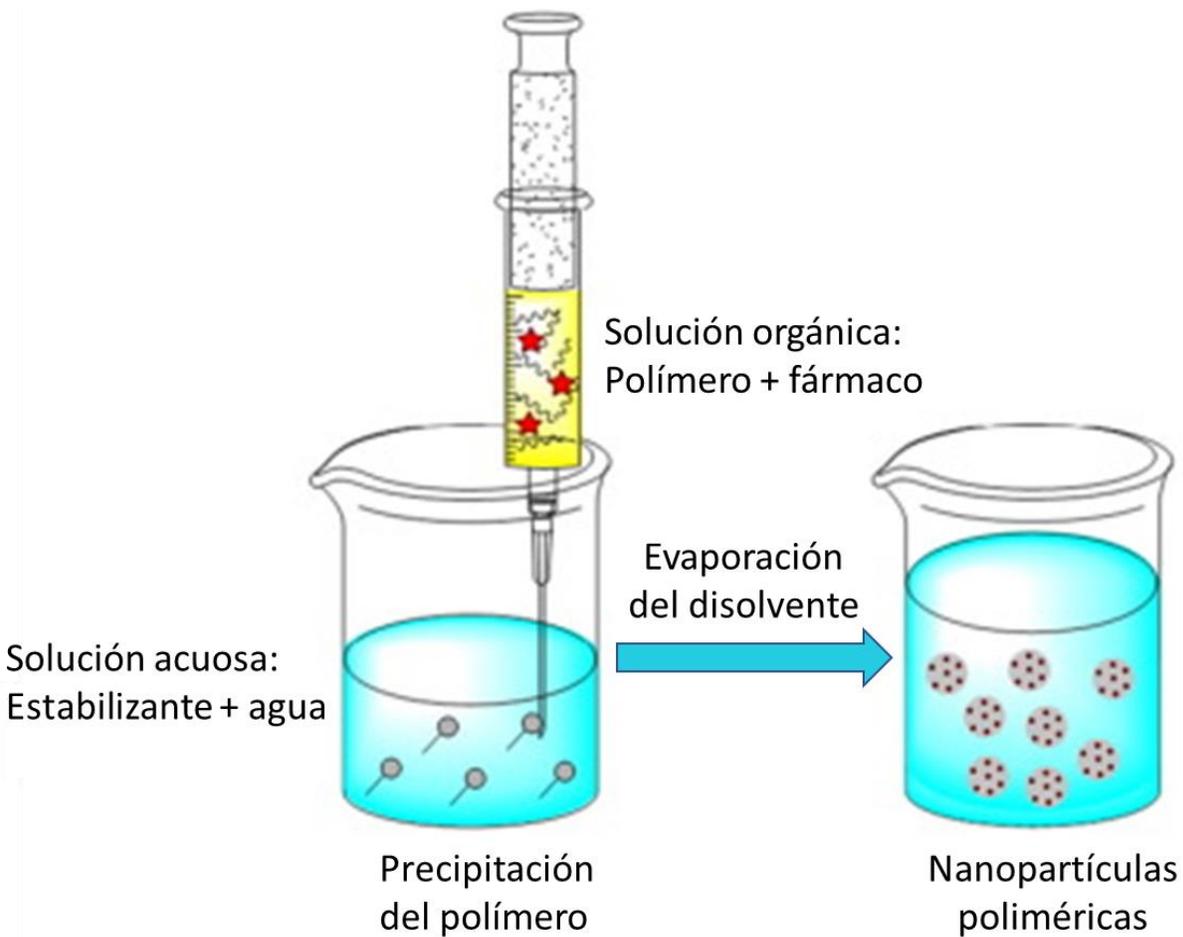


Figura 9. Diagrama del método de nanoprecipitación para la obtención de nanopartículas.
Modificado de (Crucho & Barros, 2017).

En general, se pueden incluir tensoactivos en el proceso para garantizar la estabilidad de la suspensión coloidal, pero su presencia no es necesaria para asegurar la formación de nanopartículas (Crucho & Barros, 2017).

Las nanopartículas obtenidas se caracterizan típicamente por un tamaño bien definido y una distribución de tamaño estrecha, que es mejor que las producidas por el procedimiento de emulsificación-evaporación del disolvente.

Las variables clave que condicionan las propiedades finales de las nanopartículas son aquellas relacionadas con el diseño experimental. Al ajustar cuidadosamente la naturaleza y la

concentración del polímero, fármaco y tensoactivo la relación de fase orgánica/fase acuosa, la velocidad de inyección de la fase orgánica, la dinámica del fluido y la velocidad de mezcla es posible controlar las propiedades fisicoquímicas de las NPs.

Por ejemplo, aumentar la concentración de polímero o el peso molecular del polímero generalmente resulta en un aumento del tamaño de partícula. Estos hallazgos se explican por una mayor viscosidad en la fase orgánica (M. Chorny, I. Fishbein, H.D. Danenberg, G. Golomb, 2002).

Bukhari et al. estudiaron el efecto del medio de dispersión disolvente/no disolvente en la preparación de NPs (A. Bukhari, A. Idris, M. Atta, 2014) y en dicho estudio llegaron a la conclusión de que la diferencia de la constante dieléctrica más la afinidad del disolvente por el no disolvente eran responsables de la nanoprecipitación. Además, la morfología dependía notablemente de la naturaleza de la fase de dispersión.

También se ha encontrado que la centrifugación posterior a la síntesis de las NPs, puede causar apelmazamiento, coalescencia y dificultades para redispersar las NPs (G. Dalwadi, H. A. E. Benson, Y. Chen, 2005).

En general, el desafío en la nanoprecipitación es encontrar un sistema adecuado de fármaco/polímero/disolvente/no disolvente, que permita la producción exitosa de nanopartículas y la encapsulación del fármaco. Este método es ampliamente utilizado debido a su simplicidad, rapidez y reproducibilidad.

Una de las dificultades es el proceso de mezcla durante la nanoprecipitación. Una plataforma microfluídica podría ser una herramienta prometedora para la síntesis controlada de NPs, donde el flujo hidrodinámico asegura una mezcla rápida y sintonizable de disolvente/no disolvente en los canales microfluídicos (H. Xie, J. W. Smith, 2010; R. Karnil, P. Gu, P. Basto, C. Cannizzaro, L. Dean, W. Kyei-Manu, R. Langer, O. C. Farokhzad, 2008). Otro desarrollo reciente es la llegada de la automatización a la nanoprecipitación con experimentación de alto rendimiento

(robot de pipeteo, impresión de inyección de tinta) (S. Schubert, J.T. Delaney, U.S. Schubert, 2011).

Otro inconveniente de este método es la escasa eficacia de encapsulación de los fármacos hidrófilos, ya que el fármaco puede difundirse a la fase acuosa durante la precipitación del polímero. Pero, la modificación de la solubilidad del fármaco a través de cambios en el pH o variando la composición del disolvente, se encuentran entre otros medios para mejorar la eficiencia de encapsulación (E. Leo, B. Brina, F. Forni, M. A. Vandelli, 2004; L. Peltonen, J. Aitta, S. Hyvönen, M. Karjalainen, J. Hirvonen, 2004).

5.5.2.2 Diálisis

El método de diálisis se ha aplicado con éxito en la preparación de pequeñas NPs con una distribución de tamaño reducido (H.J. Jeon, Y.I. Jeong, M.K. Jang, Y.H. Park, J.W. Nah, 2000).

La obtención de NPs por diálisis se rige por un mecanismo similar al descrito para la técnica de nanoprecipitación, pero con una configuración experimental ligeramente diferente, como se muestra en la Figura 10.

En este método, se utilizan tubos de diálisis o membranas semipermeables con un corte de peso molecular adecuado como barrera física para el polímero (J.P. Rao, K.E. Geckeler, 2011). Los prerrequisitos básicos son la miscibilidad de los disolventes y la existencia de soluciones poliméricas diluidas (Crucho & Barros, 2017).

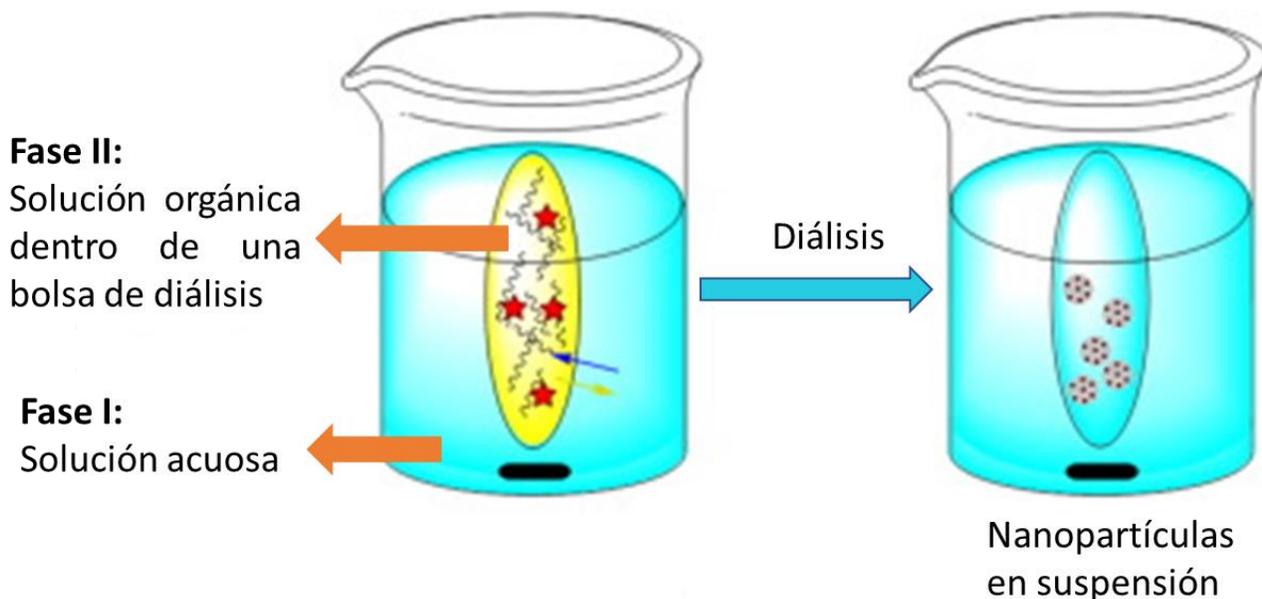


Figura 10. Diagrama del método de diálisis para la obtención de nanopartículas. Modificado de (Crucho & Barros, 2017).

Generalmente, el polímero se disuelve en un disolvente orgánico, se coloca dentro de la membrana de diálisis y se dializa contra un no disolvente. El desplazamiento del disolvente dentro de la membrana hace que la mezcla sea cada vez menos capaz de disolver el polímero. Además, un aumento en la tensión interfacial resulta en la agregación del polímero y conduce a la formación de una suspensión coloidal de nanopartículas (Crucho & Barros, 2017).

Aunque la diálisis es un método simple y común, el gran volumen de medio dializante podría provocar una liberación prematura de la carga útil de nanopartículas debido a la larga duración del proceso.

La morfología y la distribución del tamaño de partícula de las NPs obtenidas por el método de diálisis se pueden modular mediante varios parámetros experimentales, como el par de disolvente/no disolvente, el corte de peso molecular de diálisis (MWCO, por sus siglas en inglés), la temperatura a la que se realiza el procedimiento, la concentración de polímero y la velocidad de mezcla del disolvente (L. Chronopoulou, I. Fratoddi, C. Palocci, I. Venditti, M. V. Russo, 2009), así como la viscosidad del disolvente, la miscibilidad con el agua y el

comportamiento de solubilidad del polímero (Y.-I. Jeong, C.-S. Cho, S.-H. Kim, K.-S. Ko, S.-I. Kim, Y.-H. Shim, J.-W. Nah, 2001). La influencia del MWCO también fue estudiada y se demostró que la reducción de la membrana MWCO induce una disminución del tamaño de partícula medio (L. Chronopoulou, I. Fratoddi, C. Palocci, I. Venditti, M.V. Russo, 2009).

5.5.2.2.3 Tecnología de fluidos supercríticos.

Como se puede observar, los métodos analizados en las secciones anteriores requieren el uso de disolventes orgánicos y tensoactivos que son peligrosos para el medio ambiente y para los sistemas fisiológicos. Por otro lado, si quedan impurezas de disolventes residuales en las NPs cargadas con el fármaco, éstas se vuelven tóxicas y pueden degradar el fármaco dentro de la matriz del polímero (K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.R. Kulkarni, W.E. Rudzinski, 2001).

Para superar estos obstáculos, los esfuerzos de investigación se han dirigido a desarrollar métodos ambientalmente racionales para la producción de NPs. De acuerdo con esta necesidad, los fluidos supercríticos (SCF, por sus siglas en inglés) se han convertido en una alternativa atractiva debido al uso de tecnología respetuosa con el medio ambiente, escalamiento fácil y reproducible, buen control de la homogeneidad estructural y producción de nanocompuestos de alta pureza (E. Elizondo, J. Veciana, N. Ventosa, 2012).

Un SCF es un fluido que se ha comprimido y calentado por encima de su temperatura crítica (T_c) y presión crítica (P_c). En tales condiciones, sus propiedades fisicoquímicas son intermedias entre un gas y un líquido. Este es un nuevo estado de la materia, en el que el fluido se comporta como un gas y también tiene la densidad típica de un líquido y, por lo tanto, sus propiedades de solvatación (D. Sanli, S.E. Bozbag, C. Erkey, 2012).

El dióxido de carbono supercrítico ($scCO_2$) es el SCF más utilizado porque tiene condiciones críticas leves, es abundante, barato, no inflamable, no tóxico y amigable con el medio ambiente (D. Sanli, S.E. Bozbag, C. Erkey, 2012).

La tecnología de los SCF ha ganado una gran atención en la investigación farmacéutica. Recientemente, se ha publicado información muy interesante sobre los métodos de formación (J. Fages, H. Lochard, J. J. Letourneau, M. Sauceau, E. Rodier, 2004), formulación (M. Perrut, J. J. Leboeuf, 2005), y control de partículas farmacéuticas con un SCF. Incluso, Mishima et al. proporcionaron una visión general sobre la formación de partículas biodegradables para la administración de fármacos y genes mediante la tecnología de SCF (K. Mishima, 2008).

Las técnicas de procesamiento más comunes que involucran SCF son la rápida expansión de las soluciones supercríticas (RESS), el proceso antidisolvente de gases (GAS), el proceso de antidisolventes supercríticos (SAS) y sus diversas modificaciones, y las partículas de los procesos de solución saturada de gas (PGSS) (S.-D. Yeo, E. Kiran, 2005).

Estos métodos dependen de la función principal que desempeña el SCF, es decir, si se usa como un disolvente, un soluto o un antidisolvente (Crucho & Barros, 2017).

Existe una vasta literatura sobre la producción de micropartículas cargadas con medicamentos que utilizan tecnología SCF. Pero el empleo de la tecnología SCF en NPs no se ha estudiado suficientemente.

A pesar de las significativas ventajas de la tecnología de SCF, la aplicación de esa tecnología requiere una alta inversión de capital para los equipos. Además, a pesar de la disponibilidad de una serie de fluidos supercríticos, la mayoría de los polímeros exhiben poca solubilidad o incluso no solubilidad en los fluidos supercríticos y esto es el principal inconveniente de esta tecnología.

En resumen, las NPs poliméricas son sistemas adecuados para la administración de fármacos a zonas de difícil acceso como lo es el cerebro, debido a la posibilidad de modularlos en términos de forma, tamaño, hidrofobicidad, recubrimiento, química y carga superficial; el control sobre estas características puede mejorar la capacidad de las NPs para mejorar la estabilidad del agente terapéutico en circulación, dirigir los procesos de transporte, controlar la liberación de la carga en el sitio deseado y mejorar la eficiencia de penetración de la BHE (Barbu, Molnàr, Tsibouklis, & Górecki, 2009).

Los métodos más importantes para la preparación de acarreadores de fármacos en nanopartículas, junto con sus ventajas y desventajas, se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Nanopartículas poliméricas: ventajas generales y desventajas de los métodos de preparación (Pinto Reis et al., 2006).

Método	Simplicidad de procedimiento	Necesidad de purificación	Ampliación de instalaciones	EE (%)	Seguridad de compuestos
Polimerización de monómeros.					
Polimerización en emulsión					
Acuoso	Alto	Alto	Alto	Alto	Medio
Orgánico	Bajo	Alto	NR	Bajo	Bajo
Condensación interfacial	Bajo	Alto	Medio	Alto	Bajo
Polímeros preformados					
Emulsificación / evaporación de solvente	Alto	Bajo	Bajo	Medio	Medio
Emulsión / difusión solvente	Medio	Medio	Alto	Alto	Medio
Salting-out	Alto	Alto	Alto	Alto	Bajo

EE, eficiencia de encapsulación; NR, no hay referencia disponible.

Como se mencionó anteriormente, los polímeros sintéticos más utilizados en sistemas de administración de fármacos basados en NPs son biodegradables, entre los más comunes y que están aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) se encuentran el ácido poliláctico (PLA), el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y la poli-ε-caprolactona (PCL) (Hiljanen-Vainio, Karjalainen, & Seppälä, 1996).

5.6 Poli-ε-caprolactona

La PCL es un poliéster alifático lineal, un polímero biodegradable y biocompatible; es prometedora para el desarrollo de NPs (Tavares et al., 2016). La estructura molecular de PCL se muestra en la Figura 11.

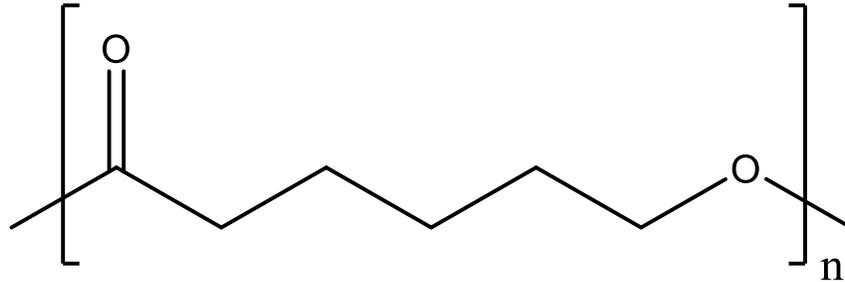


Figura 11. Estructura molecular de la poli-ε-caprolactona

Es fuertemente hidrofóbica, semicristalina, altamente soluble en diversos disolventes orgánicos a temperatura ambiente y fácilmente procesable debido a su baja temperatura de fusión (Guarino, Gentile, Sorrentino, & Ambrosio, 2017), también presenta degradación relativamente lenta; las propiedades fisicoquímicas de la PCL se muestran en la Tabla 5. Es gracias a dichas atractivas propiedades que la PCL se postula como un polímero de estudio con considerables aplicaciones en el campo biomédico.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de la poli-ε-caprolactona (Mondal et al., 2016b).

Propiedad	Valor
Densidad (g/cm ³)	1.11
Peso molecular (g/mol)	530-630000
Solubilidad	Altamente soluble en benceno, cloroformo, DCM y tolueno a temperatura ambiente. Ligeramente soluble en acetona, 2-butanona, DMF y acetonitrilo. Insoluble en agua, alcoholes, éter dietílico.
Temperatura de fusión (T _m)	65 °C
Temperatura de transición vítrea (T _g)	-65 a -61 °C

Cristalinidad (%)	67
Módulo de elasticidad longitudinal (MPa)	190
Alargamiento a la rotura (%)	>500
Esfuerzo de tracción en la rotura (MPa)	14
Permeabilidad al agua a 25 °C (g/m ² /día)	177
Tensión superficial (g) en mN/m	51

La PCL ocupa una posición única: al mismo tiempo que es biodegradable y miscible con una variedad de polímeros, cristaliza muy fácilmente. Además, carece de toxicidad y tiene una gran permeabilidad (Hiljanen-Vainio et al., 1996). Las propiedades físicas, térmicas y mecánicas de la PCL dependen principalmente de su peso molecular y grado de cristalinidad, que también contribuyen a su capacidad para degradarse por hidrólisis de sus enlaces éster en condiciones fisiológicas (Guarino et al., 2017).

Los tiempos de degradación de la PCL dependen de su peso molecular, grado de cristalinidad y morfología (Guarino et al., 2017). La PCL no es degradada por enzimas dentro del cuerpo humano o animales, ya que éstos no cuentan con las enzimas adecuadas para dicho proceso, sin embargo, puede ser degradada por microorganismos tales como bacterias y hongos ya que, al ser un poliéster, el esqueleto del polímero tiene enlaces éster que son hidrolizables.

Aunque la PCL se ha utilizado ampliamente en el campo farmacéutico, su característica hidrofóbica conduce a una rápida eliminación del cuerpo, así como a una baja estabilidad de las NPs en el agua. Para aumentar la estabilidad de las NPs de PCL, las modificaciones de la superficie son esenciales (Mondal, Griffith, & Venkatraman, 2016a).

5.7 Tipos de fuerzas presentes en las dispersiones

5.7.1 Fuerzas de interacción molecular.

Las fueras de interacción molecular son generalmente atractivas y actúan entre las partículas; son las fuerzas que interaccionan entre átomos, moléculas e iones (Giudice & Pereyra, 2009). Estas fuerzas atraen dos partículas a distancias cortas y si no existe una fuerza de repulsión

que se oponga a estas fuerzas, las partículas se agregarán (Gómez Villarraga, Ros Badosa, & García-Antón Aviñó, 2013). Cabe mencionar, que la fuerza de atracción entre partículas depende de la distancia que las separa y de su naturaleza química y/o tratamiento superficial. Por esta razón, es necesario utilizar un agente estabilizante capaz de originar una fuerza de repulsión que contrarreste las fuerzas de interacción molecular. Dicha estabilización se puede dar por efectos electrostáticos o por impedimento estérico.

5.7.2 Fuerzas electrostáticas: formación de la doble capa

Las fuerzas electrostáticas o culómbicas actúan entre especies cargadas y su magnitud es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia entre las mismas, éstas pueden ser de naturaleza atractiva o repulsiva dependiendo del signo de la carga neta superficial presente y son las responsables de la adsorción de iones en la superficie de la partícula y la atracción de otros iones que se disponen en el medio dispersante favoreciendo la formación de la doble capa de cargas en la interfase (Giudice & Pereyra, 2009).

La doble capa de cargas actúa impidiendo el acercamiento entre partículas a través de las fuerzas de repulsión generadas por las cargas del mismo signo. Generalmente, la doble capa se constituye en la interfase, se forma de acuerdo con la carga superficial neta sobre la partícula y atrae a los iones de carga opuesta presentes en la solución, como se muestra en la Figura 12, de tal modo que las cargas tienden a ordenarse a ambos lados de la interfase.

No obstante, la interacción de las fuerzas electrostáticas genera en la solución una distribución de cargas en forma difusa y decreciente hacia el seno de la solución; en consecuencia, la doble capa total contiene una capa compacta (iones específicamente adsorbidos, sustancias orgánicas y gases disueltos) y otra capa difusa conformada por aniones y cationes (Giudice & Pereyra, 2009).

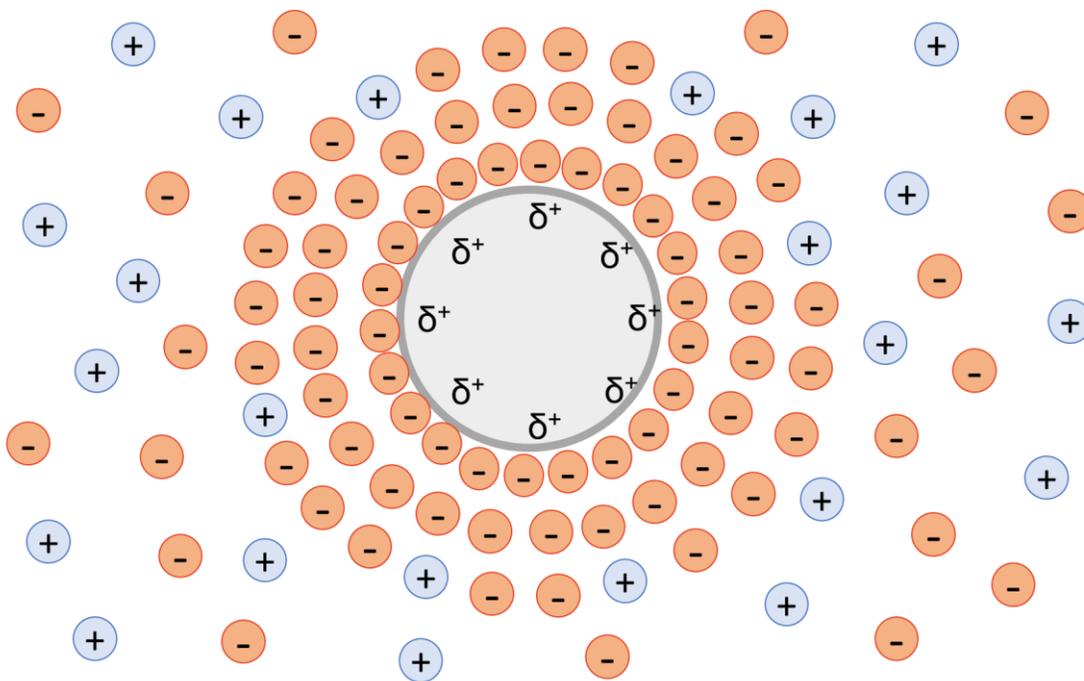


Figura 12. Formación de la doble capa eléctrica.

5.7.3 Fuerzas de atracción y repulsión combinadas

Derjaguin y Landau en Rusia en 1941 y Verwey y Overbeek en Holanda en 1948 propusieron en forma independiente una interpretación de la estabilidad de los coloides en suspensión; en su honor se ha nombrado teoría DLVO (Giudice & Pereyra, 2009).

Esta teoría se basa en la fuerza resultante del equilibrio entre las fuerzas de repulsión electrostática y fuerzas de atracción tipo Van der Waals durante el acercamiento de dos interfaces. La repulsión electrostática llega a ser importante cuando los coloides se aproximan y la doble capa comienza a interferir.

Una curva de repulsión electrostática indica la cantidad de energía que hay que vencer para que las partículas puedan ser forzadas a juntarse. Esta energía llega a un valor máximo cuando las partículas están casi juntas, disminuye a cero fuera de la doble capa y su valor máximo está relacionado con el potencial de la superficie.

Una curva de energía de atracción indica la variación en las fuerzas de van der Waals con la distribución entre las partículas.

La teoría DLVO explica la tendencia de los coloides a aglomerarse o permanecer separados al combinar la atracción de van der Waals y la curva de repulsión electrostática: la curva combinada es llamada la energía neta de interacción. El diagrama de energía potencial obtenido de la interacción entre dos partículas (Figura 13), indica que a distancias de separación relativamente grandes predomina el efecto de atracción; mientras que, a distancias menores que las correspondientes al mínimo de la curva prevalece el efecto de repulsión ya que durante el acercamiento de las partículas las capas adsorbidas se interpenetran produciendo una alta repulsión electrostática o culómbica que contribuye con la estabilidad de la dispersión (lo que sucede en el mecanismo de estabilización electrostática o por carga). Sin embargo, si las partículas poseen suficiente energía cinética (movimiento browniano) para lograr un acercamiento aún mayor, la barrera de repulsión resulta vencida poniéndose de manifiesto las fuerzas atractivas de van der Waals que conducen a la floculación irreversible (Giudice & Pereyra, 2009).

La Figura 13 se representan las energías potenciales de atracción V_A y de repulsión V_R en función de la distancia entre las partículas cargadas. Se observa que cuando las partículas se aproximan desde la distancia e hasta la distancia b deben superar un máximo de repulsión V_m antes de alcanzar el mínimo de atracción V_p donde la coagulación es irreversible. La altura desde ese máximo V_m define la estabilidad del sistema que corresponde a un potencial zeta aproximado de 30 mV, de esta forma el sistema se puede considerar estable.

La coagulación en el mínimo secundario V_S es débil y reversible porque la energía térmica de partículas muy pequeñas es del mismo orden de magnitud que la energía de este mínimo, y el movimiento Browniano es suficiente para desagregar las partículas.

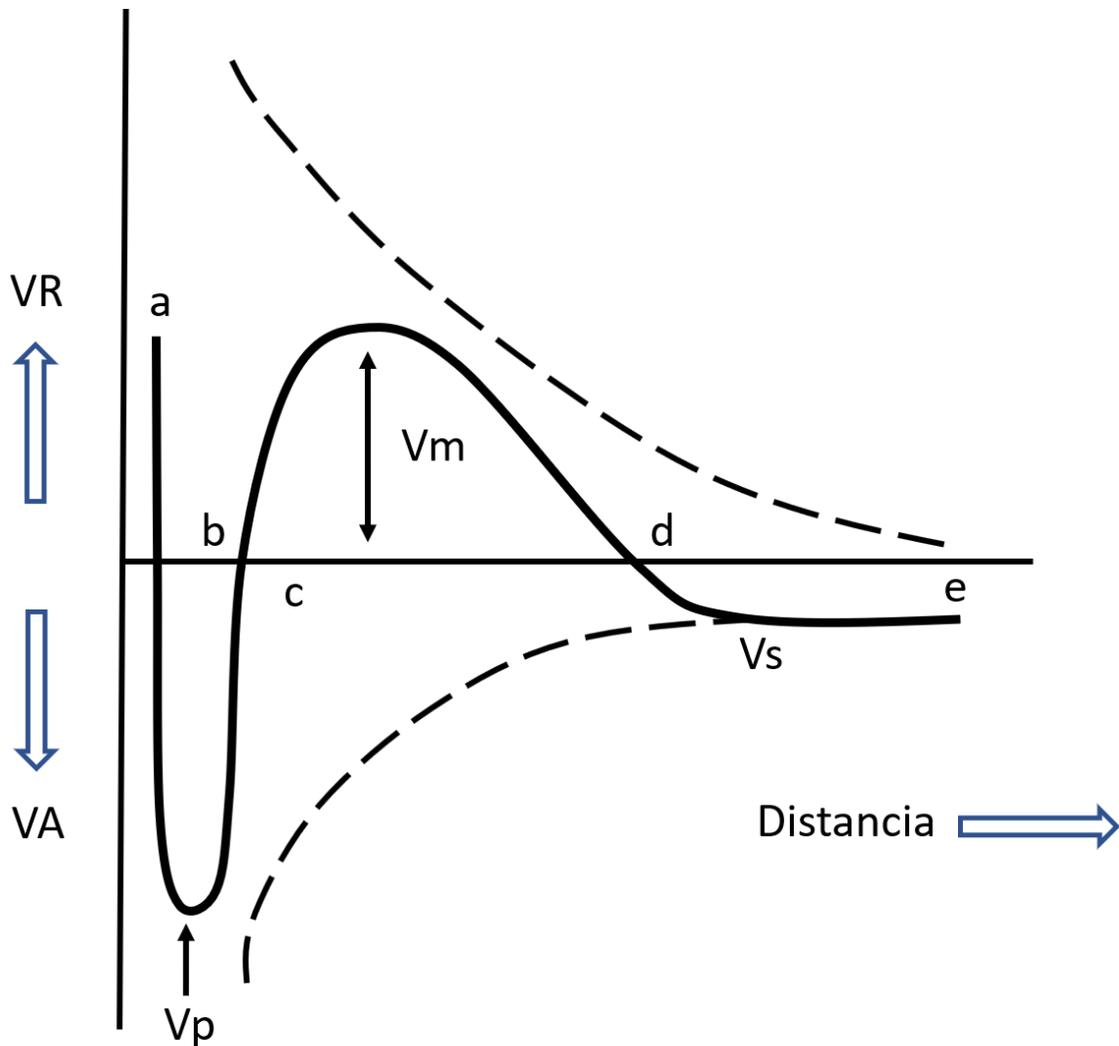


Figura 13. Efecto de las energías de atracción y repulsión en la estabilidad de las partículas coloidales.

5.8 Estabilizantes

Debido a que las partículas coloidales son inestables y tienen tendencia a agregarse, es necesario conservar su estado mediante una adecuada estabilización, ya que la agregación ocasionaría la pérdida de las propiedades asociadas a la nanoescala (Gómez Villarraga et al., 2013).

La estabilidad está fundamentalmente gobernada por el balance entre las fuerzas que actúan en los sistemas dispersos; las fuerzas atractivas deben ser contrarrestadas por las fuerzas de

repulsión proporcionadas por las cargas adsorbidas en la superficie de la partícula (doble capa) y/o por el impedimento estérico (adsorción de polímeros en la interfase) (Giudice & Pereyra, 2009), cuando en una dispersión las fuerzas atractivas son superiores en magnitud a las repulsivas, se dice que el sistema está insuficientemente estabilizado y ocurre la floculación.

Por lo tanto, se puede decir que la estabilidad de la dispersión depende fuertemente del tipo de fuerzas que se manifiestan entre las partículas, mismas que se pueden clasificar en atractivas y en repulsivas.

5.8.1 Tipos de estabilización

5.8.1.1 Estabilización electrostática

El principio de la estabilización electrostática está relacionado con el efecto que las fuerzas electrostáticas repulsivas tienen en los glóbulos de la emulsión. Cuando dos superficies o partículas cargadas idénticamente se aproximan en un medio fluido, generan una interacción repulsiva que, dependiendo de su magnitud, la distancia entre las superficies o partículas y las fuerzas de atracción que puedan generarse las mantendrá separadas (Figura 14). Estas interacciones representan una barrera de energía que ayuda a reducir la coalescencia de las partículas. Para que ocurra la coalescencia o floculación de los glóbulos en una emulsión, éstos deben estar en contacto unos con otros, para evitarlo, los glóbulos pueden mantenerse separados por la repulsión entre sus superficies cargadas (Gómez Villarraga et al., 2013), ya que cuando la partícula adsorbe un ion de carga opuesta, el potencial electrocinético de la doble capa disminuye y el resultado obtenido es que la repulsión entre las partículas decrece y por lo tanto se adhieren entre sí facilitando la floculación.

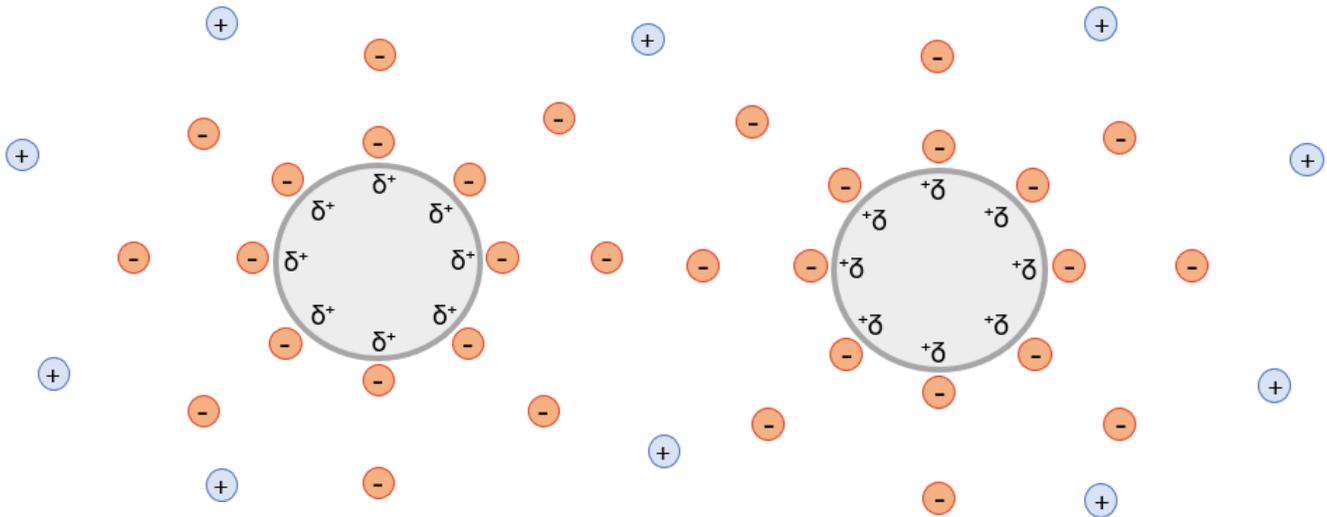


Figura 14. Estabilización electrostática de partículas coloidales.

La presencia de agentes tensoactivos sobre la superficie de las partículas y sus respectivos contraiones, producen una doble capa, cada capa tiene una carga opuesta a la otra, y esto genera una repulsión de tipo electrostático entre las partículas, evita la agregación (Gómez Villarraga et al., 2013) y produce un perfil de potencial eléctrico que exhibe su máximo valor en la superficie y varía gradualmente aproximándose a cero fuera de la capa difusa.

Los agentes tensoactivos tienen peso molecular entre 1000 y 2000 g/mol; son compuestos de naturaleza orgánica, en los que una parte de la estructura molecular es hidrofílica (polar, permanece en la fase acuosa) y la otra hidrofóbica (no polar, interacciona con la parte oleosa no soluble en agua), facilitando así la humectación, penetración y propagación sobre la superficie y en los poros del sustrato (Giudice & Pereyra, 2009). Dichos agentes pueden ser catiónicos, aniónicos, anfóteros (que se comportan como catiónicos a valores de pH ácidos o aniónicos en la zona alcalina) y no iónicos.

Un punto de particular importancia es el potencial Z, que se define como el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundantes en una partícula para desestabilizarla, por lo que este parámetro es un indicativo de la estabilidad de una partícula.

Existen factores que producen la disminución del espesor de la doble capa de cargas y en consecuencia la reducción del valor del potencial Z; en general, la caída de potencial es más significativa en la zona compacta y se ha comprobado que valores por debajo de 15 ó 20 mV favorecen el acercamiento de las partículas e incrementan el número de colisiones, promoviendo así la floculación de la fase dispersa (Giudice & Pereyra, 2009).

5.8.1.2 Estabilización por impedimento estérico

La estabilización por impedimento estérico está basada en que la aproximación de una partícula a otra, promovida por la acción de las fuerzas de van der Waals, electrostáticas y del movimiento browniano, puede impedirse construyendo una barrera física a través de la adsorción de un material polimérico en su superficie. La adsorción de moléculas o la coordinación de ligandos sobre la superficie de las partículas proporcionan una capa protectora que evita la agregación. En el espacio entre las partículas, las moléculas adsorbidas limitan entre sí su movimiento, provocando una disminución de la entropía y, por ende, un aumento de la energía libre. Asimismo, cuando dos capas protectoras comienzan a interpenetrarse se da un aumento local de la concentración de moléculas adsorbidas originando una repulsión osmótica, ya que el disolvente trata de restablecer el equilibrio mediante la dilución de las moléculas y separando de este modo las partículas (Gómez Villarraga et al., 2013).

La estabilización estérica es efectiva para dispersiones acuosas y no acuosas, pero se suele usar en medios no polares donde la estabilidad electrostática es difícil de alcanzar. Cabe mencionar que la eficiencia de la estabilización estérica está regida por la estructura de la especie adsorbida, así como el segmento adsorbido y su densidad de adsorción (Giudice & Pereyra, 2009). Estos agentes estabilizantes son polímeros de alto peso molecular (entre 5000 y 30000 g/mol), formados por moléculas lineales o ramificadas.

Los polímeros tensoactivos poseen en su estructura dos componentes que combinan la aptitud para adsorberse fuertemente sobre la superficie de una partícula y la facilidad de solvatación de la cadena polimérica en el vehículo o solvente que favorece el impedimento estérico.

La estabilización por impedimento estérico es un factor dominante cuando se trata con polímeros anfifílicos. Estos polímeros pueden mejorar la estabilidad de las emulsiones y retardar el transporte a través de las interfaces, ya que forman películas gruesas. Los polímeros anfifílicos, como es el caso de los Pluronic[®], se usan como tensoactivos macromoleculares, son adsorbidos en la interfase y forman películas gruesas semisólidas que promueven la estabilidad y retardan el transporte hacia la fase externa. Esta estrategia es muy prometedora, ya que además requiere de cantidades menores de tensoactivo y éstos pueden ser macromoléculas de origen natural (Gómez Villarraga et al., 2013).

5.8.1.2.1 Pluronic[®]

Con respecto a la estabilidad de la nanosuspensión, se debe asegurar la estabilidad e integridad estructural de las NPs para garantizar el suministro del fármaco. Debido a su característica anfifílica, los poloxámeros, también conocidos como Pluronic[®], se han utilizado para obtener NPs recubiertas en la superficie con fines de administración de fármacos (Shubhra, Tóth, Gyenis, & Feczkó, 2014).

Los poloxámeros son copolímeros sintéticos de tres bloques compuestos por unidades hidrófobas e hidrófilas de óxido de propileno (PPO) y óxido de etileno (PEO), respectivamente (Shubhra et al., 2014) (Figura 15). La cadena PPO, en virtud de cada monómero, es hidrófobo en comparación con las cadenas de PEO hidrófilas.

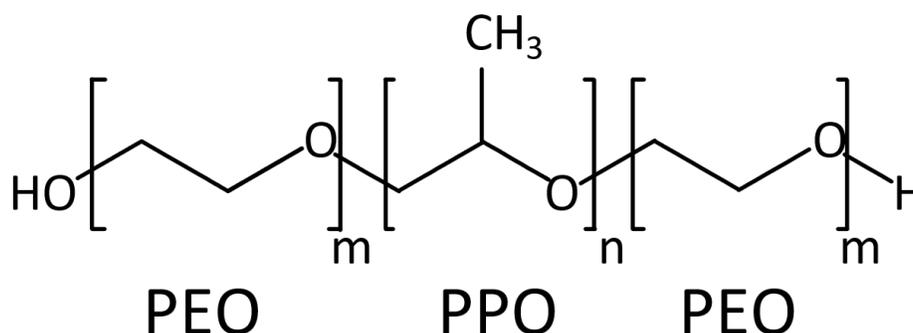


Figura 15. Estructura de la familia plurónica de copolímeros tribloque.

Los miembros de la familia Pluronic® difieren entre sí en las longitudes de las cadenas PEO y PPO y, por lo tanto, en su relativa hidrofobicidad/hidrofilia. La presencia de un bloque hidrófobo entre dos bloques hidrófilos hace que estos copolímeros tribloques sean anfifílicos, y sean solubles en una variedad de disolventes acuosos y orgánicos. La anfifilicidad confiere a los Pluronic® la propiedad de interactuar con las membranas lipídicas. Es importante destacar que estos compuestos no iónicos no tienen grupos reactivos, a excepción de los grupos hidroxilo del extremo de la cadena (J. C. Wang, Bindokas, Skinner, Emrick, & Marks, 2017).

5.8.1.2.1.1 *Pluronic® F68*

Pluronic® F68 es una mezcla polidispersa de copolímeros tribloque. Es un Pluronic® hidrófilico al 80% que tiene la composición PEO 76-PPO 29-PEO 76 (8,600 Da), y en múltiples estudios se han analizado propiedades de protección celular. A 37 °C, la concentración micelar crítica (CMC, por sus siglas en inglés) de Pluronic® F68 se ha informado de forma variable en dos órdenes de magnitud: desde 125 µM (Maskarinec et al., 2002), hasta 1.1 mM (Batrakova et al., 1998), y hasta un nivel máximo de 8 mM (Alexandridis et al., 1994).

Cabe destacar que los Pluronic® uniméricos no forman enlaces iónicos ni covalentes con otras moléculas y, por lo tanto, las interacciones de la membrana plurónica son débiles. Se ha demostrado que el bloque de PPO hidrofóbico de Pluronic® F68 desempeña un papel esencial en la conducción de Pluronic® F68 para interactuar efectivamente con la superficie de la membrana (Cheng et al., 2012).

Por lo anterior, este copolímero anfifílico presenta características que lo convierten en un portador ideal para la administración de fármacos hidrófilos/hidrófobos. El también llamado poloxámero 188 puede autoensamblarse como una micela en soluciones acuosas con un núcleo hidrofóbico y una superficie hidrofílica, debido precisamente a su naturaleza anfifílica. Y es debido a dicha característica junto con su capacidad de respuesta a estímulos (tales como funciones sensibles al pH y térmicas), que es posible optimizar el rendimiento de Pluronic® F68 para fines de liberación de fármacos con diferentes temperaturas (Zarrintaj, Ahmadi, Reza Saeb, & Mozafari, 2018).

La estabilidad química de Pluronic® F68 en solución es importante para su aplicación en formulaciones biológicas, debido a que en estado sólido se degrada mediante autooxidación, y escisión de cadena a temperaturas elevadas, produciendo aldehídos, ácidos orgánicos y polímeros de menor peso molecular (T. Wang et al., 2019).

Los tensoactivos se han utilizado ampliamente en formulaciones biológicas para prevenir la agregación de proteínas durante la fabricación, el estrés por congelación/descongelación, la agitación y el almacenamiento a largo plazo. Entre ellos, el Poloxámero 188 es uno de los agentes tensoactivos que más se han utilizado en productos comerciales con aplicaciones biológicas (T. Wang et al., 2019).

Uno de los fármacos de mayor interés recientemente es la curcumina, ya que ha mostrado en diferentes modelos, *in vitro* e *in vivo*, potencial terapéutico para enfermedades neurodegenerativas, incluidas la EA y la EP debido a su potencial actividad antioxidante. Se ha encontrado que varios tipos de NPs son adecuadas para la encapsulación o carga de curcumina para mejorar la biodisponibilidad, aumentar la concentración plasmática y mejorar los procesos de permeabilidad celular.

Además, Huang et al. demostraron que Pluronic® F68 es capaz de inhibir el transporte de fármacos mediado por P-gp (J. Huang et al., 2008). Por lo tanto, es muy prometedora la adición de Pluronic® F68 en la formulación de las NPs, ya que se podría favorecer el transporte de éstas a través de la BHE.

6. Justificación

Como se mencionó anteriormente, hoy en día no se cuenta con un tratamiento eficaz para las enfermedades neurodegenerativas debido a que el transporte de fármacos hacia el cerebro está restringido por la BHE.

La curcumina tiene actividad antioxidante fuerte, por lo que figura como un buen principio activo para tratar las EN debido a que se piensa que el estrés oxidativo es uno de los factores principales en éstas, pero la curcumina presenta limitantes farmacéuticas ya que posee propiedades intrínsecas que restringen su uso terapéutico.

Por esto, se desarrolló un sistema nanotransportador de liberación controlada a base de PCL, un polímero biocompatible, y estabilizado con Pluronic® F68, cargado con Curcumina para compensar las deficiencias del agente terapéutico, buscando desempeñar múltiples funciones, incluido el posible paso a través de la BHE y el tratamiento eficaz de las enfermedades neurodegenerativas.

7. Objetivos

7. 1. *Objetivo general.*

- Desarrollar nanopartículas cargadas con curcumina para evaluarlas como un nuevo tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

7. 2. *Objetivos particulares.*

- Obtener nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona mediante el método de emulsificación-difusión incorporando curcumina y usando Pluronic® F68 como estabilizante.
- Analizar el tamaño de partícula, el índice de polidispersión y el potencial zeta de las nanopartículas.
- Obtener el porcentaje de entrapamiento y de carga de las nanopartículas.
- Analizar la nanoestructura de las NPs mediante microscopía de fuerza atómica.
- Evaluar la estabilidad de las NPs por medio de análisis térmicos.
- Evaluar la viabilidad, proliferación e internalización celular.

8. Hipótesis

Las NPs de PCL estabilizadas con Pluronic® F68, al contener un fármaco como la curcumina serán un potencial tratamiento para las enfermedades neurodegenerativas ya que la curcumina posee propiedad antioxidante fuerte y, debido a su tamaño y a su forma esférica las NPs podrán atravesar la barrera hematoencefálica, siendo ésta un obstáculo importante al administrar medicamentos para el tratamiento enfermedades neurodegenerativas; así mismo podrán ser dirigidas y focalizadas hacia la zona de mayor interés, que es el cerebro.

9. Material y metodología.

9.1 Obtención de nanopartículas de poli- ϵ -caprolactona cargadas con curcumina usando Pluronic® F-68 como estabilizante.

Para la fabricación de NPs por medio del método emulsificación-difusión, se utilizó PCL (Mn 80,000 g/mol), Pluronic® F68, Acetato de Etilo (Fermont Cat. 11405) y D-(+)-trehalosa deshidratada, que se adquirieron de Sigma Aldrich®, mientras que el metanol y la curcumina fueron suministrados por Spectrum®.

9.1.1 Obtención de nanopartículas mediante el método de emulsificación-difusión

9.1.1.1 Saturación de fases

Se utilizó agua destilada y Acetato de Etilo para hacer una saturación de fases, con una concentración final 1:1 vol/vol. (ρ_{H_2O} = 1 g/ml, ρ_{AcOEt} = 0.8968 g/ml). Se vertieron ambos volúmenes en un embudo de separación, se tapó el embudo y se agitó suave pero firmemente 3 veces. Entre cada agitación se liberó la presión producida dentro del embudo de separación quitando el tapón. Posteriormente, el embudo de separación se colocó en un anillo de metal, mismo que estaba fijo a un soporte universal, y se dejó separar 15 min retirando el tapón del embudo, siguiendo lo reportado por David Quintanar-Guerrero et al., 2012. De acuerdo con las densidades de ambos líquidos, se obtuvo primero la fase acuosa saturada (FAS), seguida de la fase oleosa saturada (FOS) y se guardaron en frascos ámbar tapados y etiquetados correctamente.

9.1.1.2. Preparación del estabilizante

Se pesaron y disolvieron 2 g de estabilizante (poloxámero 188 (Pluronic® F68)) en 40 ml de la FAS obtenida previamente, utilizando un vaso de precipitados con un agitador magnético en un baño de hielo y una parrilla de agitación; se obtuvo una concentración final al 5% m/v. La disolución preparada se cubrió con parafilm, se etiquetó correctamente y se mantuvo en un cuarto frío.

9.1.1.3. Preparación del polímero

Se pesaron y disolvieron 400 mg de PCL en 20 ml de la FOS obtenida previamente, utilizando un vaso de precipitados con un agitador magnético, manteniendo la parrilla de agitación a una temperatura de aproximadamente 30 °C; se obtuvo una concentración final al 2% m/v. Una vez enfriada la disolución, se pesaron y agregaron 100 mg de curcumina, mismos que se disolvieron en la parrilla de agitación, manteniendo condiciones de temperatura ambiente, oscuridad y cubriendo el material utilizado con papel aluminio. La disolución preparada se etiquetó y se mantuvo en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente.

9.1.1.4. Emulsificación

Se utilizó un rotor estator (Ultra Turrax IKA T18 digital). Se midieron y vertieron 40 ml de estabilizante preparado en un vaso de precipitados mediante un embudo de separación, teniendo contacto cristal-cristal. El vaso se cubrió con papel aluminio para evitar la fotosensibilización de la curcumina y se mantuvieron condiciones de oscuridad. Se encendió el rotor y se mantuvo en éste la mínima velocidad. Se midieron 20 ml de la disolución de polímero y curcumina disueltos en la fase orgánica saturada y se agregaron al vaso de reacción, enseguida se aumentó la velocidad del rotor hasta 14,000 rpm durante 10 min. Se cubrió la boca del reactor con plástico adherente para evitar el flujo de aire y la formación de espuma.

9.1.1.5. Difusión

Transcurridos los 10 min de emulsificación, se detuvo el rotor, se añadieron 160 ml de agua destilada por medio del embudo de filtración rápida y de nuevo se encendió el rotor y se mantuvo a una velocidad de 14,000 rpm durante 10 min. Manteniendo las condiciones de oscuridad, el material cubierto con papel aluminio y tapando la boca del vaso con plástico adherente para evitar la formación de espuma. Transcurrido ese tiempo, se trasvasó a un matraz bola igualmente cubierto con papel aluminio mediante un embudo de filtración rápida.

9.1.1.6 Evaporación del disolvente

Primeramente, se puso el rotavapor a una temperatura de 40 °C, se añadió agua y hielo a un recipiente para enfriar el refrigerante y se liberó el tapón de la presión de éste.

Una vez alcanzadas las condiciones de temperatura en el sistema de evaporación rotatoria, se ajustó al rotavapor el matraz de bola que contenía la solución obtenida del rotor estator. Al igual que en los pasos anteriores se mantuvieron condiciones de oscuridad y el material se cubrió con papel aluminio. Se encendió la bomba para generar el vacío y el tapón de la presión se fue cerrando poco a poco, cuidando que no se formara mucha espuma. Una vez lograda la mínima cantidad de espuma en la solución, y estando bien cerrado el tapón de la presión, se aumentó la velocidad de rotación hasta alcanzar 50 rpm. Se dejó el sistema trabajando durante aproximadamente media hora. Transcurrido el tiempo y al no observarse más evaporación de disolvente, se disminuyó a cero la velocidad de rotación del equipo, así como la temperatura, y se apagó la bomba de vacío. Poco a poco se liberó el tapón de la presión. Finalmente, se retiró el matraz de bola del rotavapor y se recuperó la solución en un vaso de precipitados.

El vaso de precipitados permaneció envuelto en papel aluminio, se añadió a éste una barra magnética y se colocó en una parrilla de agitación. La solución se mantuvo en agitación en el vaso de precipitados durante 48 horas para evaporar el exceso de disolvente que aún pudiera contener la disolución.

El proceso completo de obtención de NPs por el método de emulsificación-difusión se muestra en la Figura 16 y el prototipo de nanopartícula obtenido se muestra en la Figura 17.

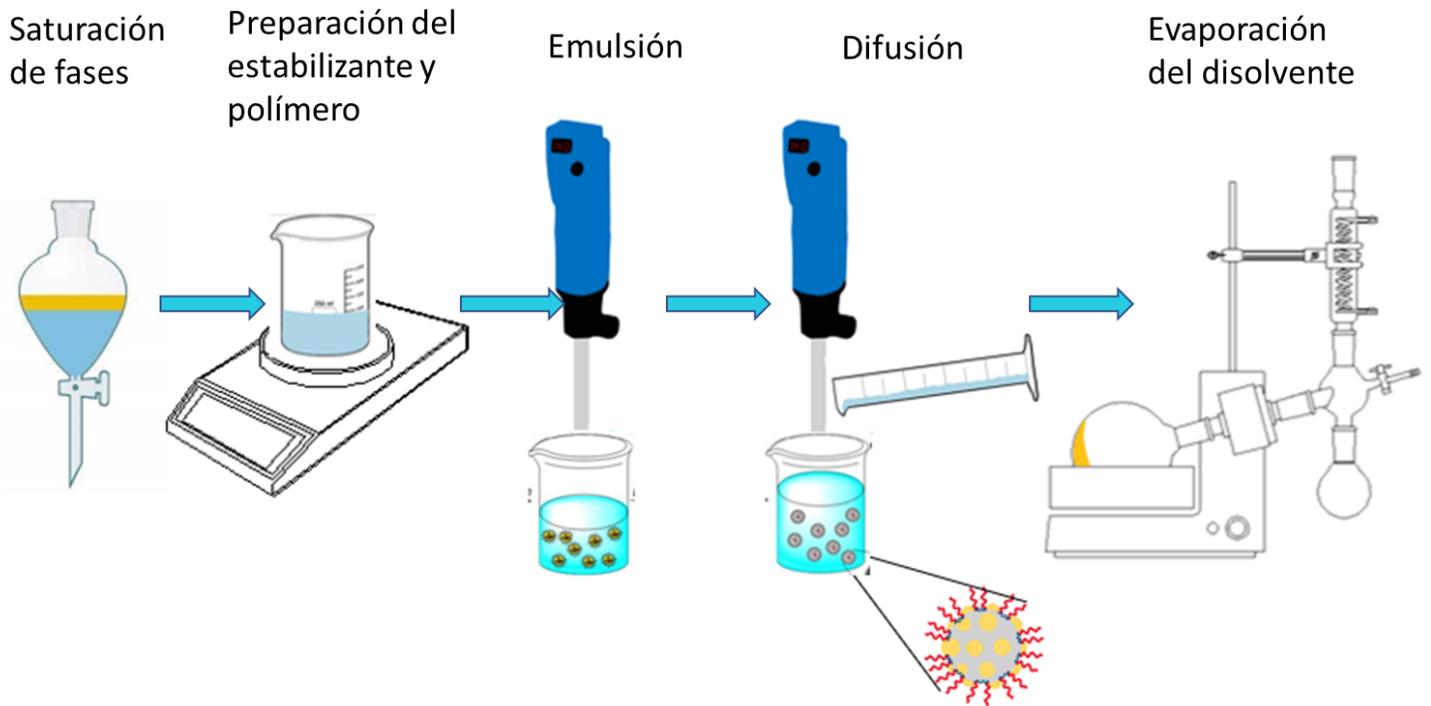


Figura 16. Esquema del método de obtención de nanopartículas emulsificación-difusión.

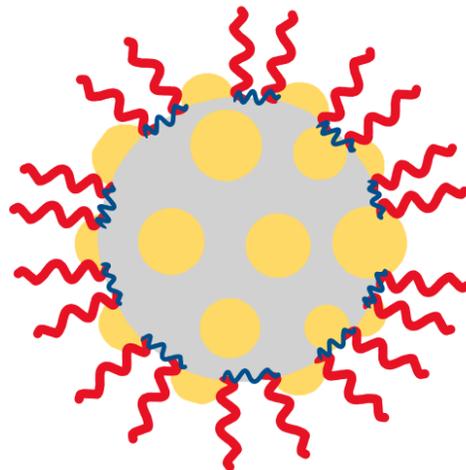


Figura 17. Nanopartícula de poli- ϵ -caprolactona cargada con curcumina estabilizada con Pluronic® F-68.

9.1.1.7 Purificación

Con la intención de eliminar las trazas de disolvente que aún pudieran permanecer en la solución de NPs, se procedió a purificar mediante la centrifugación de las nanopartículas (a una velocidad de 11,000 rpm durante media hora) para eliminar las trazas existentes del sobrenadante, y posteriormente las NPs se resuspendieron en agua destilada.

9.1.1.8 Liofilización

Mediante la congelación y posterior sublimación del solvente a presión reducida, se eliminó la fase acuosa de la solución de NPs. Jain & Roy describieron que durante el proceso de liofilización, las moléculas de agua se reemplazan con moléculas de trehalosa y proporcionan una red de enlace de hidrógeno, manteniendo la estructura tridimensional de las NPs (Jain & Roy, 2009) y aunado a la conocida capacidad de crioprotección de la trehalosa, se agregó una porción de ésta a las NPs (2.5%) para el proceso de liofilización, en el que se mantuvieron condiciones de -49 °C, 0.05 mBar, durante 48 hrs. Como resultado, se obtuvieron las nanopartículas secas y a partir de éstas se procedió a iniciar la caracterización.

9.2 Caracterización fisicoquímica

9.2.1 Tamaño de partícula y medición del potencial zeta.

Para evaluar el tamaño promedio de partícula de las NPs de Curcumina-PCL/F68, su distribución y el potencial zeta se utilizó un Zetasizer Nano (Malvern Instrument ZS90; Malvern, Reino Unido).

El tamaño de partícula y el Índice de Polidispersión (PDI, por sus siglas en inglés) se midieron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés) manteniendo un ángulo de dispersión de 90° a una temperatura de 25 °C; mientras que el potencial zeta se midió mediante movilidad electroforética utilizando la Velocimetría de Láser Doppler (VLS, por sus siglas en inglés). El tamaño de partícula se mostró por distribución de intensidad, y la distribución de tamaño se evaluó por PDI.

Para la evaluación, se tomó 1 ml de NPs de Curumina-PCL/F68, se diluyó con agua destilada en una relación 1:3 y se colocaron dentro del intervalo de sensibilidad del Zetasizer Nano. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente, en intervalos de 3 corridas con 10 lecturas cada una para obtener datos estadísticamente significativos.

9.2.2 Caracterización morfológica

Mediante la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, por sus siglas en inglés), se llevó a cabo la caracterización morfológica y análisis del tamaño de la superficie de las NPs de Curumina-PCL/F68.

A partir de la dispersión de NPs, se tomó una gota y se diluyó en agua destilada manteniendo una relación 1:100. La dilución de la muestra se extendió en un cubreobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente durante 72 h. A través de un microscopio de sonda de barrido (JSPM-4210, JEOL®, Tokio), se realizó la exploración a temperatura ambiente. La velocidad de escaneo se optimizó para obtener una imagen estable y clara sin dañar la punta del AFM. Se analizaron 4 áreas diferentes del cubreobjetos y se realizaron acercamientos suficientes para producir una distribución de tamaño de partícula sólida y representativa.

9.2.3 Análisis de interacciones químicas

El análisis de las propiedades estructurales de las NPs de Curcumina-PCL/F6, tales como las interacciones moleculares entre el fármaco y el polímero de encapsulación, se realizó mediante espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés).

Para el análisis se utilizó un espectrómetro óptico Thermo Scientific Nicolet 6700 FTIR (Thermo Fischer Scientific®, EUA) y se evaluaron las NPs liofilizadas, las NPs cargadas con curcumina y cada uno de los reactivos empleados para fabricarlas, en un intervalo de exploración de 4.000-400 cm^{-1} .

9.2.4 Propiedades térmicas

9.2.4.1 Análisis termogravimétrico (TGA)

Para evaluar la estabilidad térmica de las NPs de Curcumina-PCL/F68, se realizó un Análisis Termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés).

Se analizaron muestras de las NPs liofilizadas de aproximadamente 5 mg utilizando un equipo analizador termogravimétrico de alta resolución TGA 2950 (TA Instruments®, EUA). Los ensayos se realizaron en un intervalo de temperatura el cual abarcó desde la temperatura ambiente hasta 500 °C, manteniendo una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y bajo una atmósfera de nitrógeno.

9.2.4.2 Calorimetría Diferencia del Barrido (DSC)

Siguiendo con el análisis de las propiedades térmicas de las NPs de PCL/F68 y de Curcumina-PCL/F68, se empleó la Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés).

Utilizando un equipo DSC 2910 (Modulated TA Instruments®, EUA), se analizaron muestras liofilizadas en celdas de aluminio herméticas, en un intervalo desde temperatura ambiente hasta 250 °C, manteniendo una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y bajo una atmósfera de nitrógeno.

9.2.5 Eficiencia de encapsulación y carga de fármaco en las NPs.

Buscando evaluar la eficacia del método empleado para encapsular Curcumina en NPs de PCL/F68, se procedió a analizar la eficiencia de encapsulación y carga de fármaco en las NPs.

La eficiencia de encapsulación (EE) de las NPs de Curcumina-PCL/F68 se determinó mediante espectrofotometría UV-Vis (SP-UV1000, DLAB®, China).

Las NPs de Curcumina-PCL/F68 se centrifugaron a 11,000 rpm durante 40 min. El sedimento formado se resuspendió y disolvió en acetato de etilo. La solución obtenida se cuantificó

espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de ésta y se calculó la cantidad de curcumina atrapada en las NPs basándose en una curva de calibración lineal.

La cuantificación se registró a una longitud de onda de 420 nm y se realizó la medición de la absorbancia de concentraciones de 1 a 6 µg de curcumina (coeficiente de correlación de $R^2 = 0.99985$). Finalmente, la EE se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$EE = \frac{\text{Cantidad de curcumina en las NPs}}{\text{Cantidad inicial de curcumina}} * 100$$

Para calcular la carga de fármaco (DL, por sus siglas en inglés) en las NPs de Curcumina-PCL/F8, después de la centrifugación, se recuperó el sedimento obtenido, se dejó secar a temperatura ambiente y se registró el peso. Posteriormente, el sedimento se resuspendió y disolvió en acetato de etilo. El peso de la curcumina contenida en la disolución se determinó mediante un espectrofotómetro UV utilizando la misma curva de calibración.

Una muestra de NPs no cargadas se trataron de la misma manera y se utilizaron como blanco de referencia para finalmente calcular el valor de la Curcumina cargada en las NPs utilizando la siguiente ecuación:

$$DL = \frac{\text{Cantidad de curcumina en las NPs}}{\text{Cantidad de las NPs}} * 100$$

9.2.6 Liberación *in vitro* de curcumina

El ensayo de liberación *in vitro* de curcumina de las NPs de Curcumina-PCL/F68 se llevó a cabo mediante el método de dispersión directa, según Guo et al. (Guo et al., 2017).

Durante el ensayo, se mantuvieron condiciones “sink” para evitar la saturación del medio receptor de los estudios de liberación *in vitro*.

Una cantidad específica de NPs de Curcumina-PCL/F68 se vertió en 30 ml de una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) y se dividió en 10 series de 3

tubos con 1 ml de disolución cada uno. Las series de tubos se colocaron en una incubadora manteniendo condiciones de agitación y una temperatura de 37 °C.

En intervalos de tiempo definidos, se fue retirando una serie de tubos de la incubadora y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min. La cantidad de curcumina liberada se cuantificó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm utilizando espectrofotometría UV-Vis, haciendo cada medición por triplicado.

Los datos de liberación de curcumina de las NPs de Curcumina-PCL/F68 se utilizaron para estudiar el mecanismo de liberación de fármaco. Los datos se ajustaron utilizando los modelos matemáticos de orden cero, primer orden, el modelo de Higuchi y el modelo de Korsmeyer-Peppas. Los datos se ajustaron y la regresión lineal de los modelos matemáticos se evaluó utilizando el coeficiente de correlación. Se aplicó una regresión lineal dentro del intervalo de 3-72 h.

9.3 Caracterización biológica

Para la caracterización biológica, se utilizó el medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés), penicilina, estreptomycin, piruvato de sodio, tripsina-EDTA y PBS 1X, que se compraron a Gibco®/Life Technologies, (Carlsbad, CA, EUA). El suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) se obtuvo de Biowest®. El azul tripano y el paraformaldehído P6148 fueron suministrados por Sigma Aldrich®. El kit de proliferación celular I (MTT) se adquirió de Roche®. El medio de montaje VECTASHIELD® Antifade con DAPI se adquirió de Vector Laboratories.

9.3.1 Cultivo celular

Las células MIO-M1 (la línea celular glial humana de Müller) y las células SH-SY5Y (la línea celular de neuroblastoma humano) se obtuvieron del Instituto Nacional de Rehabilitación (CDMX, México).

Los tipos de células antes mencionados se cultivaron en medio DMEM y se suplementaron con penicilina/estreptomycin al 1% y FBS al 10%. Se incubaron manteniendo un ambiente de cultivo

óptimo para el crecimiento de las células, conservando una temperatura de 37 °C, 5 % de CO₂ y condiciones completamente humidificadas. El medio de cultivo celular se renovó cada 2 días. Cuando las células se aproximaron al 80 % de la confluencia, se tripsinizaron y se subcultivaron en el medio de crecimiento para posteriormente ser utilizadas para los experimentos.

9.3.2 Citotoxicidad *in vitro* de las NPs

La citotoxicidad *in vitro* de las NPs de PCL/F68 y de Curcumina-PCL/F68 se determinó mediante el ensayo del kit de proliferación celular I (Roche®) utilizando las líneas celulares MIO-M1 y SH-SY5Y.

Las células se sembraron en una placa de 96 pozos a una densidad de 10,000 células por pozo 24 h antes del ensayo. Luego, las células se incubaron con medio fresco y se les añadieron diferentes concentraciones de NPs de PCL/F68 y de Curcumina-PCL/F68 (0, 3.75, 30, 125, 500 y 1,000 µg/ml) durante 48 y 96 h.

La solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT) se agregó a cada pozo como reactivo de marcaje y las placas se incubaron durante 4 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada (condiciones de 37 °C y 5-6.5 % de CO₂), permitiendo que las células viables transformaran el MTT amarillo en cristales de formazán de color azul oscuro.

Después del periodo de incubación antes mencionado, los cristales de sal formados se solubilizaron agregando dimetilsulfóxido (DMSO) como solución de solubilización a cada pozo, y la solución obtenida se incubó durante la noche en una atmósfera humidificada.

El producto de formazán solubilizado se cuantificó espectrofotométricamente utilizando un lector de microplacas iMarK (Bio-Rad®, EUA) a una longitud de onda de 570 nm (con una longitud de onda de referencia de 690 nm) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Todos los experimentos se organizaron por triplicado para el análisis estadístico. Las células incubadas con DMEM fueron referidas como control. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar.

9.3.3 Captación celular de las NPs de Curcumina-PCL/F68

La captación celular de NPs de Curcumina-PCL/F68 se analizó mediante fluorescencia utilizando un microscopio Zeiss Axio Imager Z1 a 10X y 63X aumentos.

Se sembró un total de 1×10^4 de células MIO-M1 en un cubreobjetos y se incubó durante 24 h, manteniendo condiciones de 5 % de CO₂ y 37 °C. Al tratamiento se añadió una concentración de 500 µg/ml de curcumina, NPs de PCL/F68, NPs de Curcumina-PCL/F68, y el control negativo que sólo tenía medio de crecimiento, y se incubó durante 1 y 5 horas a 37 °C.

Después del tratamiento, las células se lavaron 3 veces con PBS (1X) y se fijaron con 100 µL de paraformaldehído al 4 % en PBS durante 10 min. Luego, las células se lavaron 3 veces más con PBS (1X) y se secaron. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en un portaobjetos con 8 µL de medio de montaje con DAPI y se sellaron.

10. Resultados y Discusión

10.1 Caracterización fisicoquímica

Actualmente, no hay metodologías estandarizadas o protocolos regulatorios de la FDA para la caracterización de las NPs (P.C. Lin, Lin, Wang, & Sridhar, 2014). Sin embargo, es bien sabido que las interacciones fisiológicas dependen de las propiedades fisicoquímicas de las partículas. Adicionalmente, desarrollar una imagen precisa de las NPs es esencial para comprender y predecir el rendimiento y funcionamiento del sistema en el cuerpo humano.

Las nanopartículas suelen caracterizarse en la literatura por la distribución de tamaño, la morfología, las propiedades de la superficie, la estabilidad, las interacciones fármaco-polímero y la citotoxicidad (P.C. Lin et al., 2014).

10.1.1 Tamaño de partícula y medición del potencial zeta

La técnica que se usó en la determinación del tamaño y distribución de las NPs de PCL/F68 y Curcumina-PCL/F68 en solución fue DLS, con la cual se midió el tamaño de partícula y el PDI como primer criterio de control de calidad.

En el experimento, una suspensión coloidal se ilumina con una luz láser monocromática en un ángulo de 90° que se dispersa en un detector de fotones (Kaszuba, McKnight, Connah, McNeil-Watson, & Nobbmann, 2008). Debido al movimiento Browniano de las partículas, la intensidad de la luz dispersa detectada fluctúa en el tiempo, y esto se relaciona con el tamaño de partícula con la ayuda de una función de autocorrelación (Lim, Yeap, Che, & Low, 2013). Sobre la base de la ecuación de Stokes-Einstein se puede obtener el diámetro hidrodinámico. Para partículas esféricas la relación es la siguiente:

$$Dh = \frac{kBT}{3\pi\eta Dt}$$

donde Dh es el diámetro hidrodinámico, η es la viscosidad relativa del disolvente, kB es la constante de Boltzmann, T es la temperatura y Dt es el coeficiente de difusión de la traducción (Crucho & Barros, 2017).

Las mediciones fueron realizadas después de la fabricación de las NPs cuando éstas estaban aún frescas, después de la centrifugación con la finalidad de observar posibles cambios en el tamaño, y 3 y 6 meses después de la fabricación habiendo sido almacenadas a temperatura ambiente. Como puede ser observado en la Tabla 6, los tamaños de las NPs de PCL/F68 y Curcumina-PCL/F68 recién fabricadas fueron de $163,8 \pm 5,3$ y $149,9 \pm 2,2$ nm, respectivamente, que corresponden al tamaño de NPs adecuado para la administración sistémica con fines terapéuticos (entre 2 y 200 nm) (Jo, Kim, Lee, & Kim, 2015).

Interesantemente, se observó una disminución en el tamaño de partícula al incorporar la curcumina, mientras que para la mayoría de los acarreadores de fármacos la incorporación de una sustancia activa en su interior generalmente se traduce en un aumento en el tamaño de partícula. Según Kaili Hu *Et al.*, la distribución del tamaño de partícula se controla generalmente por debajo de 200 nm de diámetro sin afectar la endocitosis por las células capilares cerebrales (Hu et al., 2009).

Además, en ambos sistemas de NPs, el PDI presentó valores inferiores a 0.1, que se asoció con una alta homogeneidad en la población de partículas (Gaumet, Vargas, Gurny, & Delie, 2008), sugiriendo así una distribución monomodal.

Tabla 6. Características de NPs de PCL/F68 y NPs de Curcumina-PCL/F68.

Muestra	Tamaño (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
NPs de PCL/F68	160.8 ± 4.5	0.080 ± 0.01	Nr
NPs de PCL/F68 (después de centrifugar)	163.8 ± 5.3	0.045 ± 0.01	-7.78 ± 0.18
NPs de PCL/F68 (3 meses)	170.5 ± 0.7	0.059 ± 0.01	-7.08 ± 1.32
NPs de PCL/F68 (6 meses)	197.1 ± 3.9	0.077 ± 0.05	-9.78 ± 0.79
NPs de Curcumina-PCL/F68	149.9 ± 2.2	0.087 ± 0.05	Nr
NPs de Curcumina-PCL/F68 (después de centrifugar)	148.3 ± 1.9	0.044 ± 0.02	-7.32 ± 0.03

NPs de Curcumina-PCL/F68 (3 meses)	150.5 ± 1.9	0.067 ± 0.02	-9.86 ± 0.32
NPs de Curcumina-PCL/F68 (6 meses)	178.4 ± 4.4	0.064 ± 0.03	-12.96 ± 1.04

Nr: No registrado, el parámetro fue analizado hasta el final del proceso de purificación.

El tamaño de partícula y el PDI fueron evaluados después de 3 y 6 meses para analizar la estabilidad física en las nanosuspensiones. Durante dichos periodos de almacenamiento, no se observó floculación o coalescencia en las NPs y el PDI no demostró modificaciones importantes; se evidenció un incremento en el tamaño de partícula directamente proporcional con el tiempo, lo cual, probablemente se debe a la agregación de las NPs.

Sin embargo, el intervalo de tamaño de partícula es aceptable incluso 6 meses después de la preparación, y la desventaja del aumento de tamaño de partícula conforme al tiempo se evitó con la liofilización de las NPs. La Figura 17 representa las NPs de PCL/F68 y las NPs de Curcumina-PCL/F68 en dispersión y liofilizadas, así como un gráfico representativo de la distribución de tamaño de las NPs de Curcumina-PCL/F68 después de la centrifugación.

El análisis del potencial zeta es utilizado para determinar la carga superficial y la estabilidad de una suspensión coloidal de NPs, es decir, conocer en qué grado se producirá la agregación de partículas a lo largo del tiempo. La carga de la superficie de las partículas se determinó midiendo el potencial de una suspensión mediante VLS.

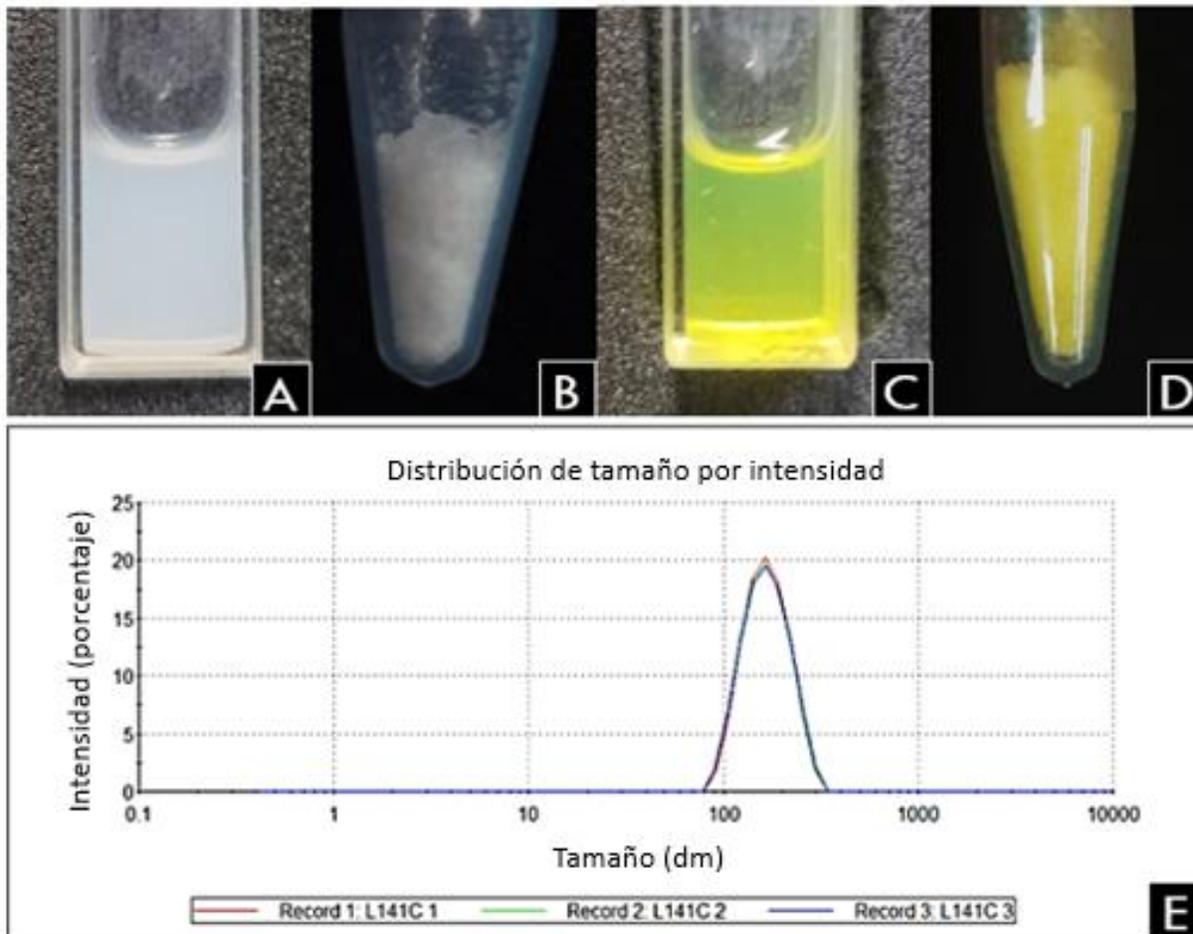


Figura 17. Características físicas de las nanopartículas. A) NPs de PCL/F68 en suspensión; B) Nanopartículas de PCL/F68 liofilizadas; C) Nanopartículas de Curcumina-PCL/F68 en suspensión; D) Nanopartículas de Curcumina-PCL/F68 liofilizadas; E) Gráfico representativo de la distribución de tamaño de las Nanopartículas de Curcumina-PCL/F68 después de centrifugación medido por dispersión de luz.

El principio básico de VLS consiste en medir la movilidad electroforética de partículas cargadas bajo un potencial eléctrico aplicado, es decir, se aplica un campo eléctrico a la dispersión de partículas, que entonces se mueven con una velocidad relacionada con su potencial zeta; esta velocidad se mide utilizando una técnica interferométrica de láser patentada llamada M3-PALS (Dispersión de luz para análisis de fase, por sus siglas en inglés), lo cual permite el cálculo de la movilidad electroforética, y a partir de ésta, del potencial zeta mediante la ecuación de Henry:

$$\mu = \frac{2\zeta\epsilon}{3\eta_0} f(kr)$$

donde ζ es el potencial zeta, ϵ es la constante dieléctrica, η_0 es la viscosidad del medio y $f(kr)$ se refiere a la función de Henry (Crucho & Barros, 2017).

El potencial zeta representa una medida para evaluar y predecir la estabilidad de una suspensión coloidal. Los valores entre -30 mV y +30 mV indican una condición hacia la inestabilidad, agregación, coagulación o floculación (Sapsford, Tyner, Dair, Deschamps, & Medintz, 2011), es decir, los valores alrededor de 30 mV (valor absoluto) representan la estabilidad en las NPs (Jo et al., 2015) y es menos probable que en esos valores ocurra una agregación de partículas para valores de alto potencial debido a la repulsión eléctrica.

Para las NPs de PCL/F68 y las NPs de Curcumina-PCL/F68 se obtuvieron valores de potencial zeta en un intervalo de -12,96 a -7,08 mV (Tabla 1). La carga negativa obtenida en las NPs de PCL/F68 se asocia con la presencia de grupos carboxilo de la PCL; estos resultados se ajustan a los datos encontrados en la literatura (Rodrigues Tavaress, Rodrigues de Menezes, Dutra Filho, Mendes Cabral, & Bruno Tavares, 2017).

A pesar de que lo reportado en la literatura y los resultados obtenidos del potencial zeta de las NPs no son similares, cabe mencionar que en la formulación se utilizó Pluronic® F68 como estabilizante y precisamente dicho agente proporciona estabilidad a la suspensión de NPs por medio de un efecto de repulsión a través de un mecanismo de estabilización por impedimento estérico, y no completamente por medio de la carga superficial (Moghimi & Hunter, 2000).

Se ha reportado que las NPs con cargas superficiales neutras y negativas reducen la adsorción de las proteínas séricas, lo que es benéfico ya que se traduce en una vida media de circulación mayor (Blanco, Shen, & Ferrari, 2015b). Además, los valores moderados del potencial zeta, obtenidos por los sistemas empleados, podrían permitir la interacción neuronal adecuada para la internalización sin un riesgo de toxicidad, según lo informado por otros autores (Froehlich & Fröhlich, 2016).

10.1.2 Caracterización morfológica

Desde la introducción del AFM por Binnig et al., éste se ha convertido en una herramienta esencial no sólo para estudiar la morfología de la superficie con resolución nanométrica sino también para las mediciones de fuerza sensible (Binnig, Quate, & Gerber, 1986). La imagenología de AFM se realiza al detectar las fuerzas atractivas/repulsivas entre una punta de prueba y la superficie de la muestra (Drelich, Tormoen, & Beach, 2004). El AFM no requiere un procedimiento específico de preparación de la muestra y es una técnica relativamente no destructiva, permitiendo estudiar una amplia gama de sustratos.

Con base en lo anterior, el tamaño relativo y la morfología superficial de las NPs fabricadas fueron evaluados mediante AFM. Tanto las NPs de PCL/F68 como las de Curcumina-PCL/F68 demostraron un tamaño aproximado de 200 nm y una morfología esférica y sin aglomeración (Figura 18), corroborando los datos obtenidos por el método DLS.

De acuerdo con las características observadas, las NPs obtenidas optimizan la relación entre la superficie y el volumen, convirtiéndose en acarreadores adecuados con la capacidad de movilización capilar efectiva para la administración de fármacos. El pequeño tamaño de partícula y la morfología geométrica de estas estructuras, hacen posible la escape del sistema de retículo endoplasmático y de la fagocitosis por macrófagos (Jallouk, Palekar, Pan, Schlesinger, & Wickline, 2015).

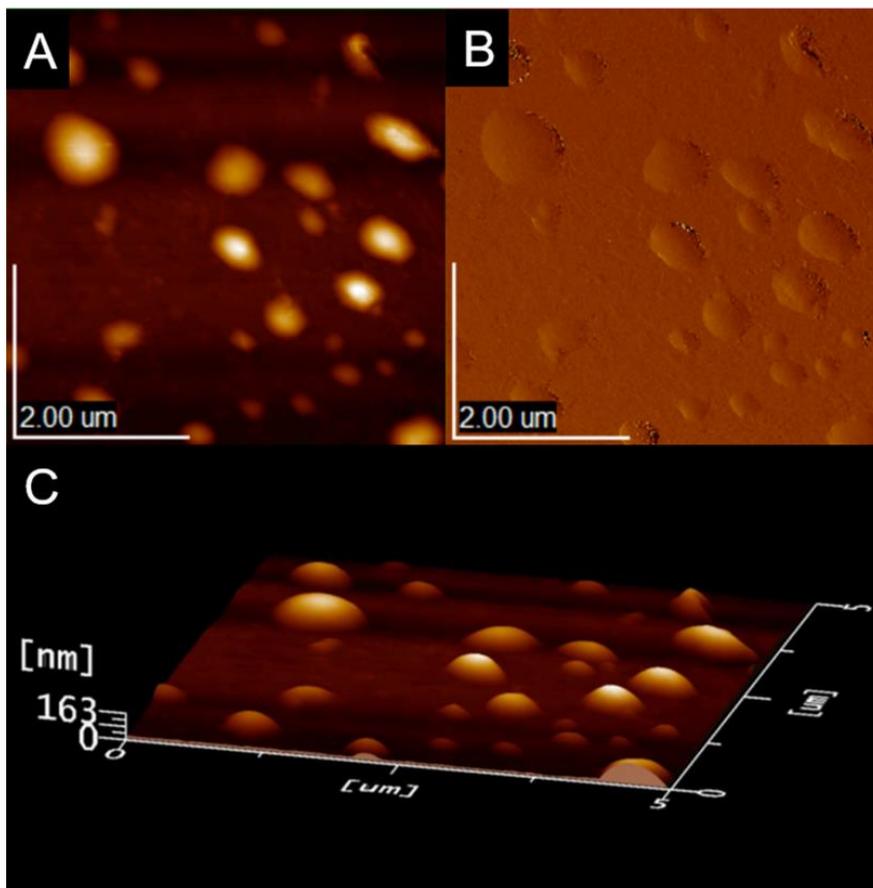


Figura 18. Las imágenes topográficas de Nanopartículas de Curcumina-PCL/F68 obtenidas por AFM. Puede observarse una forma esférica en las Nanopartículas.

10.1.3 Análisis de las interacciones químicas

La FTIR es un tipo de espectroscopía de vibración útil para investigar las propiedades estructurales de las NPs y las interacciones moleculares entre los fármacos y el polímero de encapsulación. La FTIR se basa en cambios periódicos de momentos dipolares debido a las vibraciones moleculares características de las moléculas o grupos de átomos (Dumont et al., 2016). Con esta técnica es posible confirmar la presencia de compuestos conocidos en regiones del espectro y detectar la presencia de impurezas o interacciones inesperadas de la presencia de grupos funcionales característicos.

Debido a la alta sensibilidad de la FTIR a los grupos funcionales de superficie de las NPs, su naturaleza no destructiva y la preparación de muestras fácil en general han contribuido a

establecer FTIR como un método de referencia para la caracterización de la química de superficie de las NPs (Petit & Puskar, 2018).

Por lo anterior, se realizó un análisis mediante FTIR para confirmar la ausencia de cambios químicos en las NPs fabricadas. La evaluación se llevó a cabo en las NPs de PCL/F68 y de Curcumina-PCL/F68 (Figura 19). Todos los compuestos evaluados presentaron sus bandas de características.

Para PCL (línea a), la banda observada en $3,435\text{ cm}^{-1}$ es atribuida al grupo hidroxilo terminal, también se observa una banda en $2,940\text{ cm}^{-1}$ y se adjudica al C-H₂ asimétrico, así como la banda registrada en $2,866\text{ cm}^{-1}$ se adscribe al C-H₂ simétrico; en $1,722\text{ cm}^{-1}$, se puede observar la banda característica del grupo carbonilo.

La banda en $2,881\text{ cm}^{-1}$ en el espectro de Pluronic® F68 (línea b) se relaciona con la banda de vibración del enlace C-H; en $1,108\text{ cm}^{-1}$ se puede observar otra banda, la cual se atribuye al enlace C-O (Elzein, Nasser-Eddine, Delaite, Bistac, & Dumas, 2004).

Por otro lado, el espectro de curcumina (línea c) reveló una banda característica del enlace O-H que se observa en $3,506\text{ cm}^{-1}$. También se evidenció la vibración de alargamiento del C-C con un pico en $1,624\text{ cm}^{-1}$. Además, se observa una banda en $1,510\text{ cm}^{-1}$, la cual representa el estiramiento del enlace C=O (Benassi, Ferrari, Lazzari, Spagnolo, & Saladini, 2008).

El espectro de trehalosa (línea d) exhibió diferentes bandas características. Las vibraciones detectadas en $3,479$ y $3,251\text{ cm}^{-1}$ representan el estiramiento del enlace O-H, de acuerdo con lo reportado en la literatura (Malferrari et al., 2014).

El espectro obtenido de las nanosuspensiones muestra los picos de PCL, trehalosa, y la curcumina. No se observó ningún cambio significativo como se esperaba, debido a las interacciones físicas en la fabricación de las NPs. Con base en lo anterior, se puede decir que las NPs obtenidas presentan características físicas apropiadas, es decir, sin modificación de su estructura química, lo cual podría mejorar la interacción celular de las NPs en el SNC.

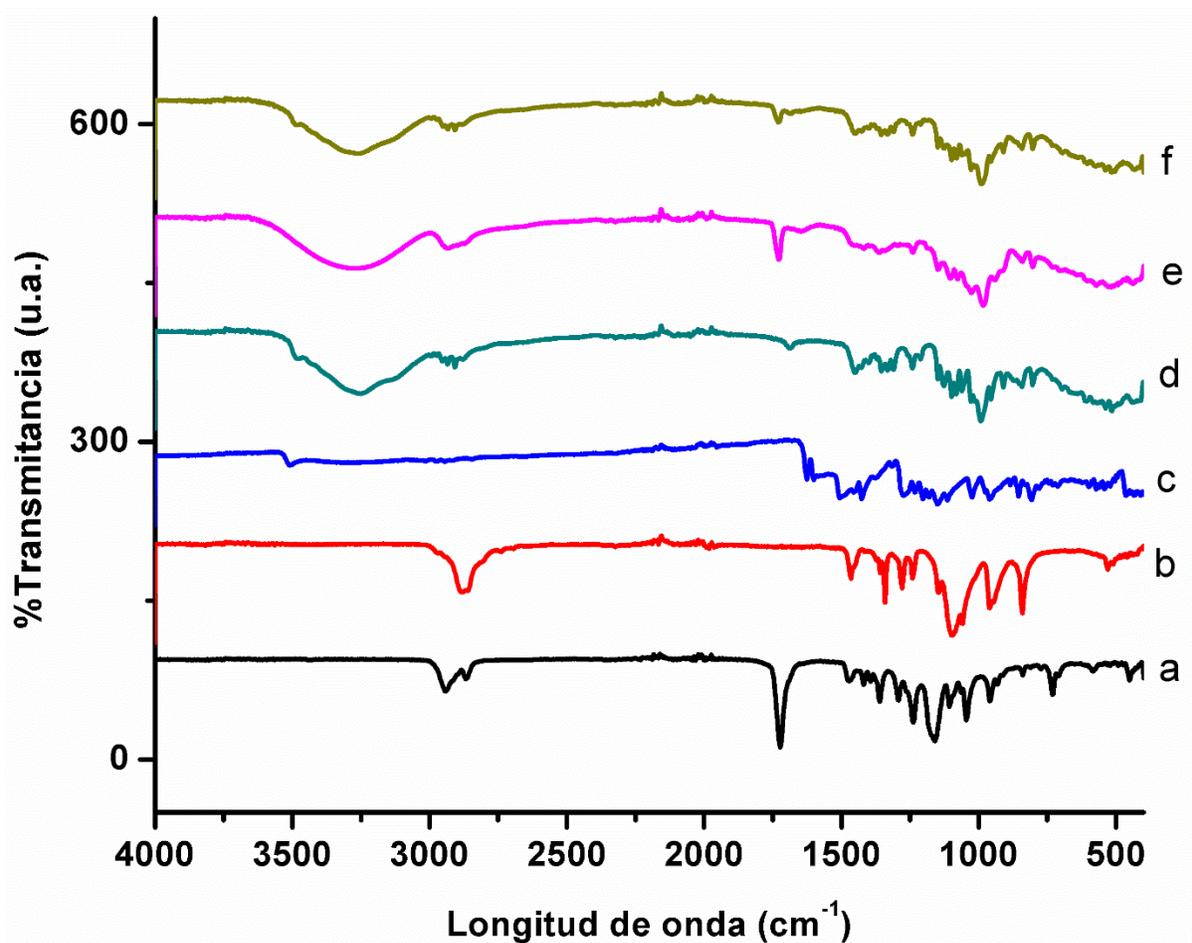


Figura 19. Espectros FTIR de PCL (a), Pluronic® F68 (b), Curcumina (c), D-(+)-Trehalosa Deshidratada (d), NPS de PLC/F68 (e), y NPs de Curcumina-PCL/F68 (f).

10.1.4 Propiedades térmicas

10.1.4.1 Análisis Termogravimétrico (TGA)

Los termogramas obtenidos del análisis TGA de los controles, las NPs liofilizadas de Curcumina-PCL/F68 y de PCL-F68 se muestran en la Figura 20. Como se puede observar, todas las curvas, con excepción de la trehalosa, presentan degradación uniforme, es decir, los compuestos se degradan completamente en una sola etapa.

La PCL pura (línea a) comenzó a perder peso por arriba de 328 °C y se descompuso completamente hasta casi 430 °C, de acuerdo con lo reportado en la literatura (Aliah & Ansari, 2017).

Pluronic® F68 (línea b) mostró en su espectro una pérdida de peso desde 250 hasta 360 °C.

Para el espectro de curcumina (línea c), la temperatura inicial de la pérdida de masa fue de aproximadamente 160 °C, lo cual es el resultado de la degradación o descomposición del polvo de la cúrcuma; por debajo de esta temperatura, la disminución de peso observada en el termograma corresponde a la pérdida de humedad.

En el espectro correspondiente a trehalosa (línea d), se puede observar la primera pérdida de peso en 100 °C, esto representa la deshidratación de trehalosa deshidratada, pasando a trehalosa anhidra (S. Y. Lin & Chien, 2003). La segunda etapa de pérdida de peso corresponde a la degradación de la muestra y ésta empezó alrededor de los 250 °C.

Tanto las NPs de PLC/F68 como las de Curcumina-PCL/F68 presentaron temperaturas de degradación más bajas que los componentes puros. Este comportamiento es posiblemente debido a que las NPs presentan una mayor área de superficie, lo cual podría indicar mayor reactividad en comparación con los componentes puros. Así, la transmisión de calor fue más eficiente y la degradación de las NPs comenzó antes (Rodrigues Tavaress et al., 2017).

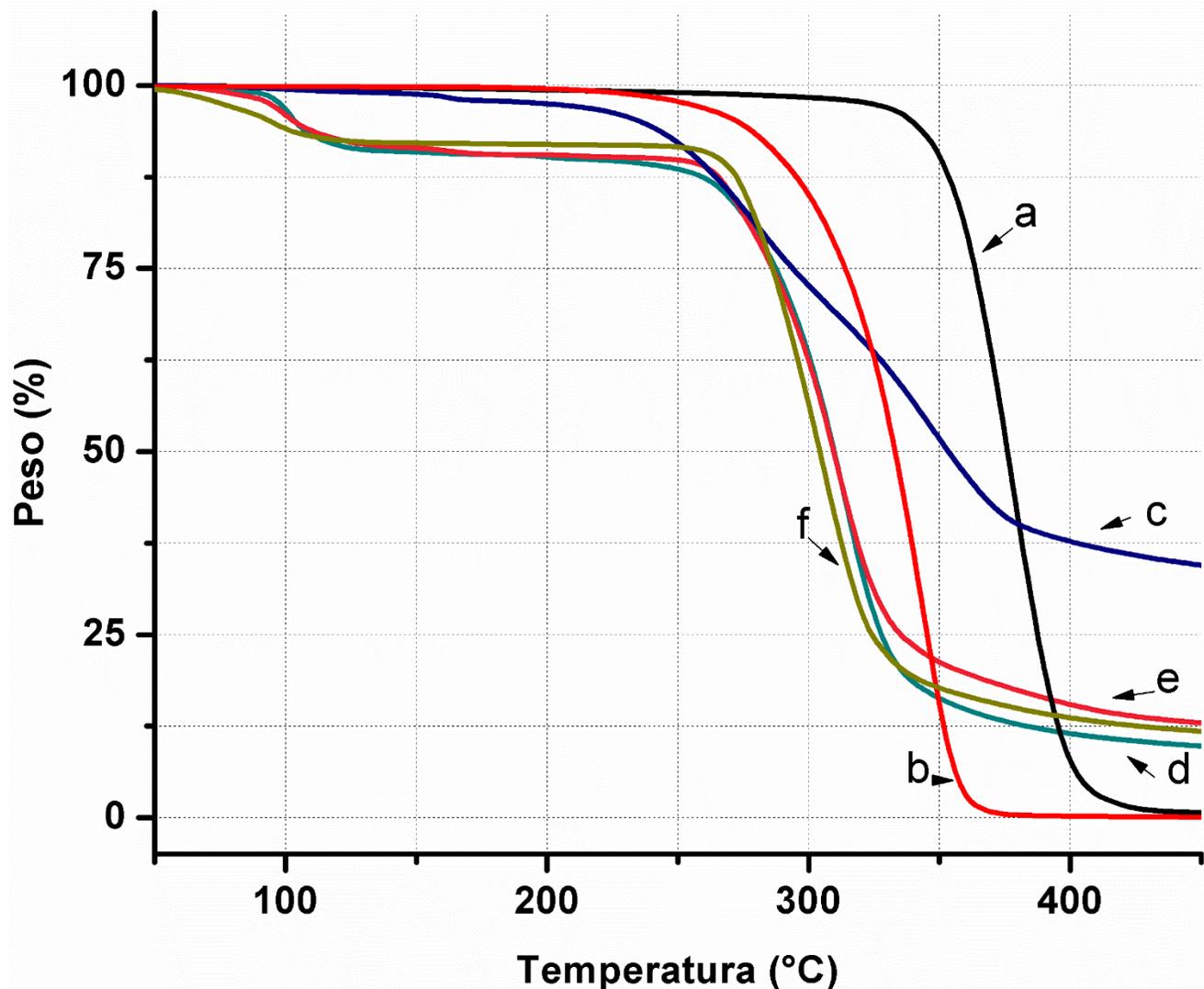


Figura 20. El termograma TGA de PCL (a), Pluronic® F68 (b), curcumina (c), D-(+)-Trehalosa Deshidratada (d), NPs de PLC/F68 (e), y NPs de Curcumina-PCL/F68 (f).

10.1.4.2 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Para mejorar la eficiencia de carga del fármaco y extender su liberación, se debe tener en cuenta la naturaleza de las interacciones polímero-fármaco, así como el tipo de polímero y sus propiedades fisicoquímicas (Crucho & Barros, 2017).

El DSC se usa comúnmente para estudiar el estado fisicoquímico y las posibles interacciones del fármaco cargado en las NPs. También, mediante esta técnica se pueden detectar

transiciones de fase como la transición vítrea, la cristalización y la fusión (Kerč & Srčič, 1995). La temperatura de transición vítrea es la transición reversible en materiales amorfos o en regiones amorfas en materiales semicristalinos, desde un estado duro y quebradizo a un estado fundido (Crucho & Barros, 2017).

Se evaluaron las propiedades térmicas de las NPs mediante DSC, mismas que se muestran en la Tabla 7. La PCL presentó una temperatura de fusión (T_m , por sus siglas en inglés) de 63.5 °C. La temperatura de fusión para Pluronic® F68 fue de 53.7 °C, mientras que para la curcumina se registraron 174 °C, lo cual coincide con lo reportado en la literatura (Manjili et al., 2016, Mei et al., 2009).

D-(+)-Trehalosa deshidratada mostró dos eventos térmicos importantes. El primero fue a los 100 °C, lo que representa la deshidratación de la trehalosa deshidratada a trehalosa anhidra; mientras la segunda temperatura se relaciona con una endoterma aguda ubicada en los 210 °C, correspondiente a la fundición.

Curiosamente, el pico de fusión de la curcumina en el sistema de NPs de Curcumina-PCL/F68 no se pudo detectar. Este comportamiento podría ser debido a la exitosa encapsulación de la curcumina en las NPs, formando una solución sólida con los excipientes PCL y Pluronic® F68 (Murali Mohan Yallapu, Jaggi, & Chauhan, 2010), o a la dispersión a nivel molecular de la curcumina, ya que ésta podría estar en una fase cristalina amorfa o desordenada en una dispersión molecular o un estado de solución sólida en la matriz polimérica.

Las interacciones entre los tipos de moléculas controlan la solubilidad de los materiales entre sí mediante fuerzas de van der Waals y enlaces de hidrógeno (Crucho & Barros, 2017). Cuando las interacciones moleculares fármaco-polímero son comparables a las interacciones fármaco-fármaco y polímero-polímero, el componente polimérico es capaz de proteger el fármaco, pudiendo incorporar grandes cantidades de fármaco en la matriz polimérica sin cristalización del fármaco (Thassu, Deleers, & Pathak, n.d.). Por lo tanto, las NPs fabricadas podrían ser un sistema adecuado con una alta capacidad de carga de fármaco para tratar enfermedades del SNC.

Tabla 7. Eventos térmicos.

Muestra	T _{t1} (° C)	T _{t2} (° C)	T _{t3} (° C)	De acuerdo con
PCL	63.5	-	-	(Woodruff et al., 2010)
Pluronic® F68	53.7	-	-	(Mei et al., 2009)
Curcumina	174	-	-	(Manjili et al., 2016)
D-(+)-Trehalosa Deshidratada	100	212	-	(Raimi-abraham et al., 2014)
NPs de PCL/F68	56	63	212	-
NPs de Curcumina- PCL/F68	63.5	101	212	-

T_i: Temperatura de transición

10.1.5 Eficiencia de Encapsulación y carga del fármaco en las NPs

Para conocer la cantidad de fármaco dentro de las NPs con respecto a la cantidad total inicial se realizó el cálculo de la EE; y para evaluar la cantidad de fármaco asociada con la masa de las NPs, se llevó a cabo la proporción DL.

Al realizar el cálculo de la EE, el valor encontrado fue 96.01% ± 0.95, mientras que para la DL el valor fue 4.9% ± 0.72. De acuerdo con los valores obtenidos, se demuestra que el método de fabricación aplicado (método de emulsificación-difusión) en este trabajo tiene un alto porcentaje de EE, a pesar de que estudios previos se ha informado una baja EE en NPs basadas en biopolímeros como PCL y PLGA (Manjili et al., 2016).

Debido a que la curcumina tiene muy baja solubilidad (20 µg/ml) y presenta una tasa de degradación rápida, el desarrollo de nanoformulaciones con métodos eficaces de encapsulación de curcumina que revelen un alto porcentaje de entrapamiento, mejoran las características de ésta en solución acuosa y al mismo tiempo aumenta la posibilidad de su aplicación en terapias médicas.

10.1.6 Liberación in vitro de curcumina

El mecanismo clásico para controlar la liberación de fármacos de las NPs poliméricas se logra mediante la regulación de las tasas de biodegradación del polímero y la difusión del fármaco desde la matriz del polímero (Kamaly, Yameen, Wu, & Farokhzad, 2016). Para este trabajo se realizó la cuantificación de la liberación de curcumina mediante el método de dispersión directa, el patrón obtenido se presenta en la Figura 21.

Las NPs de Curcumina-PCL/F68 presentaron una liberación de ráfaga (o de tipo “burst”) en los primeros 30 minutos del ensayo. Dicha liberación de ráfaga observada se traduce en la adsorción de la curcumina en la superficie de las NPs y posiblemente también represente el fármaco entrampado cerca de la superficie de las NPs. En las horas posteriores, la curcumina fue liberada gradualmente de las NPs de Curcumina-PCL/F68.

La liberación total de la curcumina encapsulada en las NPs de Curcumina-PCL/F68 alcanzó el 75 % pasadas 72 h del inicio de la cuantificación. Por otro lado, aproximadamente el 91 % de la curcumina libre se solubilizó en las primeras 6 h. Como era de esperarse, la liberación de curcumina de las NPs de Curcumina-PCL/F68 fue significativamente más lenta que el fármaco solo.

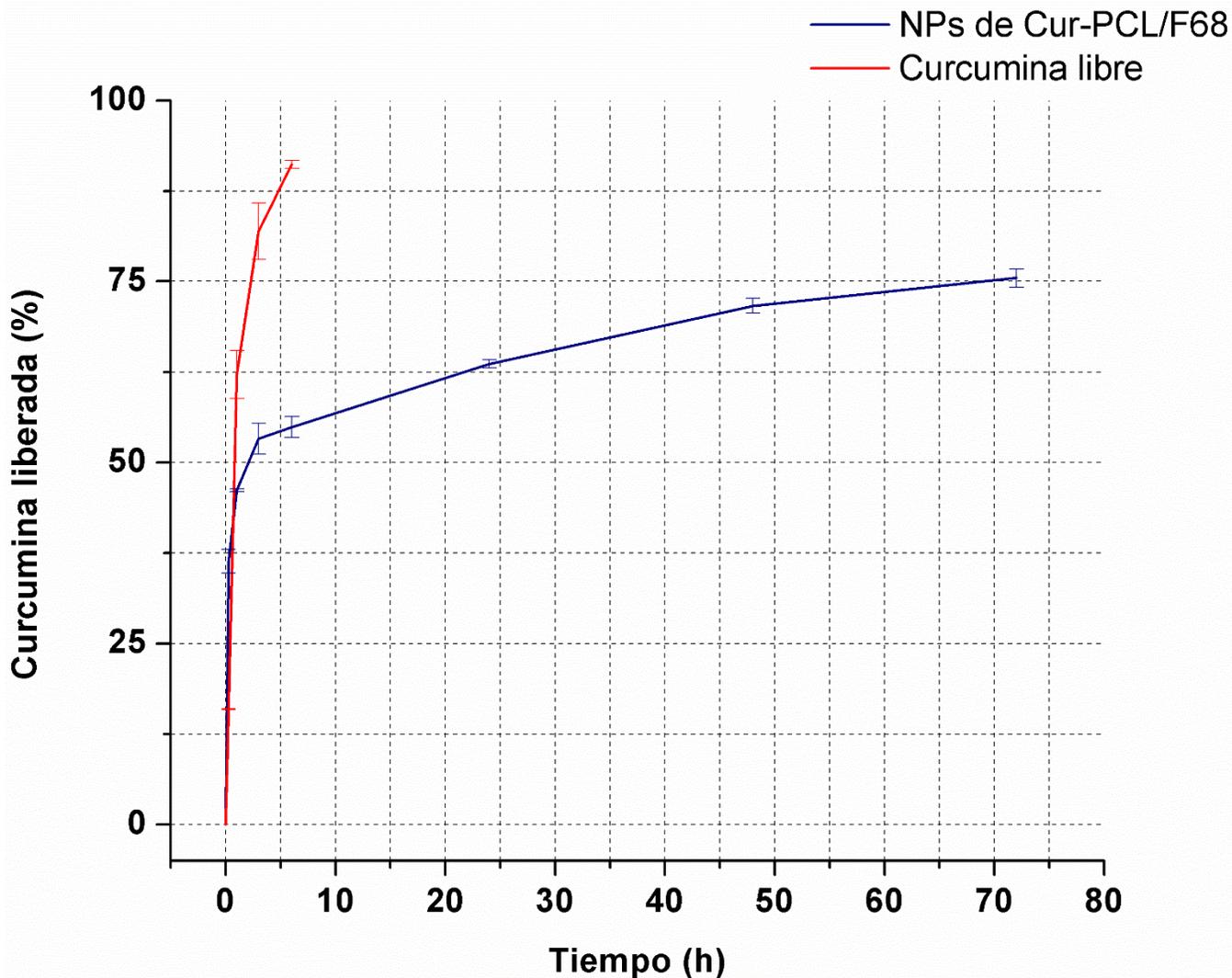


Figura 21. Perfil de liberación de la curcumina. Se evaluó curcumina libre y curcumina atrapada en Nanopartículas de Curcumina-PCL/F68 en PBS (0.1 M) a 37 °C.

Varios modelos matemáticos se utilizaron para investigar el mecanismo de liberación de la curcumina de las NPs de Curcumina-PCL/F68. La liberación de fármacos depende de lo siguiente: adsorción de los fármacos en la superficie de la matriz de las NPs; difusión a través de la matriz de las NPs; erosión de la matriz de las NPs; degradación de la matriz de los polímeros, o una difusión combinada, erosión, y el proceso de degradación del polímero (Javadzadeh et al., 2010).

La aplicación del modelo matemático correcto permite analizar los mecanismos de liberación de los fármacos. Como se muestra en la Tabla 8, los datos se procesaron estadísticamente y se evaluaron los modelos matemáticos de orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas, determinando en cada uno de ellos el coeficiente de correlación (R^2), la ordenada al origen (A) y la pendiente (b). Los datos obtenidos mostraron el más alto coeficiente de correlación al cuadrado con el modelo Higuchi ($R^2 = 0.996$; $a = 0.0342$; $b = 0.4699$).

Este modelo se basa en la Ley de Fick, donde la liberación se produce por medio de la difusión de la curcumina desde el núcleo de la nanopartícula hacia la solución externa de PBS (Higuchi, 1963). Por lo tanto, se puede decir que la liberación de curcumina de las NPs de Curcumina-PCL/F68 es controlada por difusión y la fracción de la curcumina liberada es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo.

El mecanismo de liberación de fármaco de las NPs de Curcumina-PCL/F68 podría considerarse ser el siguiente y se representa gráficamente en la Figura 22: el medio PBS actúa erosionando, disolviendo e hinchando la matriz de la PCL, y penetra en el interior a través de los poros y los diminutos espacios intraparticulares. En el interior, en el primer contacto entre fármaco y agua, el fármaco se disuelve lentamente y prosigue sucesivamente por la difusión de las superficies de cristal en la matriz uniforme y en el disolvente de baño bajo condiciones “sink” (Higuchi, 1963).

Tabla 8. Modelado matemático de los perfiles de liberación.

Modelo matemático	Ecuación	R^2	a	b
Orden cero	$Q_t = Q_0 + K_0t$	0.9615	0.3299	53.654 %/h
Primer orden	$\ln Q_t = \log Q_0 + K_1t$	0.9842	-0.0096	2.2430 1/h
Higuchi	$Q_t = K_H t^{1/2}$	0.9960	0.0342	0.4699 %/h ^{1/2}
Korsmeyer-Peppas	$\frac{Q_t}{Q_\infty} = K_K t^n$	0.9742	0.1129	-0.3391 1/h ⁿ

Q_t : Cantidad de fármaco liberado en el tiempo t

Q_0 : Cantidad inicial de fármaco en la forma farmacéutica

Q_∞ : Cantidad total de fármaco disuelto cuando se agota la forma farmacéutica

K_0, K_1, K_H, K_K : constantes de velocidad de lanzamiento

R^2 : coeficiente de correlación cuadrada

%: porcentaje de fármaco disuelto al tiempo t

$y = ax \pm b$ es una ecuación obtenida después de la regresión: a – pendiente y b - coeficiente lineal.

La liberación controlada de fármacos es importante ya que mediante procesos de este tipo se pueden mejorar los métodos de tratamiento, superando obstáculos del metabolismo y la pérdida de fármaco a través de la vía de administración ya que las NPs protegen al fármaco encapsulado y al mismo tiempo favorecen sus propiedades intrínsecas; así mismo, se permite reducir la dosis necesaria de fármaco para alcanzar una concentración eficaz en el cuerpo y se pueden disminuir también los agentes libres circulantes, lo que puede aminorar efectos secundarios dañinos.

Los resultados obtenidos indican que el sistema es adecuado para la liberación controlada de fármacos, misma que es necesaria en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

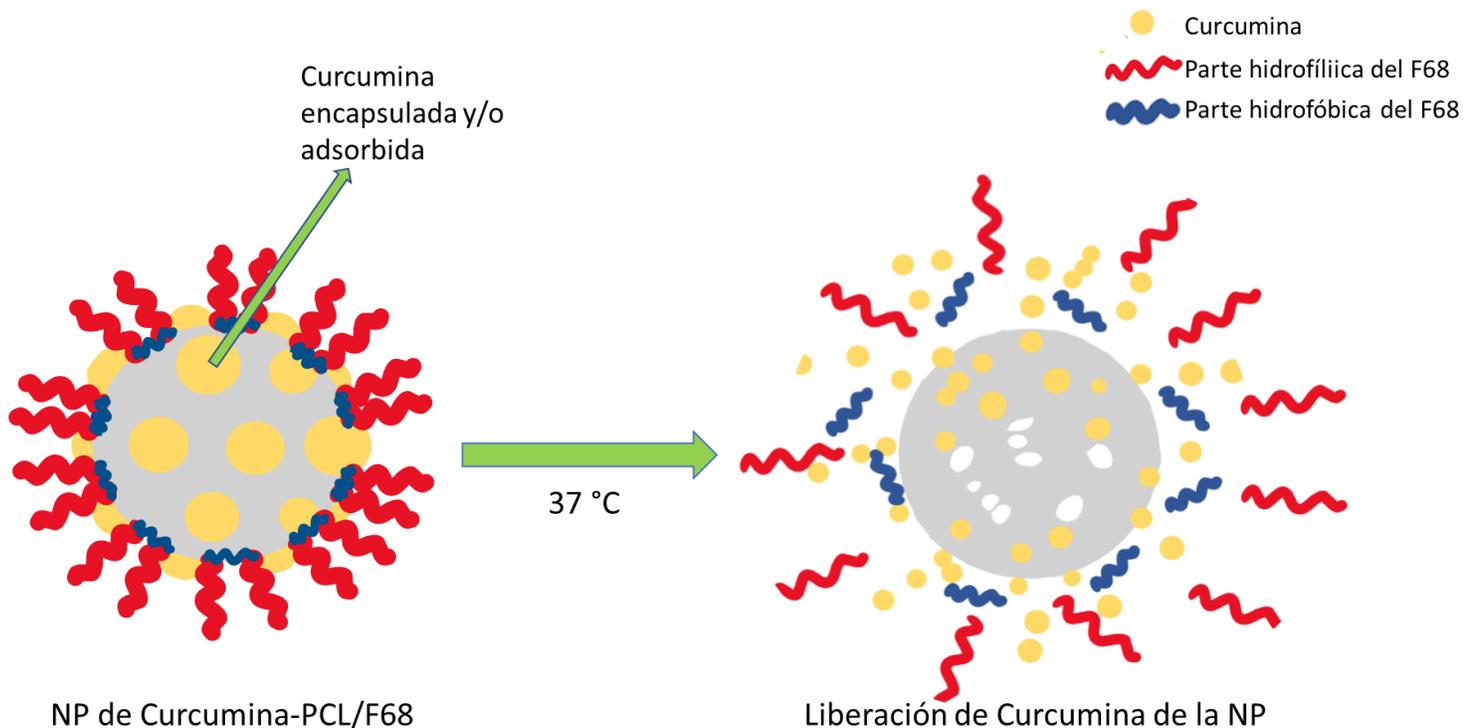


Figura 22. Descripción gráfica de la desintegración de la NP y liberación del fármaco.

10.2 Caracterización biológica

10.2.1 Citotoxicidad *in vitro* de las NPs

Con el fin de determinar el efecto de citotoxicidad en las NPs de PCL/F68 y de Curcumina-PCL/F68, las células MIO-M1 y SH-SY5 fueron tratadas con diferentes concentraciones de NPs (0, 3,75, 30, 125, 500, y 1,000 $\mu\text{g/ml}$), y la viabilidad celular se evaluó después de 24 y 96 h.

A pesar de que las NPs son biodegradables y biocompatibles debido a los excipientes que las componen, la citotoxicidad de las NPs depende de los parámetros de tamaño y forma de partícula y la concentración. El tamaño, la carga, la superficie química y la forma de las NPs puede afectar a la manera en que éstas interactúen con el entorno biológico y, en última instancia, determinar el potencial de citotoxicidad (Capco & Chen, 2014).

Este trabajo describe los posibles efectos celulares de las NPs en el SNC humano evaluado en cultivos celulares, lo cual reveló que no hay efectos tóxicos en las células gliales y neuronales, en términos de la perspectiva de su potencial uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Las Figuras 23 y 24 presentan la viabilidad celular, analizada a través del ensayo MTT, de las células MIO-M1 en presencia tanto de NPs de PCL/F68 como de NPs de Curcumina-PCL/F68. Las figuras 24A y 24B representan el porcentaje de viabilidad de las células MIO-M1 a las 24 y 96 h, respectivamente. Como puede ser observado, la presencia de las NPs no afectó la viabilidad de estas células dentro del intervalo de concentración analizado (0, 3,75, 30, 125, 500, y 1,000 $\mu\text{g/ml}$).

A las 24 h (Figura 23A), la viabilidad celular en presencia de las NPs de PCL/F68 permaneció alrededor del 102 %, incluso con la concentración más alta de NPs. Para las NPs de Curcumina-PCL/F68, la viabilidad fue mantenida en aproximadamente 98 %. Sólo en la concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ de NPs la viabilidad disminuyó ligeramente a un 92.8 %. Sin embargo, la prueba de biocompatibilidad mostró que las NPs son un sistema adecuado para aplicaciones médicas.

Pasadas 96 h de incubación (Figura 23B), la viabilidad celular se observó alrededor del 100 % con ambos tipos de NPs. Solamente las NPs de PCL/F68 en concentración de 500 µg/ml presentaron un decremento, mostrando 90 % de viabilidad.

Un comportamiento similar fue percibido en las células SH-SY5Y (Figuras 24A y 24B). Después de 24 h de incubación, el intervalo de viabilidad celular con las NPs de PCL/F68 fue mantenido entre 90-106 %; mientras tanto, las NPs de Curcumina-PCL/F68 presentaron un decremento cuando la prueba se realizó con la concentración de 1,000 µg/ml. Sin embargo, a las 96 h, se apreció un incremento en la viabilidad celular tanto con las NPs de PCL/F68 como con las de Curcumina-PCL/F68.

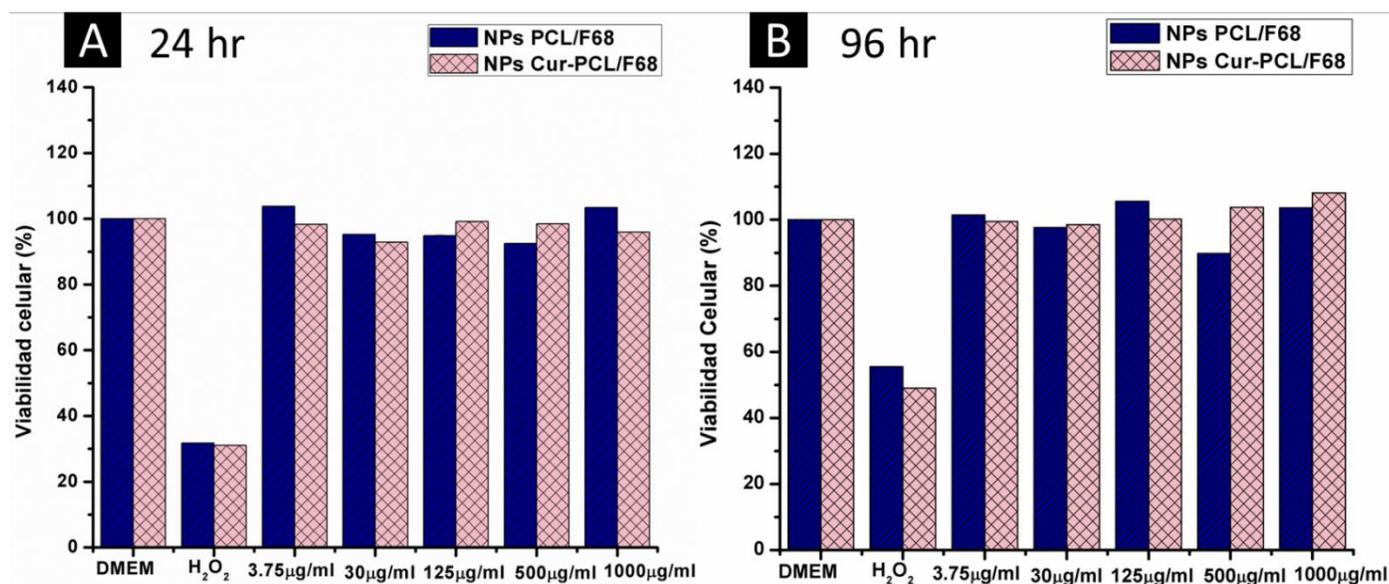


Figura 23. Evaluación de citotoxicidad de las Nanopartículas de PCL/F68 y de Curcumina-PCL/F68 a las 24 y 96 h con las células MIO-MI.

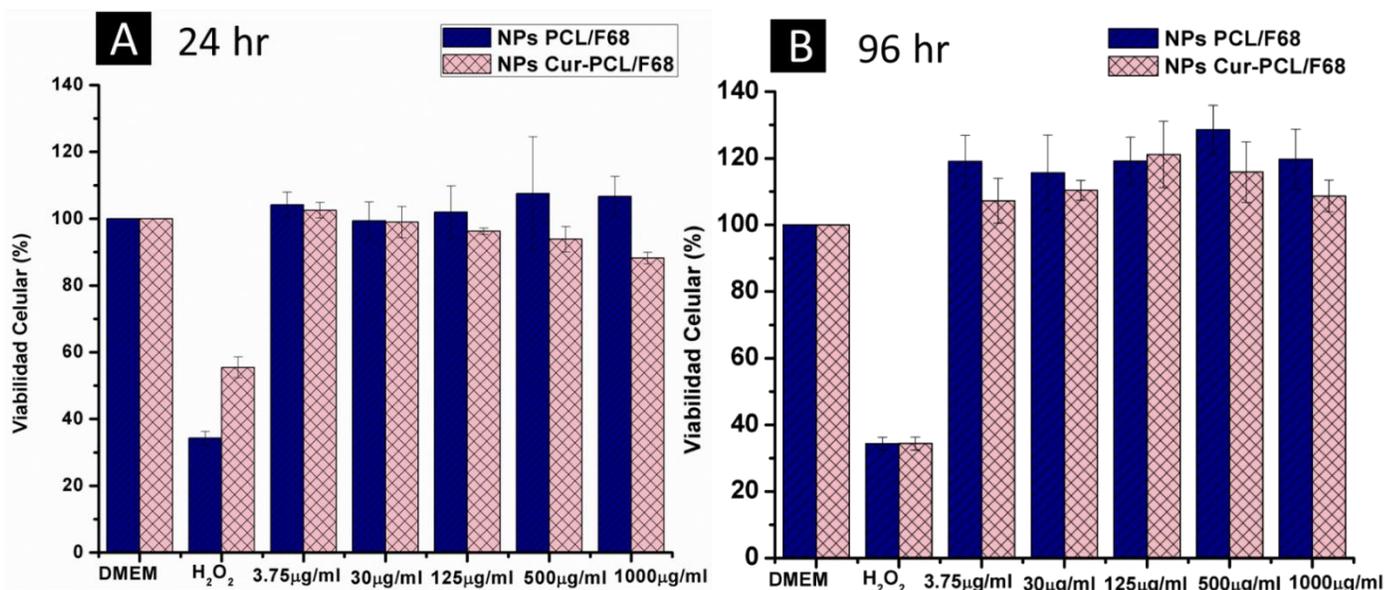


Figura 24. Evaluación de citotoxicidad de las NPs de PCL/F68 y de Curcumina-PCL/F68 a las 24 y 96 h con las células SH-SY5Y.

Los resultados indican que las NPs de PCL/F68 y de Curcumina-PCL/F68 no son tóxicas para las células MIO-M1 y SH-SY5Y, incluso cuando son agregadas altas concentraciones de NPs. Este comportamiento puede deberse a los componentes de la formulación, tales como la alta biocompatibilidad de la PCL, Pluronic® F68 y la Curcumina. También pueden influir factores como el tamaño de partícula, el potencial zeta moderado y la forma esférica de las NPs. En este sentido, la morfología esférica ha sido descrita como menos tóxica y reactiva en comparación con otras formas como fibras o nanotubos (Fonseca-santos, Daflon palmira, Gremiao, & Chorilli, 2015).

10.2.2 Captación celular de las NPs

La respuesta celular mediada por NPs es crucialmente importante para terapias exitosas, ya que las partículas mediarían activamente los efectos biológicos, como la unión y activación de los receptores de membrana y la subsecuente expresión de proteínas (Jiang, Kim, Rutka, & Chan, 2008).

La captación de NPs en las células generalmente involucra procesos endocíticos, que dependen principalmente de su tamaño y características de la superficie (Iversen, Skotland, &

Sandvig, 2011). Estas propiedades se pueden ajustar mediante el método de preparación de NPs (Rao & Geckeler, 2011).

El tamaño desempeña un papel en la captación celular de liposomas, NPs poliméricas, virus artificiales, y nanoestructuras inorgánicas (Capco & Chen, 2014). Sin embargo, hallazgos recientes indican que la morfología de la partícula es importante también para la biodistribución e internalización celular (Petros & Desimone, 2010). También ha sido reportado que las partículas esféricas se internalizan rápida y uniformemente debido a su simetría.

De la misma manera, las características de superficie de las NPs podrían modificar el comportamiento de las células. Además se ha reportado que la actividad inhibitoria de las bombas de eflujo por parte de los Pluronic[®], como Pluronic[®] F68, podría ser empleada para atravesar la BHE (Blanco, Shen, & Ferrari, 2015, Petros & Desimone, 2010, Batrakova & Kabanov, 2008).

Debido a que la curcumina posee propiedades fotoquímicas, proporciona una mayor oportunidad de estudiar la captación celular *in vitro* utilizando un microscopio de fluorescencia. Las Figuras 25 y 26 ilustran la captación celular de la curcumina libre, NPs de PCL/F68, y NPs de Curcumina-PCL/F68 en diferentes periodos de incubación con células MIO-M1.

El estudio de captación celular utilizado se basa en la intensidad de la fluorescencia de la curcumina en las NPs. El destino intracelular de las NPs es fundamental para su éxito; así, evaluar la internalización de las NPs en las células representa un factor importante del potencial involucrado en su aplicación.

Como puede observarse, en la primera hora, la fluorescencia es menor que la observada a las 5 h para todas las muestras. Las Figuras 25A y 25B correspondientes a las NPs de PCL/F68 exhibieron una leve señal de fluorescencia. Para las NPs de Curcumina-PCL/F68 (Figuras 25C y 25D), la fluorescencia puede ser observada cerca del núcleo. Las Figuras 25E y 25F muestran la internalización de la curcumina libre. La fluorescencia es menor a la observada con las NPs; sin embargo, una señal pudo observarse.

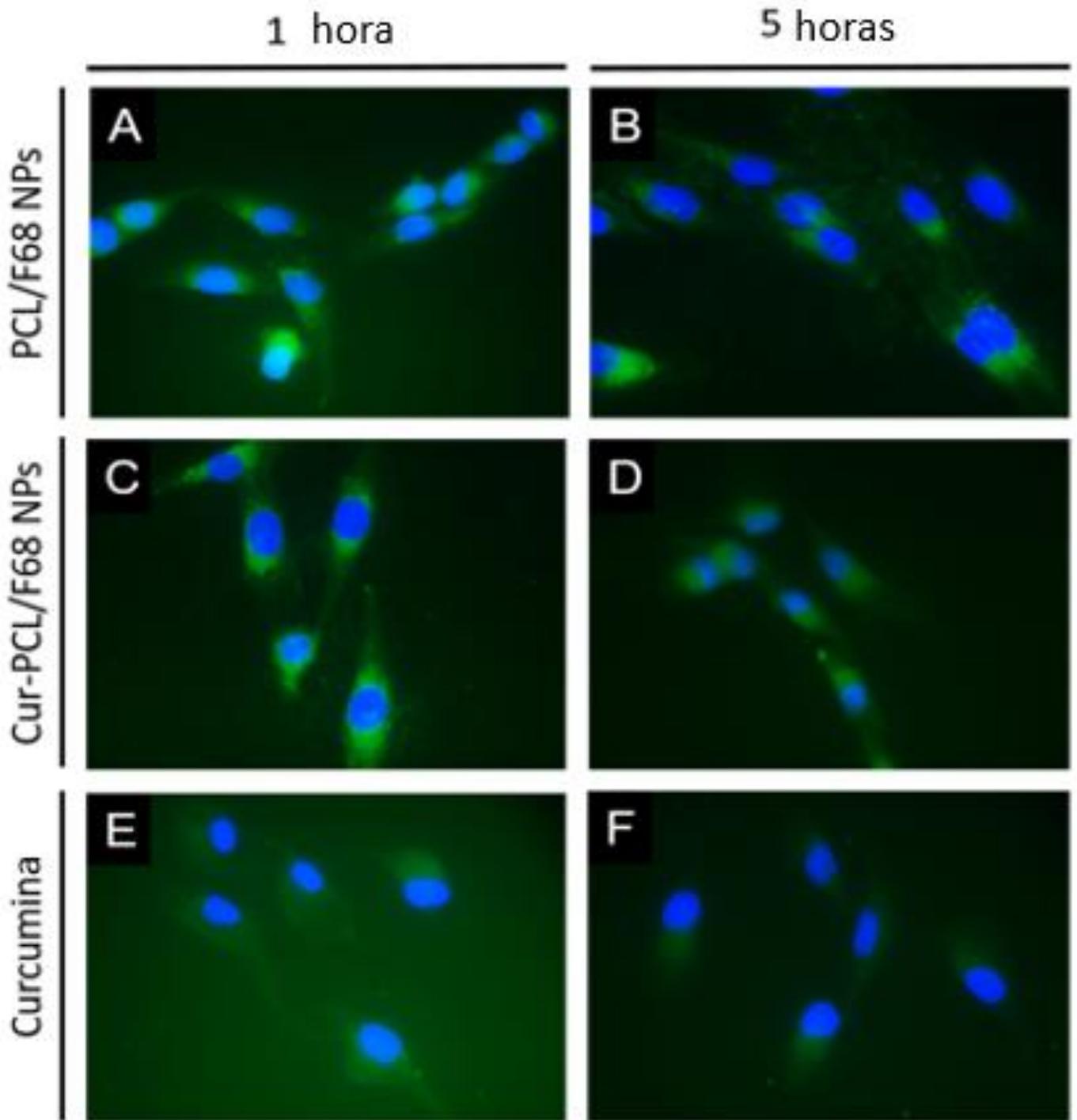


Figura 25. Captación celular después de 1 y 5 h en las células MIO-MI evaluado por fluorescencia. A y B, Nanopartículas de PCL/F68 con Cumarina como control positivo. C y D, NPs de Curcumina-PCL/F68 como sistema de interés. E y F, curcumina libre. El núcleo celular teñido con DAPI se observa en azul. La autofluorescencia de las Nanopartículas se observa en verde. Las muestras se observaron a 63X.

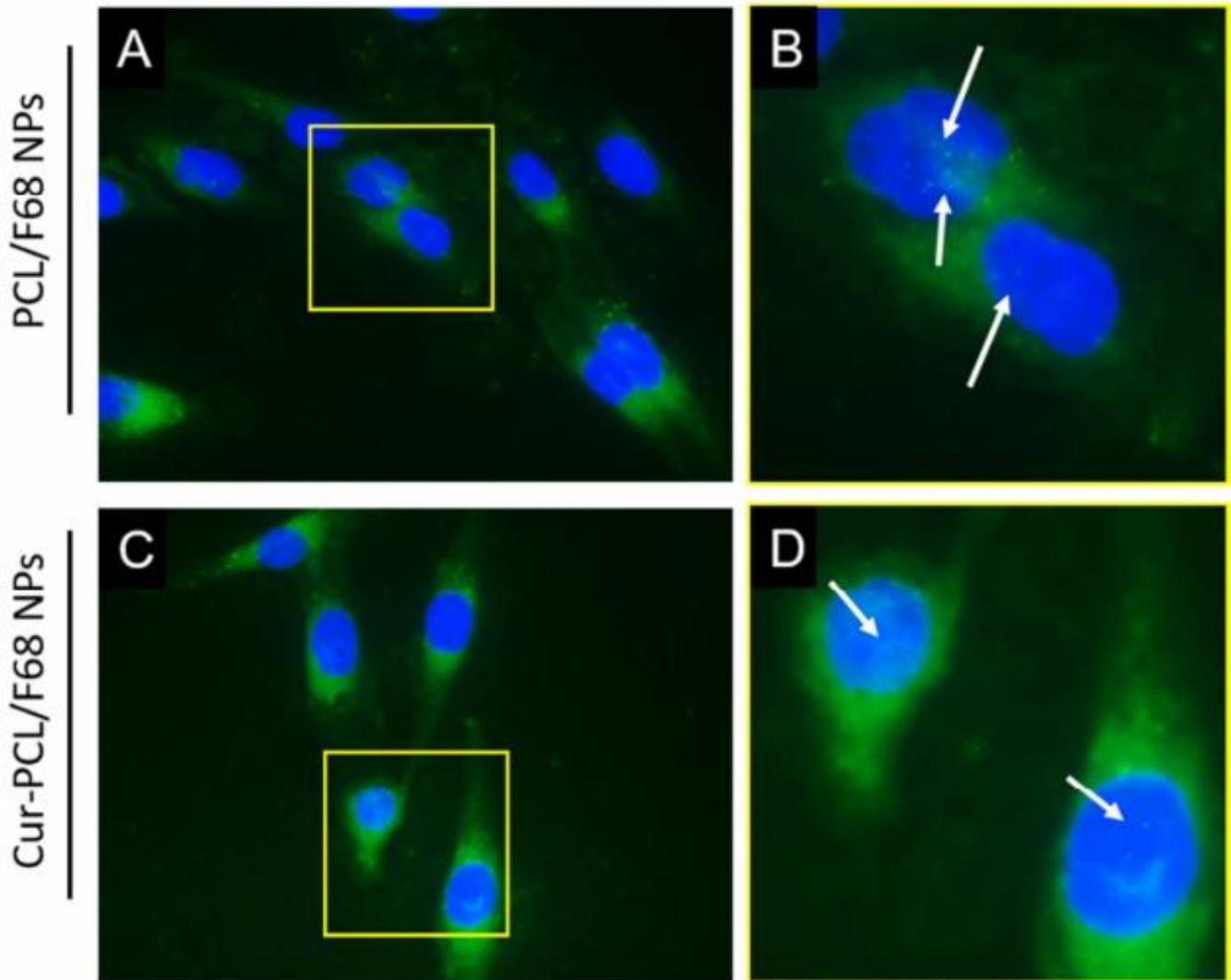


Figura 26. Captación celular después de 5 h de NPs de PCL/F68 (A y B), y después de 1 h de NPs de Cur-PCL/F68 (C y D). Las flechas blancas muestran la presencia de NPs dentro del núcleo de la célula. Las muestras se observaron a 63X.

La curcumina es una molécula lipofílica que puede interactuar con la membrana celular y se transporta posteriormente hacia el interior de la célula. Sin embargo, la internalización celular se mejoró considerablemente empleando, como nanotransportador, las NPs de Curcumina-PCL/F68.

La conjunción de los parámetros fisicoquímicos adecuados descritos previamente para las NPs de Curcumina-PCL/F68 son evidenciados con un alto grado de internalización en la línea glial celular, las células de Müller, (MIO-M1). Estas células están involucradas en enfermedades

neuronales que expresan daños en la retina. Estos resultados son satisfactorios como una etapa prometedora de investigación destinada a la búsqueda de nuevos tratamientos para las enfermedades neurodegenerativas.

También, la alta internalización de las NPs podría estar relacionada con la presencia de Pluronic® F68, que reduce el eflujo de NPs de las células por parte de la P-Gp en la BHE. Como se mencionó, la BHE es una interfaz activa entre el sistema vascular y el cerebro que apoya la homeostasis del tejido, pero también presenta un gran obstáculo para la liberación de fármacos al SNC (Cai et al., 2016).

Leyva-García et al. y Jörg Kreuter han reportado otros posibles mecanismos de internalización de NPs hacia el cerebro, éstos podrían ser (Leyva-García et al., 2015; Jörg Kreuter, 2014):

Un mayor tiempo de circulación de las NPs en el torrente sanguíneo incrementa la cantidad de éstas adsorbidas a los capilares cerebrales, creando así un gradiente de concentración y como resultado se obtendría una mejor distribución al cerebro.

Un mayor tiempo de circulación de las NPs podría favorecer la endocitosis por las células endoteliales, y la posterior liberación del fármaco dentro de dichas células, así como la seguida propagación del fármaco al cerebro.

Transcitosis a través de la capa de células endoteliales, el posterior depósito en el cerebro y la liberación del fármaco en el mismo.

La apertura de las uniones estrechas entre las células endoteliales de los vasos sanguíneos del cerebro. De esta forma, las NPs podrían llegar al cerebro en forma libre a través de dichas uniones y dentro de éste liberar el fármaco.

Podría también generarse un efecto tóxico sobre la vasculatura cerebral, lo que daría lugar a la apertura de la BHE.

Los tensoactivos tienen un efecto característico general que es la solubilización de lípidos de membrana de las células endoteliales, con lo cual aumenta la permeabilidad de la membrana favoreciendo así el paso de fármacos a través de la BHE.

También, se ha demostrado que algunos tensoactivos como el Poloxámero 188 tienen la capacidad de inhibir a la P-gp, misma que constituye el flujo de salida en la BHE, por lo que se disminuye o bloquea la expulsión de fármacos del cerebro.

Además de la inhibición de la P-Gp, Pluronic® F68 adsorbe selectivamente ciertas proteínas plasmáticas, especialmente las apolipoproteínas E y B en la superficie de la nanopartícula. Las apolipoproteínas promueven la endocitosis mediada por receptor de las partículas por las células endoteliales cerebrales, y facilitan el paso a través de la BHE de las NPs cargadas con fármacos (Petri B, Bootz A, Khalansky A, Hekmatara T, Müller R, Uhl R, Kreuter J, 2007).

En consecuencia, las NPs de Curcumina-PCL/F68 representan un novedoso sistema con una potencial aplicación como tratamiento en las enfermedades neurodegenerativas.

11. Conclusiones

Mediante la técnica de emulsificación-difusión se obtuvieron NPs cargadas con curcumina con un tamaño promedio de 149.9 nm, un PDI inferior a 0.1, una forma esférica y sin aglomeraciones, que en conjunto permitieron una alta internalización celular, misma que se evidenció por medio del ensayo de fluorescencia se evidenció la internalización *in vitro* de las NPs dentro de las células MIO-M1 y SH-SY5H, logrando llegar incluso hasta el núcleo.

Mediante el análisis de interacciones químicas, se demostró la no reactividad entre PCL y curcumina, lo cual sugiere que los excipientes conservan sus propiedades naturales. Al analizar las propiedades térmicas, en el TGA se observó que las NPs se degradan más rápidamente en comparación con los componentes puros, manifestando que las NPs presentan mayor reactividad que éstos. Durante el análisis del sistema nanoparticulado, por medio del DSC, no fue posible detectar una temperatura de transición correspondiente a la curcumina, lo cual sugiere la exitosa encapsulación de la curcumina o que ésta se encuentra dispersa a nivel molecular.

La eficiencia de encapsulación fue del 96% y la cantidad de curcumina cargada en las NPs fue de 4.9%, evidenciando así, la eficacia del método de obtención empleado. Aunado a la exitosa encapsulación de curcumina en las NPs, se logró una liberación controlada del fármaco, misma que se ajustó al modelo matemático de liberación de Higuchi, el cual sugiere que las NPs se degradan por erosión debido a la hidrólisis de los enlaces éster de la PCL. Debido a lo anterior, no sería necesario administrar una gran cantidad de NPs para alcanzar la dosis efectiva y se evitaría comprometer los sistemas de toxicidad, aunque en el estudio de citotoxicidad *in vitro* se demostró que las NPs son biocompatibles y no presentan cambios significativos en la viabilidad celular, incluso en presencia de concentraciones altas de NPs.

Debido a su tamaño y características de superficie, las NPs obtenidas podrían llegar a permitir el paso a través de la BHE. Además, cuentan con una estrategia de direccionamiento activo brindado por el excipiente Pluronic® F68 que aumenta su especificidad.

Con base en lo mencionado anteriormente, los resultados de este trabajo sugieren el papel potencial que puede desempeñar la curcumina encapsulada en NPs en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y el efecto del F68 en el direccionamiento neuronal.

12. Referencias

- Aggarwal, B. B., & Harikumar, K. B. (2009). Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(1), 40–59. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.06.010>
- Aladag, I., Eyibilen, A., Guven, M., Guven, G., Atis,*, O., & Erkokmaz, U. (2019). Role of oxidative stress in hearing impairment in patients with type two diabetes mellitus. <https://doi.org/10.1017/S0022215109004502>
- Aladag, İ., Eyibilen, A., Güven, M., Atış, Ö., Erkokmaz, Ü., & Erkokmaz, U. (2009). Role of oxidative stress in hearing impairment in patients with type two diabetes mellitus. *The Journal of Laryngology & Otology*, 123(09), 957. <https://doi.org/10.1017/S0022215109004502>
- Aliah, N. N., & Ansari, M. N. M. (2017). Thermal analysis on Characterization of Polycaprolactone (PCL) – Chitosan Scaffold for Tissue Engineering. *International Journal of Scientific Research Engineering & Technology*, 6(2), 76–80.
- Allémann, E., Leroux, J. C., Gurny, R., & Doelker, E. (1993). In Vitro Extended-Release Properties of Drug-Loaded Poly(DL-Lactic Acid) Nanoparticles Produced by a Salting-Out Procedure. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 10(12), 1732–1737. <https://doi.org/10.1023/A:1018970030327>
- Álvarez-Cisneros, T., Torres-Castro, S., Mena-Montes, B., Torres-Carrillo, N. M., Montes, B. M., Castro, S. T., ... Robledo, G. (2017). *Género y salud en cifras Alzheimer: diferencias por género entre América Latina y otras regiones del mundo Factores de protección de las demencias: importancia para las mujeres Envejecimiento y Demencias en México desde una perspectiva de género.*
- Ammoury, N., Fessi, H., Devissaguet, J. P., Dubrasquet, M., & Benita, S. (1991). Jejunal Absorption, Pharmacological Activity, and Pharmacokinetic Evaluation of Indomethacin-Loaded Poly(D,L-Lactide) and Poly(Isobutyl-Cyanoacrylate) Nanocapsules in Rats. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of*

Pharmaceutical Scientists, 8(1), 101–105. <https://doi.org/10.1023/A:1015846810474>

Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., & Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises...: Full Text Finder Results. *Molecular Pharmaceutics*, 4(6), 807–818. Retrieved from <http://resolver.ebscohost.com.libproxy.txstate.edu/openurl/?sid=Entrez%3APubMed&id=pmid%3A17999464&linksourcetid=3402>

Anderson, T. M. D. (2003). 2003 Aggarwal et al Anticancer Potential of Curcumin (Review), 398, 363–398.

Ayloo, S., & Gu, C. (2019). Transcytosis at the blood–brain barrier. *Current Opinion in Neurobiology*, 57, 32–38. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2018.12.014>

Barbu, E., Molnàr, É., Tsibouklis, J., & Górecki, D. C. (2009). The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood–brain barrier. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(6), 553–565. <https://doi.org/10.1517/17425240902939143>

Barnham, Kevin J., Masters, Colin L. and Bush, Ashley I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004; Vol. 3: 205.

Batrakova, E. V., & Kabanov, A. V. (2008, September 10). Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of Controlled Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.04.013>

Benassi, R., Ferrari, E., Lazzari, S., Spagnolo, F., & Saladini, M. (2008). Theoretical study on Curcumin: A comparison of calculated spectroscopic properties with NMR, UV-vis and IR experimental data. *Journal of Molecular Structure*, 892(1–3), 168–176. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2008.05.024>

Binnig, G., Quate, C. F., & Gerber, C. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9), 930–933. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>

Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015a). Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, 33(9), 941–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>

Blanco, E., Shen, H., & Ferrari, M. (2015b). Principles of nanoparticle design for overcoming

biological barriers to drug delivery. *Nature Biotechnology*, 33(9), 941–951. <https://doi.org/10.1038/nbt.3330>

Cai, Q., Wang, L., Deng, G., Liu, J., Chen, Q., & Chen, Z. (2016). Systemic delivery to central nervous system by engineered PLGA nanoparticles. *American Journal of Translational Research*, 8(2), 749–764.

Capco, D., & Chen, Y. (2014). *Nanomaterial. Impacts on cell biology and medicine. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 811). https://doi.org/10.1007/978-94-017-8739-0_11

Celis-De la Rosa, A. de J., Cabrera-Pivaral, C. E., Báez-Báez, M. G. L., Celis-Orozco, A., Gabriel-Ortiz, G., & Zavala-González, M. A. (2017). Mortalidad por enfermedad de Alzheimer en México de 1980 a 2014. *Gaceta Médica de México*, 154, 550–554. <https://doi.org/10.24875/GMM.18003361>

Chen, X., Sun, J., Li, H., Wang, H., Lin, Y., Hu, Y., & Zheng, D. (2017). Curcumin-Loaded Nanoparticles Protect Against Rhabdomyolysis-Induced Acute Kidney Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43(5), 2143–2154. <https://doi.org/10.1159/000484233>

Chithrani, B. D., & Chan, W. C. W. (2007). Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Letters*, 7(6), 1542–1550. <https://doi.org/10.1021/nl070363y>

Couvreur, P., Kante, B., Lenaerts, V., Scailteur, V., Roland, M., & Speiser, P. (1980). Tissue distribution of antitumor drugs associated with polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(2), 199–202. <https://doi.org/10.1002/jps.2600690222>

Cozzolino, M., Delcanale, P., Montali, C., Tognolini, M., Giorgio, C., Corrado, M., ... Viappiani, C. (2019). Enhanced photosensitizing properties of protein bound curcumin. *Life Sciences*, 233, 116710. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116710>

Crucho, C. I. C., & Barros, M. T. (2017). Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering: C*, 80, 771–784. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.06.004>

- Damge, C., Michel, C., Aprahamian, M., & Couvreur, P. (1988). New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier. *Diabetes*, 37(2), 246–251. <https://doi.org/10.2337/diab.37.2.246>
- Damgé, C., Vonderscher, J., Marbach, P., & Pinget, M. (1997). Poly(alkyl cyanoacrylate) nanocapsules as a delivery system in the rat for octreotide, a long-acting somatostatin analogue. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49(10), 949–954. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06022.x>
- De Jong, W. H., & Borm, P. J. A. (2008). Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3(2), 133–149. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18686775>
- De Mello, V. A., & Ricci-Júnior, E. (2011). Encapsulation of naproxen in nanostructured system: Structural characterization and in Vitro release studies. *Quimica Nova*, 34(6), 933–939. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000600004>
- Del Prado-Audelo, M. L., Caballero-Florán, I. H., Meza-Toledo, J. A., Mendoza-Muñoz, N., González-Torres, M., Florán, B., ... Leyva-Gómez, G. (2019). Formulations of curcumin nanoparticles for brain diseases. *Biomolecules*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom9020056>
- Del Prado-Audelo, M. L., Magaña, J. J., Mejía-Contreras, B. A., Borbolla-Jiménez, F. V., Giraldo-Gomez, D. M., Piña-Barba, M. C., ... Leyva-Gómez, G. (2019). In vitro cell uptake evaluation of curcumin-loaded PCL/F68 nanoparticles for potential application in neuronal diseases. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 905–914. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.05.042>
- Dong, S., Zeng, Q., Mitchell, E. S., Xiu, J., Duan, Y., Li, C., ... Zhao, Z. (2012). Curcumin Enhances Neurogenesis and Cognition in Aged Rats: Implications for Transcriptional Interactions Related to Growth and Synaptic Plasticity. *PLoS ONE*, 7(2), e31211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031211>
- Drelich, J., Tormoen, G. W., & Beach, E. R. (2004). Determination of solid surface tension from particle–substrate pull-off forces measured with the atomic force microscope. *Journal of*

Colloid and Interface Science, 280(2), 484–497.
<https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2004.08.002>

Dumont, E., De Bleye, C., Sacré, P.-Y., Netchacovitch, L., Hubert, P., & Ziemons, E. (2016). From near-infrared and Raman to surface-enhanced Raman spectroscopy: progress, limitations and perspectives in bioanalysis. *Bioanalysis*, 8(10), 1077–1103.
<https://doi.org/10.4155/bio-2015-0030>

Ekman, B., & Sjöholm, I. (1978). Improved stability of proteins immobilized in microparticles prepared by a modified emulsion polymerization technique. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67(5), 693–696. <https://doi.org/10.1002/jps.2600670533>

El-Aneed, A. (2004). An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release*, 94(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2003.09.013>

El-Samaligy, M. S., Rohdewald, P., & Mahmoud, H. A. (1986). Polyalkyl cyanoacrylate nanocapsules. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 38(3), 216–218.
<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1986.tb04547.x>

Elzein, T., Nasser-Eddine, M., Delaite, C., Bistac, S., & Dumas, P. (2004). FTIR study of polycaprolactone chain organization at interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 273(2), 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.001>

Fernández, H. H. (2012). Updates in the medical management of Parkinson disease. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 79(1), 28–35. <https://doi.org/10.3949/ccjm.78gr.11005>

Fonseca-santos, B., Daflon palmira, M., Gremiao, & Chorilli, M. (2015). Nanotechnology-based drug delivery systems for the treatment of Alzheimer ' s disease. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 4981–5003. <https://doi.org/10.2147/IJN.S87148>

Froehlich, E., & Fröhlich, E. (2016). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles . Int J The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, (February), 5577–5591.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>

- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., & Delie, F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.001>
- Gelperina, Svetlana Maksimenko, Olga Khalansky, Alexander Vanchugova, Lyudmila Shipulo, Elena Abbasova, Kenul Berdiev, Rustam Wohlfart, Stefanie Chepurnova, Nina Kreuter, J. (2010). Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of the formulation parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(2), 157–163. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2009.09.003>
- Ghalandarlaki, N., Alizadeh, A. M., & Ashkani-Esfahani, S. (2014). Nanotechnology-applied curcumin for different diseases therapy. *BioMed Research International*, 2014, 394264. <https://doi.org/10.1155/2014/394264>
- Giudice, C. A., & Pereyra, A. M. (2009). *Tecnología de pinturas y recubrimientos. Componentes, formulación, manufactura y control de calidad.*
- Goldsmith, M., Abramovitz, L., & Peer, D. (2014). Precision Nanomedicine in Neurodegenerative Diseases. *ACS Nano*, 8(3), 1958–1965. <https://doi.org/10.1021/nn501292z>
- Golpich, M., Amini, E., Mohamed, Z., Azman Ali, R., Mohamed Ibrahim, N., & Ahmadiani, A. (2017). Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 23(1), 5–22. <https://doi.org/10.1111/cns.12655>
- Gómez Bautista, D. Reguladores de la autofagia con potencial terapéutico para el tratamiento de distintas enfermedades neurodegenerativas. Banco de tesis UNAM. Folio 07800462. 2018.
- Gómez Villarraga, F., Ros Badosa, J., & García-Antón Aviñó, J. (2013). *Síntesis de complejos y estabilización de nanopartículas de paladio con ligandos híbridos prazólicos y carbenos N-heterocíclicos y su aplicación en catálisis.*
- Grangier, J. L., Puygrenier, M., Gautier, J. C., & Couvreur, P. (1991). Nanoparticles as carriers for growth hormone releasing factor. *Journal of Controlled Release*, 15(1), 3–13. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(91\)90098-X](https://doi.org/10.1016/0168-3659(91)90098-X)

- Guarino, V., Gentile, G., Sorrentino, L., & Ambrosio, L. (2017). Polycaprolactone: Synthesis, Properties, and Applications. In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology* (pp. 1–36). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471440264.pst658>
- Gülçin, I. (2006). Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sciences*, *78*(8), 803–811. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.05.103>
- Guo, F., Guo, D., Zhang, W., Yan, Q., Yang, Y., Hong, W., & Yang, G. (2017). Preparation of curcumin-loaded PCL-PEG-PCL triblock copolymeric nanoparticles by a microchannel technology. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *99*, 328–336. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2017.01.001>
- Gupta, P., Garg, T., Tanmay, M., & Arora, S. (2015). Polymeric Drug-Delivery Systems: Role in P-gp Efflux System Inhibition. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, *32*(3), 247–275. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2015011592>
- Gurny, R., Peppas, N. A., Harrington, D. D., & Banker, G. S. (1981). Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *7*(1), 1–25. <https://doi.org/10.3109/03639048109055684>
- Gürsoy, A., Eroğlu, L., Ulutin, S., Taşyürek, M., Fessi, H., Puisieux, F., & Devissaguet, J. P. (1989). Evaluation of indomethacin nanocapsules for their physical stability and inhibitory activity on inflammation and platelet aggregation. *International Journal of Pharmaceutics*, *52*(2), 101–108. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90283-4](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90283-4)
- Hall, J. B., Dobrovolskaia, M. A., Patri, A. K., & McNeil, S. E. (2007). Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine*, *2*(6), 789–803. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.6.789>
- Hancock, B. C., & Parks, M. (2000). What is the True Solubility Advantage for Amorphous Pharmaceuticals? *Pharmaceutical Research*, *17*(4), 397–404. <https://doi.org/10.1023/A:1007516718048>
- Harmia-Pulkkinen, T., Tuomi, A., & Kristoffersson, E. (1989). Manufacture of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles with pilocarpine and timolol by micelle polymerization:

Factors influencing particle formation. *Journal of Microencapsulation*, 6(1), 87–93. <https://doi.org/10.3109/02652048909019905>

Haryuna, T. S. H., Munir, D., Maria, A., & Bashiruddin, J. (2017). The antioxidant effect of curcumin on cochlear fibroblasts in rat models of diabetes mellitus. *Iranian Journal of Otorhinolaryngology*, 29(4), 197–202. <https://doi.org/10.22038/ijorl.2017.19603.1660>

Heathman, T. R. J., Webb, W. R., Han, J., Dan, Z., Chen, G. Q., Forsyth, N. R., ... Sun, X. (2014). Controlled Production of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyhexanoate) (PHBHHx) Nanoparticles for Targeted and Sustained Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(8), 2498–2508. <https://doi.org/10.1002/JPS.24035>

Higuchi, T. (1963). Mechanism of sustained-action medication. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52, 1145–1149. <https://doi.org/10.1002/jps.2600521210>

Hiljanen-Vainio, M., Karjalainen, T., & Seppälä, J. (1996). Biodegradable lactone copolymers. I. Characterization and mechanical behavior of ϵ -caprolactone and lactide copolymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 59(8), 1281–1288. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19960222\)59:8<1281::AID-APP11>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19960222)59:8<1281::AID-APP11>3.0.CO;2-9)

Hu, K., Li, J., Shen, Y., Lu, W., Gao, X., Zhang, Q., & Jiang, X. (2009). Lactoferrin-conjugated PEG-PLA nanoparticles with improved brain delivery: In vitro and in vivo evaluations. *Journal of Controlled Release*, 134(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.10.016>

Huang, J., Si, L., Jiang, L., Fan, Z., Qiu, J., & Li, G. (2008). Effect of pluronic F68 block copolymer on P-glycoprotein transport and CYP3A4 metabolism. *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1–2), 351–353. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2007.12.028>

Huang, M., & Gu, X. (2019). Nanotherapeutic strategies for the treatment of neurodegenerative diseases. *Brain Targeted Drug Delivery System*, 321–356. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814001-7.00013-5>

Hubert, B., Atkinson, J., Guerret, M., Hoffman, M., Devissaguet, J. P., & Maincent, P. (1991). The Preparation and Acute Antihypertensive Effects of a Nanocapsular Form of Darodipine, a Dihydropyridine Calcium Entry Blocker. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 8(6), 734–738.

<https://doi.org/10.1023/A:1015897900363>

- Huq, F., Liò, P., Rana, H. K., Moni, M. A., Quinn, J. M. W., Ahmed, M. B., & Akhtar, M. R. (2018). Genetic effects of welding fumes on the progression of neurodegenerative diseases. *NeuroToxicology*, 71(November 2018), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.12.002>
- Iversen, T.-G., Skotland, T., & Sandvig, K. (2011). Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. *Nano Today*, 6(2), 176–185. <https://doi.org/10.1016/J.NANTOD.2011.02.003>
- Jain, N. K., & Roy, I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 18(1), 24–36. <https://doi.org/10.1002/pro.3>
- Jallouk, A. P., Palekar, R. U., Pan, H., Schlesinger, P. H., & Wickline, S. A. (2015). *Modifications of Natural Peptides for Nanoparticle and Drug Design. Protein and Peptide Nanoparticles for Drug Delivery* (1st ed., Vol. 98). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.12.001>
- Javadzadeh, Y., Ahadi, F., Davaran, S., Mohammadi, G., Sabzevari, A., & Adibkia, K. (2010). Preparation and physicochemical characterization of naproxen-PLGA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(2), 498–502. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.047>
- Jiang, W., Kim, B. Y. S., Rutka, J. T., & Chan, W. C. W. (2008). Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature Nanotechnology*, 3(3), 145–150. <https://doi.org/10.1038/nnano.2008.30>
- Jo, D. H., Kim, J. H., Lee, T. G., & Kim, J. H. (2015). Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(7), 1603–1611. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.04.015>
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C. (2016). Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chemical Reviews*, 116(4), 2602–2663. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>

- Kaszuba, M., McKnight, D., Connah, M. T., McNeil-Watson, F. K., & Nobbmann, U. (2008). Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *Journal of Nanoparticle Research*, 10(5), 823–829. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9317-4>
- Ke, W., Pei, Y., Feng, L., Liu, Y., Huang, R., Wu, D., & Jiang, C. (2009). Gene therapy using lactoferrin-modified nanoparticles in a rotenone-induced chronic Parkinson model. *Journal of the Neurological Sciences*, 290(1–2), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.09.032>
- Kerč, J., & Srčić, S. (1995). Thermal analysis of glassy pharmaceuticals. *Thermochimica Acta*, 248, 81–95. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(94\)01949-H](https://doi.org/10.1016/0040-6031(94)01949-H)
- Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., & Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology*, 24(4), 325. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>
- Konan, Y. N., Berton, M., Gurny, R., & Allemann, E. (2003). Enhanced photodynamic activity of meso-tetra(4-hydroxyphenyl)porphyrin by incorporation into sub-200 nm nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(3–4), 241–249. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(03\)00017-4](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(03)00017-4)
- Krause, H. J., Schwarz, A., & Rohdewald, P. (1986). Interfacial polymerization, a useful method for the preparation of polymethylcyanoacrylate nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 12(4), 527–552. <https://doi.org/10.3109/03639048609048026>
- Kreuter, J. (2014). Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know? *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.08.008>
- Kreuter, J., Mauler, R., Gruschkau, H., & Speiser, P. P. (1976). The Use of New Polymethylmethacrylate Adjuvants for Split Influenza Vaccines. *Pathobiology*, 44(1), 12–19. <https://doi.org/10.1159/000162849>
- Kubiak, C., Manil, L., & Couvreur, P. (1988). Sorptive properties of antibodies onto cyanoacrylic nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 41(3), 181–187. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(88\)90190-1](https://doi.org/10.1016/0378-5173(88)90190-1)
- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based

drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 1–18.
<https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2009.09.001>

Landry, F. B., Bazile, D. V., Spenlehauer, G., Veillard, M., & Kreuter, J. (1996). Degradation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles coated with albumin in model digestive fluids (USP XXII). *Biomaterials*, 17(7), 715–723. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)86742-1](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)86742-1)

Langasco, R., Fancello, S., Rasso, G., Cossu, M., Cavalli, R., Galleri, G., ... Gavini, E. (2019). Increasing protective activity of genistein by loading into transfersomes: A new potential adjuvant in the oxidative stress-related neurodegenerative diseases? *Phytomedicine*, 52, 23–31. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2018.09.207>

Langer, R. (1999). Biomaterials in Drug Delivery and Tissue Engineering: One Laboratory's Experience. <https://doi.org/10.1021/AR9800993>

Lanza, R. P. (Robert P., Langer, R. S., & Vacanti, J. (2007). *Principles of tissue engineering*. Elsevier Academic Press.

Larumbe, R. (2001). Neurodegenerative diseases programme. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 24(3), 49–76.

Lenaerts, V., Labib, A., Chouinard, F., Rousseau, J., Ali, H., & Van Lier, J. (1995). Nanocapsules with a reduced liver uptake: Targeting of phthalocyanines to EMT-6 mouse mammary tumour in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 41(1), 38–43.

Lepeltier, E., Bourgaux, C., & Couvreur, P. (2014). Nanoprecipitation and the “Ouzo effect”: Application to drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 71, 86–97. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2013.12.009>

Lettiero, B., Andersen, A. J., Hunter, A. C., & Moghimi, S. M. (2012). Complement system and the brain: Selected pathologies and avenues toward engineering of neurological nanomedicines. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 283–289. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2011.10.036>

Leyva-García, N., Leyva-Gómez, G., Florán, B., Quintanar-Guerrero, D., Cortés, H., & Magaña, J. J. (2015). Nanoparticle technology for treatment of Parkinson's disease: the role of surface phenomena in reaching the brain. *Drug Discovery Today*, 20(7), 824–837.

<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.02.009>

- Li, V. H. K., Wood, R. W., Kreuter, J., Harmia, T., & Robinson, J. R. (1986). Ocular drug delivery of progesterone using nanoparticles. *Journal of Microencapsulation*, 3(3), 213–218. <https://doi.org/10.3109/02652048609031575>
- Lim, J., Yeap, S. P., Che, H. X., & Low, S. C. (2013). Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 381. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-381>
- Lin, P.-C., Lin, S., Wang, P. C., & Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32(4), 711–726. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2013.11.006>
- Lin, S. Y., & Chien, J. L. (2003). In Vitro Simulation of Solid-Solid Dehydration, Rehydration, and Solidification of Trehalose Dihydrate Using Thermal and Vibrational Spectroscopic Techniques. *Pharmaceutical Research*, 20(12), 1926–1931. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000008038.38378.d6>
- Lockman, P. R., Mumper, R. J., Khan, M. A., & Allen, D. D. (2002). Nanoparticle Technology for Drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(1), 1–13. <https://doi.org/10.1081/DDC-120001481>
- Lorenz, V., Liebing, P., Suta, M., Engelhardt, F., Hilfert, L., Busse, S., ... Edelmann, F. T. (2019). Synthesis, structure, complexation, and luminescence properties of the first metal-organic curcumin compound bis(4-triphenylsiloxy)curcumin. *Journal of Luminescence*. <https://doi.org/10.1016/J.JLUMIN.2019.02.058>
- Lowe, P. J., & Temple, C. S. (1994). Calcitonin and Insulin in Isobutylcyanoacrylate Nanocapsules: Protection Against Proteases and Effect on Intestinal Absorption in Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46(7), 547–552. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1994.tb03854.x>
- Maheshwari, R. K., Singh, A. K., Gaddipati, J., & Srimal, R. C. (2006). Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences*, 78(18), 2081–2087. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.12.007>

- Mahringer, A., & Fricker, G. (2016). ABC transporters at the blood–brain barrier. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 12(5), 499–508. <https://doi.org/10.1517/17425255.2016.1168804>
- Maincent, P., Le Verge, R., Sado, P., Couvreur, P., & Devissaguet, J. P. (1986). Disposition kinetics and oral bioavailability of vincamine-loaded polyalkyl cyanoacrylate nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75(10), 955–958. <https://doi.org/10.1002/jps.2600751009>
- Maiti, P., & Dunbar, G. (2018). Use of Curcumin, a Natural Polyphenol for Targeting Molecular Pathways in Treating Age-Related Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1637. <https://doi.org/10.3390/ijms19061637>
- Malcor, J.-D., Payrot, N., David, M., Faucon, A., Abouzid, K., Jacquot, G., ... Lisowski, V. (2012). Chemical Optimization of New Ligands of the Low-Density Lipoprotein Receptor as Potential Vectors for Central Nervous System Targeting. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(5), 2227–2241. <https://doi.org/10.1021/jm2014919>
- Malferrari, M., Nalepa, A., Venturoli, G., Francia, F., Lubitz, W., Möbius, K., & Savitsky, A. (2014). Structural and dynamical characteristics of trehalose and sucrose matrices at different hydration levels as probed by FTIR and high-field EPR. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(21), 9831–9848. <https://doi.org/10.1039/c3cp54043j>
- Manjili, H. K., Sharafi, A., Danafar, H., Hosseini, M., Ramazani, A., & Ghasemi, M. H. (2016). Poly(caprolactone)-poly(ethylene glycol)-poly(caprolactone) (PCL-PEG-PCL) nanoparticles: A valuable and efficient system for in vitro and in vivo delivery of curcumin. *RSC Advances*, 6(17), 14403–14415. <https://doi.org/10.1039/c5ra24942b>
- Márquez, M. J., Romani, D., Díaz, S. B., & Brandán, S. A. (2018). Structural and vibrational characterization of anhydrous and dihydrated species of trehalose based on the FTIR and FTRaman spectra and DFT calculations. *Journal of King Saud University - Science*, 30(2), 229–249. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.01.009>
- Mbela, T. K. M., Poupaert, J. H., & Dumont, P. (1992). Poly(diethylmethyldene malonate) nanoparticles as primaquine delivery system to liver. *International Journal of*

Pharmaceutics, 79(1–3), 29–38. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(92\)90090-O](https://doi.org/10.1016/0378-5173(92)90090-O)

Mei, L., Zhang, Y., Zheng, Y., Tian, G., Song, C., Yang, D., ... Huang, L. (2009). A novel docetaxel-loaded poly (ϵ -caprolactone)/Pluronic F68 nanoparticle overcoming multidrug resistance for breast cancer treatment. *Nanoscale Research Letters*, 4(12), 1530–1539. <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9431-6>

Moghimi, S. M., & Hunter, A. C. (2000). Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends in Biotechnology*, 18(10), 412–420. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01485-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01485-2)

Moinard-Chécot, D., Chevalier, Y., Briançon, S., Beney, L., & Fessi, H. (2008). Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. *Journal of Colloid and Interface Science*, 317(2), 458–468. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2007.09.081>

Mondal, D., Griffith, M., & Venkatraman, S. S. (2016, March 23). Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/00914037.2015.1103241>

Moni, M., A., M., Rana, R., K., H., Islam, I., B., M., ... J., J. (2018). Early Detection of Neurological Dysfunction Using Blood Cell Transcript Profiles. *BioRxiv Bioinformatics*, 1–8. <https://doi.org/10.1101/483016>

Nasir, A., Kausar, A., & Younus, A. (2015). A Review on Preparation, Properties and Applications of Polymeric Nanoparticle-Based Materials. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 54(4), 325–341. <https://doi.org/10.1080/03602559.2014.958780>

Némati, F., Dubernet, C., Fessi, H., De Verdière, A. C., Poupon, M. F., Puisieux, F., & Couvreur, P. (1996). Reversion of multidrug resistance using nanoparticles in vitro: Influence of the nature of the polymer. *International Journal of Pharmaceutics*, 138(2), 237–246. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(96\)04559-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(96)04559-0)

Newman, S. A., Pan, Y., Short, J. L., & Nicolazzo, J. A. (2017). Assessing the Impact of Lithium Chloride on the Expression of P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(9), 2625–2631. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2017.01.013>

Organización Mundial de la Salud (OMS). ¿Qué son los trastornos neurológicos?

2016. <https://www.who.int/features/qa/55/es/> (accesado Febrero 14, 2019).

Owens, D. E., & Peppas, N. A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 307(1), 93–102. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2005.10.010>

Pang, Z., Lu, W., Gao, H., Hu, K., Chen, J., Zhang, C., ... Zhu, C. (2008). Preparation and brain delivery property of biodegradable polymersomes conjugated with OX26. *Journal of Controlled Release*, 128(2), 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.03.007>

Parkinson, J. (2002). An Essay on the Shaking Palsy. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 14(2), 223–236. <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>

Perez, C., Sanchez, A., Putnam, D., Ting, D., Langer, R., & Alonso, M. J. (2001). Poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *Journal of Controlled Release*, 75(1–2), 211–224. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00397-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00397-2)

Petit, T., & Puskar, L. (2018). FTIR spectroscopy of nanodiamonds: Methods and interpretation. *Diamond and Related Materials*, 89, 52–66. <https://doi.org/10.1016/J.DIAMOND.2018.08.005>

Petri B, Bootz A, Khalansky A, Hekmatara T, Müller R, Uhl R, Kreuter J, G. S. (2007). Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. *Journal of Controlled Release*, 117(1), 51–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.10.015>

Petros, R. A., & Desimone, J. M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews*, (July). <https://doi.org/10.1038/nrd2591>

Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>

Pitto-Barry, A., & Barry, N. P. E. (2014). Pluronic® block-copolymers in medicine: From chemical

and biological versatility to rationalisation and clinical advances. *Polymer Chemistry*, 5(10), 3291–3297. <https://doi.org/10.1039/c4py00039k>

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., ... Lang, A. E. (2017). Nature Reviews Disease Primers. *Nature Reviews Disease Primers*, 3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.101>

Prabha, S., Zhou, W. Z., Panyam, J., & Labhasetwar, V. (2002). Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: Studies with fractionated nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 244(1–2), 105–115. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00315-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00315-0)

Priyadarsini, K. I., Maity, D. K., Naik, G. H., Kumar, M. S., Unnikrishnan, M. K., Satav, J. G., & Mohan, H. (2003). Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radical Biology and Medicine*, 35(5), 475–484. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00325-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00325-3)

Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Doelker, E., & Fessi, H. (1997). A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique. *Colloid & Polymer Science*, 275(7), 640–647. <https://doi.org/10.1007/s003960050130>

Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allémann, E., & Doelker, E. (1996). Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 143(2), 133–141. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(96\)04697-2](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04697-2)

Radwan, M. A., & Aboul-Enein, H. Y. (2002). The effect of oral absorption enhancers on the in vivo performance of insulin-loaded poly(ethylcyanoacrylate) nanospheres in diabetic rats. *Journal of Microencapsulation*, 19(2), 225–235. <https://doi.org/10.1080/02652040110081406>

Raimi-abraham, B. T., Mo, J. G., Belton, P. S., Barker, S. A., & Craig, D. Q. M. (2014). Generation and Characterization of Standardized Forms of Trehalose Dihydrate and Their Associated Solid-State Behavior. <https://doi.org/10.1021/cg5004885>

Rao, J. P., & Geckeler, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-

control parameters. *Progress in Polymer Science*, 36(7), 887–913. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2011.01.001>

Reddy, A. C. P., & Lokesh, B. R. (1994). Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 137(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/BF00926033>

Rodrigues Tavares, M., Rodrigues de Menezes, L., Dutra Filho, J. C., Mendes Cabral, L., & Bruno Tavares, M. I. (2017). Surface-coated polycaprolactone nanoparticles with pharmaceutical application: Structural and molecular mobility evaluation by TD-NMR. *Polymer Testing*, 60, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.01.032>

Rodríguez-Violante, M., Velásquez-Pérez, L., & Cervantes-Arriaga, A. (2019). Incidence rates of Parkinson's disease in Mexico: Analysis of 2014-2017 statistics. *Rev Mex Neuroci*, 20(3), 136–140. <https://doi.org/10.24875/RMN.M19000043>

Rolland, A., Gibassier, D., Sado, P., & Le verge, R. (1986). Purification Et Proprietes Physicochimiques Des Ssuspension De Nanoparticules De Polymers Acryliques. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 41(2), 94–105.

Romano, M. F., Nissen, M. D., Del, N. M., Paredes, H., & Carlos, A. (2007). Enfermedad del Alzheimer. *Posgradode LaVla Cátedra de Medicina*, 175, 9–12. Retrieved from <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article>

Roney, C., Kulkarni, P., Arora, V., Antich, P., Bonte, F., Wu, A., ... Aminabhavi, T. M. (2005). Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood–brain barrier for Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*, 108(2–3), 193–214. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.07.024>

Rubin, L. L., & Staddon, J. M. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annual Review of Neuroscience*, 22(1), 11–28. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.11>

Saini, R., Saini, S., & Sharma, S. (2010). Nanotechnology: The future medicine. *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery*, 3(1), 32. <https://doi.org/10.4103/0974-2077.63301>

Samarghandian, S., Azimi-Nezhad, M., Farkhondeh, T., & Samini, F. (2017). Anti-oxidative effects of curcumin on immobilization-induced oxidative stress in rat brain, liver and kidney.

- Sánchez, A., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1993). Development of biodegradable microspheres and nanospheres for the controlled release of cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics*, 99(2–3), 263–273. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90369-Q](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90369-Q)
- Sapsford, K. E., Tyner, K. M., Dair, B. J., Deschamps, J. R., & Medintz, I. L. (2011). Analyzing Nanomaterial Bioconjugates: A Review of Current and Emerging Purification and Characterization Techniques. *Analytical Chemistry*, 83(12), 4453–4488. <https://doi.org/10.1021/ac200853a>
- Satu, S., S., M., Howlader, H., C., K., Akhund, A., U., T. M. N., ... A., M. (2018). Bioinformatics Approach to Identify Diseasome and Comorbidities Effect of Mitochondrial Dysfunctions on the Progression of Neurological Disorders. *BioRxiv Bioinformatics*, 1–10. <https://doi.org/10.1101/483065>
- Seijo, B., Fattal, E., Roblot-Treupel, L., & Couvreur, P. (1990). Design of nanoparticles of less than 50 nm diameter: preparation, characterization and drug loading. *International Journal of Pharmaceutics*, 62(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90024-X](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90024-X)
- Sharma, R. A., Gescher, A. J., & Steward, W. P. (2005). Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer*, 41(13), 1955–1968. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.05.009>
- Shen, L., Jiang, H.-H., & Ji, H.-F. (2018). Is boiled food spice curcumin still biologically active? An experimental exploration. *Food & Nutrition Research*, 62(0). <https://doi.org/10.29219/fnr.v62.1397>
- Shubhra, Q. T. H., Tóth, J., Gyenis, J., & Feczko, T. (2014). Poloxamers for Surface Modification of Hydrophobic Drug Carriers and Their Effects on Drug Delivery. *Polymer Reviews*, 54(1), 112–138. <https://doi.org/10.1080/15583724.2013.862544>
- Silva-Buzanello, R. A. da, Ferreira De Souza, M., Alves De Oliveira, D., Bona, E., Leimann, F. V., Filho, L. C., ... Hess Gonçalves, O. (2016). Preparation of curcumin-loaded nanoparticles and determination of the antioxidant potential of curcumin after encapsulation.

Polímeros, 26(3), 207–214. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2246>

- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70(1–2), 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00339-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4)
- Sreejayan, & Rao, M. N. A. (1997). Nitric Oxide Scavenging by Curcuminoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49(1), 105–107. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06761.x>
- Stoica, L., Stoica, B. A., Olinici, D., Onofrei, P., Botez, E. A., & Cotrutz, C. E. (2018). Correlations between morphological changes induced by curcumin and its biological activities. *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine de Morphologie et Embryologie*, 59(1), 65–69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29940613>
- Tavares, M. R., de Menezes, L. R., do Nascimento, D. F., Souza, D. H. S., Reynaud, F., Marques, M. F. V., & Tavares, M. I. B. (2016). Polymeric nanoparticles assembled with microfluidics for drug delivery across the blood-brain barrier. *The European Physical Journal Special Topics*, 225(4), 779–795. <https://doi.org/10.1140/epjst/e2015-50266-2>
- Thiyagarajan, M., & Sharma, S. S. (2004). Neuroprotective effect of curcumin in middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats. *Life Sciences*, 74(8), 969–985. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2003.06.042>
- Tobío, M., Gref, R., Sánchez, A., Langer, R., & Alonso, M. J. (1998). Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharmaceutical Research*, 15(2), 270–275. <https://doi.org/10.1023/A:1011922819926>
- Ueda, M., Iwara, A., & Kreuter, J. (1998). Influence of the preparation methods on the drug release behaviour of loperamide-loaded nanoparticles. *Journal of Microencapsulation*, 15(3), 361–372. <https://doi.org/10.3109/02652049809006863>
- Ueda, M., & Kreuter, J. (1997). Optimization of the preparation of loperamide-loaded poly (L-lactide) nanoparticles by high pressure emulsification-solvent evaporation. *Journal of Microencapsulation*, 14(5), 593–605. <https://doi.org/10.3109/02652049709006812>
- Unnikrishnan, M. K., & Rao, M. N. A. (1995). Curcumin inhibits nitrogen dioxide induced

- oxidation of hemoglobin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 146(1), 35–37. <https://doi.org/10.1007/BF00926878>
- Veronese, F. M., Marsilio, F., Caliceti, P., De Filippis, P., Giunchedi, P., & Lora, S. (1998). Polyorganophosphazene microspheres for drug release: Polymer synthesis, microsphere preparation, in vitro and in vivo naproxen release. *Journal of Controlled Release*, 52(3), 227–237. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00098-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00098-9)
- Wang, J. C., Bindokas, V. P., Skinner, M., Emrick, T., & Marks, J. D. (2017). Mitochondrial mechanisms of neuronal rescue by F-68, a hydrophilic Pluronic block co-polymer, following acute substrate deprivation. *Neurochemistry International*, 109, 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.04.007>
- Wang, T., Markham, A., Thomas, S. J., Wang, N., Huang, L., Clemens, M., & Rajagopalan, N. (2019). Solution Stability of Poloxamer 188 Under Stress Conditions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 108(3), 1264–1271. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.10.057>
- Watnasirichaikul, S., Davies, N. M., Rades, T., & Tucker, I. G. (2000). Preparation of biodegradable insulin nanocapsules from biocompatible microemulsions. *Pharmaceutical Research*, 17(6), 684–689. <https://doi.org/10.1023/A:1007574030674>
- Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer — Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, 35, 1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>
- Xiong, W., Peng, L., Chen, H., & Li, Q. (2015). Surface modification of MPEG-b-PCL-based nanoparticles via oxidative self-polymerization of dopamine for malignant melanoma therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 2985–2996. <https://doi.org/10.2147/IJN.S79605>
- Yallapu, M. M., Gupta, B. K., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2010). Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *Journal of Colloid and Interface Science*, 351(1), 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.05.022>
- Yallapu, M. M., Jaggi, M., & Chauhan, S. C. (2010). β -Cyclodextrin-curcumin self-assembly

enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(1), 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.039>

Yallapu, M. M., Khan, S., Maher, D. M., Ebeling, M. C., Sundram, V., Chauhan, N., ... Chauhan, S. C. (2014). Anti-cancer activity of curcumin loaded nanoparticles in prostate cancer. *Biomaterials*, 35(30), 8635–8648. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.040>

Yoo, H. S., Oh, J. E., Lee, K. H., & Park, T. G. (1999). Biodegradable nanoparticles containing doxorubicin-PLGA conjugate for sustained release. *Pharmaceutical Research*, 16(7), 1114–1118. <https://doi.org/10.1023/A:1018908421434>

Yu, L. (2001). Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 48(1), 27–42. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00098-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00098-9)

Zarrintaj, P., Ahmadi, Z., Reza Saeb, M., & Mozafari, M. (2018). Poloxamer-based stimuli-responsive biomaterials. In *Materials Today: Proceedings* (Vol. 5, pp. 15516–15523). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.04.158>

13. Anexos

13.1 Validación del método analítico para cuantificación de Curcumina

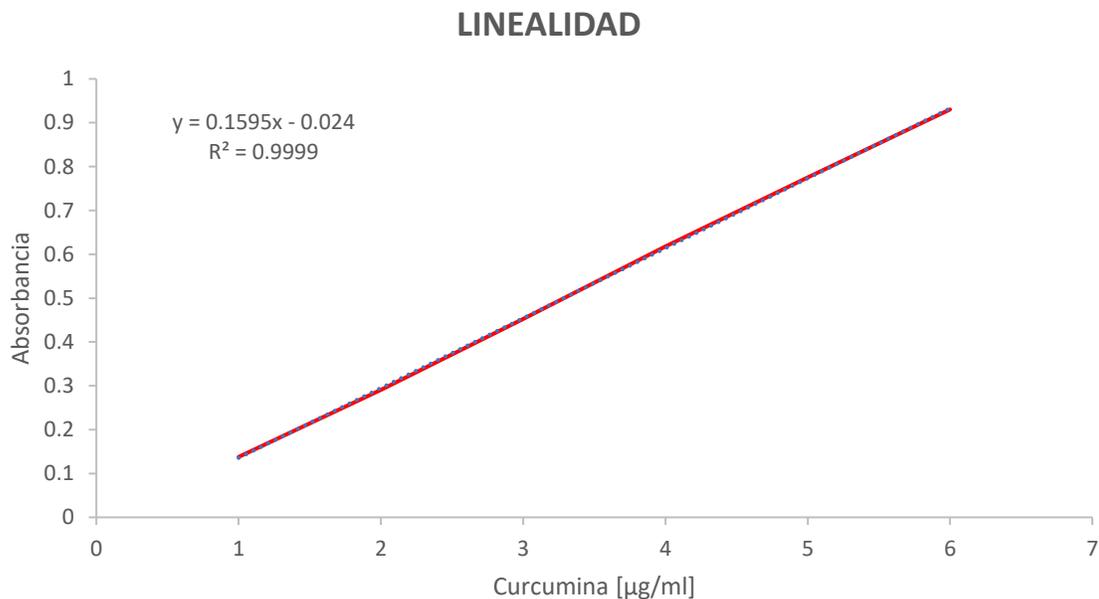


Figura 27. Ajuste de los datos obtenidos en el método analítico de cuantificación de Curcumina.

Tabla 9. Datos de absorbancia obtenidos para la concentración de 1 µg/ml, medidos a una longitud de onda $\lambda = 420$ nm.

Concentración (µg/ml)	Abs	Fx/x
1	0.277	0.1385
1	0.278	0.139
1	0.274	0.137
1	0.293	0.1465
1	0.299	0.1495
1	0.293	0.1465
1	0.301	0.1505
1	0.299	0.1495
1	0.301	0.1505
Promedio	0.29055556	
Desv. Est.	0.01111431	

Tabla 10. Datos de absorbancia obtenidos para la concentración de 3 µg/ml, medidos a una longitud de onda $\lambda = 420$ nm.

Concentración (µg/ml)	Abs	Fx/x
3	0.477	0.159
3	0.475	0.15833333
3	0.474	0.158
3	0.452	0.15066667
3	0.447	0.149
3	0.446	0.14866667
3	0.436	0.14533333
3	0.434	0.14466667
3	0.434	0.14466667
Promedio	0.45277778	
Desv. Est.	0.01801928	

C.V. (%)	3.82519105
----------	------------

C.V. (%)	3.97971824
----------	------------

Tabla 11. Datos de absorbancia obtenidos para la concentración de 4 µg/ml, medidos a una longitud de onda $\lambda = 420$ nm.

Concentración (µg/ml)	Abs	Fx/x
4	0.601	0.15025
4	0.603	0.15075
4	0.601	0.15025
4	0.624	0.156
4	0.625	0.15625
4	0.624	0.156
4	0.631	0.15775
4	0.629	0.15725
4	0.625	0.15625
Promedio	0.61811111	
Desv. Est.	0.01256428	
C.V. (%)	2.03268942	

Tabla 12. Datos de absorbancia obtenidos para la concentración de 5 µg/ml, medidos a una longitud de onda $\lambda = 420$ nm.

Concentración (µg/ml)	Abs	Fx/x
5	0.759	0.1518
5	0.758	0.1516
5	0.756	0.1512
5	0.797	0.1594
5	0.797	0.1594
5	0.794	0.1588
5	0.772	0.1544
5	0.772	0.1544
5	0.771	0.1542
Promedio	0.77511111	
Promedio	0.01684076	
Desv. Est.	2.17268946	

Tabla 13. Datos de absorbancia obtenidos para la concentración de 6 µg/ml, medidos a una longitud de onda $\lambda = 420$ nm.

Concentración (µg/ml)	Abs	Fx/x
6	0.92	0.15333333
6	0.918	0.153
6	0.914	0.15233333
6	0.987	0.1645
6	0.985	0.16416667
6	0.986	0.16433333
6	0.863	0.14383333
6	0.903	0.1505

6	0.896	0.14933333
Promedio	0.93022222	
Desv. Est.	0.0451159	
C.V. (%)	4.85001315	

Tabla 14. Parámetros de validación para la cuantificación de curcumina.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
Linealidad	$R^2 \geq 0.98$	0.9999
Límite de detección	-	0.1 µg/ml
Límite de cuantificación	-	0.6 µg/ml

Tabla 15. Evaluación de precisión y exactitud como método de control de calidad interno.

Precisión y Exactitud				
	Concentración nominal	Concentración promedio	Exactitud (%)	Precisión (%CV)
Control de calidad alto	0.7 µg/ml	0.81	116.7	3.4
Control de calidad medio	1.5 µg/ml	1.614	107.6	1.38
Control de calidad bajo	5.5 µg/ml	5.607	101.9	0.992

13.2 Ajuste de los datos obtenidos en el perfil de liberación *in vitro* de Curcumina

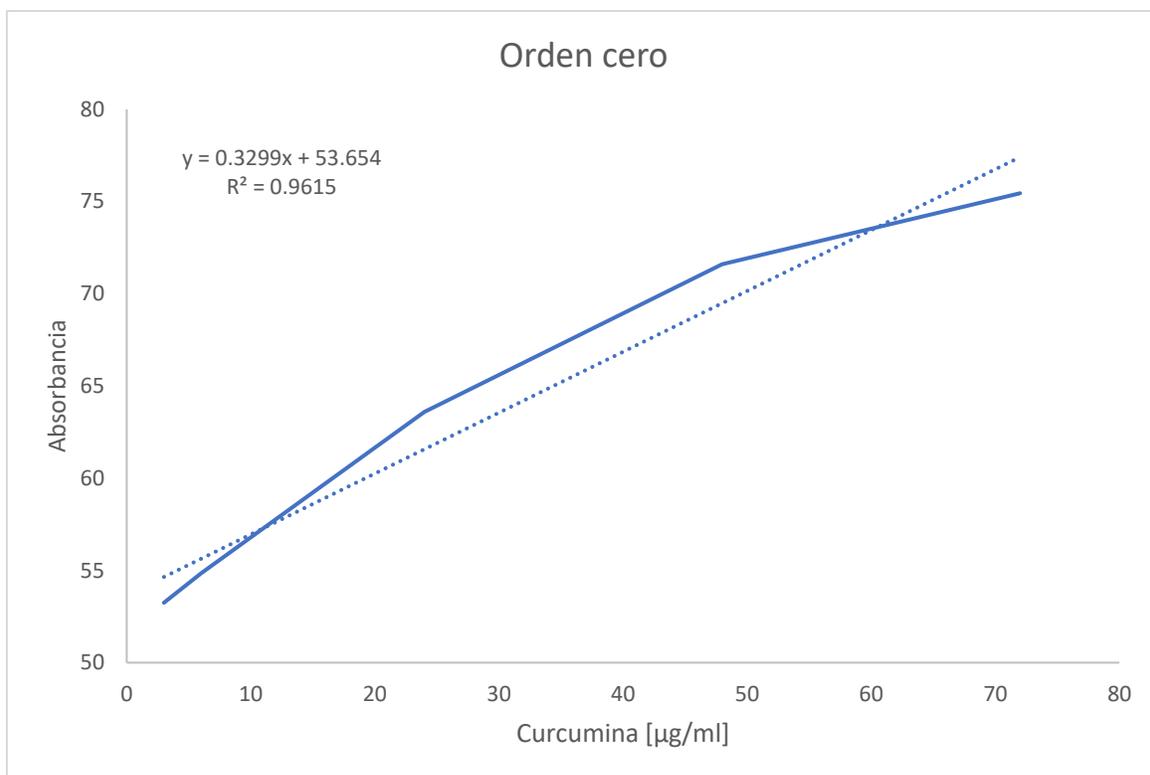


Figura 28. Ajuste de los datos obtenidos en el perfil de liberación *in vitro* de Curcumina ajustados al modelo de Orden Cero

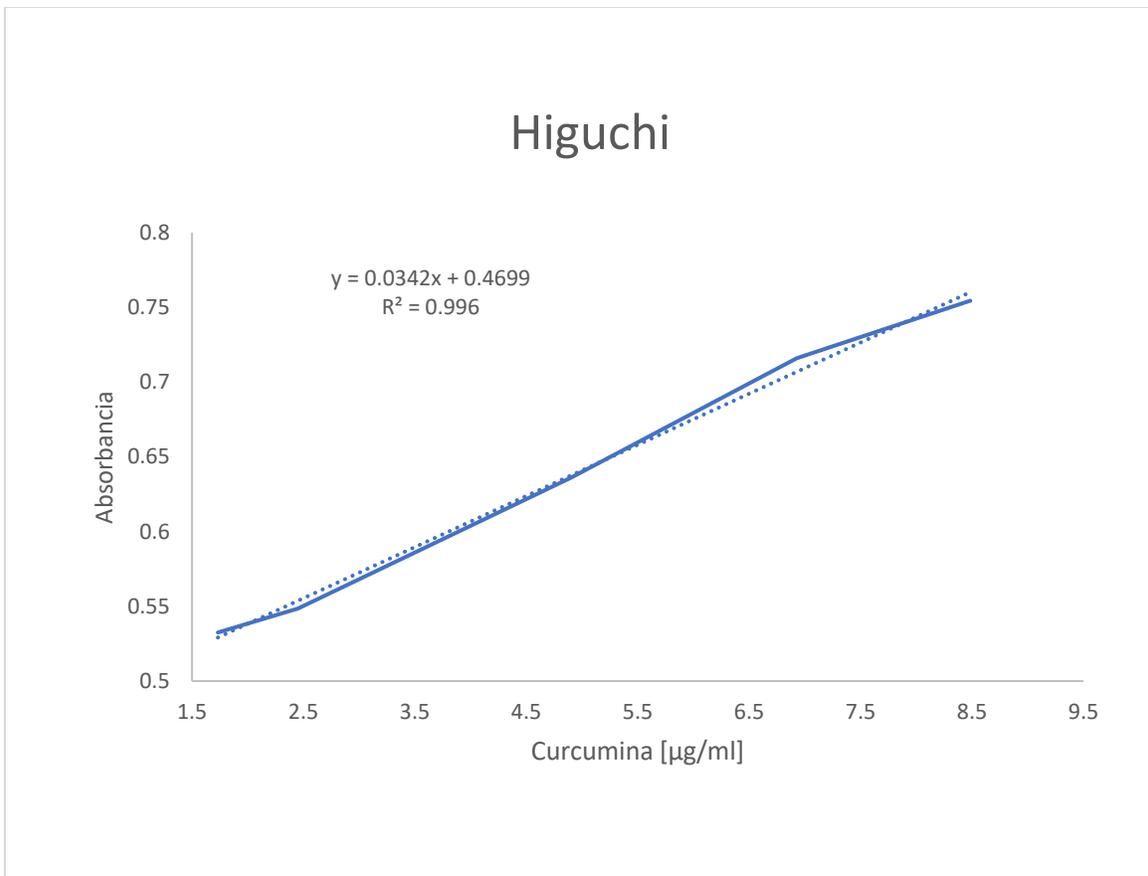


Figura 29. Ajuste de los datos obtenidos en el perfil de liberación *in vitro* de Curcumina ajustados al modelo de Higuchi

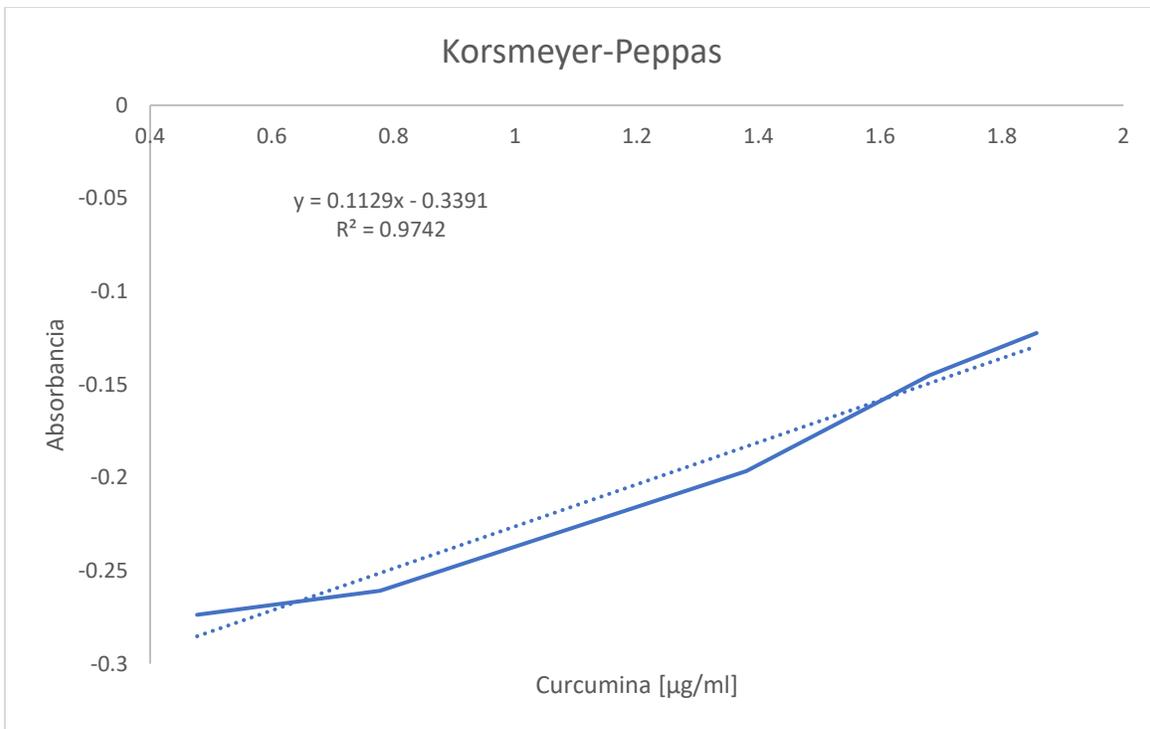


Figura 30. Ajuste de los datos obtenidos en el perfil de liberación *in vitro* de Curcumina ajustados al modelo de Korsmeyer-Peppas