



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD
INDUCIDA POR NANOPARTÍCULAS DE
DIÓXIDO DE SILICIO (SiO_2) Y
POLIETILCIANOACRILATO (PECA) *IN VITRO*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

DÍAZ PADILLA JOSÉ DANIEL

ASESOR: DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA.
COASESOR: DR. ROBERTO DÍAZ TORRES.

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS.



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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

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

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: TESIS

Evaluación de la Citotoxicidad inducida por Nanopartículas de Dióxido de Silicio (SiO₂) y Polietilenoacrilato (PECA) in vitro

Que presenta el pasante: José Daniel Díaz Padilla

Con número de cuenta: 304150584 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 12 de marzo de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DAR. Juan José Díaz Esquivel	
VOCAL	Dra. Raquel López Arellano	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er SUPLENTE	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	
2do SUPLENTE	QFB. Adriana Gil García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México que a lo largo de mi vida ha sido como mi segundo hogar al haberme recibido en la Escuela Nacional Preparatoria Plantel 8 “Miguel E. Schulz”.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán donde no solo me forjé profesionalmente, sino también como una mejor persona.

A mis asesores la Dra. Patricia Ramírez Noguera y el Dr. Roberto Díaz Torres, a quienes les tengo gran admiración y respeto. Les agradezco infinitamente la oportunidad que me dieron de trabajar con ustedes, el apoyo y la paciencia que me tuvieron a lo largo de este proyecto.

A la Unidad de Investigación Multidisciplinaria Laboratorio 9 “Toxicología y Genética” FES-C Campo 4 donde se realizó este proyecto.

A la Dra. Elizabeth García por el apoyo para determinar las pruebas de Tamaño de Partícula y Potencial Z en el laboratorio de Psicofarma S. A. de C. V.

Al técnico Rodolfo Robles, por haber tomado las micrográficas en Microscopía Electrónica de Barrido en la FES-C Campo 1.

Al MVZ. Cesar Cuenca por el apoyo para utilizar el lector de microplacas en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria Laboratorio 1 FES-C Campo 4.

A los proyectos PAPIME PE202410, PAPIIT IN220612 y PACIVE CONS-09 a cargo de la Dra. Patricia Ramírez Noguera.

DEDICATORIAS.

No hay palabras que puedan describir mi profundo agradecimiento hacia todas las personas que, poco o mucho, me ayudaron a alcanzar este gran logro.

A mis padres Angélica y José quienes durante todos estos años confiaron en mí y nunca podré pagar todos sus desvelos ni todos los sacrificios que han hecho para que yo me convierta en un persona de provecho. Porque gracias a su apoyo y consejos, he llegado a realizar la más grande de mis metas, deseo de todo corazón que mi triunfo profesional lo sienta como suyo. LOS AMO.

A mis hermanas Claudia y Brenda, quienes han estado conmigo siempre y agradezco a la vida por haberlas puesto a mi lado ya que sin ellas no sería la persona que soy, LAS AMO. Este logro también es de ustedes por su incondicional apoyo y cariño que me demuestran día con día.

A todos mis amigos, compañeros y profesores que a lo largo de este camino me han enseñado muchísimas cosas y con los que he pasado momentos que recordare por siempre. GRACIAS.

Estar preparados es importante, saber esperar lo es aún más, pero... aprovechar el momento adecuado es la clave de la vida.

Arthur Schnitzler.

Í N D I C E

Índice de Figuras.....	7
Índice de Tablas.....	9
Índice de Gráficos.....	10
Abreviaturas.....	12
1. Introducción.....	13
2. Definición de nanopartículas.....	13
3. Historia de las nanopartículas.....	16
4. Métodos de preparación de nanopartículas.....	18
4.1. Dispersión de polímeros preformados.....	19
4.1.1. Método de evaporación del disolvente.....	19
4.1.2. Difusión de disolvente o emulsificación espontánea.....	20
4.1.3. Método de doble o múltiple emulsión.....	21
4.2. Método de polimerización.....	21
4.2.1. Polimerización - Emulsificación.....	21
4.2.1.1. Fase continua acuosa.....	22
4.2.1.2. Fase continua orgánica.....	24
4.2.2. Salting-out.....	24
4.3. Gelificación iónica o coacervación de polímeros.....	25
4.4. Método de nanoprecipitación.....	25
5. Caracterización de nanopartículas.....	26
5.1. Tamaño de partícula.....	27
5.1.1. Dispersión de la luz dinámica o Espectroscopia de correlación de fotones....	27
5.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	28
5.3. Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	29
5.4. Potencial Zeta.....	30
6. Nanopartículas de Polietilcianoacrilato (PECA).....	31
7. Nanopartículas de Dióxido de Silicio (SiO ₂).....	32
8. Purificación de nanopartículas.....	33
8.1. Esterilización.....	33
9. Nanotoxicología.....	34

9.1. Biomarcadores.....	35
9.1.1. Biomarcadores de exposición.....	35
9.1.2. Biomarcadores de efecto.....	35
9.1.3. Biomarcadores de susceptibilidad.....	35
9.2. Factores que influyen en la toxicidad de las nanopartículas.....	37
10. Estrés oxidativo.....	37
10.1. Radicales libres.....	39
10.2. Mecanismo de defensa antioxidante.....	40
11. Citotoxicidad.....	41
11.1. Ensayo de la reducción del MTT.....	43
11.2. Ensayo de cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	44
11.3. Ensayo de cuantificación de Glutación reducido (GSH).....	44
11.4. Ensayo de cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.....	45
12. Cultivos celulares.....	46
12.1. Tipos de cultivos celulares.....	46
12.1.1. Cultivo de órganos.....	46
12.1.2. Explantes primarios.....	46
12.1.3. Cultivo celular.....	46
12.2. Tipos de células empleadas en nanotoxicología.....	47
12.3. Mantenimiento de cultivos celulares.....	47
12.4. Manipulación de células en cultivo.....	48
12.4.1. Cambios de medio de cultivo.....	48
12.4.2. Pase de las células.....	48
12.4.3. Almacenamiento de células.....	49
13. Objetivos.....	50
13.1. Objetivo General.....	50
13.2. Objetivos Específicos.....	50
14. Planteamiento del problema.....	51
15. Materiales y Métodos.....	52
15.1. Materiales.....	52

15.1.1. Preparación de nanopartículas.....	52
15.1.2. Cultivos celulares.....	52
15.1.3. Ensayo de la reducción del MTT.....	52
15.1.4. Ensayo de cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	52
15.1.5. Ensayo de cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.....	52
15.1.6. Ensayo de cuantificación de Glutación reducido (GSH).....	53
15.1.7. Soluciones.....	53
15.1.8. Equipo.....	53
15.1.9. Modelos experimentales.....	54
15.2. Métodos.....	54
15.2.1. Preparación de nanopartículas.....	54
15.2.1.1. Preparación de solución control.....	54
15.2.1.2. Preparación de sistema de nanopartículas de SiO ₂	54
15.2.1.3. Preparación de sistema de nanopartículas de PECA.....	55
15.2.1.4. Preparación de sistema de nanopartículas de SiO ₂ /PECA.....	53
15.2.1.5. Preparación de sistema 1 nanopartículas de PECA/SiO ₂	53
15.2.1.6. Preparación de sistema 2 de nanopartículas de PECA/SiO ₂	56
15.2.2. Preparación de muestras para caracterización de nanopartículas.....	56
15.2.3. Acondicionamiento de las nanopartículas para los cultivos celulares.....	56
15.2.4. Cálculo del peso de las nanopartículas de cada sistema.....	57
15.2.5. Mantenimiento de los cultivos celulares.....	57
15.2.6. Ensayo de viabilidad celular reducción del MTT.....	58
15.2.7. Ensayo de cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	58
15.2.8. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.....	59
15.2.9. Ensayo de cuantificación de Glutación reducido (GSH).....	60
16. Análisis Estadístico.....	61
17. Resultados y Análisis.....	62
17.1. Caracterización.....	62
17.1.1. Tamaño de Partícula y Potencial Z.....	62
17.1.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	62

17.1.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	64
17.1.4. Cantidad de nanopartículas de cada sistema.....	66
17.2. Citotoxicidad.....	67
17.2.1. Viabilidad Celular (MTT).....	67
17.2.2. Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	72
17.2.3. Glutación Reducido (GSH).....	77
18. Conclusiones.....	82
19. Perspectivas.....	83
20. Anexo. Gráficos obtenidos de la Caracterización del Tamaño de Partícula y Potencial Z.....	84
21. Referencias Bibliográficas.....	89

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Escala que relaciona el tamaño de diferentes estructuras con respecto a las nanopartículas.....	14
Figura 2. Representación de nanocápsulas y nanoesferas.....	15
Figura 3. Esquema de preparación de nanopartículas.....	17
Figura 4. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de emulsificación/evaporación.....	20
Figura 5. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de polimerización en fase acuosa.....	22
Figura 6. Representación esquemática de los posibles mecanismos de polimerización del monómero alquilcianoacrilato.....	23
Figura 7. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de polimerización en fase orgánica.....	24
Figura 8. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de Salting-out.....	25
Figura 9. Representación del método de dispersión de la luz dinámica.....	28
Figura 10. Diagrama de Microscopio Electrónico de Transmisión y Barrido.....	30
Figura 11. Gráfico que relaciona los valores del potencial Z a diferentes pH.....	31
Figura 12. Efecto de los radicales libres sobre la membrana celular.....	38
Figura 13. Generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	39
Figura 14. Reducción metabólica del MTT a sales de formazan por la enzima succinato deshidrogenasa.....	43
Figura 15. Reacción de condensación entre TBA y MDA.....	44
Figura 16. Metabolismo del Glutati6n en la c6lula.....	45

Figura 17. Proceso para el desarrollo <i>in vitro</i> de cultivos celulares.....	47
Figura 18. Sistema de esterilización por filtración.....	57
Figura 19. Micrografía de las nanopartículas del Sistema SiO ₂ obtenida por TEM.....	63
Figura 20. Micrografía de las nanopartículas del Sistema PECA obtenida por TEM.....	63
Figura 21. Micrografía de las nanopartículas del Sistema SiO ₂ /PECA obtenida por TEM.....	64
Figura 22. Micrografía de las nanopartículas del Sistema PECA/SiO ₂ obtenida por TEM.....	64
Figura 23. Micrografía de las nanopartículas del Sistema SiO ₂ obtenida por SEM.....	65
Figura 24. Micrografía de las nanopartículas del Sistema PECA obtenida por SEM.....	65
Figura 25. Micrografía de las nanopartículas del Sistema SiO ₂ /PECA obtenida por SEM.....	66
Figura 26. Micrografía de las nanopartículas del Sistema PECA/SiO ₂ obtenida por SEM.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos de caracterización de nanopartículas.....	26
Tabla 2. Estabilidad en base al Potencial Z.....	31
Tabla 3 Principales métodos para la purificación de Nanopartículas.....	34
Tabla 4. Principales factores que pueden determinar los efectos toxicológicos de las nanopartículas en el organismo.....	37
Tabla 5. Líneas de defensa del organismo.....	40
Tabla 6. Ensayos para evaluar la nanotoxicidad <i>in vitro</i>	42
Tabla 7. Elaboración de solución control y sistemas nanoparticulados.....	54
Tabla 8. Curva de calibración de MDA.....	59
Tabla 9. Curva de calibración de BSA.....	60
Tabla 10. Curva de calibración de GSH.....	61
Tabla 11. Resultados de nanocaracterización.....	62
Tabla 12. Cantidad de nanopartículas de cada sistema elaborado.....	67

Gráfico 12. Efecto Dosis-Respuesta del sistema 2 de nanopartículas de PECA/SiO ₂ para la inducción de TBARS en células VERO.....	74
Gráfico 13. Comparación de la cantidad de TBARS entre los diferentes sistemas y controles a dosis baja en células VERO.....	76
Gráfico 14. Comparación de la cantidad de TBARS entre los diferentes sistemas y controles a dosis alta en células VERO.....	76
Gráfico 15. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de SiO ₂ para GSH en células VERO.....	77
Gráfico 16. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de PECA para GSH en células VERO.....	78
Gráfico 17. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de SiO ₂ /PECA para GSH en células VERO.....	78
Gráfico 18. Efecto Dosis-Respuesta del sistema 1 de nanopartículas de PECA/SiO ₂ para GSH en células VERO.....	79
Gráfico 19. Efecto Dosis-Respuesta del sistema 2 de nanopartículas de PECA/SiO ₂ para GSH en células VERO.....	79
Gráfico 20. Comparación de la cantidad de GSH entre los diferentes sistemas y controles a dosis baja en células VERO.....	80
Gráfico 21. Comparación de la cantidad de GHS entre los diferentes sistemas y controles a dosis alta en células VERO.....	81

ABREVIATURAS

NP	Nanopartículas.
PECA	Polietilcianoacrilato.
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido.
TEM	Microscopia Electrónica de Transmisión.
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-íol)-2,5-difeniltetrazol.
TBARS	Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico.
GSH	Glutación Reducido.
SNC	Sistema Nervioso Central.
CMC	Concentración Micelar Crítica.
DLS	Dispersión de la Luz Dinámica.
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno.
TBA	Ácido Tiobarbitúrico.
OPT	Ortoftaldehído.
BSA	Albúmina de suero bovino.
DMSO	Dimetil Sulfóxido.
MDA	Malonaldehído.

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de SiO ₂ para porcentaje de viabilidad en células VERO.....	68
Gráfico 2. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de PECA para porcentaje de viabilidad en células VERO.....	68
Gráfico 3. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de SiO ₂ /PECA para porcentaje de viabilidad en células VERO.....	69
Gráfico 4. Efecto Dosis-Respuesta del sistema 1 de nanopartículas de PECA/SiO ₂ para porcentaje de viabilidad en células VERO.....	69
Gráfico 5. Efecto Dosis-Respuesta del sistema 2 de nanopartículas de PECA/SiO ₂ para porcentaje de viabilidad en células VERO.....	70
Gráfico 6. Comparación de porcentaje de viabilidad celular entre los diferentes sistemas y controles a dosis baja en células VERO	71
Gráfico 7. Comparación de porcentaje de viabilidad celular entre los diferentes sistemas y controles a dosis alta en células VERO	71
Gráfico 8. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de SiO ₂ para la inducción de TBARS en células VERO.....	72
Gráfico 9. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de PECA para la inducción de TBARS en células VERO.....	73
Gráfico 10. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de SiO ₂ /PECA para la inducción de TBARS en células VERO.....	73
Gráfico 11. Efecto Dosis- Respuesta del sistema 1 de nanopartículas de PECA/SiO ₂ para la inducción de TBARS en células VERO.....	74

1. INTRODUCCIÓN.

La nanotecnología es una ciencia multidisciplinaria que está teniendo un gran auge en la actualidad y que consiste en el desarrollo de materiales, dispositivos y sistemas de tamaño nanométrico ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), proporcionando productos con nuevas propiedades fisicoquímicas diferentes a las de las moléculas individuales o sólidos de la misma composición. (Medina, 2007).

En los últimos años, el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos ha cobrado un impulso muy grande. La necesidad de encontrar la manera de llevar los fármacos hasta su sitio de acción en dosis controladas durante el tiempo ha hecho que los farmacéuticos modernos apunten sus esfuerzos hacia ese objetivo. Dentro de los sistemas que se han probado y que han mostrado estas dos bondades están los liposomas, los dendrímeros, los transfersomas y las nanopartículas, dentro de las cuales podemos mencionar las nanopartículas hechas de polímeros biodegradables y no biodegradables, las fabricadas a base de lípidos, las de proteínas y las fabricadas con polisacáridos.

Desde un principio, hubo la preocupación de que estos sistemas pudieran tener efectos tóxicos, por lo que se pasó de materiales no biodegradables a materiales que fueran biodegradables. Ahora la preocupación va más allá y el objetivo es desarrollar sistemas que no tengan efectos tóxicos sobre el metabolismo celular, las membranas celulares o alguna otra estructura celular y los genes.

La controversia que este tema ha causado es enorme, porque hay científicos que piensan que los materiales usados para fabricar los sistemas nanométricos, no están en una cantidad importante como para causar un daño al organismo. Por otra parte hay investigadores que están convencidos de que aún en las cantidades usadas, estos sistemas puedan traer problemas de toxicidad importantes.

Los estudios *in vitro* utilizando líneas celulares son actualmente los más socorridos y pueden dar indicios muy importantes sobre la toxicidad de sistemas mesoscópicos en general. Sin embargo, siempre queda la duda de si en un sistema biológico completo la toxicidad será correlacionable.

2. DEFINICIÓN DE NANOPARTICULAS.

Las nanopartículas (NP) son definidas como dispersiones particuladas o partículas sólidas con un tamaño en el rango de 10-1000 nm generalmente constituidos por polímeros sintéticos o naturales; con propósitos farmacéuticos son definidas como partículas coloidales que se encuentran en un rango de tamaño de 1 hasta 1000 nm ($1 \mu\text{m}$), las cuales consisten de materiales macromoleculares y pueden ser usadas terapéuticamente como acarreadores de fármacos, en

las cuales el activo (fármaco o material biológicamente activo) está disuelto, entrampado, encapsulado, adsorbido o enlazado en la matriz de la nanopartícula. (Kreuter, 2007).

Como sistemas nanométricos que son, permiten que el fármaco que lleva asociado pueda atravesar las diferentes barreras biológicas del organismo lo cual no se podría realizar con los sistemas convencionales de liberación ya que en éstos son fundamentalmente las propiedades fisicoquímicas las que condicionan su absorción y biodistribución. (Vila Jato, 2006).

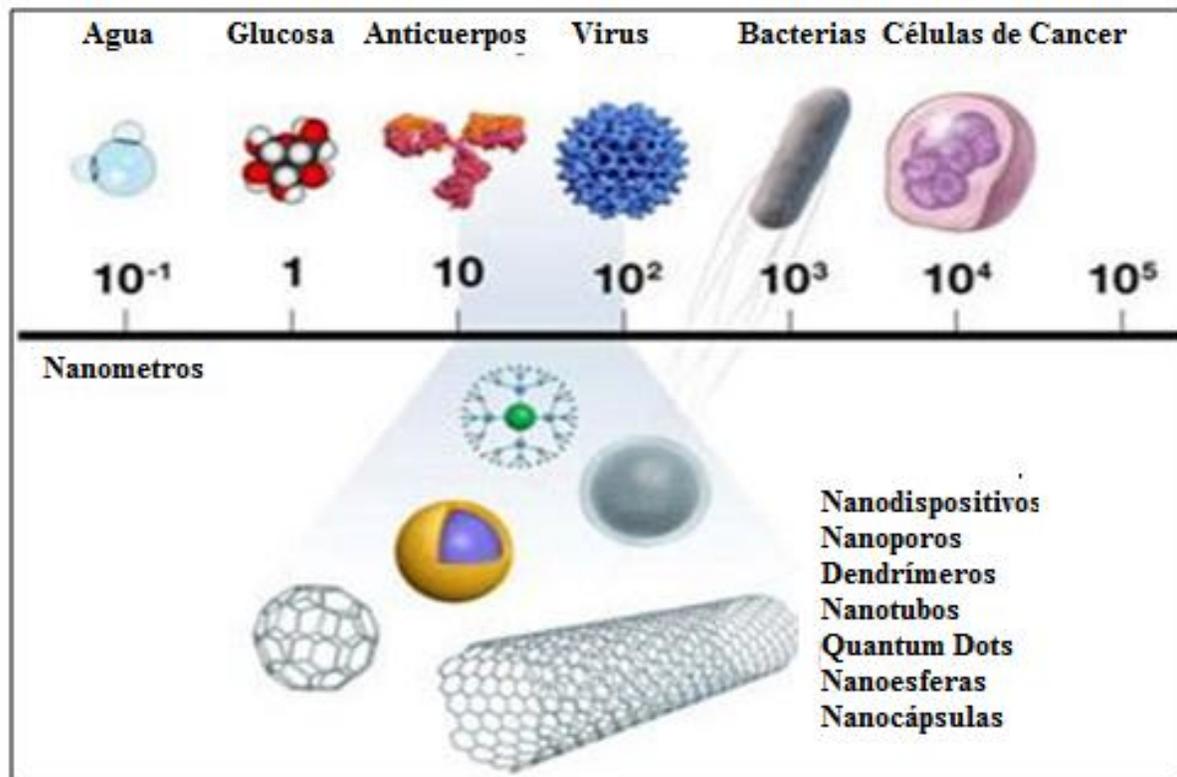


Figura 1. Escala que relaciona el tamaño de diferentes estructuras con respecto a las nanopartículas. (<http://redes-e-servidores.blogspot.com/2011/01/nanotecnologia.html>).

Actualmente existen diversos métodos de preparación de nanopartículas, se pueden agrupar en aquellos en los que se realiza una polimerización a partir de monómeros o bien aquellos que parten del polímero. Elegir el método de preparación depende de las características del material formador del sistema y de las características de solubilidad del principio activo que se desea incorporar. (De la Cruz, 2010).

Dependiendo del método de preparación de nanopartículas se pueden obtener nanocápsulas o nanoesferas. La diferencia entre las nanoesferas y las nanocápsulas radica no sólo en la morfología y la arquitectura, sino también en la disposición del fármaco en el sistema coloidal y comportamiento de liberación. Las nanocápsulas son sistemas en los que el fármaco se limita a una cavidad rodeada por una membrana única de polímero, mientras que las

nanoesferas son sistemas matriciales donde el fármaco se encuentra disperso por todo el cuerpo de la partícula. (Mohanraj, 2006).

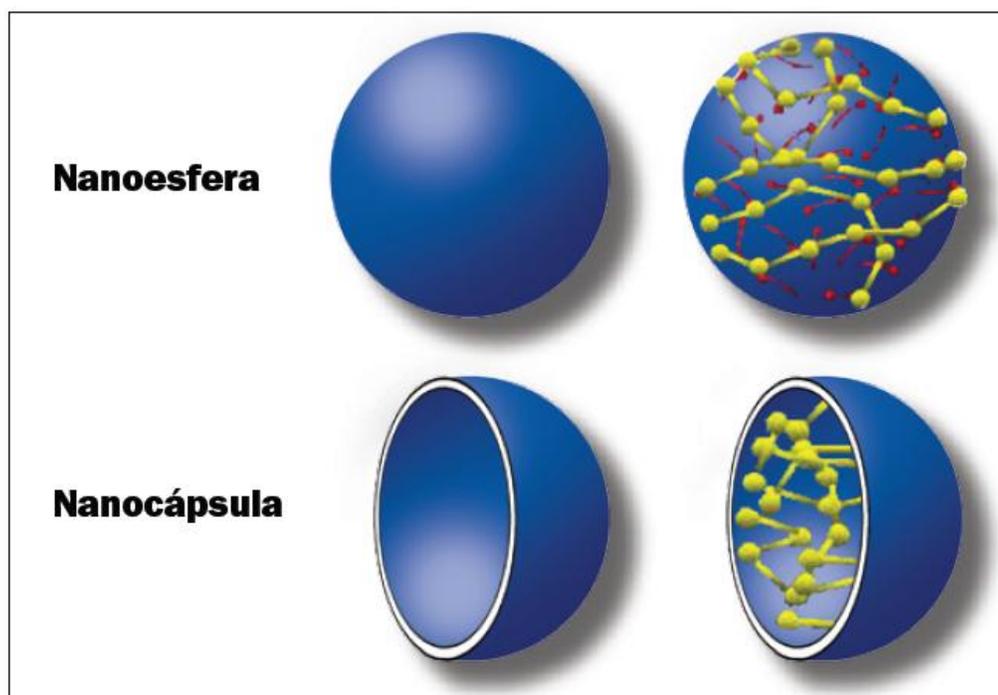


Figura 2. Representación de nanocápsulas y nanoesferas. (Llabot, 2008).

En teoría, la alta calidad de las nanocápsulas logra una velocidad constante de liberación de fármaco (liberación de orden cero), mientras que las nanoesferas presentan típicamente una liberación de fármaco de primer orden. (Fresta, 1996).

Las nanoesferas se preparan mediante un proceso de emulsión/polimerización, en el que gotas de monómero insoluble en agua se emulsionan en fase acuosa. El mecanismo de polimerización es un proceso aniónico iniciado por bases covalentes presentes en el medio de polimerización. La reacción se produce a través de la fase acuosa. El pH del medio determina la velocidad de polimerización y la absorción de fármaco cuando este último es ionizable.

La preparación de nanocápsulas consiste en la solubilización del monómero en una fase alcohólica que contiene un aceite, para luego realizar una dispersión en una fase acuosa que contenga tensoactivo. En contacto con el agua, la fase alcohólica difunde y favorece la formación de una emulsión (o/w) muy fina. El monómero, insoluble en agua, polimeriza en la zona interfacial, formando un muro polimérico. (Arias, 2003).

Las nanopartículas presentan propiedades físicas y químicas únicas, su relación entre el número de átomos superficiales y el tamaño de la partícula es de carácter exponencial. Por ello propiedades relacionadas con la superficie, como las eléctricas, mecánicas, magnéticas,

ópticas o químicas son diferentes a las de los mismos materiales a escala no manométrica. Estas propiedades juegan un papel importante en la toxicidad de estas partículas y es trascendental conocerlas para entender, predecir y gestionar el riesgo potencial que presentan, mediante nuevos ensayos adaptados a sus propiedades. (Frejo, 2011).

Las ventajas del uso de nanopartículas como un sistema de liberación de fármaco incluyen lo siguiente:

1. El tamaño de partícula y características superficiales de las nanopartículas pueden ser fácilmente manipuladas para la activación tanto pasiva como activa en la entrega del fármaco después de su administración parenteral.
2. El control y relación de la duración en el transporte del fármaco y en el sitio de localización, alterando la distribución orgánica del fármaco y en consecuencia en la depuración del fármaco también como el incremento activo en la eficacia terapéutica del fármaco y reducción de efectos secundarios.
3. La liberación controlada y características de degradación pueden ser realmente moduladas por la elección de los constituyentes de la matriz.
4. El sitio específico de entrega puede ser logrado por la adhesión de ligandos a la superficie de las partículas por el uso de una guía magnética los sistemas pueden ser usados en varios roles de administración incluyendo oral, nasal, parenteral, intraocular, etc. (Mohanraj, 2006).

3. HISTORIA DE LAS NANOPARTÍCULAS.

El concepto de nanopartículas y medicamentos dirigidos fue inspirado por una visita de uno de los gigantes de la ciencia Paul Ehrlich a la ópera de Karl Maria von Weber. Ehrlich había estado trabajando durante mucho tiempo en la tinción de las bacterias y los tejidos, después de asistir a esta ópera pensaba que el concepto de la entrega selectiva de medicamentos podría mejorar la terapia. Llamó al sistema de distribución "Zauberkugeln" en inglés "Magic Bullets" (balas mágicas).

Las primeras nanopartículas transportadoras de fármacos estaban constituidas por gelatina y albúmina; sin embargo, el uso de proteínas puede estimular el sistema inmune y presentarse problemas de antigenicidad y toxicidad. Para disminuir estos efectos se desarrollaron las nanopartículas de polímeros sintéticos.

Speiser y su equipo se centraron en el desarrollo de nanopartículas para fines de vacunación. Las vacunas contra el tétanos, la difteria y otras infecciones requieren múltiples inyecciones

para construir los niveles de anticuerpos en el cuerpo que son suficientes para su protección. Se esperaba que debido a las propiedades de liberación sostenida de las nanocápsulas o nanopartículas se lograría una estimulación inmunológica constante y sólo una inyección sería necesaria para lograr la respuesta de anticuerpos necesaria.

En 1969 Gerd Birrenbachwas uno de los estudiantes de Speiser, empleo un proceso que ellos llamaban "polimerización micelar". Las respuestas de los anticuerpos obtenidos con esta preparación fueron muy prometedoras, sin embargo, estas preparaciones nunca más fueron desarrolladas, muy probablemente debido a las altas cantidades de fase orgánica y tensoactivos necesario, así como la elevada toxicidad del monómero.

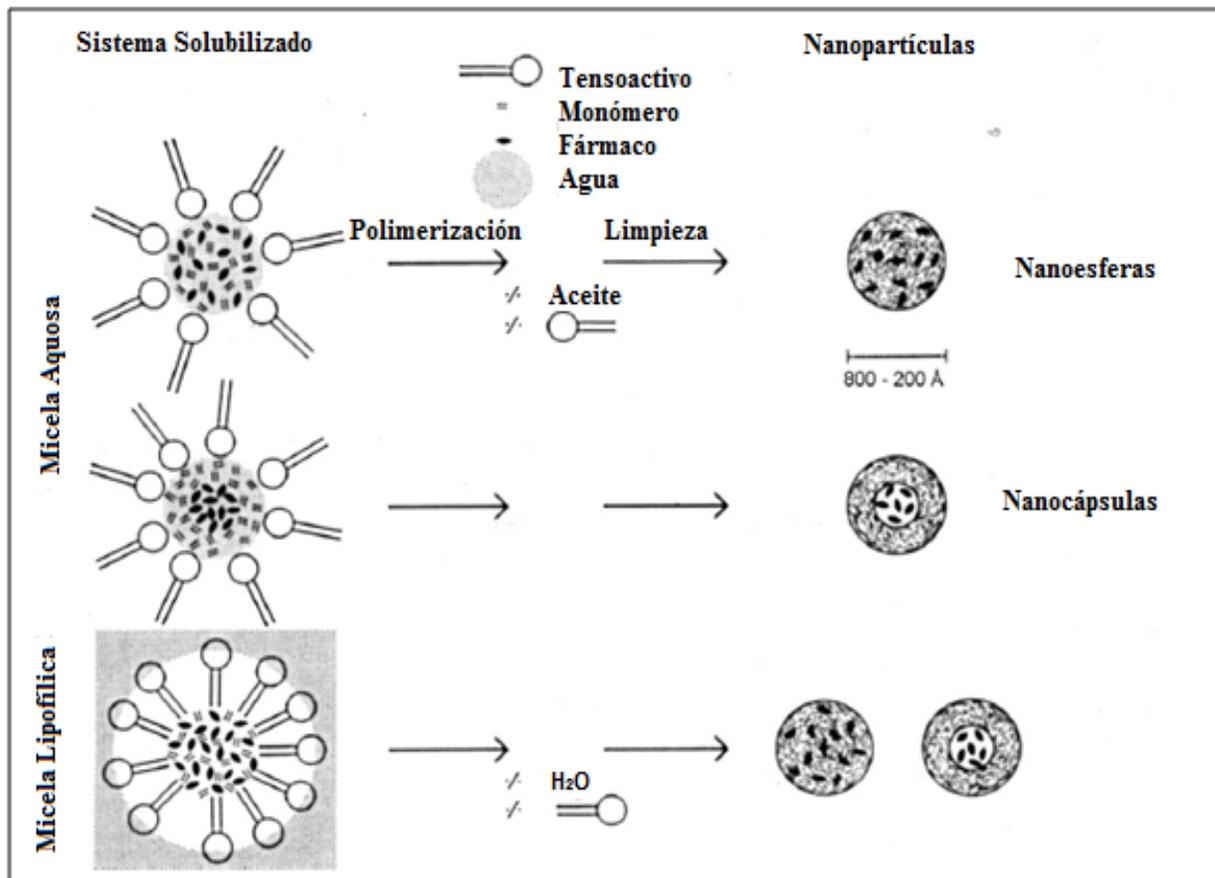


Figura 3. Esquema de preparación de nanopartículas. (Birrenbach, 1976).

Richard Oppenheim de Melbourne Australia, se unió al grupo del profesor Speiser en 1974 como científico visitante por un año y, como consecuencia, también se convirtió en uno de los pioneros en las nanopartículas. Después de su regreso a Melbourne, Oppenheim, junto con su estudiante de doctorado, Jennifer Marty, desarrollaron nanopartículas de gelatina y albúmina mediante la desolvatación que se produce después de la adición de un agente de desolvatación como el alcohol o una sal inorgánica en altas concentraciones. Esta adición conduce normalmente a coacervación, formando microcápsulas por este proceso. Casi 20 años después

este proceso se ha mejorado y es utilizada para el transporte a través de las membranas celulares de los oligonucleótidos e incluso los genes.

Otro pionero en nanopartículas, Patrick Cuvreur se unió al grupo del profesor Speiser, trabajó en el proceso desarrollado por Birrenbach y Speiser. Poco después de esto se produjo la primera nanopartícula de acrílico rápidamente biodegradable hechas de polimetilcianoacrilato y polietilcianoacrilato. Posteriormente las nanopartículas fueron hechas de poli n-butilo, isobutilo, n-hexilo e isohexilo cianoacrilato.

Robert Gurny fue el primero en desarrollar nanopartículas de ácido poli láctico, con fines de administración de medicamentos. (Kreuter, 2007).

El primer reporte de nanoesferas con aplicaciones farmacéuticas fue realizado por Birrenbach en 1976, conteniendo diversos trazadores o sustancias activas como IgG marcada con Yodo, toxoide tetánico y ureasa, utilizando un método de polimerización de acrilamida y N-N'-metilen bisacrilamida en una emulsión inversa (w/o). Este método requirió: 1) grandes cantidades de disolventes orgánicos como fase externa; 2) tensoactivo aniónicos para producir la microemulsión y finalmente 3) un iniciador de polimerización.

Respecto a las nanocápsulas, Al Khouri Fallouh y col. presentaron en 1986 una técnica de polimerización interfacial con monómeros de alquilcianoacrilatos, con el objetivo de atrapar fármacos lipofílicos que no habían podido ser utilizados en nanocápsulas de polialquilcianoacrilatos. En esta técnica, los monómeros de alquilcianoacrilato y el fármaco son disueltos en una fase constituida por etanol conteniendo un aceite, una mezcla de fosfolípidos o bencilbenzoato; dicha fase es inyectada dentro de agua que contiene tensoactivo de tipo no iónico bajo agitación magnética. La dispersión de la fase orgánica en la acuosa ocurre simultáneamente, produciéndose tanto la difusión del etanol en la fase externa como la polimerización del monómero en la interface agua-aceite. Posteriormente, la suspensión de nanocápsulas es concentrada bajo presión reducida. (Chávez, 2002).

La aplicación absolutamente más importante de las nanopartículas es su empleo para la terapia del cáncer, así como una de las aplicaciones más prometedoras es su uso para el transporte de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Esta barrera representa un obstáculo insuperable para un gran número de fármacos, incluyendo los fármacos anticancerosos, antibióticos, y una variedad de fármacos activos del sistema nervioso central (SNC), especialmente neuropéptidos. (Kreuter, 2007).

4. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.

Los métodos de preparación de nanopartículas son actualmente muy numerosos, pudiendo agruparlos en aquellos en los que se realiza una polimerización a partir de monómeros o bien aquellos que parten del polímero. La elección de la técnica de preparación depende de las

características del material formador del sistema y de la solubilidad del principio activo que se desea incorporar. (Hernández, 2010).

Las nanopartículas pueden prepararse a partir de una variedad de materiales tales como proteínas, polisacáridos y polímeros sintéticos. La selección del material de matriz depende de muchos factores, incluyendo:

- a) el tamaño de las nanopartículas requeridas,
- b) las propiedades inherentes del fármaco, por ejemplo, solubilidad, y la estabilidad acuosa,
- c) las características superficiales tales como la carga y la permeabilidad,
- d) grado de biodegradabilidad, biocompatibilidad y toxicidad,
- e) el perfil de liberación de fármaco deseada,
- f) y antigenicidad del producto final.

Las nanopartículas se han preparado con mayor frecuencia por tres métodos:

- 1) dispersión de polímeros preformados,
- 2) polimerización de monómeros, y
- 3) gelificación iónica o coacervación de polímeros hidrofílicos. Sin embargo, otros métodos tales como la tecnología de fluidos supercríticos también se han descrito en la literatura para la producción de nanopartículas.

4.1. DISPERSIÓN DE POLÍMEROS PREFORMADOS.

La dispersión de polímeros preformados es una técnica común utilizada para preparar nanopartículas biodegradables. Esta técnica puede utilizarse de varias maneras como se describe a continuación:

4.1.1. Método de evaporación del disolvente.

El método de evaporación de solvente fue descrito para la preparación de microesferas con tamaños de aproximadamente 1 μm . Sin embargo, con este proceso se pueden obtener partículas menores a 1000 nm. (Kreuter, 2002).

En este método, el polímero se disuelve en un disolvente orgánico tal como diclorometano, cloroformo o acetato de etilo que también se utiliza como disolvente para disolver el fármaco hidrofóbico. La mezcla de solución de polímero y fármaco se emulsiona luego en una solución acuosa que contiene un tensoactivo o agente emulsionante para formar una emulsión aceite en agua (o/w). Después de la formación de una emulsión estable, el disolvente orgánico se evapora ya sea mediante la reducción de la presión o por agitación continua. (Mohanraj, 2006).

El tamaño puede ser controlado por un número de factores incluyendo grado de agitación, el tipo y la cantidad de agente dispersante, la viscosidad de la fase orgánica y acuosa, la configuración del vaso y del agitador, la cantidad de la fase acuosa y orgánica, y la temperatura.

4.1.2. Difusión de disolvente o emulsificación espontánea.

La difusión de disolvente o proceso de emulsificación espontánea puede crear gotas de menor tamaño que el método de evaporación de disolvente. En este caso, la fase dispersada está compuesta de un disolvente inmiscible y uno miscible al agua, el cual es emulsionado dentro de una solución acuosa. La difusión del disolvente miscible en agua causa turbulencia y mayor ruptura de las gotas en la emulsión.

En esta técnica, el fármaco y el polímero son disueltos en un disolvente orgánico, el disolvente inmiscible en agua que es emulsificado dentro de una solución acuosa que contiene emulsificadores y estabilizantes. La emulsión es entonces diluida con agua para incrementar el nivel del disolvente orgánico, el cual puede ser disuelto en la fase continua. Esto causa la disminución en el contenido del disolvente orgánico dentro de la fase dispersada, la cual conduce a la precipitación del polímero y el fármaco para formar las nanopartículas (Williams, 2007).

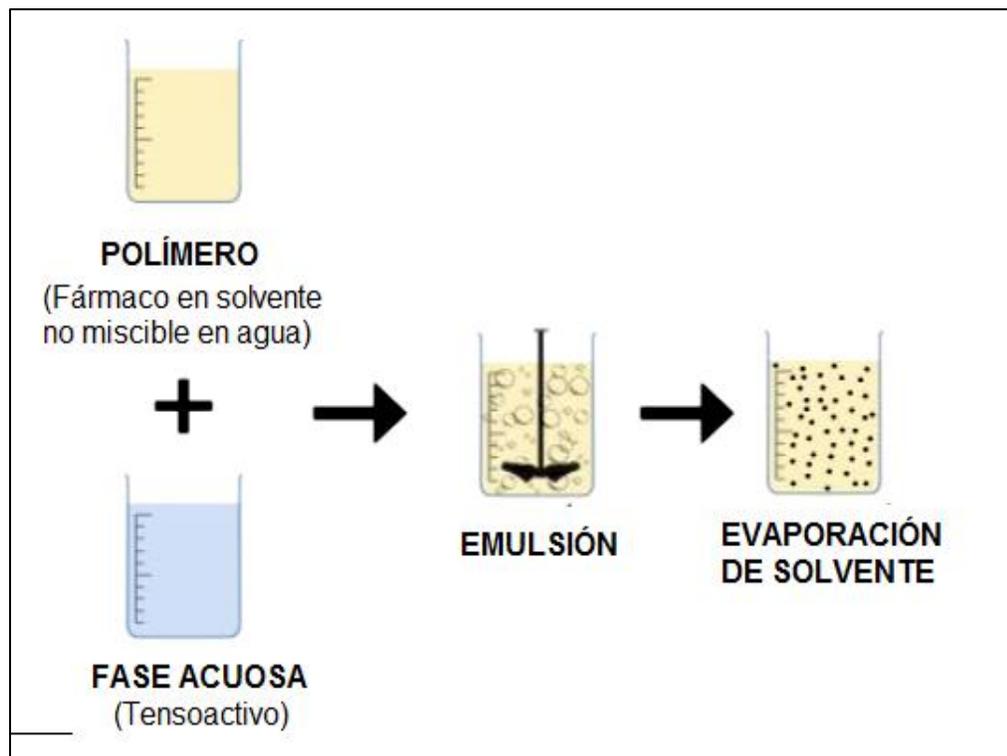


Figura 4. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de emulsificación/evaporación

Tanto la evaporación del disolvente y métodos de difusión de disolventes se pueden utilizar para fármacos hidrófobos o hidrófilos. (Mohanraj, 2006).

4.1.3. Método de doble o múltiple emulsión.

El método de doble o múltiple emulsión ha hecho posible encapsular compuestos hidrófilos. En primer lugar, un fármaco hidrófilo y un surfactante se disuelven en agua. La emulsión primaria es preparada por la dispersión de la fase acuosa en un disolvente orgánico que contiene un polímero disuelto. Se trata entonces de una re-emulsificación con una nueva fase acuosa que contiene también surfactante. Luego, el procedimiento de eliminación de disolvente y recolección de las nanopartículas es similar a la técnica de emulsión simple. (Llabot, 2008).

4.2. MÉTODO DE POLIMERIZACIÓN.

En el método de polimerización, el monómero es polimerizado para formar nanopartículas en una solución acuosa. El fármaco es incorporado tanto por una disolución en el medio de polimerización o por adsorción las nanopartículas después de ser completada la polimerización. La suspensión de nanopartículas es entonces purificada para remover varios estabilizadores y tensoactivos empleados para la polimerización por ultracentrifugación y re-suspendiendo las partículas en un medio isotónico libre de tensoactivos. La formación de las nanocápsulas así como su tamaño dependen de la concentración de los tensoactivos y estabilizantes usados. (Mohanraj, 2006).

4.2.1. Polimerización - Emulsificación.

La polimerización de monómeros en presencia de surfactantes por encima de la concentración micelar crítica (CMC) (denominada polimerización por emulsión) conduce generalmente a la formación de partículas de menor tamaño. La polimerización por emulsión presenta ciertas ventajas inherentes a ella, tales como un elevado índice de polimerización con formación de polímero de elevado peso molecular y un tamaño de partícula inferior. (Harivardhan, 2003).

El principio de la nanoemulsión está basado en la emulsificación espontánea que ocurre o mezcla una fase orgánica y una fase acuosa. La fase orgánica es una solución homogénea oleosa, tensoactivo lipofílico y disolvente miscible en agua; en cuanto a la fase acuosa, consiste en un tensoactivo hidrofílico y agua. Este método puede ser descrito como la disolución hidrofóbica de sustancias en disolvente orgánico el cual posteriormente es emulsificado con una solución acuosa (Sishmitha, 2010).

La polimerización - emulsificación es uno de los métodos más rápidos para la preparación de nanopartículas y es fácilmente escalable. El método es clasificado en dos categorías, basadas en el uso de una fase continua orgánica o acuosa.

4.2.1.1. Fase continua acuosa.

En este método de preparación de nanopartículas, el monómero es disuelto en una fase continua que es usualmente una solución acuosa, y el tensoactivo o emulsificante no es necesario. El proceso de polimerización puede ser iniciado por diferentes mecanismos. La iniciación ocurre cuando una molécula de monómero es disuelta en la fase continua coloidal con una molécula iniciadora que podría ser un ion o un radical libre. Alternativo, la molécula de monómero puede ser transformada dentro de un radical iniciador por radiación de alta energía, incluyendo radiación Gamma, ultravioleta o luz fuerte visible. El inicio del crecimiento de cadenas se da cuando el monómero iniciador iónico reacciona con otra molécula de monómero por medio de un mecanismo de polimerización aniónica. La separación de fases y formación de partículas sólidas pueden tomar lugar antes o después de terminar la reacción de polimerización.

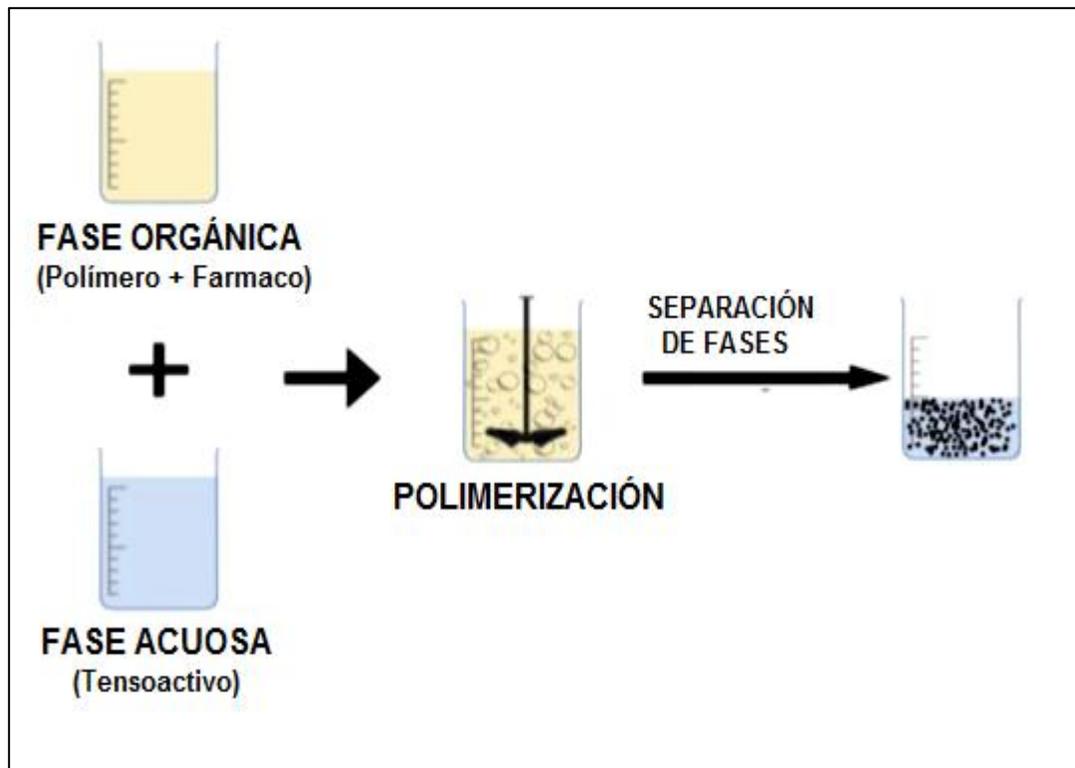


Figura 5. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de polimerización en fase acuosa.

El proceso de polimerización puede realizarse mediante el mecanismo del radical libre y mediante el mecanismo aniónico/anfótero.

a) *Mecanismo de Polimerización de Radical Libre*

Está determinado por una alta energía de activación ($125 < \text{kJ/mol}$). Se trata de una polimerización lenta, cuya velocidad de reacción depende fuertemente de la temperatura y de cantidad de radicales libres.

b) *Mecanismo de Polimerización Aniónica/Anfótera*

Tiene mayor interés por ser más rápido y fácil de realizar, además de ser apropiado para las aplicaciones biomédicas. Incluso bases muy débiles como los iones OH^- derivados de la disociación del agua son capaces de iniciarla. Los iniciadores clásicos son compuestos iónicos (I^- , CH_3COO^- , Br^- , OH^- , etc.) pero también compuestos nucleofílicos pueden iniciarla. Presumiblemente estos generan zwitteriones (ion híbrido con carga negativa y positiva), más que especies iónicas cargadas capaces de realizar una propagación aniónica. En este caso, los iones de OH^- de la disociación del agua son los encargados de actuar como iniciadores de la reacción de polimerización. (Arias, 2003).

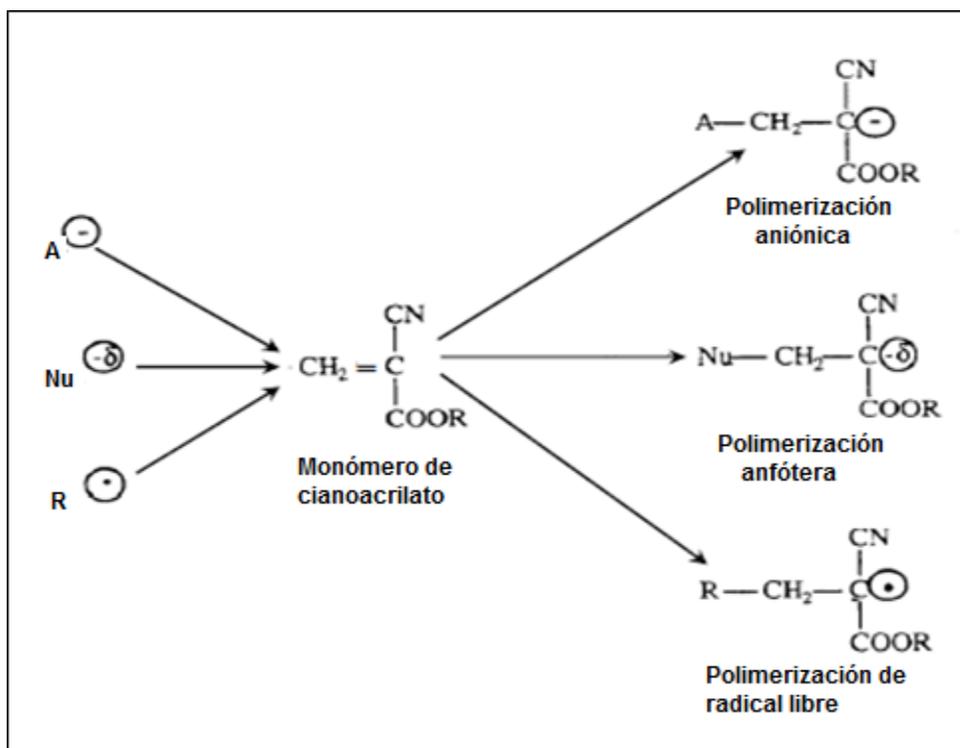


Figura 6. Representación esquemática de los posibles mecanismos de polimerización del monómero alquilcianoacrilato.

4.2.1.2. Fase continua orgánica.

La metodología de una fase continua orgánica involucra la dispersión del monómero dentro del material en el cual éste no es soluble (no disolvente). En uno de los primeros métodos de producción de nanopartículas, tensoactivos o polímeros protectores solubles eran usados para prevenir agregación en cada estado de polimerización. Este procedimiento se ha hecho menos importante, porque esto requiere disolventes orgánicos tóxicos, tensoactivos, monómeros e iniciadores que son subsecuentemente eliminadas por la formación de partículas. Como resultado de la naturaleza no biodegradable de estos polímeros así como el difícil procedimiento, algunos procesos alternativos son de mayor interés hoy en día. (Pinto, 2005).

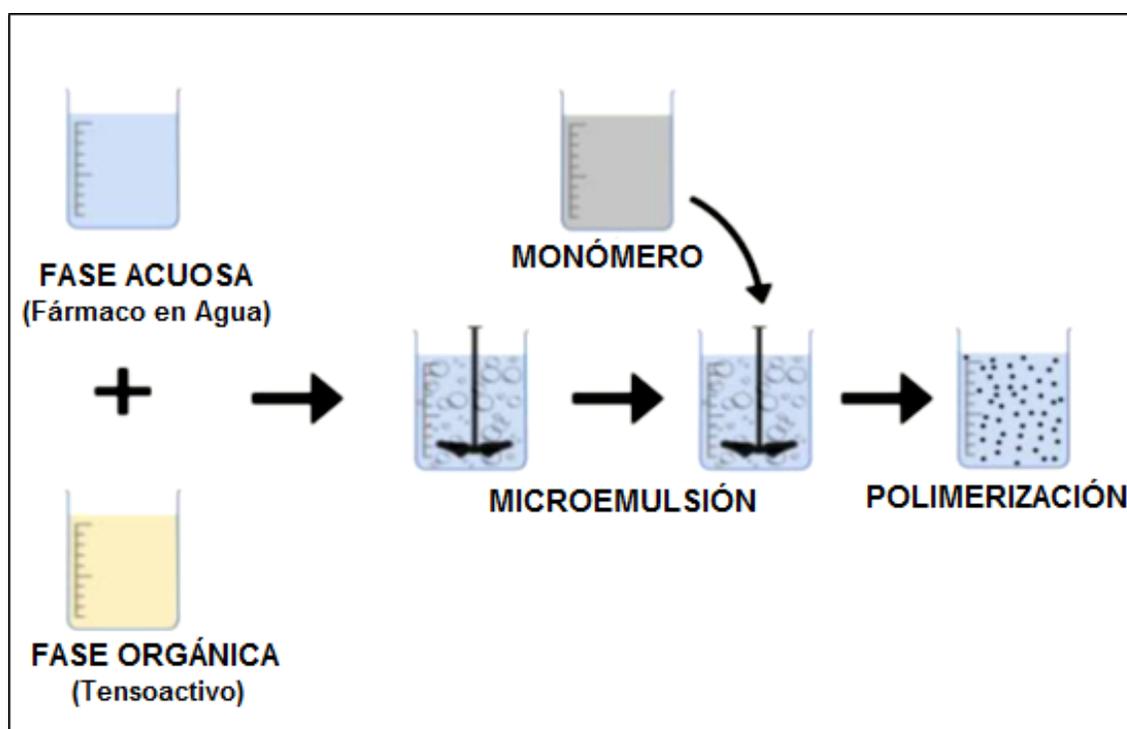


Figura 7. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de polimerización en fase orgánica.

4.2.2. Salting-out.

Este método se basa en la separación de un disolvente miscible con agua de una disolución acuosa mediante efecto de Salting-Out. En esta técnica no pueden ser utilizados disolventes clorados, ya que puede existir alguna competencia entre los iones. (De la Cruz, 2010).

Mediante esta técnica se forma una emulsión agua/aceite que contiene polímeros, agua, acetona, acetato de magnesio, estabilizador (tensoactivo) y el componente activo.

Posteriormente se añade agua hasta que el volumen es suficiente para permitir la difusión de la acetona en el medio acuoso, lo que resulta en la formación de nanopartículas. Esta suspensión se purifica por filtración de flujo transversal y liofilización. (Llabot, 2008).

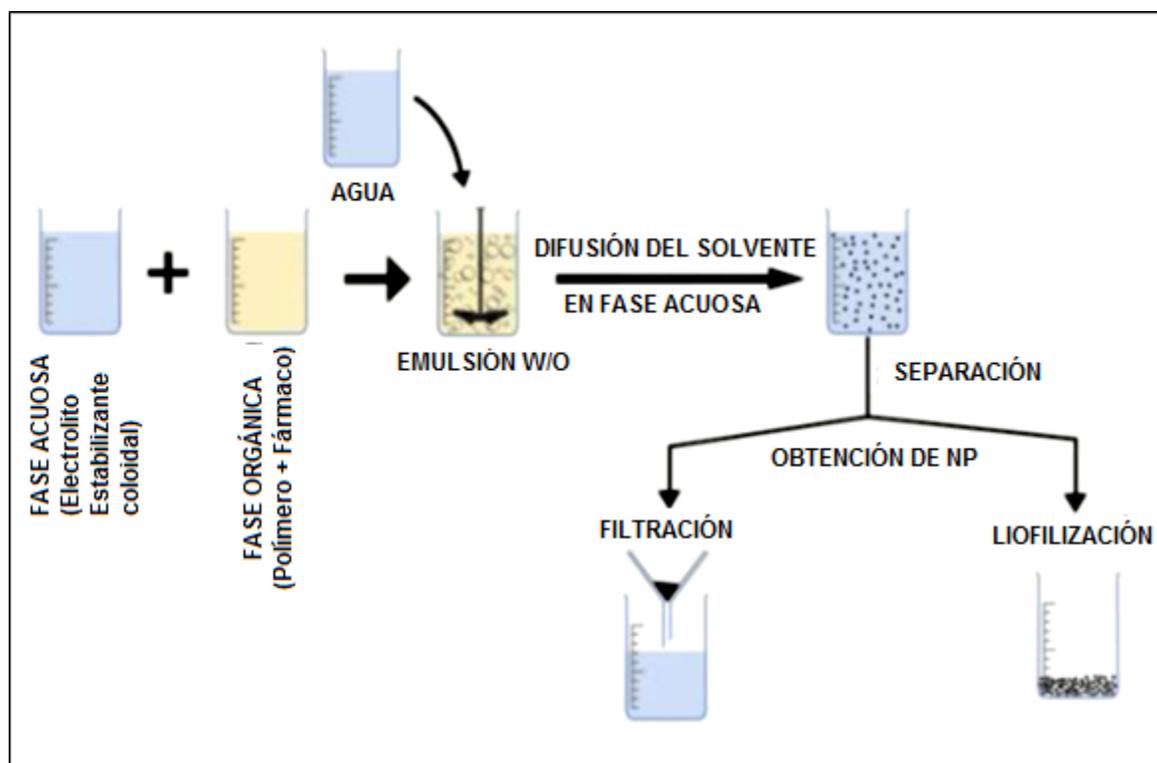


Figura 8. Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de Salting-out.

4.3. GELIFICACIÓN IÓNICA O COACERVACIÓN DE POLÍMEROS.

El método de coacervación o gelación iónica involucra una mezcla de dos fases acuosas, una es el polímero y la otra es un polianión. Un ejemplo es el caso del Quitosán; el grupo amino está cargado positivamente e interactúa con las cargas negativas del Tripolifosfato para formar coacervados con un tamaño en el rango de nanómetros. Los coacervados son formados como resultado de la interacción electrostática entre las dos fases acuosas, mientras que la gelación iónica envuelve el material sufriendo una transición del líquido a gel debido a la interacción iónica de las condiciones a temperatura ambiente. (Mohanraj, 2006).

4.4. MÉTODO DE NANOPRECIPITACIÓN.

Las nanopartículas también pueden ser obtenidas por el método de *nanoprecipitación*. Con esta técnica, los fármacos y el polímero se disuelven en acetona y se añaden a una solución acuosa que contiene tensoactivos. Luego la acetona es evaporada a presión reducida y las

nanopartículas permanecen en la suspensión acuosa resultando en un tamaño de 110 a 208 nm.

La producción de nanopartículas tiene muchas variables independientes. Un parámetro clave es *el tipo de surfactante / estabilizador* a usar. Una amplia gama de moléculas sintéticas y naturales con diferentes propiedades, se ha propuesto para la preparación de nanopartículas.

La concentración de estabilizador (tensoactivo) utilizado también tiene efecto sobre las propiedades de las nanopartículas. Particularmente, si la concentración de los estabilizadores es demasiado baja, se producirá la agregación de las “nano-gotas” del polímero y poca o ninguna nanopartículas se podrán recuperar. Por otra parte, si se utiliza demasiado estabilizador, la incorporación de fármacos a la nanopartícula podría reducirse debido a la interacción entre el fármaco y el tensoactivo. Sin embargo, estudios realizados demostraron que cuando la concentración del estabilizador está dentro de ciertos límites, se puede, mediante ajustes de la concentración, utilizar esto como forma de controlar el tamaño de nanopartículas. (Llabot, 2008).

5. CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.

Existe un gran número de métodos para caracterizar nanopartículas. El tamaño es el rasgo más destacado en las nanopartículas, sin embargo otros parámetros como la densidad, el peso molecular y sus características cristalinas tendrán una gran influencia en sus propiedades de liberación y degradación; al igual que las características de su superficie, tales como la carga en superficie, la hidrofilia y la lipofilia, que influirán en la interacción con el medio ambiente después de su administración a humanos y animales, y esto a su vez influirá en su distribución. (Kreuter, 2002).

Tabla 1. Métodos de caracterización de nanopartículas.

Parámetro	Método
Tamaño de partícula	Espectroscopia de correlación de fotón (DLS) Microscopía electrónica de barrido (SEM) Microscopía electrónica de transmisión (TEM)
Peso Molecular	Cromatografía en gel
Cristalinidad	Difracción de rayos X Calorimetría diferencial de barrido
Carga superficial	Electroforesis Potencial zeta
Hidrofobicidad	Cromatografía de interacción hidrofóbica Medición del ángulo de contacto

5.1. TAMAÑO DE PARTÍCULA.

El tamaño de partícula y la distribución del tamaño de partícula son características importantes de los sistemas nanoparticulados, debido a que ellos determinan su distribución *in vivo*, su destino biológico, su toxicidad, su capacidad de dirección, además de influenciar en la carga de fármaco y en la estabilidad de las nanopartículas. La liberación del fármaco es afectada por el tamaño, esto se debe a que las partículas pequeñas tienen una gran área superficial lo que facilita una rápida liberación a diferencia de partículas grandes que poseen un mayor núcleo por lo que la difusión del fármaco será lenta. (Mohanraj, 2006).

5.1.1. Dispersión de la luz dinámica o Espectroscopia de correlación de fotones.

También conocida como DLS por siglas en inglés (dynamic light scattering) la cual se basa en medir la dispersión de luz (láser) en función del tiempo en pequeñas regiones del sistema, el resultado se ve reflejado en fluctuaciones que la intensidad de la luz dispersada, las cuales están relacionadas con la velocidad de difusión mediante la ecuación de Einstein para movimiento Browniano. Esta ecuación teórica relaciona de manera precisa el coeficiente de difusión con el diámetro hidrodinámico de la partícula (radio de la partícula suspendida), dando por resultado una muy buena aproximación para determinar tamaño de partícula. (Schatztel, 1991).

$$D = \frac{RT}{N} \frac{1}{6\pi kP}$$

D: Coeficiente de difusión

R: Constante de los gases

T: Temperatura

N: Número de Avogadro

k: Viscosidad

P: Radio de la partícula suspendida

Este método abarca tamaños en un intervalo de pocos nanómetros hasta 6 μm . La DLS es una buena herramienta para la caracterización de nanopartículas, pero no es una buena opción para determinar tamaños de partículas muy grandes, la presencia de agregados incrementa la media del tamaño. (Wolfgang, 2001).

La distribución del tamaño es normalmente descrita como un histograma log-normal con el diámetro de la partícula sobre la abscisa y la cantidad de partículas en un tamaño dado ordenado en una clase. A no ser que la densidad de la partícula varíe con el tamaño, la distribución del volumen es equivalente a la distribución de la masa. (Thassu, 2007).

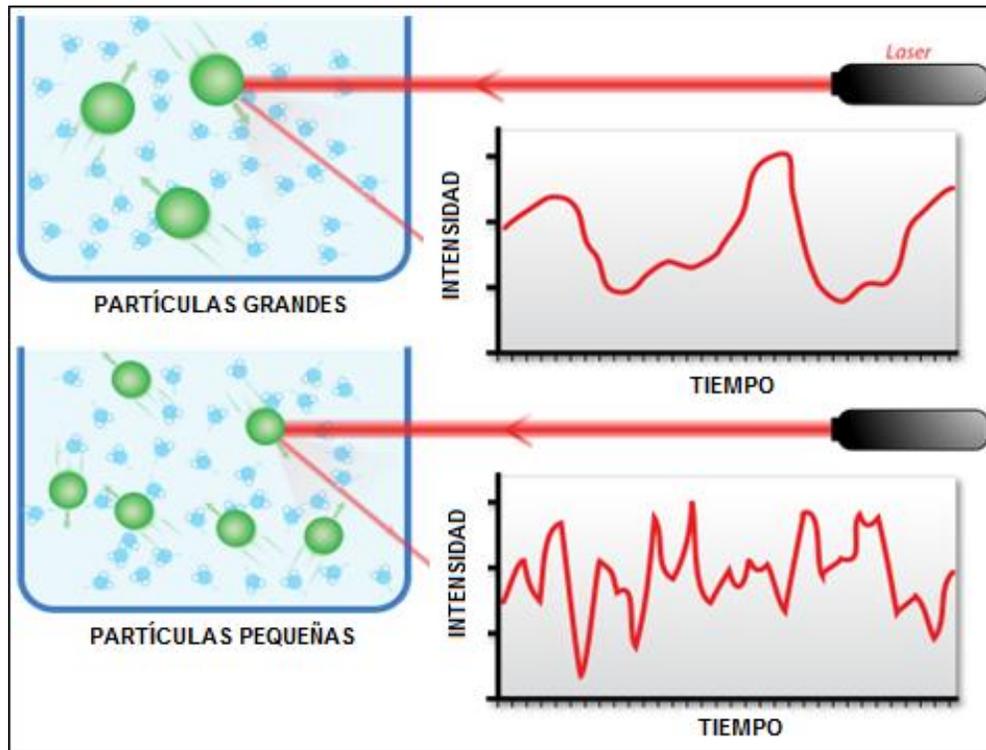


Figura 9. Representación del método de dispersión de la luz dinámica.

5.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).

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

El microscopio electrónico de barrido puede estar equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: un detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución SEI (*Secondary Electron Image*), un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie BEI (*Backscattered Electron Image*), y un detector de energía dispersiva EDS (*Energy Dispersive Spectrometer*) permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis e imágenes de distribución de elementos en superficies pulidas. (Grágeda y Montesinos, 2012).

Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz de electrones finamente enfocado, que pueden dispersarse en la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Los electrones perdidos y los secundarios son recogidos y contados por un dispositivo electrónico situado a los lados de la muestra. Cada punto leído corresponde a un píxel en un monitor de televisión. Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del píxel mostrado. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor.

Para facilitar esta emisión de electrones se metaliza la muestra que es recubierta de una pequeña capa de oro o platino. El haz de electrones se puede concentrar en una zona diminuta ($\sim 20 \text{ \AA}$) que puede barrer la superficie de la muestra al ser reflectado por bobinas adecuadas. Los electrones secundarios se detectan por encima del espécimen y la imagen muestra la intensidad de los electrones secundarios emitidos por las diferentes partes de la muestra. (Thassu, 2007).

5.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN (TEM).

El análisis de estructuras por medio de la microscopía electrónica de transmisión del inglés (TEM) "*Transmission Electron Microscopy*", es una técnica en la cual un haz de electrones es transmitido a través de la muestra seca, bajo condiciones de alto vacío. Los electrones difractados al pasar a través de la muestra generan un difractograma que puede ser transformado directamente en imagen mediante lentes magnéticas que es la proyección de la estructura cristalina a lo largo de la dirección de los electrones.

Tanto el difractograma de electrones como la imagen reconstruida se pueden proyectar en una pantalla. El poder de resolución depende de la longitud de onda y de la calidad de las lentes del objetivo. Las imágenes se pueden producir a partir de los electrones difractados (imágenes de campo oscuro) o a partir de los electrones directos que han atravesado la muestra sin interacción (imágenes de campo claro/brillante). Hay que tener en cuenta el espesor de la muestra y de las condiciones de focalización. (Nixon, 1969).

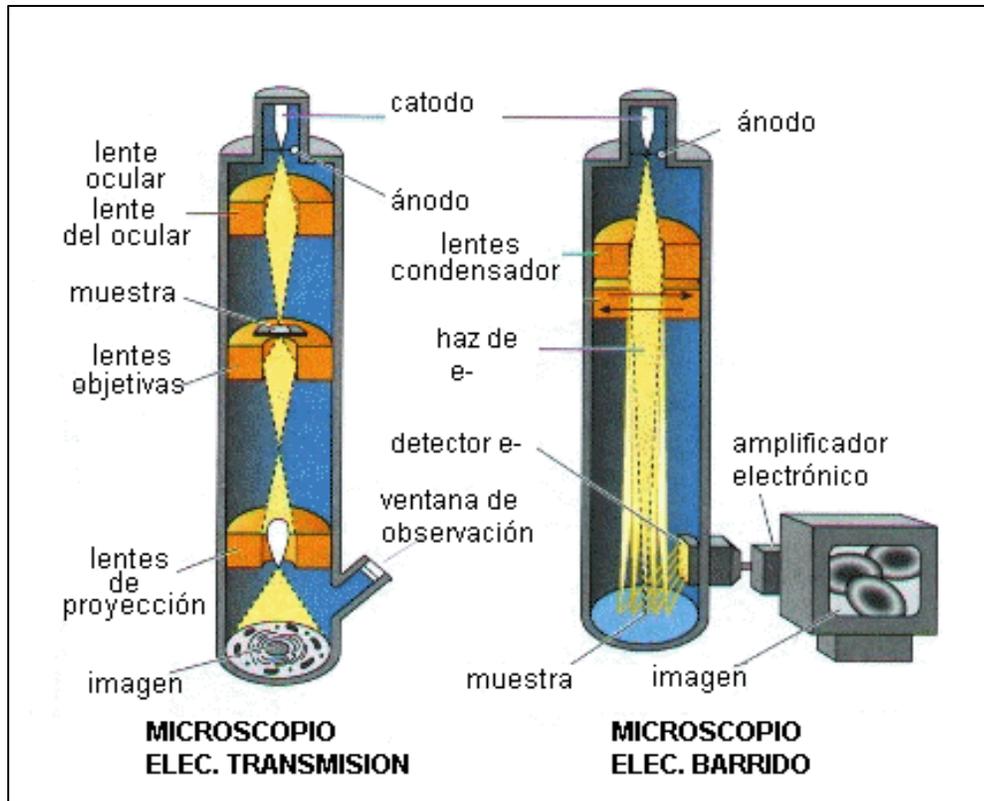


Figura 10. Diagrama de Microscopio Electrónico de Transmisión y Barrido.

5.4. POTENCIAL ZETA.

La medida del potencial zeta permite hacer predicciones acerca de la estabilidad de la dispersión coloidal. En general, la agregación de las partículas es menor en aquellas que están cargadas (Potencial Z alto) debido a la repulsión eléctrica. Sin embargo, esta regla no puede aplicarse estrictamente a los sistemas que contienen estabilizantes, ya que la adsorción de los estabilizantes disminuirá el potencial zeta debido al cambio en la superficie de la nanopartícula. (Wolfgang, 2001).

El potencial Z es una medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundante en la partícula para desestabilizarla. Por lo tanto, el potencial zeta es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean a la partícula.

Este parámetro es usado comúnmente para caracterizar la propiedad de la carga superficial de las nanopartículas. El potencial eléctrico de las partículas es influenciado por la composición de la partícula y el medio en el cual es dispersado. Las nanopartículas con potencial entre ± 60 y 100 mV tienen una excelente estabilidad física, entre $(\pm) 30$ mV y $(\pm) 60$ mV han sido descritas para ser de estabilidad moderada en suspensión y es atribuible a la carga de repulsión entre las partículas, lo cual puede ser suficiente para prevenir su agregación. El potencial Z puede también ser usado para determinar si un

material cargado activamente es encapsulado dentro de la nanocápsula o adsorbido en la superficie. (Mohanraj, 2006).

Tabla 2. Estabilidad en base al Potencial Z.

Estabilidad	Potencial Z (\pm mV)
Muy buena	100 a 60
Buena	60 a 40
Moderada	40 a 30
Umbral de dispersión	30 a 15
Umbral de aglomeración	15 a 10
Fuerte aglomeración y precipitación	< 5

Cuando el potencial Z pasa a través del cero, en el eje de las X, a este punto se le llama punto isoeléctrico. Esto significa que las partículas no experimentan repulsión, por lo que la aglomeración puede ser un efecto esperado.

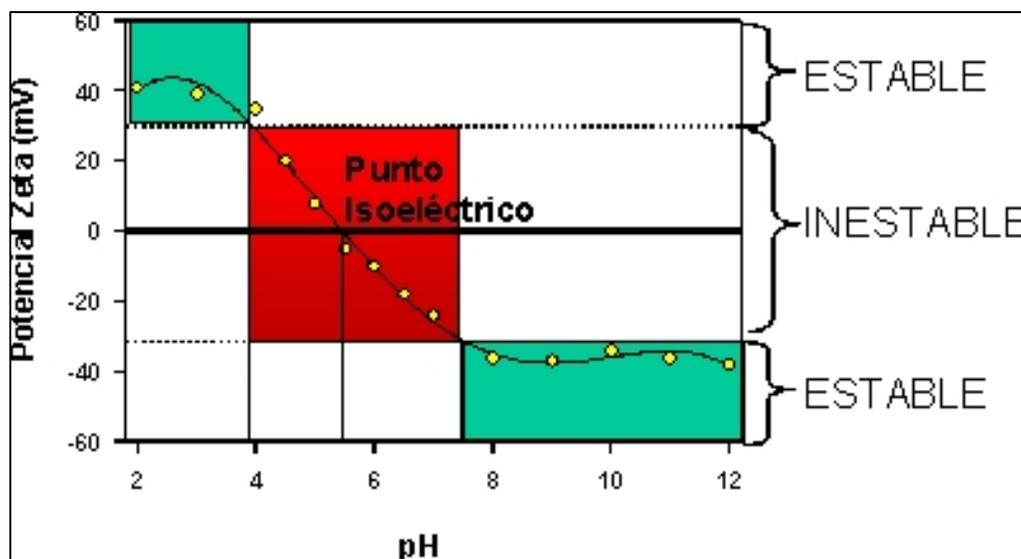


Figura 11. Gráfico que relaciona los valores del potencial Z a diferentes pH.

6. NANOPARTÍCULAS DE POLIETILCIANOACRILATO (PECA).

El poli(etil-2-cianoacrilato) pertenece a la familia de los polialquilcianoacrilatos, de gran interés por la elevada reactividad de sus monómeros, capaces de polimerizar fácilmente en varios medios, incluida el agua. Entre sus múltiples aplicaciones destaca su uso como adhesivo quirúrgico y como sistema coloidal de transporte controlado de fármacos.

Su aplicación en el caso concreto del diseño de vehículos de fármacos se debe a su capacidad, ya mencionada, de polimerizar en medio acuoso (de gran interés para propósitos farmacéuticos), a sus propiedades mecánicas, a su biocompatibilidad y compatibilidad con fármacos, a su permeabilidad, a ser un polímero biodegradable (lo cual es preciso para la administración parenteral) y a que su amplio uso como adhesivo quirúrgico en humanos constituye una garantía de baja toxicidad. (Arias, 2003).

Las nanopartículas de polietilcianoacrilato cumplen requisitos ideales tales como la biodegradabilidad, la capacidad de alterar la biodistribución de fármacos y la facilidad de sintetización y purificación. Las primeras nanopartículas de PECA se sintetizaban mediante polimerización por dispersión de monómero de etilcianoacrilato en presencia de un estabilizante.

Las nanoesferas del monómero PECA se preparan mediante un proceso de emulsión/polimerización, en el que gotas de monómero insoluble en agua se emulsionan en fase acuosa. La reacción se produce en micelas tras la difusión de moléculas de monómero a través de la fase acuosa rápidamente.

Se observó que el pH de polimerización óptimo para la formación de nanopartículas se encontraba por debajo de 5.0. La polimerización con un pH superior a 5.0 daba como resultado agregados de polímero con distribuciones de peso molecular multimodales amplias. Se consideró que la polimerización a temperatura elevada (60°C) tenía un efecto benéfico en el proceso de formación de partículas. (Harivardhan, 2003).

7. NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE SILICIO (SiO₂).

El dióxido de silicio o sílice es uno de los materiales más comunes en nuestro planeta. Es una sustancia amorfa que se produce sintéticamente mediante un proceso de hidrólisis en fase de vapor, que da sílice pirogénica, mediante un proceso húmedo, que da sílice precipitada, gel de sílice, o sílice hidratada.

El dióxido de silicio se ha convertido en uno de los más importantes y frecuentemente utilizados excipientes farmacéuticos. La mejoría de las propiedades de flujo de los materiales necesarios para la moderna fabricación de tabletas y capsulas son nada más un ejemplo de las ventajas obtenidas por el uso del dióxido de silicio.

Se ha demostrado que la sílice inmersa en medio acuoso orienta los átomos de silicio superficiales en una configuración tetraédrica con cada átomo de Si ligado en promedio a aproximadamente un grupo OH. (Arce, 2010).

En los últimos años, el uso de nanopartículas de SiO₂ se ha extendido a campos biomédicos y biotecnológicos, tales como biosensores para ensayo simultáneo de glucosa, para la identificación de leucemia de células usando microscopía óptica de imagen, terapia de cáncer y la administración de fármacos. (Lin W., 2006).

8. PURIFICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

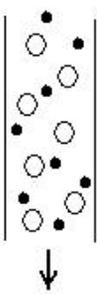
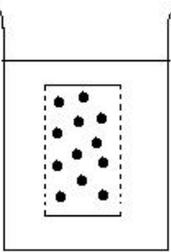
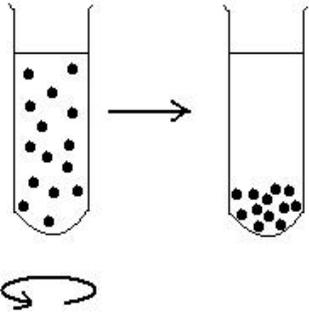
Dependiendo del método de preparación, varias impurezas potencialmente tóxicas pueden ser encontradas en las suspensiones de nanopartículas incluyendo solventes orgánicos, monómeros residuales, iniciadores de polimerización, electrolitos, tensoactivos, estabilizadores, y grandes agregados poliméricos. La necesidad y el grado de purificación dependen del objetivo final de la formulación desarrollada.

Aunque los agregados poliméricos pueden ser fácilmente removidos por una simple filtración a través de filtros de vidrio, la eliminación de impurezas requiere procedimientos más sofisticados. Los procedimientos más comúnmente reportados son la filtración en gel, la diálisis y la ultracentrifugación.

8.1. ESTERILIZACIÓN.

Las nanopartículas que pretenden ser administradas vía parenteral requieren ser estériles y libres de pirógenos. La esterilización con filtros de 0.22 μm no es adecuada para nanopartículas en suspensión debido a que los microorganismos y las nanopartículas generalmente tienen un tamaño similar (0.25-1 μm). La esterilización puede llevarse cabo por otros sistemas micro-particulares, cualquiera de los dos usando condiciones asépticas durante la formulación, o por un subsecuente tratamiento como el autoclave o radiación γ. El tipo de tratamiento de esterilización depende de la susceptibilidad física del sistema. La autoclave y la radiación γ han mostrado tener un impacto en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas en varios sistemas, un ejemplo es la modificación del tamaño de partícula, la estabilidad y las características relacionadas con el fármaco. Hace algún tiempo, las modificaciones ocurrían como consecuencia de rompimiento del entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, pero pueden ser resultado de la alteración de otros componentes como los agentes de superficie o los mismos fármacos. (De Jaeghere, 1999).

Tabla 3. Principales métodos para la purificación de Nanopartículas.

Método	Principio esquemático	Inconvenientes
Filtración en gel		Difícil remoción de impurezas de alto peso molecular
Diálisis		Difícil remoción de impurezas de alto peso molecular Tardado Dificultad para escalamiento
Ultracentrifugación		Agregación de partículas Tardado Dificultad para escalamiento

9. NANOTOXICOLOGÍA.

La rápida expansión de la nanotecnología ha dado como resultado un amplio abanico de nanopartículas que varían en tamaño, forma, carga química, recubrimiento y solubilidad. Debido a su tamaño las nanopartículas tienen la propiedad de modificar las propiedades físico-químicas de la materia, observándose un aumento en su capacidad de interacción con los tejidos biológicos, lo que puede generar efectos biológicos adversos en las células vivas que de otro modo no sería posible con el mismo material de mayor tamaño. (Frejo, 2011).

La Nanotoxicología se define como la ciencia que examina los efectos dañinos y tóxicos de las nanopartículas diseñadas artificialmente así como de los mecanismos en los organismos vivos y el medio ambiente. (Klaine, 2008).

Los mecanismos de toxicidad no han sido totalmente esclarecidos, aunque según Lanone y Boczkowski, el principal mecanismo de nanotoxicidad *in vivo* es la inducción de estrés oxidativo mediante la generación de radicales libres.

El estrés oxidativo se debe a un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. Las alteraciones en este estado normal redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. (Frejo, 2011).

9.1. BIOMARCADORES.

Un aspecto crucial en la Toxicología es la medición de los efectos de xenobióticos en los organismos y su ecosistema. Las alteraciones bioquímicas, fisiológicas moleculares o celulares inducidas por agentes xenobióticos permiten correlacionar estos eventos con la dosis de exposición y los niveles del agente tóxico con la magnitud de los diferentes efectos al organismo. Por ello se ha tenido que utilizar biomarcadores, los cuales son observaciones medibles de las alteraciones biológicas.

Se pueden definir como modificaciones, presencia de componentes, estructuras, procesos y/o reacciones que se atribuyen de manera directa o indirecta a la exposición de sustancias xenobióticas. Con ellos es posible establecer una evaluación de riesgo en consideración de variables toxicocinéticas y toxicodinámicas. Los biomarcadores se dividen en tres categorías:

9.1.1. Biomarcadores de exposición.

Estos consisten en la medición de la sustancia xenobiótica o un metabolito de la misma, también puede ser un efecto directamente atribuible al xenobiótico que se encuentre dentro del organismo. Los xenobióticos o sus metabolitos pueden ser medidos directamente en tejidos, orina, sangre y heces así como en el aire exhalado y otros fluidos corporales y en algunos casos reflejar la magnitud de la exposición. Los compuestos carcinógenos o sus metabolitos son generalmente especies electrofílicas que pueden causar cambios bioquímicos por su afinidad a grupos nucleofílicos que se encuentran en biomoléculas o moléculas orgánicas e inorgánicas. Estos efectos pueden cuantificarse y considerarse como biomarcadores de exposición.

9.1.2. Biomarcadores de efecto.

Son alteraciones en la fisiología, bioquímica u organización celular atribuida a la exposición de sustancias tóxicas.

9.1.3. Biomarcadores de susceptibilidad.

Este tipo de biomarcadores pueden relacionarse con un incremento o disminución en las respuestas celulares hacia un efecto tóxico que se refleja en el organismo a nivel celular, tisular u orgánico. Esto provoca una vulnerabilidad diferenciada hacia los signos, síntomas o enfermedades generados tras la exposición a agentes físicos, químicos o biológicos. (Manahan, 2003).

En términos de impacto a la salud y el medio ambiente es necesario evaluar los riesgos de nanomateriales mediante estudios toxicológicos y epidemiológicos así como el manejo de los riesgos que conlleva a su uso por medio de decisiones políticas, sistemas regulatorios y todo aquello que relacione el uso de nuevas tecnologías aplicadas a la salud.

Existen dos criterios para identificar nanomateriales que podrían constituir un riesgo para la salud humana:

1. El material debe ser capaz de interactuar con el cuerpo de tal forma que su nanoestructura se encuentre biodisponible.
2. El material debe ser capaz de provocar una respuesta biológica que se encuentra asociada a la nanoestructura.

Hay numerosas razones por las que los nanomateriales pueden tener mayor toxicidad que sus contrapartes en volumen. En general, los nanomateriales pueden penetrar dentro de pequeñas estructuras y moverse profundamente dentro de espacios celulares estrechos y tejidos que las partículas más grandes. Una vez dentro de las células, ellas pueden inducir estrés oxidativo, alteraciones fagocíticas, inhibición de la proliferación celular, y disminuir la viabilidad celular entre otros efectos. Las partículas más pequeñas pueden evadir sistemas reticuloendoteliales con mayor facilidad, y así permanecer por más tiempo en el cuerpo. Los nanomateriales pueden generar complejos móviles que entran en tejidos normalmente inaccesibles. Reacciones químicas inesperadas debido al incremento en la reactividad puede dañar las propiedades estructurales y funcionales de la célula. Todas estas posibilidades contribuyen al potencial toxicológico de los nanomateriales.

9.2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA TOXICIDAD DE LAS NANOPARTÍCULAS.

Tabla 4. Principales factores que pueden determinar los efectos toxicológicos de las nanopartículas en el organismo. (Gálvez, 2010).

FACTORES	
Factores que dependen de la exposición.	Vía de penetración. Duración de la exposición, Concentración.
Factores que dependen del organismo expuesto.	Susceptibilidad individual. Lugar de depósito. Ruta que siguen las nanopartículas una vez se han introducido en el organismo.
Factores relacionados con los nanomateriales.	Toxicidad intrínseca de la sustancia.

10. ESTRÉS OXIDATIVO.

En las células y en los organismos en condiciones normales se mantiene un balance entre la producción de radicales libres y especies reactivas con los sistemas antioxidantes; de manera tal que la toxicidad por oxidación es limitada, aún este limitado daño es parcialmente responsable del envejecimiento natural de las células y los organismos.

Sin embargo, se considera que la agresión oxidativa alcanza niveles patológicos cuando se rompe el balance entre ella y la eficiencia de los sistemas amortiguadores antioxidantes; lo cual se puede producir por un déficit de antioxidantes o por un incremento en la producción de las especies reactivas. De igual manera cuando se reduce la agresión oxidativa, se reduce la eficiencia total del sistema amortiguador antioxidante, evitando así gastos energéticos excesivos y una condición reductora muy elevada en la célula que comprometa las acciones oxidantes de importancia para el funcionamiento celular. (Quintanar, 2009).

Los organismos aeróbicos requieren del oxígeno para realizar sus funciones vitales pero una vez que el oxígeno es activado se convierte en tóxico para este tipo de organismos, el exceso de formas activas de oxígeno conduce al estrés oxidativo. (Gasca, 2011).

Cuando en la célula existe un aumento en la formación de radicales libres o una disminución en los mecanismos antioxidantes, se produce una condición llamada estrés oxidativo, en donde el daño a las macromoléculas puede ocasionar la muerte de la célula o el tejido.

El término estrés oxidativo se refiere a una situación en la cual las células son expuestas a un desequilibrio en las concentraciones de oxígeno molecular o sus formas reducidas. (Zúñiga, 2008).

La oxidación de los lípidos membranales provoca pérdida de la permeabilidad, la fluidez y la integridad de las membranas (la plasmática y de los organelos celulares). (Quintanar, 2009).

El estrés oxidativo se caracteriza principalmente por el daño a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. Cuando los radicales libres reaccionan con ellos, se produce un metabolito final conocido como malondialdehído (MDA), el cual se determina en el laboratorio como indicador de estrés oxidativo. (Gutiérrez, 2008).

Los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares y lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando MDA, de tal manera que la concentración sérica de MDA es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados y, por lo tanto, un buen indicador de peroxidación lipídica (Montoya, 2008).

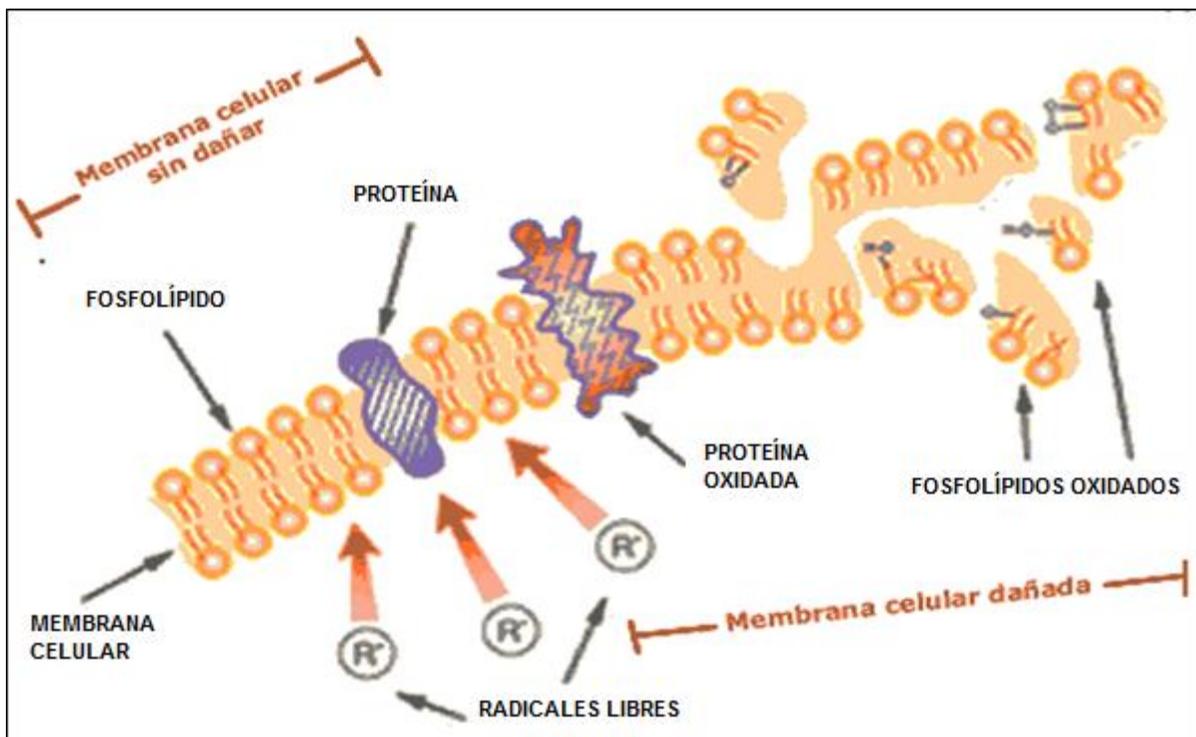


Figura 12. Efecto de los radicales libres sobre la membrana celular.

10.1. RADICALES LIBRES

Los radicales libres se definen como especies químicas que presentan un electrón desapareado en su orbital más externo, por lo que son altamente reactivos a moléculas vecinas ya que sustrae un electrón de átomos o moléculas estables, a las cuales oxida, con el fin de alcanzar su propia estabilidad. Una vez que el radical libre ha conseguido el electrón que necesita para aparear a su electrón libre, la molécula estable que pierde el electrón se oxida y deja a otro electrón desapareado, lo que la convierte a su vez en un radical libre, iniciándose y después propagándose de la misma manera, generando así una reacción en cadena. (Quintanar, 2009).

En los seres vivos, los radicales libres provienen principalmente del oxígeno o del nitrógeno (por lo que son llamados radicales libres derivados del oxígeno o del nitrógeno, respectivamente) y pueden dañar lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos. La célula posee varios tipos de mecanismos antioxidantes, los cuales evitan o minimizan el daño provocado por los radicales libres.

Algunos radicales libres son extremadamente reactivos, como el radical hidroxilo (OH^\bullet), otros menos reactivos como el radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que por definición no es considerado un radical libre de oxígeno, pero es potencialmente capaz de generar fácilmente OH^\bullet . (Troncoso, 2007).

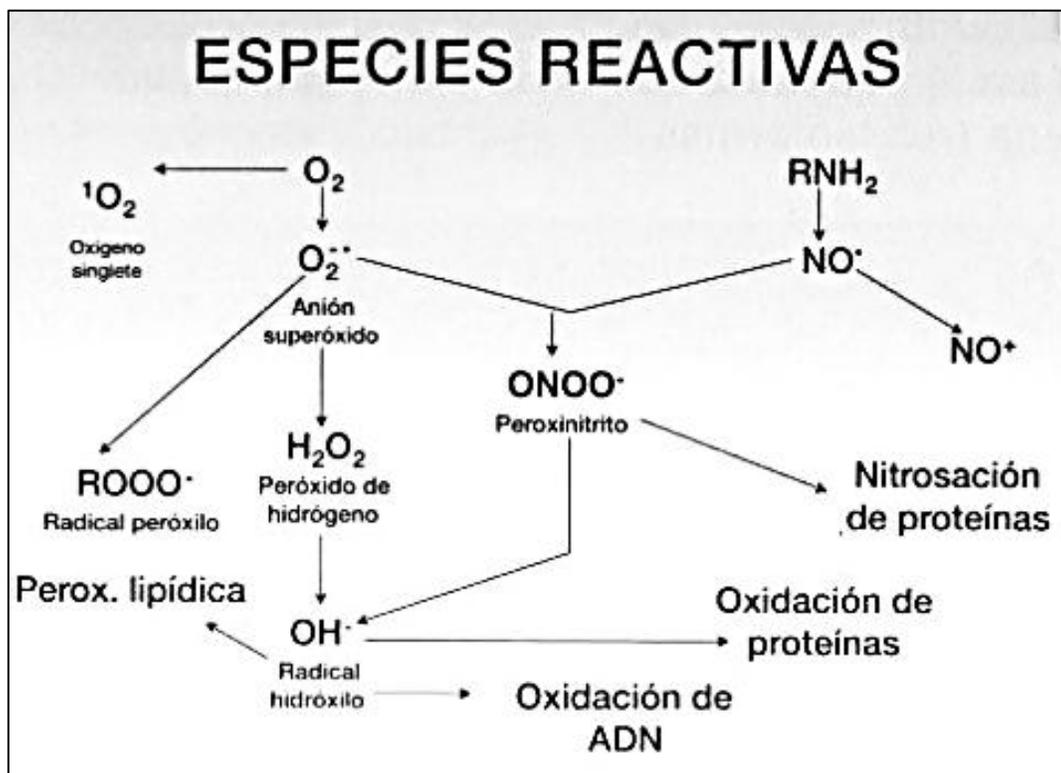


Figura 13. Generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

10.2. MECANISMOS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE.

Para evitar que se desborde el estrés oxidativo, las células y los organismos aeróbicos requieren generar y mantener defensas antioxidantes de manera óptima e incrementarlas acorde al tamaño de la agresión.

Los mecanismos homeostáticos antioxidantes con los que el organismo enfrenta el daño oxidativo son específicos, afines, numerosos y diversos; reflejando la necesidad de hacer frente a la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas; también son numerosos los compartimientos donde actúan en el organismo y en las células.

Los mecanismos antioxidantes se pueden clasificar de diversas formas, en la tabla 5 se mencionan las líneas de defensa en el organismo.

Tabla 5. Líneas de defensa del organismo. (Quintanar, 2009).

Mecanismo	Ejemplo
Macromoléculas que acomplejan especies reactivas y evitan su acción.	Proteínas que acumulan o transportan metales de transición, como la transferrina y la ceruloplasmina o como el oxígeno, la hemoglobina y la mioglobina.
Enzimas antioxidantes con gran afinidad para catalizar con altas velocidades la reacción de reducción parcial de una especie reactiva	La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del O_2 a H_2O_2 ; la glutatión peroxidasa (GPx) que es una enzima dependiente de selenio y cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o lipoperóxidos (L-OOH); la glutatión sulfhidril transferasa (GST) que cataliza el ataque nucleofílico del cosustrato GSH sobre el centro electrófilo de un gran número de oxidantes y la catalasa (CAT) que reduce el H_2O_2 a H_2O .
Cosustratos antioxidantes, son empleados por las enzimas para poder reducir parcialmente a los radicales libres y las especies reactivas.	El glutatión y el NADPH. El glutatión con gran facilidad cede electrones (muy nucleofílico) debido a su grupo sulfhidrilo (-SH) y su potencial redox; una vez que queda oxidado se puede regenerar gracias a la enzima glutatión reductasa (GR) que lo reduce con la oxidación de NADPH. El NADPH tiene un potencial redox muy negativo y por ende es un importante donador

	de electrones e hidrógenos, con lo que puede pasar a NADP ⁺ que en su forma oxidada diversas enzimas lo emplean como cosustrato.
Enzimas que regeneran sustratos o cosustratos antioxidantes.	Las enzimas que regeneran al glutatión reducido, la vitamina E y el NADPH. El glutatión se mantiene casi todo en forma reducida principalmente a través de glutatión reductasa (GR), una flavoenzima que gracias a la oxidación del NADPH cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH).

11.CITOTOXICIDAD.

En la actualidad, la toxicología alcanza enorme trascendencia social debido al importante número de sustancias químicas comercializadas y su posible impacto sobre la salud pública y ambiental. Ello ha conducido al desarrollo de estrategias de evaluación de riesgos con fines normativos: es el caso de la llamada “toxicología reguladora”, rama dentro de la toxicología que se dedica a la legalización y armonización de todos los protocolos e informes de sustancias tóxicas a partir de normativas legales, disposiciones ministeriales por propia iniciativa o como cumplimiento de recomendaciones o directrices de organismos internacionales los cuales producen un extenso cuerpo legal de raíz toxicológica, ampliamente conocidas. (Combs, 2002).

La **citotoxicidad** celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado. A partir de aquí, diferentes autores han desarrollado baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de los fármacos y los compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como líneas celulares establecidas. (Fentem, 1994).

Dentro de la batería de ensayos *in vitro* como métodos de toxicología alternativa útiles y necesarios para el registro o solicitud de ensayos clínicos de una sustancia dada se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad, capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones. En los cuales se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y

degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular. (Repetto, 2002).

Las pruebas de citotoxicidad evalúan el efecto de los materiales sobre diferentes poblaciones celulares midiendo el número o crecimiento celular luego de la exposición a los materiales. Además estas pruebas determinan daños a nivel de la membrana celular, biosíntesis o actividad enzimática y el material genético.

Otro grupo de pruebas miden la citotoxicidad de un material evaluando los cambios en la permeabilidad de membrana celular. Esto se realiza observando la facilidad con que un colorante puede atravesar la membrana celular, estas pruebas se basan en que la pérdida de la permeabilidad de la membrana es equivalente a un daño celular severo o a la muerte celular. (Escalona, 2012).

En la tabla 6 se resumen algunas de las pruebas que se utilizan para los ensayos de citotoxicidad, proliferación celular y genotoxicidad.

Tabla 6. Ensayos para evaluar la nanotoxicidad *in vitro*. (Hillegass, 2010).

Evaluación	Ensayo
Citotoxicidad	Azul de tripán Viabilidad Celular (MTT) Cuantificación de GSH Clonogénico (CFE) LDH Túnel Técnica Apostan Anexina V Lipoperoxidación (TBARS).
Proliferación	Contenido de ADN Incorporación de Timidina Incorporación de BrdU Ki-67 Detección de PCNA
Genotoxicidad	Ames (<i>S. typhimurium</i> o <i>E. coli</i>) Detección de modificaciones basadas en ADN Análisis de cariotipo (inducción de aberraciones cromosómicas y micronúcleos) Ensayo cometa.

Existen diversos ensayos para evaluar la nanotoxicidad *in vitro*, en este trabajo se determinaron los ensayos remarcados en la tabla 6 y a continuación se describe el fundamento de cada uno.

11.1. ENSAYO DE LA REDUCCIÓN DEL MTT.

El ensayo con MTT es otra prueba enzimática comúnmente utilizada para medir la citotoxicidad de los materiales, tiene como propósito medir la actividad de la deshidrogenasa celular. (Escalona, 2012); también es muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. (Denizot, 1986).

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) de color amarillo, es realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. (Denizot, 1986).

Si la enzima se encuentra inactiva por efectos citotóxicos de un material, no se formará el formazán. (Escalona, 2012). La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido. El porcentaje de Viabilidad se obtiene de la siguiente forma:

$$\% \text{ de MTT} = \frac{(\text{Abs de la muestra})}{(\text{Abs del blanco})} \times 100$$

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir al MTT a formazán después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa. (Jiménez, 2007).

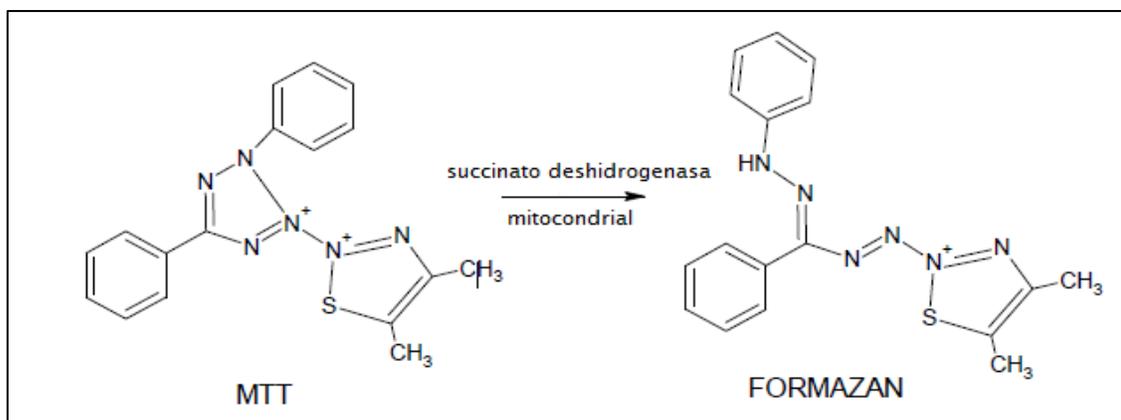


Figura 14. Reducción metabólica del MTT a sales de formazan por la enzima succinato deshidrogenasa.

11.2. ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).

La cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO) utilizando ácido tiobarbitúrico (TBA) permite estimar la lipoperoxidación celular en la cual el malondialdehído (MDA) es derivatizado.

La determinación de este compuesto es relativamente sencilla y se fundamenta en la reacción de condensación que ocurre entre una molécula de malondialdehído y dos moléculas de ácido tiobarbitúrico en medio ácido formando un complejo colorido que presente un pico máximo de absorción a 532 nm.

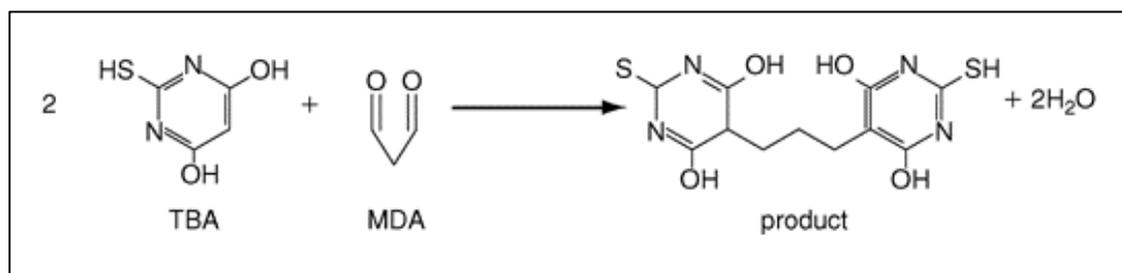


Figura 15. Reacción de condensación entre TBA y MDA.

11.3. ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DE GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH).

El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido no proteico (γ -glutamil-cisteinil-glicina) el cual protege a la célula contra las acción de agentes oxidantes endógenos y exógenos, así como mantener la estabilidad de la membrana. (Meister, 1976).

El GSH es el antioxidante intracelular más abundante aproximadamente a una concentración de 5 mM a nivel celular, tiene un papel muy importante en la protección contra las especies reactivas de oxígeno (ERO), el metabolismo de los nutrientes y detoxificación de xenobióticos, y la regulación del estado redox intracelular. (Reliene, 2006).

También es un cofactor para las reacciones de isomerización, sirve como almacenamiento y transporte de cisteína. Además, es esencial para la proliferación celular y tiene un papel importante en la apoptosis. Una función muy importante del glutatión es mantener el potencial de óxido-reducción de la célula, ya que mantiene en estado reducido los grupos tiol de las proteínas y así permite la generación de diversas cascadas de señalización intracelular. (Martínez, 2011).

El GSH tiene muchas funciones diferentes como por ejemplo; protección contra las especies oxidantes y el mantenimiento de los grupos SH de las proteínas. Durante estas reacciones de protección, el Glutatión se convierte en glutatión disulfuro (GSSG, es la

forma oxidada del GSH). El GSSG es reducido enzimáticamente por la glutatión reductasa, por ello el GSH es la forma dominante en los organismos.

La determinación de la concentración de GSH se realiza con un método espectrofluorométrico donde se utiliza el ortoftaldehído (OPT) como indicador, donde se forma un producto fluorescente que se registra a una longitud de onda de absorción, de excitación 350 y de 420 nm de emisión con un espectrofluorómetro de luminiscencia. (Quezada, 2002).

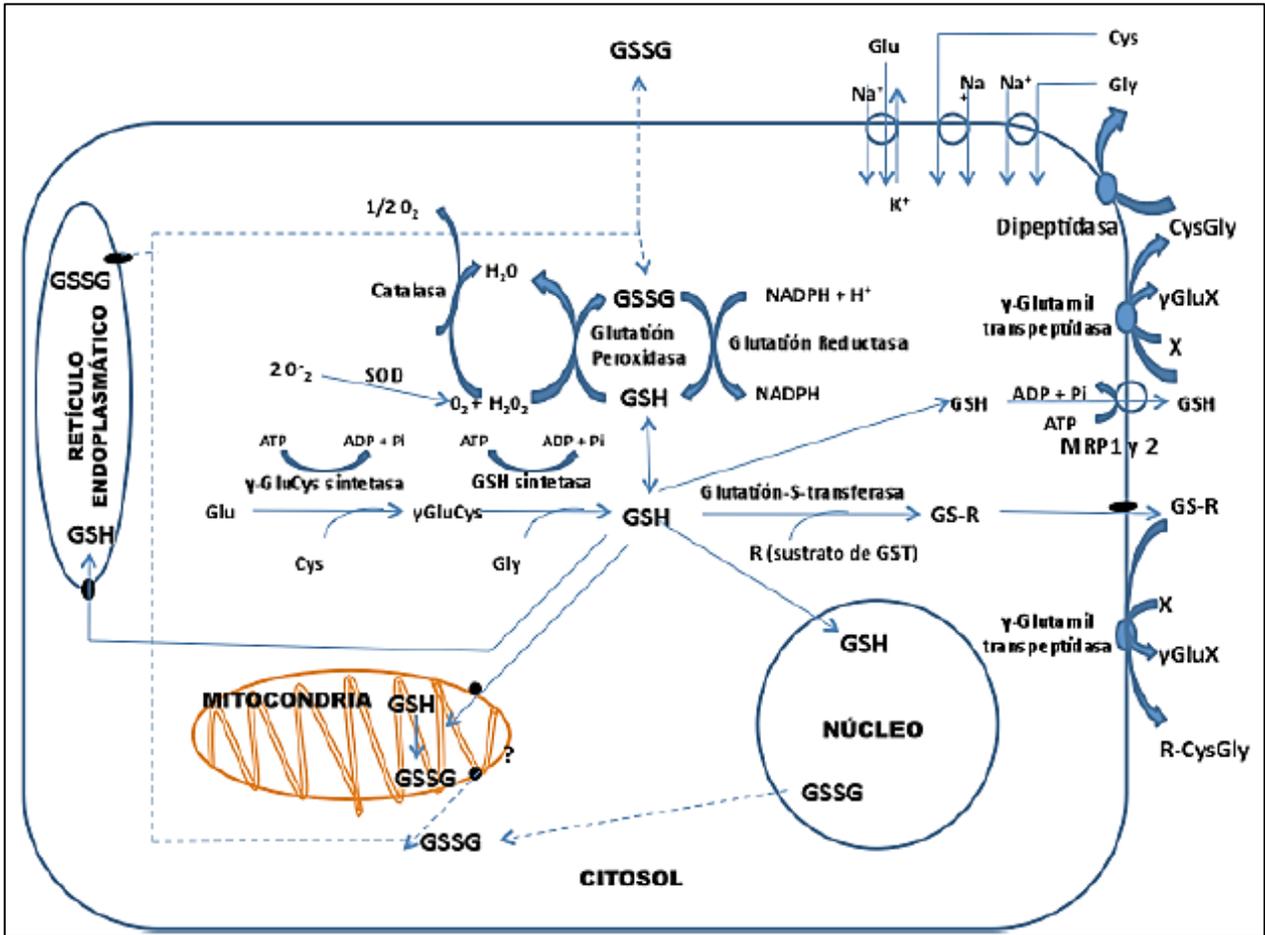


Figura 16. Metabolismo del glutatión en la célula. (Martínez, 2011).

11.4. ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE BRADFORD.

La determinación de la concentración de proteínas totales en una muestra biológica es un procedimiento rutinario cuando se requiere conocer la actividad específica de una preparación enzimática o en otros ensayos en los que se requiere asociar la cantidad total de proteínas con el valor en estimación.

Se basa en el acoplamiento del colorante con la proteína y se determina colorimétricamente, existe una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de proteínas.

El método de Bradford, cuantifica la unión de un colorante (azul de Coomassie G-250) a una proteína desconocida y la compara contra diferentes cantidades de una proteína estándar, usualmente albúmina sérica bovina (BSA). El complejo colorante-proteína presenta un máximo de absorción a 595 nm. Está diseñado para cuantificar entre 1 y 10 mg de proteína, es un método simple, confiable, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. (Bradford, 1976).

12.CULTIVOS CELULARES.

Actualmente se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células “*in vitro*”, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

12.1. TIPOS DE CULTIVOS CELULARES.

Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración hablaremos de diferentes tipos de cultivos: de órganos, explantes, primarios o secundarios.

12.1.1. Cultivo de órganos.

El órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional. Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen.

12.1.2. Explantes primarios.

Son fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia del explante.

12.1.3. Cultivo celular.

Supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones. Como característica negativa se pierde la heterogeneidad celular de partida, la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento.

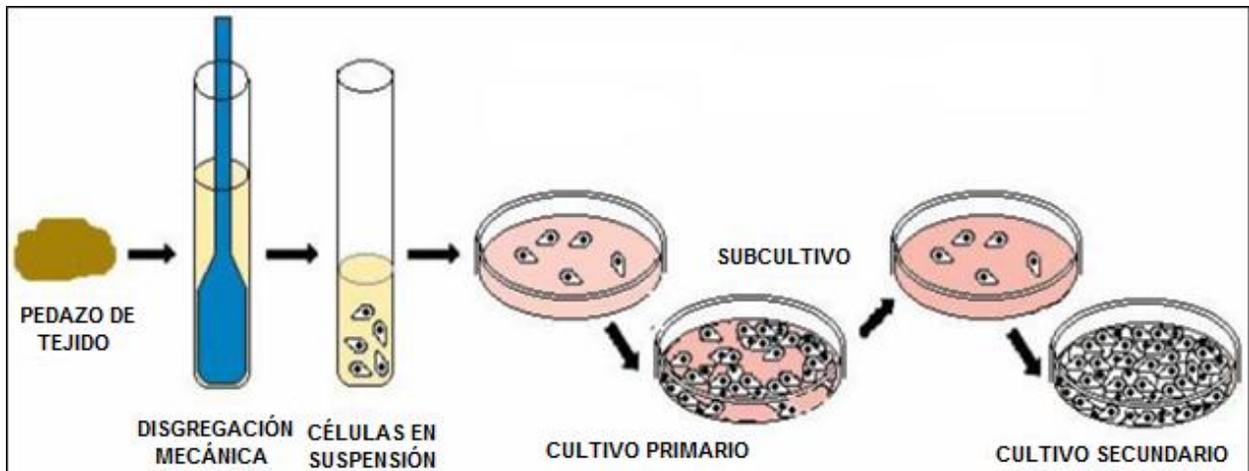


Figura 17. Proceso para el desarrollo *in vitro* de cultivos celulares. (Segretín, 2009).

Una de las formas de crecimiento *in vitro* es el cultivo en monocapa. Cuando las células requieren la adhesión a un sustrato para crecer y dividirse, el crecimiento se realiza en una única capa celular (monocapa). Esta monocapa crecerá hasta alcanzar cerca del 100% de confluencia (máxima capacidad de cubrimiento de superficie); pasado esta etapa, el crecimiento se detiene por inhibición por contacto y las células pueden comenzar a degenerar, despegarse y morir. No obstante, algunas variantes de células tumorales son capaces de “apilarse” y dar lugar a multicapas.

12.2. TIPOS DE CÉLULAS EMPLEADAS EN NANOTOXICOLOGÍA.

Para determinar la toxicología de las nanopartículas, es necesario conocer el modo de exposición, la vía de entrada y los procesos de adsorción, distribución y eliminación de las nanopartículas dentro del organismo. (Gálvez, 2010).

De acuerdo con lo anterior se pueden utilizar diferentes tipos de células, dependiendo del tipo de daño que se pretenda evaluar. Algunas células humanas que se pueden utilizar en nanotoxicología son las células HeLa las cuales son un tipo de células inmortales usadas en investigación, son el linaje más antiguo derivan de una muestra de cáncer cérvico-uterino, así como células de hígado (Huh-7), cerebro (A-172), estómago (MKN-1), pulmón (A-549), y riñón (HEK293). (Kyung, 2007).

También se pueden utilizar líneas celulares de animales como las células VERO (células epiteliales de riñón de mono verde Africano) y GH3 (tumor de hipófisis de rata).

12.3. MANTENIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES.

Las células se cultivan generalmente en recipientes (cajas Petri, multiplacas, Frascos de Roux) con un medio de cultivo suplementado y se mantienen a una apropiada temperatura

y mezcla de gases (habitualmente, 37°C, 5% CO₂ y 95% O₂) en un incubador celular. Las condiciones de cultivo varían ampliamente para cada tipo celular.

Además de la temperatura y la mezcla de gases, el factor más comúnmente variado en los sistemas de cultivo es el medio de crecimiento. Las recetas para los medios de crecimiento pueden variar en pH, concentración de glucosa, factores de crecimiento y la presencia de otros componentes nutritivos. Los factores de crecimiento usados para suplementar a los medios derivan a menudo de sangre animal, como el suero bovino. También pueden añadirse antibióticos al medio de cultivo, para evitar contaminaciones.

12.4. MANIPULACIÓN DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO.

Al estar generalmente las células en continua división durante el cultivo, es normal que crezcan hasta ocupar toda el área o volumen disponible. Esto puede generar varios problemas:

- Agotamiento de los nutrientes del medio
- Acumulación de células apoptóticas o necróticas
- Inhibición de la división celular por contacto: los contactos entre células pueden desencadenar un arresto del ciclo celular
- Diferenciación celular promiscua provocada por los contactos intercelulares

Estos problemas pueden afrontarse mediante métodos de cultivo celular en esterilidad. El objetivo de estos métodos es evitar la contaminación con bacterias o levaduras que competirían por los nutrientes y/o podrían infectar y así eliminar las células. Toda manipulación se lleva a cabo, típicamente, en una campana de flujo laminar para evitar la entrada de microorganismos contaminantes.

Entre las manipulaciones más comunes llevadas a cabo en cultivos celulares, se encuentran los cambios de medio y el pase de las células.

12.4.1. Cambios de medio

El objetivo de los cambios de medio es renovar los nutrientes y evitar la acumulación de productos metabólicos potencialmente tóxicos y de células muertas. En el caso de las suspensiones celulares, las células se separan del medio mediante centrifugación y se re-suspenden en medio fresco. En los cultivos adherentes, el medio puede eliminarse directamente mediante aspiración y reemplazarse por el fresco.

12.4.2. Pase de las células

El pase de las células supone transferir un pequeño número de células a un nuevo recipiente. Las células pueden cultivarse más tiempo si se pasan regularmente, ya que así se evita la senescencia asociada a situaciones prolongadas de alta densidad celular.

Con cultivos en suspensión el pase se hace fácilmente, tomando una pequeña cantidad de cultivo que contenga unas pocas células y diluyéndola en un volumen mayor de medio fresco. En cultivos adherentes, las células han de ser inicialmente despegadas; esto se efectúa comúnmente con una mezcla de tripsina y EDTA. Un pequeño número de las células despegadas pueden sembrarse en un nuevo recipiente con medio de cultivo fresco.

12.4.3. Almacenamiento de células.

Las células procedentes de cultivos primarios o de líneas celulares establecidas pueden almacenarse durante largos períodos de tiempo en temperaturas bajo cero. Para ello se utilizan sistemas criogénicos.

Uno de los métodos de preservación por tiempo indefinido de células es por medio de la congelación en nitrógeno líquido. Los pasos cruciales dependen de adecuadas velocidades de congelamiento y descongelamiento de las células. Para congelar las células los protocolos más exitosos bajan la temperatura lentamente hasta los $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ evitando de esta manera la formación de cristales intracelulares que pudieran dañar a las células. Cuando la temperatura se baja bruscamente la velocidad de formación de cristales intracelulares se incrementa y la viabilidad decae en forma considerable. En la preparación se incluye, además, un agente que limita la cristalización, como el dimetil sulfóxido (DMSO). Para el descongelado en cambio, se incrementa abruptamente la temperatura para evitar que las células sufran grandes cambios de volumen y estallen.

13.OBJETIVOS.

13.1. OBJETIVO GENERAL.

- Evaluar la capacidad citotóxica *in vitro* de diferentes sistemas nanoparticulados a base SiO₂/PECA por medio de las técnicas de MTT, TBARS y GSH.

13.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

- Implementar un método de elaboración de nanopartículas fabricadas a base de SiO₂ y PECA así como de sistemas nanoparticulados híbridos obtenidos con ambos compuestos.
- Realizar la caracterización de los sistemas nanoparticulados obtenidos mediante microscopia electrónica de transmisión, microscopia electrónica de barrido, estimación del potencial Z y la determinación de tamaño de partícula.
- Establecer un diseño experimental para evaluar la citotoxicidad *in vitro* en la línea celular VERO, con el fin de evaluar, la viabilidad celular, la estimación de especies reactivas de oxígeno (TBARS) y la concentración de GSH con objeto de estimar en base al tipo de nanopartícula estudiada si existe una susceptibilidad específica significativa.

14. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando la variedad de aplicaciones en las Nanociencias y la Nanotecnología, se han creado expectativas amplias y el impacto e importancia del progreso en diferentes áreas como la medicina, energía y medio ambiente; han orientado esfuerzos en diversos proyectos de investigación en el área de las Ciencias de la Salud. Al respecto, se sugiere que los sistemas nanoestructurados pudieran comprometer la función celular ejerciendo efectos tóxicos. Aunado a esto, las evidencias muestran diferencias fisicoquímicas específicas de los materiales que conforman a las nanopartículas comparativamente con su estado inicial. Con esta necesidad en mente y considerando que en los últimos años, el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos ha cobrado gran importancia y en muchos de los casos, la información relacionada a su potencial tóxico es escasa.

En el presente proyecto se implementó un método de elaboración de nanopartículas a partir de SiO₂ y PECA, así como sistemas híbridos obtenidos de su mezcla; una vez caracterizados, estudiamos la toxicidad *in vitro* asociada a la exposición de las nanopartículas obtenidas.

Un paso de suma importancia en este proyecto es la caracterización fisicoquímica de los sistemas nanoparticulados fabricados ya que con esto se puede tener una idea más clara de cómo es su estructura, forma y tamaño, así como características que puedan hablarnos sobre su estabilidad y concentración para estimar quizá si existe alguna asociación con los efectos tóxicos evaluados.

Con todo lo anterior se pretende demostrar si hay consecuencias al exponer las nanopartículas obtenidas y caracterizadas a sistemas experimentales *in vitro* como lo es la línea celular VERO derivada de riñón. Actualmente las regulaciones al respecto de estudios en Nanotoxicología para algunos casos son escasas o se están creando. A pesar de esto es importante estudiar los efectos *in vitro* e *in vivo* asociados a la exposición de nanomateriales y de nanoestructuras.

En el área es necesario demostrar si los materiales con los que se elaboran estas estructuras conservan la inocuidad obligada ya que se ha demostrado que sus propiedades fisicoquímicas pueden ser diferentes una vez fabricados. Esto genera una controversia porque hay científicos que piensan que los materiales usados para fabricar los sistemas nanométricos, no están en una cantidad importante como para causar un daño al organismo y por otra parte hay investigadores que están convencidos de que aún en las cantidades usadas, estos sistemas puedan traer problemas de toxicidad importantes.

15.MATERIALES Y MÉTODOS

15.1. MATERIALES

15.1.1. Preparación de nanopartículas

- Dióxido de silicio (*Sigma-Aldrich*)
- Tripolifosfato 96.2% (*Procter & Gamble Manufactura*)
- Etil 2-cianoacrilato (*Aldrich*)
- Pluronic F-68 (*Sigma-Aldrich*)
- Ácido acético glacial (*J.T. Baker*)

15.1.2. Cultivos celulares

- Buffer de fosfatos
- Pen Strep (Penicilin Streptomycin) (*GIBCO*)
- Suero Fetal Bovino (FBS) (*GIBCO*)
- L-Glutamine 200 mM 100X (*GIBCO*)
- Aminoácidos no esenciales MEM (MEM NEAA) (*GIBCO*)
- Advanced DMEM (Dilbecco's Modified Eagle Medium) 1X (*GIBCO*)
- Para la preparación de PBS:
 - Fosfato de potasio monobásico 99.2% (*J. T. Baker*)
 - Fosfato dibásico de sodio 99-100.5% (*J. T. Baker*)
 - Cloruro de sodio 99.5% (*Prod. Quim. Monterrey*)
 - Cloruro de potasio 100% (*J. T Baker*)

15.1.3. Ensayo de la reducción del MTT.

- 2-Propanol $\geq 99\%$ (*Sigma*).
- Detergente biológico Nonidet P40 Substitute Biochemika (*Fluka*).
- MTT (thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) 97.5% TLC (*Sigma*).

15.1.4. Ensayo de cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

- Ácido perclórico (*J. T. Baker*).
- Detergente biológico Tritón
- Malondialdehído (MDA) bis (dimetyl acetal) 99% (*Aldrich*).
- Ácido 2-tiobarbiturico $\geq 98\%$ (*Sigma-Aldrich*).

15.1.5. Ensayo de cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.

- Albúmina sérica bovina Molecular Biology Tested (*Sigma*).
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate (*BIO RAD*).

15.1.6. Ensayo de cuantificación de Glutación reducido (GSH).

- Glutación Reducido (*Sigma-Aldrich*).
- Ortoftaldehído (OPT) (*Sigma-Aldrich*).

15.1.7. Soluciones.

- Medio de cultivo DMEM Advanced GIBCO suplementado con L-Glutamina 0.04M, SFB al 5% y 1% de Antibiótico Streptomycin Penicillium.
- Buffer de Fosfatos pH=7.2- 7.4.
- MTT una concentración de 5 mg/ml
- Solución de ácido clorhídrico al 0.04N con 1% de Nonidet en Alcohol isopropílico de uso biológico
- PBS con 1% de Tritón
- Ácido Perclórico 0.5M
- Ácido Tiobarbitúrico al 0.67%
- Reactivo de Bradford (Protein Assay Dye Reagent Concentrate)
- Stock de Albúmina sérica Bovina 1 mg/ml
- Stock de Malondialdehído (MDA) 0.01M

15.1.8. Equipos.

- Agitador magnético MRC
- Agitador mecánico Homogenizer Glas-Col Variable Speed Reversible
- Balanza analítica Sartorius BL 120S
- pHmetro OAKTON Ph 510 series pH/mV/°C meter
- Incubadora para cultivos celulares Shel Lab CO₂ Incubator
- Campana de flujo laminar Industrias Figursa Mod. CFV-90
- Centrifuga Roto-Uni II BHG
- Microcentrífuga con control de temperatura Microfuge 22R Centrifuge Beckman Coulter
- Ultrasonido Ultrasonic Processor Mod. CPX 130 Cole Parmer
- Vórtex Vortex-2 Gene Scientific Industries
- Microscopio Electrónico de Barrido JEOL Mod. 25SII.
- Microscopio Electrónico de Transmisión JEM 2010.
- Zetasizer Nanoseries (*MALVERN*).
- Fluorómetro (*BIORAD*).
- Lector de placa Multiskan Ascent Labsystem.
- Espectrofotómetro Varian Cary 100.

15.1.9. Modelos experimentales.

1. Línea celular VERO ATCC Catalog No. CCL-81TM. (Riñon de Mono Verde Africano).

15.2. MÉTODOS.

15.2.1. Preparación de nanopartículas.

Se elaboraron 5 sistemas de nanopartículas con dos diferentes materiales Dióxido de silicio (SiO₂) y polietilcianocrilato (PECA), al igual que se elaboró una solución control. La solución control y los sistemas de elaboraron como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Elaboración de solución control y sistemas nanoparticulados.

	Control	Sistema SiO ₂	Sistema PECA	Sistema SiO ₂ /PECA	Sistema 1 PECA/SiO ₂	Sistema 2 PECA/SiO ₂
Ácido acético al 1 %	300 ml	300 ml	300 ml	300 ml	300 ml	300 ml
Pluronic F-68	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %	1 %
SiO ₂	---	0.1 %	----	0.1 %	0.1 %	0.1 %
PECA	---	----	525 µl	525 µl	525 µl	525 µl

15.2.1.1. Preparación de solución control.

- En un vaso de precipitados de 500 ml se adicionan 300 ml de ácido acético al 1% y 3 g. de Pluronic F-68 pesados en balanza analítica, dejar hasta total hidratación.
- Una vez hidratado el tensoactivo se mezcla hasta que todo se encuentre incorporado.
- La solución preparada se deposita en un recipiente de plástico, se etiqueta con nombre, fecha de elaboración y se mantiene en refrigeración.

15.2.1.2. Preparación de sistema de nanopartículas de SiO₂.

- En un vaso de precipitados de 500 ml se adicionan 300 ml de ácido acético al 1%.
- Pesar en balanza analítica 3 g. de Pluronic F-68 y 0.3 g. de SiO₂.
- Adicionar el tensoactivo y dejar hasta total hidratación.
- Adicionar lentamente y con agitación 0.3 g. de SiO₂.

-
-
- Agitar con propela durante 1 hora.
 - La solución preparada se deposita en un recipiente de plástico, se etiqueta con nombre, fecha de elaboración y se mantiene en refrigeración.

15.2.1.3. Preparación de sistema de nanopartículas de PECA.

- En un vaso de precipitados de 500 ml se adicionan 300 ml de ácido acético al 1%.
- Pesar en balanza analítica 3 g. de Pluronic F-68, adicionarlo y dejar hasta total hidratación.
- Adicionar lentamente gota por gota y con agitación 525 μ l de PECA, los cuales se toman con pipeta automática.
- Agitar con propela durante 1 hora.
- La solución preparada se deposita en un recipiente de plástico, se etiqueta con nombre, fecha de elaboración y se mantiene en refrigeración.

15.2.1.4. Preparación de sistema de nanopartículas de SiO₂/PECA.

- En un vaso de precipitados de 500 ml se adicionan 300 ml de ácido acético al 1%.
- Pesar en balanza analítica 3 g. de Pluronic F-68, adicionarlo y dejar hasta total hidratación.
- Adicionar lentamente y con agitación 0.3 g. de SiO₂.
- Agitar con propela durante 30 minutos.
- Adicionar lentamente gota por gota y con agitación 525 μ l de PECA, los cuales se toman con pipeta automática.
- Agitar con propela durante 1 hora.
- La solución preparada se deposita en un recipiente de plástico, se etiqueta con nombre, fecha de elaboración y se mantiene en refrigeración.

15.2.1.5. Preparación de sistema 1 nanopartículas de PECA/SiO₂.

- En un vaso de precipitados de 500 ml se adicionan 300 ml de ácido acético al 1%.
- Pesar en balanza analítica 3 g. de Pluronic F-68, adicionarlo y dejar hasta total hidratación.
- Adicionar lentamente gota por gota y con agitación 525 μ l de PECA, los cuales se toman con pipeta automática.
- Agitar con propela durante 30 minutos.
- Adicionar lentamente y con agitación 0.3 g. de SiO₂.
- Agitar con propela durante 1 hora.

-
- La solución preparada se deposita en un recipiente de plástico, se etiqueta con nombre, fecha de elaboración y se mantiene en refrigeración.

15.2.1.6. Preparación de sistema 2 de nanopartículas de PECA/SiO₂.

- En un vaso de precipitados de 500 ml se adicionan 300 ml de ácido acético al 1%.
- Pesar en balanza analítica 3 g. de Pluronic F-68, adicionarlo y dejar hasta total hidratación.
- Adicionar lentamente gota por gota y con agitación 525 µl de PECA, los cuales se toman con pipeta automática.
- Adicionar lentamente y con agitación 0.3 g. de SiO₂.
- Agitar con propela durante 1 hora.
- La solución preparada se deposita en un recipiente de plástico, se etiqueta con nombre, fecha de elaboración y se mantiene en refrigeración.

15.2.2. Preparación de muestras para caracterización de nanopartículas.

Una vez que se realizaron los diferentes sistemas de nanopartículas, para el caso de SEM se fijaron un par de gotas de cada solución de nanopartículas, dejándose secar a temperatura ambiente evitando cualquier contacto con polvo.

Para el caso de TEM se mandó 2 ml de cada solución al Laboratorio de Microscopía en la Facultad de Química.

Con respecto al tamaño de partícula y potencial Z se mandó 2 ml de cada solución al laboratorio de *Psicofarma S. A. de C. V.* donde se realizó las determinaciones con un equipo *Zetasizer*.

15.2.3. Acondicionamiento de las nanopartículas para los cultivos celulares.

Los diferentes sistemas y la solución control se filtraron por gravedad con papel filtro, después se filtraron por membranas *Whatman de 0.45 µm*, las cuales se adaptaron a jeringas de 5 ml para ayudar a pasar las soluciones. Para esterilizar los sistemas se utilizó un sistema de filtración el cual funciona a vacío (*sistema esterifil de Millipore figura*), previamente a su uso se esterilizó en autoclave. La solución control y los sistemas se filtraron por una membrana de nitrato de celulosa de *0.2 µm*, todo en condiciones estériles. Estas condiciones se lograron colocando dos mecheros de bunsen a los lados del sistema de filtración. Una vez lleno el contenedor del sistema de filtración se transfirió la solución en tubos de plástico estériles de 50 ml, esto se realizó en la campana de flujo laminar. Los tubos se sellaron con papel parafilm y se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización.

Una vez estériles los sistemas y la solución control se adicionaron en dos dosis a los cultivos celulares. La dosis alta de 100 μ l y la dosis baja de 10 μ l.



Figura 18. Sistema de esterilización por filtración.

15.2.4. Cálculo del peso de las nanopartículas de cada sistema.

Se mantuvieron 5 viales limpios en un desecador, los cuales se pesaban periódicamente hasta que se llegó a un peso constante. Una vez que se obtuvo se adicionaron 3 ml de cada sistema a cada uno de los viales, estos se mantuvieron en un desecador dentro de una incubadora, una vez que se evaporó el líquido se pesaron diariamente hasta que el peso se mantuvo constante. Para obtener el peso de las nanopartículas de cada sistema se realizó la resta del peso final menos el peso inicial de cada vial.

15.2.5. Mantenimiento de los cultivos celulares.

Se sembraron células VERO en suspensión en cajas Petri a las cuales se les añadió medio Advanced DMEM suplementado al 5 % con suero fetal bovino (Invitrogen), 1 % de penicilina-estreptomicina y 1 % de glutamina. Después de aproximadamente 48 horas de incubación se llegó a un estado de confluencia y posteriormente fueron tripsinizadas para recuperar las células y realizar subcultivos en placas de pozos. Las condiciones de incubación fueron a 37° C, 5% de ambiente de CO₂ y 90 % de humedad relativa en completa esterilidad. La

exposición a las nanopartículas se realizó cuando las células llegaron a estado de confluencia en las placas de 6 o 12 pozos, las placas que contienen las células se colocaron en una campana de flujo laminar para mantener estériles los cultivos, una vez marcados los pozos para dosis alta y dosis baja se adicionaron a cada uno los sistemas; ya con las nanopartículas se incubaron de nuevo las placas bajo las mismas condiciones de crecimiento y dependiendo la prueba fue el tiempo de exposición.

15.2.6. Ensayo de viabilidad celular reducción del MTT

Este ensayo se realizó en placas de 12 pozos, cada pozo contiene las células las cuales deben de estar en un 90-95 % de confluencia. La exposición a las nanopartículas se realiza por duplicado de cada sistema, a las 2 horas de haber agregado las nanopartículas se adiciono a cada pozo 10 µl de MTT y se siguió incubando por 4 horas más a 37° C. Al termino de este tiempo se agregó 1ml de alcohol isopropílico (HCl 4mM, Nonident 0.1 %) y se agitaron las placas a 150 rpm/10min con el fin de extraer el azul de formazán. La lectura se realizó en un espectrofotómetro a una $\lambda=590$ nm.

Para calcular el porcentaje de viabilidad celular se utilizó la fórmula:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{(\text{Abs de la muestra})}{(\text{Abs del blanco})} \times 100$$

15.2.7. Ensayo de cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Se realizó en placas de 6 pozos, cada pozo contiene las células las cuales deben de estar en un 90-95 % de confluencia. Una vez que fueron agregadas las nanopartículas el tiempo de exposición fue 6 horas, pasado el tiempo se cosecharon las células, se retiró el medio de cada pozo y se lavó 2 veces con PBS frio; se agregó 1 ml de PBS y se rasuro cada pozo con el fin de desprender la monocapa de células. La suspensión celular se colocó en tubos eppendorf, se centrifugo para retirar el sobrenadante y el botón se re suspendió con 200 µl de PBS 1X pH=7.4. Posteriormente se sonicó y centrifugo, del sobrenadante se tomaron 20µl para determinación de proteínas totales.

En un tubo eppendorf se colocaron 180µl del mismo sobrenadante y se agregaron 180µl de ácido perclórico 2.5 % se dejó incubando 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugo y el sobrenadante se colocó en otro tubo adicionándole 360 µl de ácido tiobarbitúrico 0.67 %, los cuales se incubaron a 90° C/30min. La lectura se realizó en microplaca a 540 nm.

Para la determinación de TBARS y proteínas totales, se realizó curvas de calibración. Para el caso de TBARS se utilizó un stock de Malonaldehído (MDA) y para la determinación de proteínas totales se utilizó un stock de albúmina sérica bovina (BSA). Con estas curvas se logró obtener los resultados expresados en *mmol de TBARS / mg de proteínas totales en las células*.

Curva de calibración de Ácido Tiobarbitúrico.

El stock utilizado para esta curva fue de Malonaldehído (MDA) preparándose a una concentración 0.01 M el cual se protegió de la luz. De la solución stock se realizó una dilución 1/10000 (25 µl en 250 ml de agua desionizada). La curva de calibración se preparó por duplicado como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Curva de calibración de MDA

Tubo	µl de MDA	µl de H2O	µl de TBA
1	0	250	250
2	3	247	250
3	5	245	250
4	10	240	250
5	30	220	250
6	50	200	250
7	70	180	250
8	100	150	250
9	150	100	250
10	180	70	250
11	200	50	250
12	250	0	250

Después de haber preparado cada tubo se dejaron incubando a 90°C/30 min. La lectura se realizó en microplaca a 540 nm.

15.2.8. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.

A los 20 µl que se separaron de cada muestra de TBARS se les adiciono 180 µl de PBS. La lectura se realizó en microplaca donde en cada pozo se adicionaron 40 µl de muestra y 160 µl de reactivo de Bradford (1:4), se dejó incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos, lectura a 620 nm.

Curva de calibración para proteínas totales.

Para la curva de calibración se preparó un stock de Albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1 mg/ml. Los sistemas para realizar la curva se prepararon por duplicado y como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Curva de calibración de BSA

Tubo	BSA (μ l)	PBS (μ l)
1	0	1000
2	10	990
3	20	980
4	40	960
5	60	940
6	80	920
7	100	900
8	120	882

Después de preparar los sistemas se adicionaron 40 μ l de cada sistema y 160 μ l de reactivo de Bradford, se dejó incubando a temperatura ambiente durante 15 minutos y la lectura se realizó a 620 nm.

15.2.9. Ensayo de cuantificación de Glutati3n reducido (GSH).

Se realizó en placas de 6 pozos, cada pozo contiene las células las cuales deben de estar en un 90-95 % de confluencia. Una vez que fueron agregadas las nanopartículas el tiempo de exposición fue 6 horas, pasado el tiempo se cosecharon las células, se retiró el medio de cada pozo y se lavó 2 veces con PBS frío; se agregó 1 ml de PBS y se rasuro cada pozo con el fin de desprender la monocapa de células. La suspensión celular se colocó en tubos eppendorf, se centrifugo para retirar el sobrenadante y el botón se re suspendió con 200 μ l de PBS 1X pH=7.4. Posteriormente se sonicó y centrifugo, del sobrenadante se tomaron 20 μ l para determinación de proteínas totales.

En un tubo eppendorf se colocaron 180 μ l del mismo sobrenadante y se agregaron 180 μ l de ácido percl3rico 2.5 % se dejó incubando 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugo para tomar 200 μ l de sobrenadante de cada muestra y se colocaron en tubos eppendorf color ámbar. A cada tubo se adicionaron 700 μ l de PBS con EDTA manteniéndose en hielo, en oscuridad total a cada muestra se le adicionó 100 μ l de OPT al 1 % se homogenizo y dejó reaccionar durante 15 minutos a

temperatura ambiente. Las lecturas se realizaron en “Gain Bajo” llevándose a cero las unidades de fluorescencia con una blanco (900 μ l PBS/EDTA + 100 μ l de OPT 1 %) antes de realizar las lecturas. Con la curva de calibración de GSH y la cuantificación de proteínas totales se obtuvieron los resultados expresados en *mmol de GSH / mg de proteínas totales en células*.

Curva de calibración de GSH.

Para la curva de calibración se preparó un stock de GSH a una concentración de 50 mM. Los sistemas para la curva se realizaron por duplicado y se prepararon como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Curva de calibración de GSH.

Tubo	μl GSH	μl de OPT	μl de PBS
1	15	100	885
2	30	100	870
3	45	100	855
4	60	100	840
5	75	100	825

La curva se preparó bajo las mismas condiciones que las muestras y la lectura se realizó en “Gain Bajo”.

16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico de cada prueba se realizó 3 repeticiones por duplicado de cada sistema, los gráficos muestran los datos promedios y el error estándar de la media para cada muestra, todos se compararon con un control negativo el cual eran únicamente las células sin ningún tratamiento. El análisis estadístico que se realizó es “Comparación Múltiple de Medias de Tukey” al 95 % de confianza en el programa “OriginPro8” con el cual se puede conocer si hay diferencias significativas entre las pruebas.

17.RESULTADOS Y ANÁLISIS.

17.1. CARACTERIZACIÓN.

17.1.1. Tamaño de Partícula y Potencial Z.

En la tabla 11 se muestran los resultados de tamaño de partícula usando distribución por volumen y potencial Z de cada sistema de nanopartículas. En cuanto al tamaño de partícula en la tabla 11 los sistemas muestran un tamaño similar entre los 4.5-5.5 nm, esta similitud puede deberse al método de elaboración y a que todos los sistemas se hicieron pasar por una membrana para su filtración. Es de gran utilidad conocer el tamaño de partícula ya que al tener tamaños muy pequeños puede existir la posibilidad de que puedan atravesar la membrana celular por la similitud en tamaño a proteínas y anticuerpos. Sin embargo, algunos estudios recientes han demostrado que debido a su tamaño, las nanopartículas no entran libremente a todos los sistemas biológicos, si no que para lograrlo dependen de las moléculas funcionales adicionadas a sus superficies.

Para el caso del potencial Z los valores para los sistemas SiO₂ y Sistema 1 PECA/SiO₂ son más altos que los demás sistemas, lo cual nos indica que tienen una mayor estabilidad, mientras que los demás sistemas son negativos y muy cercanos a cero, lo que puede indicar que las nanopartículas posiblemente muestran un comportamiento de aglomeración y tengan una mala estabilidad, de acuerdo a la tabla 2. La agregación de las partículas es menor en aquellas que tienen un Potencial Z alto ya sea negativo o positivo, debido a la repulsión eléctrica. Sin embargo, esta regla no puede aplicarse estrictamente a los sistemas que contienen estabilizantes, ya que la adsorción de los estabilizantes disminuirá el potencial Z debido al cambio en la superficie de la nanopartícula (Mohanraj, 2006).

Tabla 11. Resultados de nanocaracterización.

Nanopartículas	Potencial Z (mV)	Tamaño de Partícula (nm)
Sistema SiO ₂	20.4	4.597
Sistema PECA	- 4.27	5.012
Sistema SiO ₂ /PECA	- 6.39	5.012
Sistema 1 PECA/SiO ₂	15.40	4.788
Sistema 2 PECA/SiO ₂	-2.14	5.526

17.1.2. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Las siguientes imágenes corresponden a las muestras obtenidas en Microscopio Electrónico de Transmisión de cada sistema de nanopartículas.

En la figuras 19, 20 y 21 se observa que las nanopartículas presentan una estructura esférica y se encuentran un poco dispersas, mientras que en la figura 22 se observa una aglomeración en las nanopartículas.

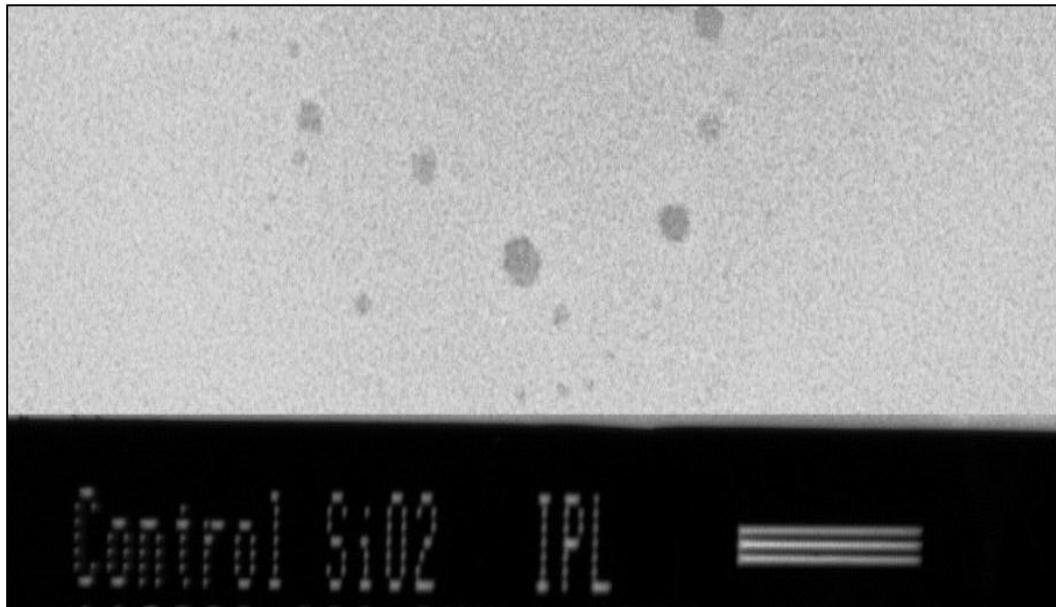


Figura 19. Micrografía de las nanopartículas del Sistema SiO₂ obtenida por TEM.

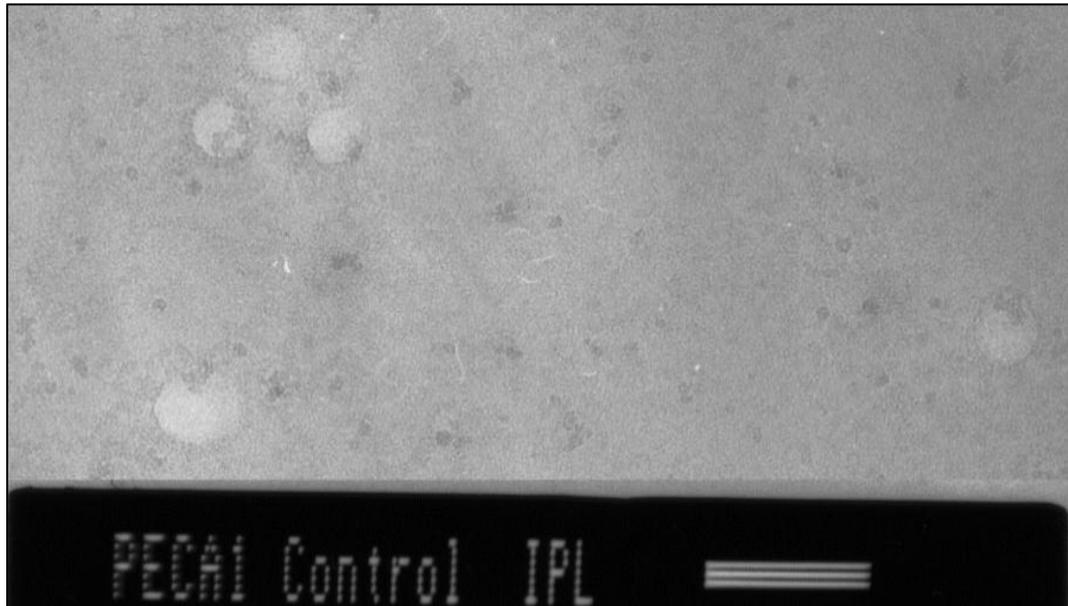


Figura 20. Micrografía de las nanopartículas del Sistema PECA obtenida por TEM.

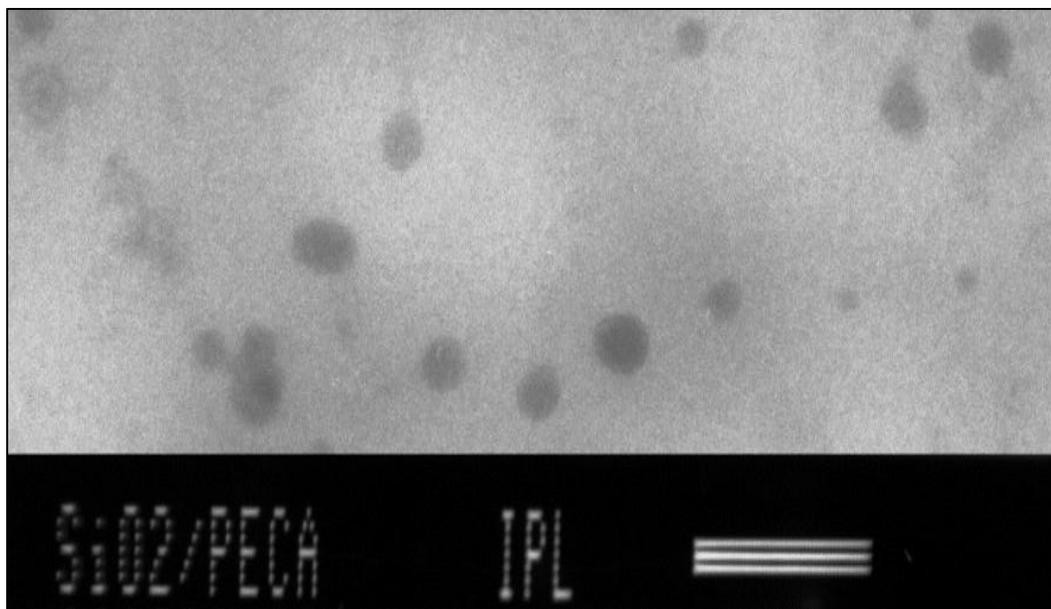


Figura 21. Micrografía de las nanopartículas del Sistema SiO_2/PECA obtenida por TEM.

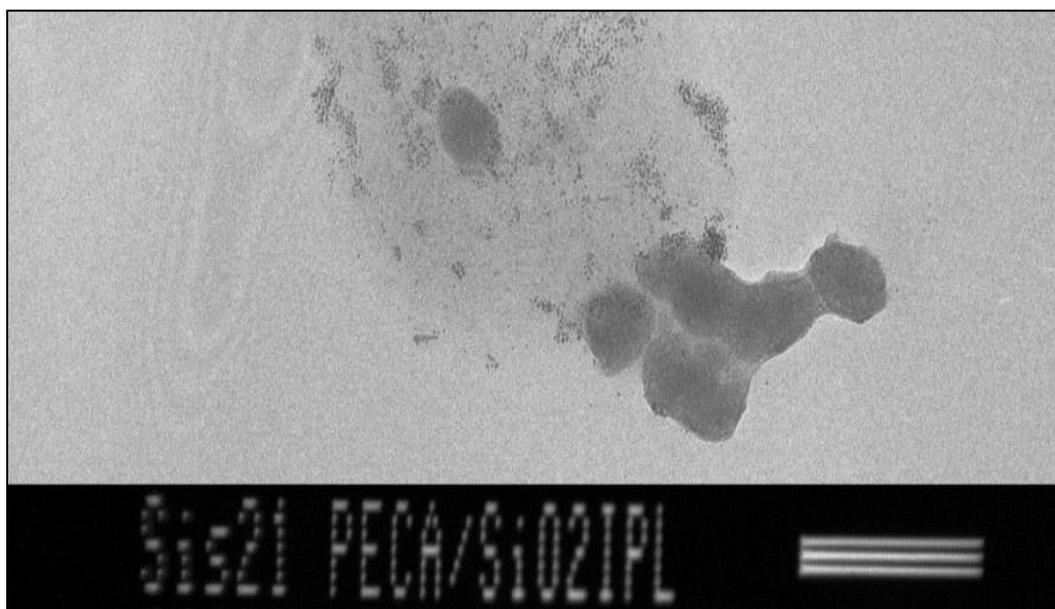


Figura 22. Micrografía de las nanopartículas del Sistema PECA/SiO_2 obtenida por TEM.

17.1.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Las imágenes que se muestran en la parte inferior fueron obtenidas en microscopio electrónico de barrido (SEM) de todos los sistemas de nanopartículas fabricadas. Estas micrografías revelan una imagen tridimensional de las nanopartículas elaboradas, pudiéndose observar más a fondo la superficie que presentan.

Para el caso de las figuras 23 y 25 la forma que presentan las nanopartículas es un poco más esférica a comparación de las figuras 24 y 26 las cuales presentan una forma más irregular.

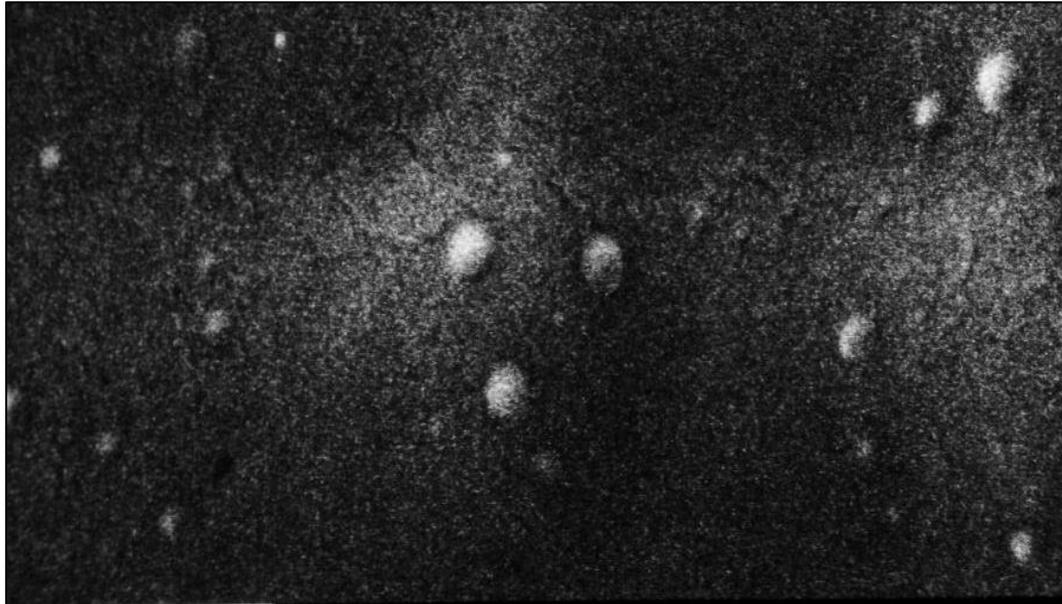


Figura 23. Micrografía de las nanopartículas del Sistema SiO₂ obtenida por SEM.

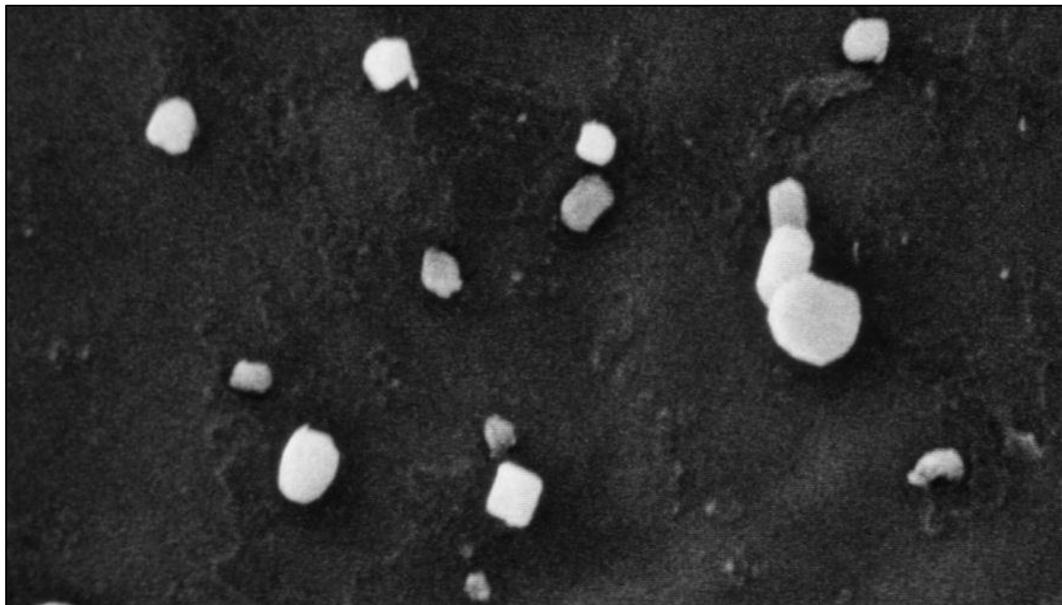


Figura 24. Micrografía de las nanopartículas del Sistema PECA obtenida por SEM.

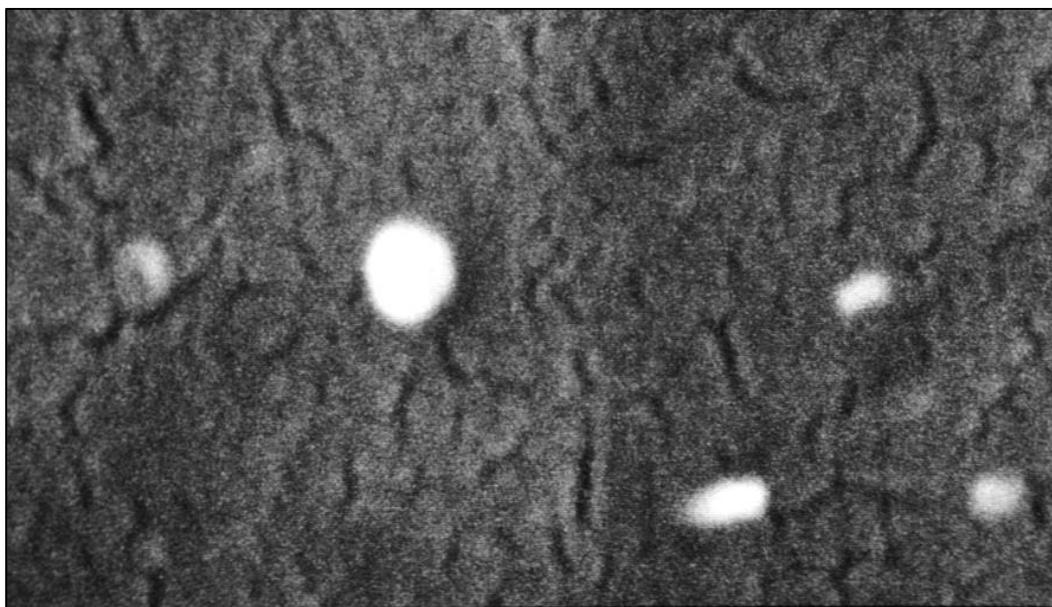


Figura 25. Micrografía de las nanopartículas del Sistema SiO_2/PECA obtenida por SEM.

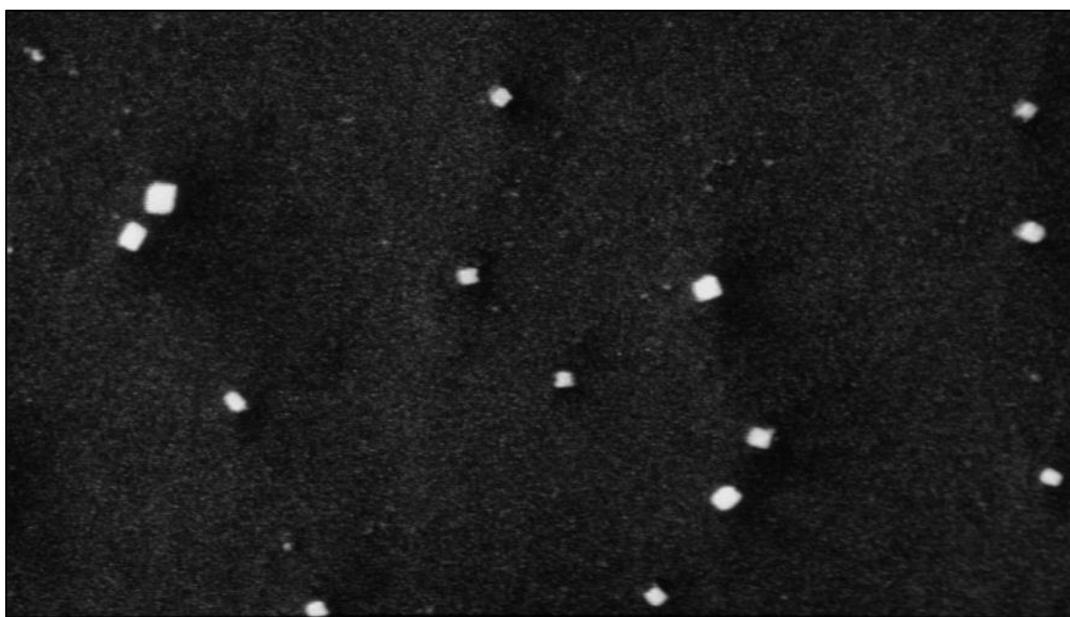


Figura 26. Micrografía de las nanopartículas del Sistema PECA/SiO_2 obtenida por SEM.

17.1.4. Cantidad de nanopartículas de cada sistema.

En la tabla 12 se puede apreciar el total de nanopartículas contenidas en cada sistema, al igual que la cantidad que se adicionó de acuerdo a las dosis (10 y 100 μl) que se manejaron durante el proceso de experimentación. Es de suma importancia conocer estos datos ya que podemos tener una idea de la cantidad de nanopartículas que adicionamos a los medios de cultivos en las diferentes pruebas de citotoxicidad. De

acuerdo a los datos reportados en la tabla se adicionó más cantidad de nanopartículas del sistema 1 PECA/SiO₂ y en menor cantidad las del sistema PECA.

Tabla 12. Cantidad de nanopartículas de cada sistema elaborado.

	mg de nanopartículas/ml	Dosis baja 10µl (mg nanopartículas)	Dosis alta 100 µl (mg nanopartículas)
Sistema SiO ₂	5.6167	0.0562	0.5617
Sistema PECA	4.8500	0.0485	0.4850
Sistema SiO ₂ /PECA	5.7333	0.0573	0.5733
Sistema 1 PECA/SiO ₂	9.0500	0.0905	0.9050
Sistema 2 PECA/SiO ₂	6.8000	0.0680	0.6800

17.2. CITOTOXICIDAD.

17.2.1. Viabilidad Celular (MTT).

El ensayo MTT es de gran utilidad para evaluar la citotoxicidad de los materiales, tiene como propósito conocer la capacidad metabólica mitocondrial de las células control y expuestas, se realizó mediante el ensayo de reducción metabólica del MTT que lleva a cabo la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a formazán.

La capacidad de las células para reducir al MTT es un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular.

En los gráficos 1-5 se muestran los resultados para la prueba de viabilidad celular donde no se encontró diferencia significativa, se puede observar claramente el efecto dosis-respuesta donde a mayor cantidad de nanopartículas agregadas mayor fue el compromiso celular y la viabilidad de las células fue menor.

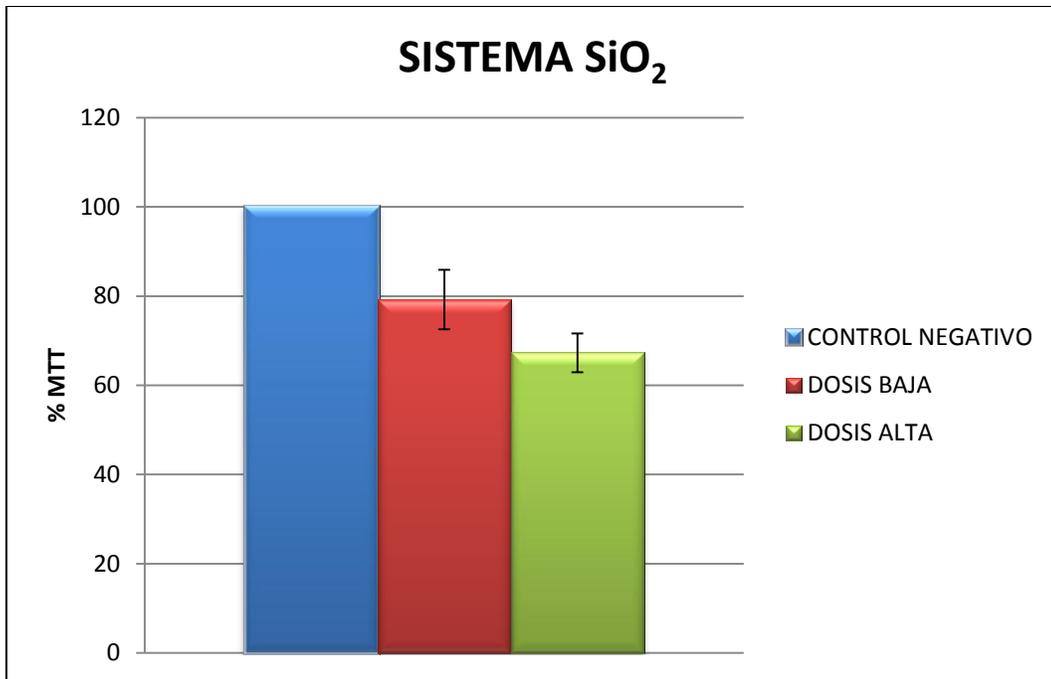


Gráfico 1. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de SiO₂ para porcentaje de viabilidad en células VERO.

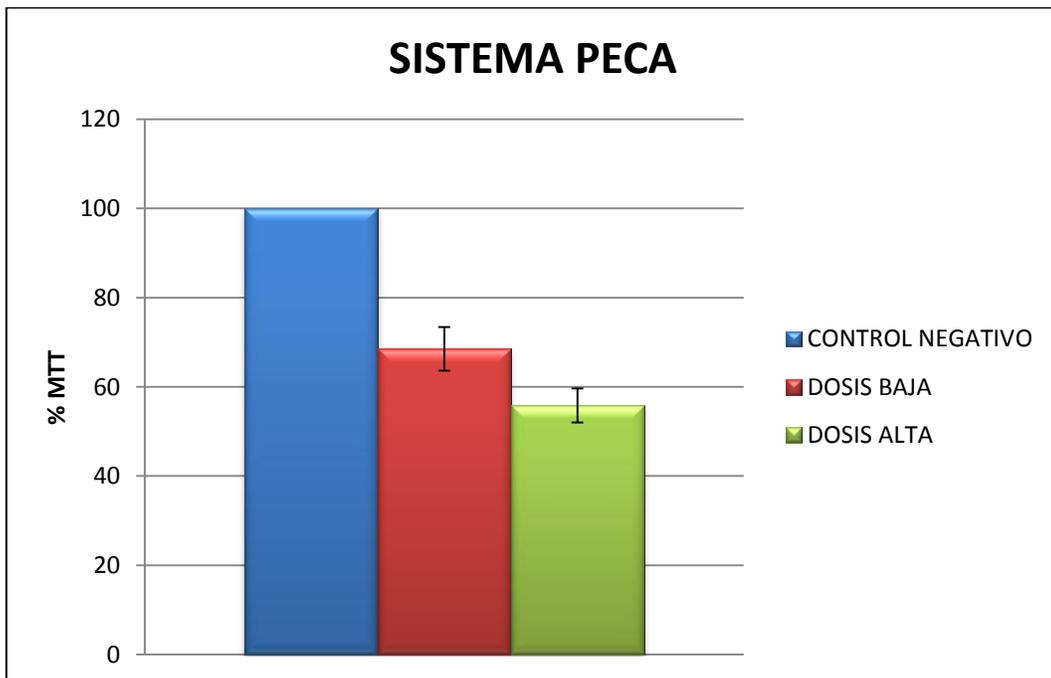


Gráfico 2. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de PECA para porcentaje de viabilidad de células VERO.

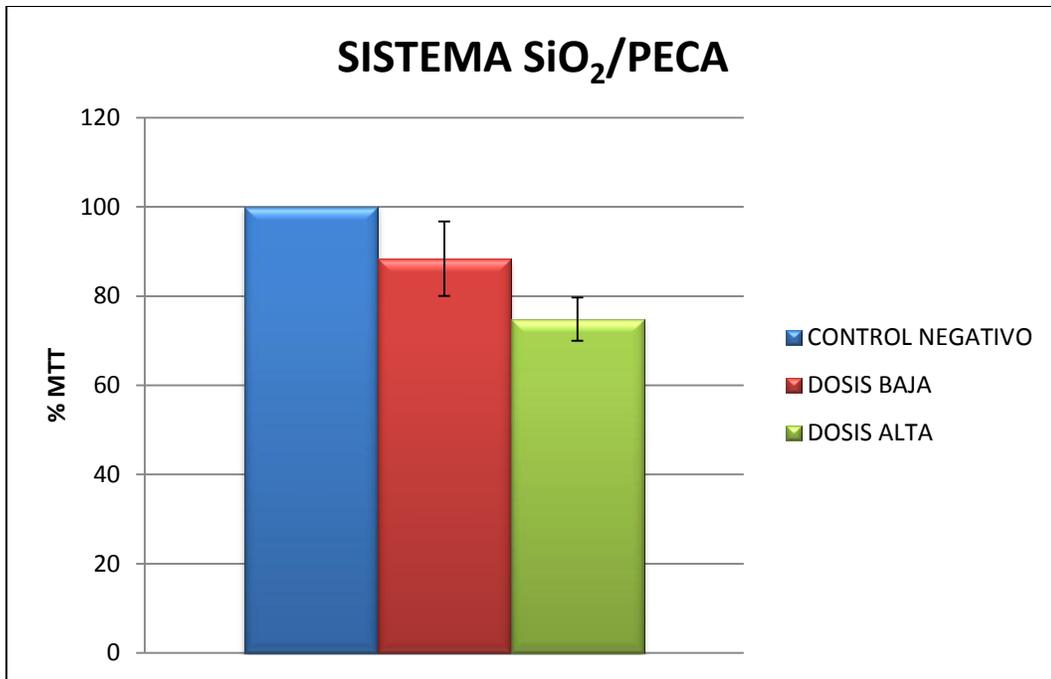


Gráfico 3. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de SiO₂/PECA para porcentaje de viabilidad en células VERO.

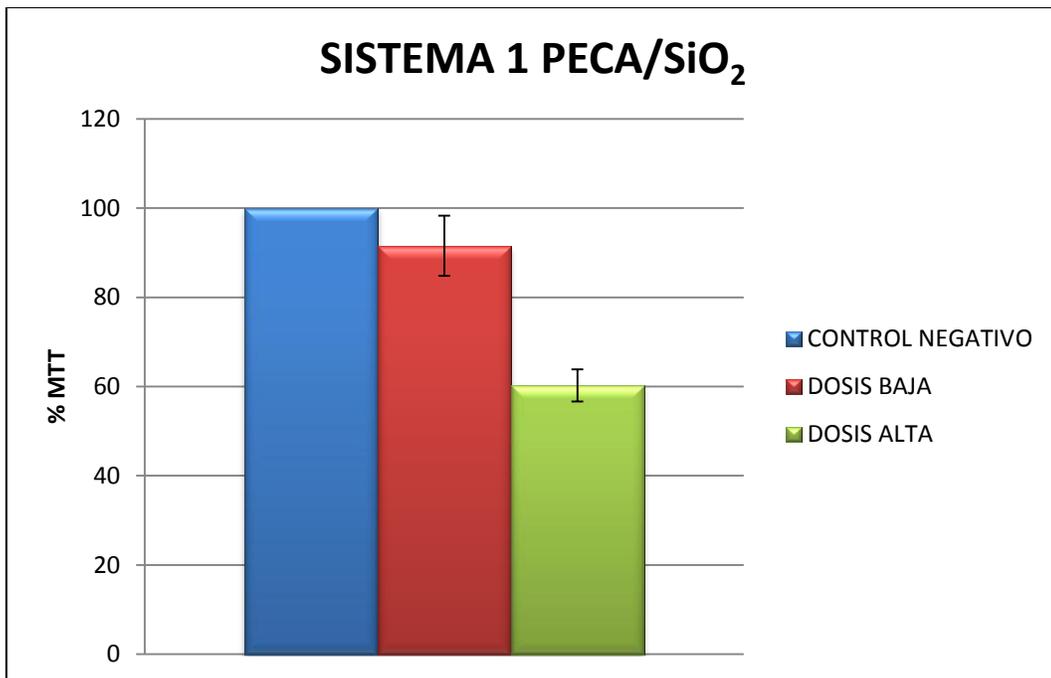


Gráfico 4. Efecto Dosis-Respuesta del sistema 1 de nanopartículas de PECA/SiO₂ para porcentaje de viabilidad en células VERO.

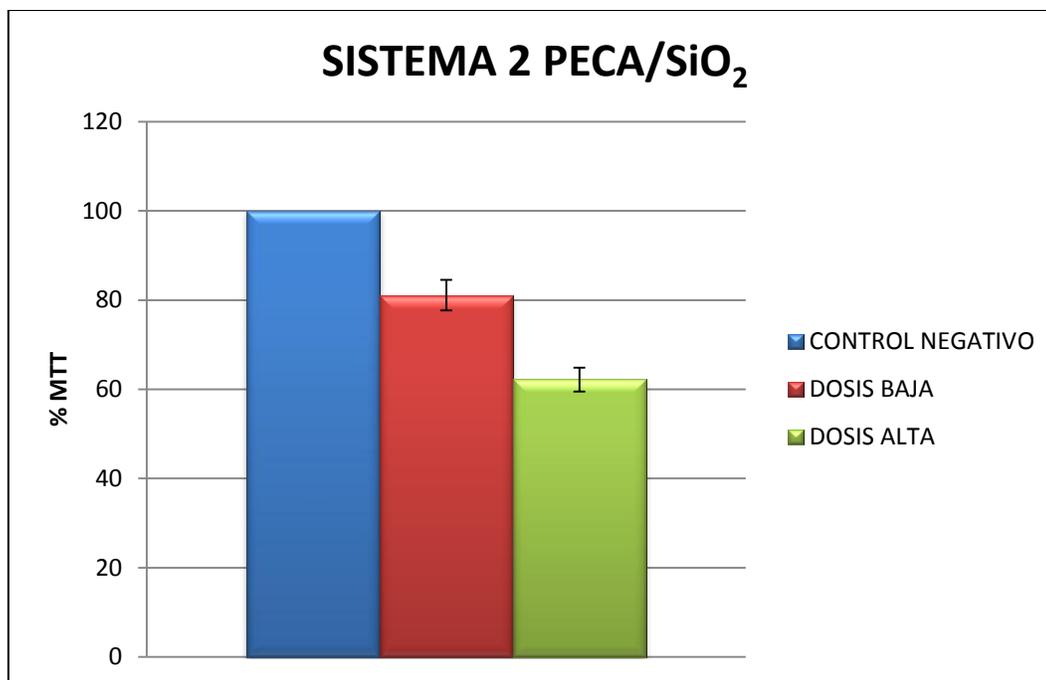


Gráfico 5. Efecto Dosis-Respuesta del sistema 2 de nanopartículas de PECA/SiO₂ para porcentaje de viabilidad en células VERO.

Los resultados del gráfico 6 muestran que para el caso de las dosis bajas evaluadas para cada sistema, las células en todos los casos se consideran viables ya que se tienen valores por encima del 70 %, con excepción del sistema de nanopartículas PECA donde tuvo un valor ligeramente por debajo a el 70 %; la comparación se realizó con respecto a un control negativo (sin exposición a nanopartículas).

En cuanto a las dosis altas para todos los sistemas de nanopartículas evaluados, y que se muestran en el gráfico 7, podemos observar que la viabilidad celular sí se vio afectada con la cantidad de nanopartículas agregadas en cada caso, ya que se tienen valores por debajo del 70 %, siendo el sistema PECA el que presentó mayor proporción de células no viables; sólo el sistema híbrido SiO₂/PECA tuvo un valor por encima del 70 % por lo que se puede considerar que las células se encontraban viables.

Con lo anterior se puede decir que el sistema PECA presentó un mayor efecto en el que se comprometió de manera significativa la viabilidad celular tanto a dosis alta como a dosis baja evaluada, comparativamente con un control negativo.

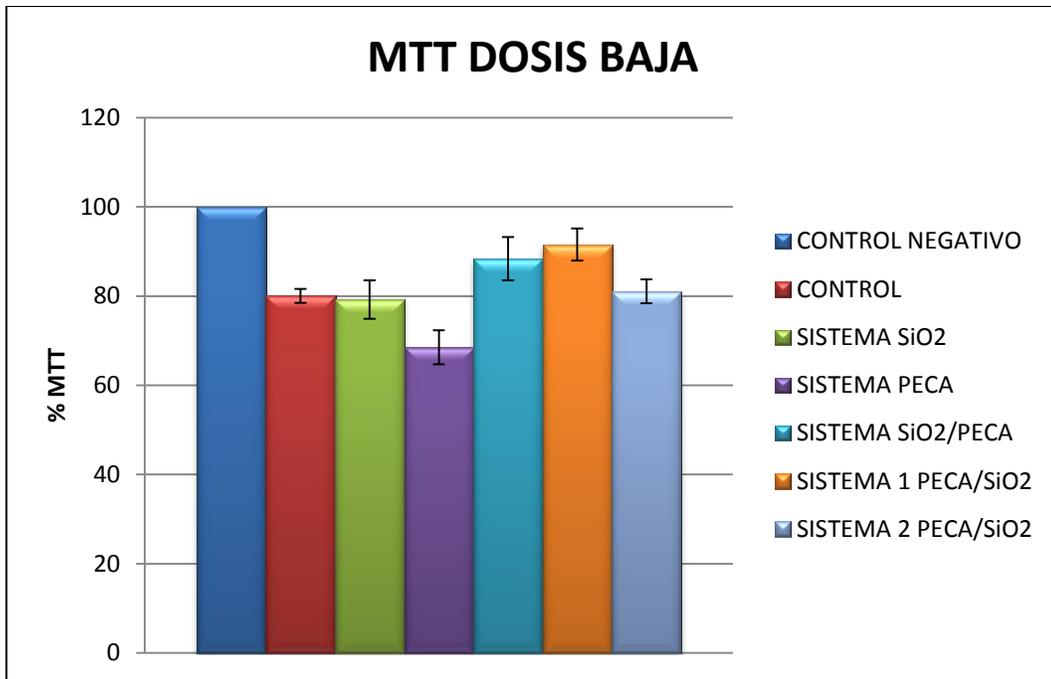


Gráfico 6. Comparación de porcentaje de viabilidad celular entre los diferentes sistemas y controles a dosis baja en células VERO.

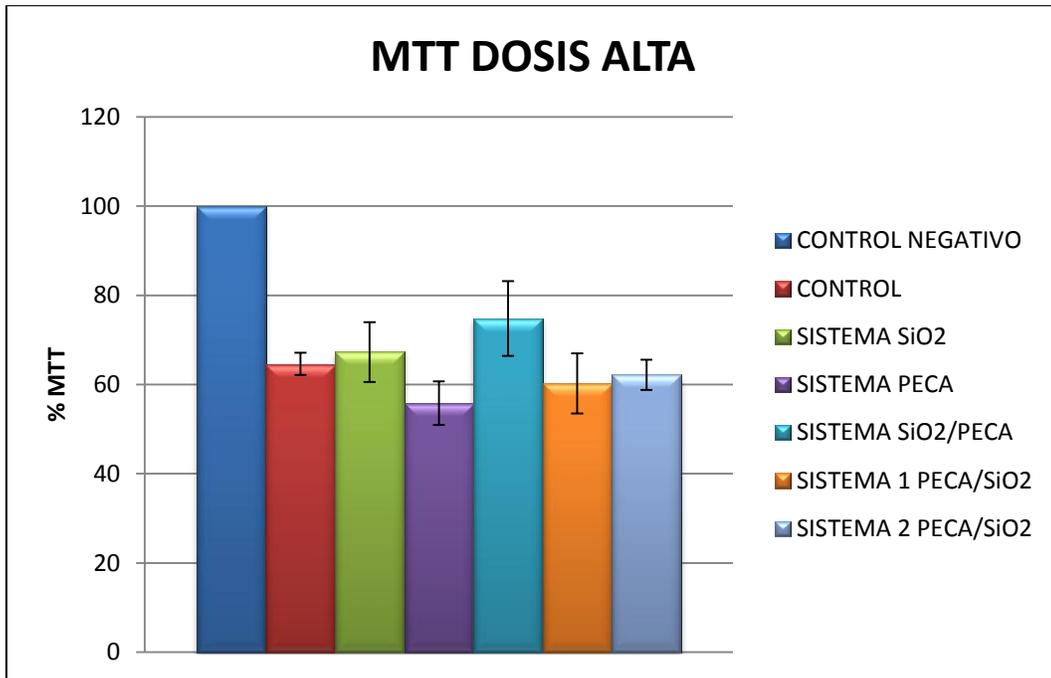


Gráfico 7. Comparación de porcentaje de viabilidad celular entre los diferentes sistemas y controles a dosis alta en células VERO.

17.2.2. Especies Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

El incremento en el estrés oxidativo es un desbalance entre la producción y eliminación de las especies reactivas de oxígeno, que conducen a un aumento en la concentración de radicales libres y en consecuencia al incremento en el daño celular. (Gallardo, 2007).

Las células poseen varios tipos de mecanismos antioxidantes, los cuales evitan o minimizan el daño provocado por los radicales libres. El estrés oxidativo se caracteriza principalmente por el daño a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. Cuando los radicales libres reaccionan con ellos, se produce un metabolito final conocido como malondialdehído (MDA), (Gutiérrez, 2008); de tal manera que la concentración sérica de MDA es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados y, por lo tanto, un buen indicador de peroxidación lipídica celular (Montoya, 2008).

Para la medición de la concentración de peroxidación lipídica en células se utilizó el método del ácido tiobarbitúrico (TBA), como se observa en los gráficos 8-12 hay una relación dosis-respuesta significativa, es decir, con el aumento de la dosis de cada sistema de nanopartículas se incrementa la concentración de TBARS. Para el caso de las dosis altas de todos los sistemas incluyendo el control (medio de dispersión de las nanopartículas) se observó que si hay diferencia estadística significativa con respecto al control negativo (células sin exposición).

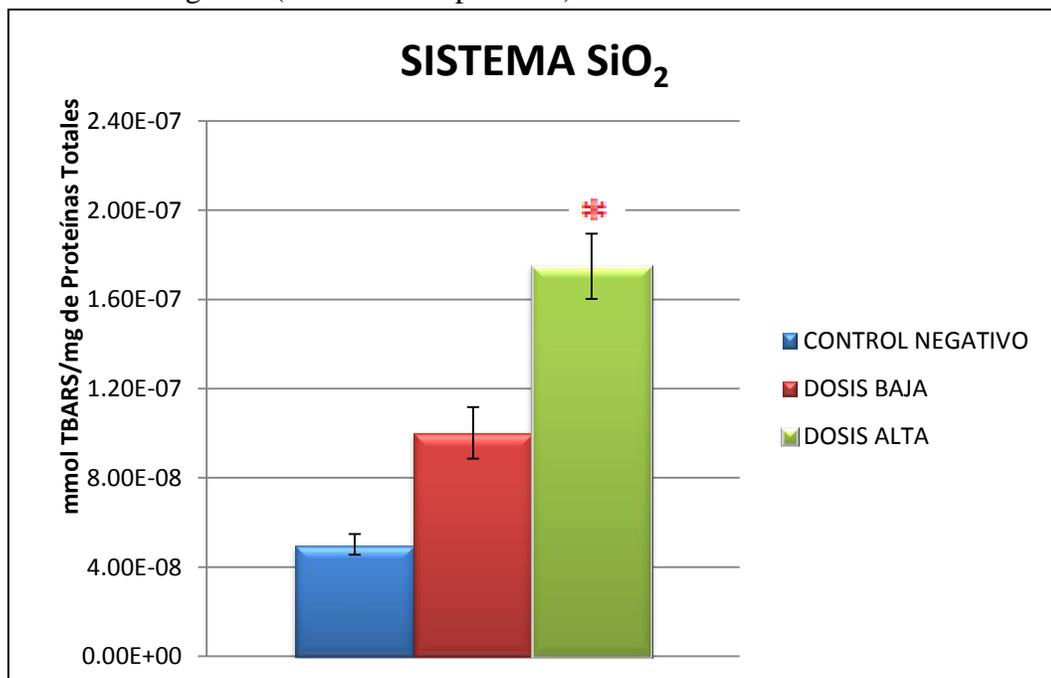


Gráfico 8. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de SiO₂ para la inducción de TBARS en células VERO. Las barras marcadas con * muestran diferencias significativas con respecto al control negativo p<0.05%.

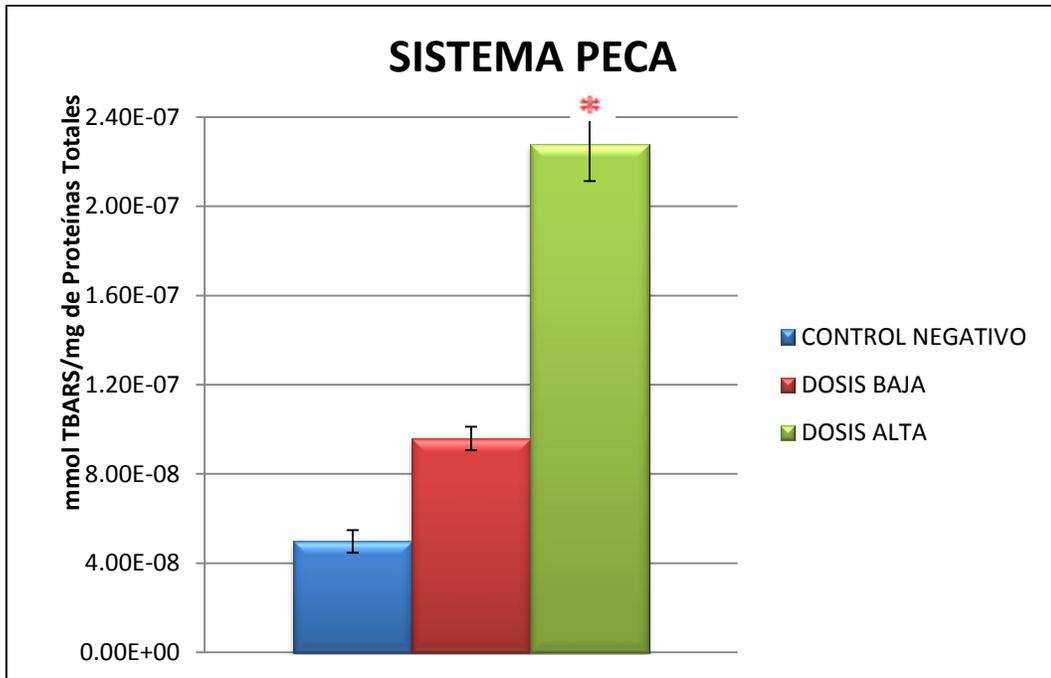


Gráfico 9. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de PECA para la inducción de TBARS en células VERO. Las barras marcadas con * muestran diferencias significativas con respecto al control negativo $p < 0.05\%$.

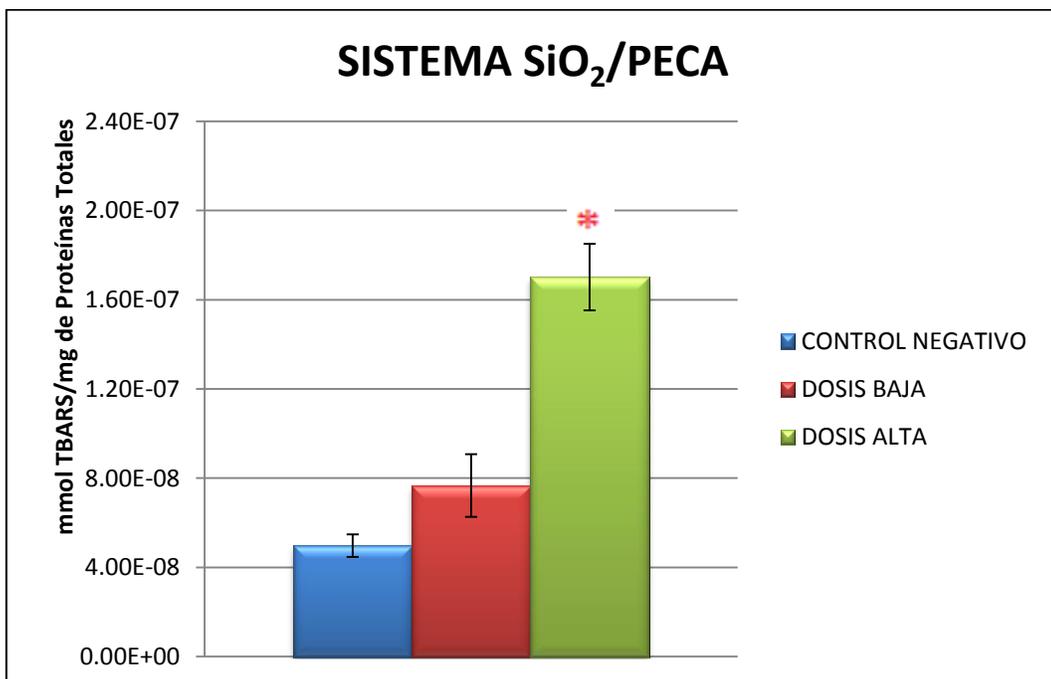


Gráfico 10. Efecto Dosis-Respuesta de sistema de nanopartículas de SiO₂/PECA para la inducción de TBARS en células VERO. Las barras marcadas con * muestran diferencias significativas con respecto al control negativo $p < 0.05\%$.

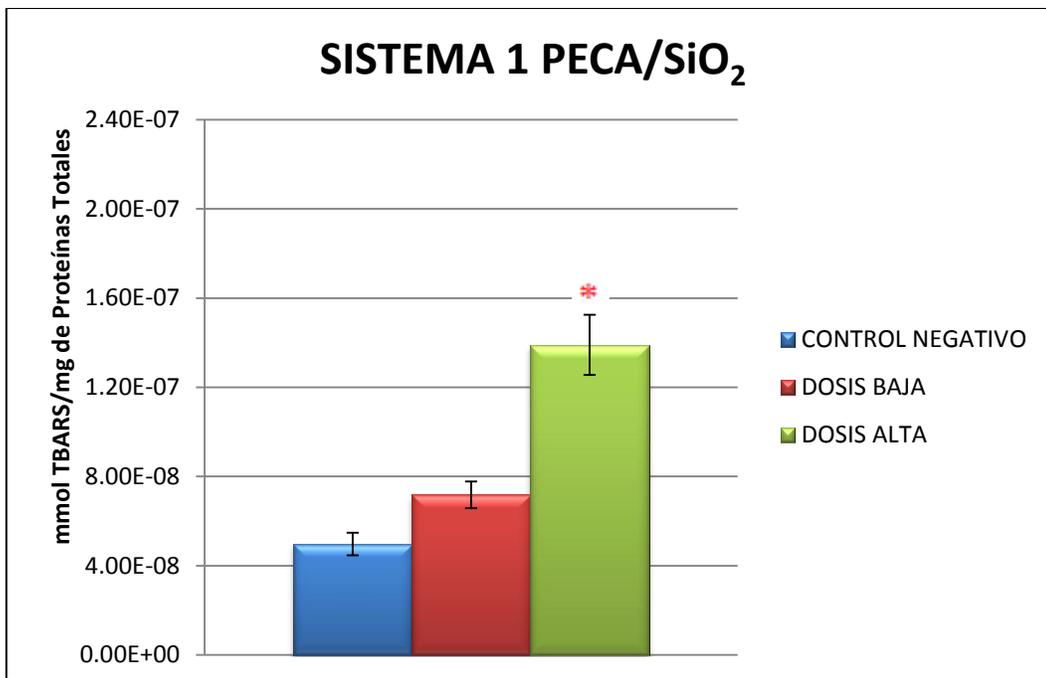


Gráfico 11. Efecto Dosis-Respuesta del sistema 1 de nanopartículas de PECA/SiO₂ para la inducción de TBARS en células VERO. Las barras marcadas con * muestran diferencias significativas con respecto al control negativo $p < 0.05\%$.

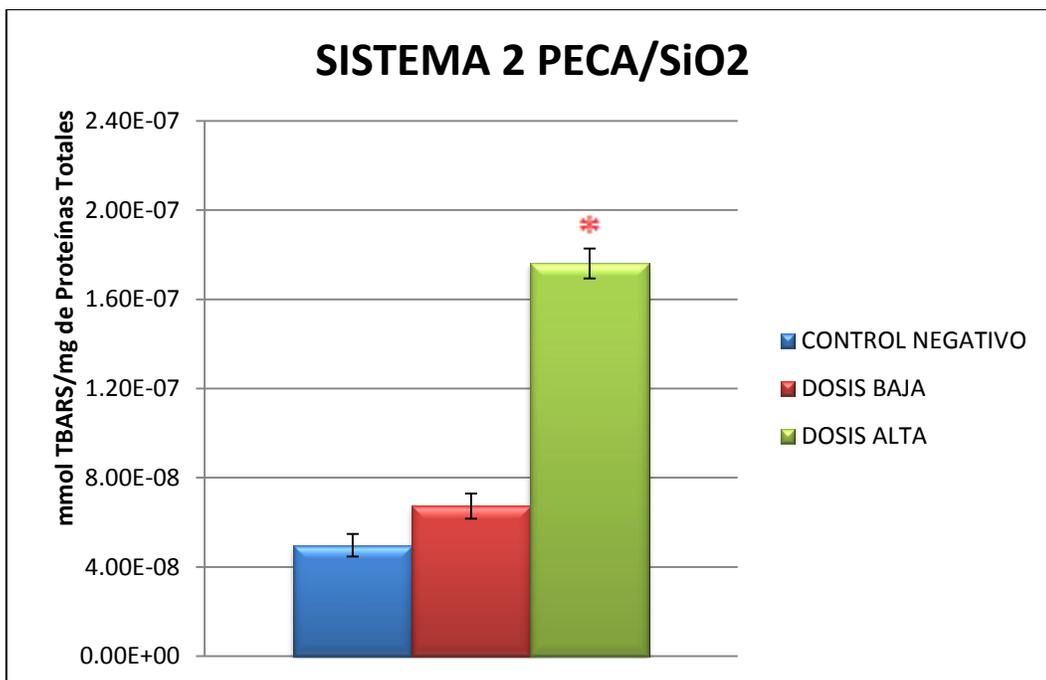


Gráfico 12. Efecto Dosis-Respuesta del sistema 2 de nanopartículas de PECA/SiO₂ para la inducción de TBARS en células VERO. Las barras marcadas con * muestran diferencias significativas con respecto al control negativo $p < 0.05\%$.

En el gráfico 13 se muestra la comparación entre los sistemas en estudio a dosis baja, se puede observar que los sistemas SiO₂ y PECA presentaron un valor mayor de TBARS que los sistemas híbridos de estos mismos materiales, comparando el control es similar al control negativo, los que nos indica que la exposición a las nanopartículas de los sistemas elaborados puede estar asociada al incremento en la cantidad de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico y que este incremento puede comprometer la funcionalidad membranal.

En el gráfico 14 donde la dosis de nanopartículas incremento 10 veces se puede observar que la cantidad de TBARS aumentó considerablemente en todos los sistemas, incluyendo el control que en comparación a la dosis baja donde era similar al control negativo. El sistema que presentó una mayor cantidad de TBARS, por lo tanto mayor cantidad de radicales libres es el sistema PECA. El estrés oxidativo asociado a la exposición de las nanopartículas en la máxima dosis evaluada es muy severo de acuerdo a la concentración de TBARS que presentan los sistemas, en comparación al control negativo. Se puede suponer que la cantidad de nanopartículas agregadas y sus propiedades fisicoquímicas que presentan pueden ser los factores que afectan en este caso la integridad de la membrana celular, recordando que la membrana es la barrera de protección de la célula y es de vital importancia para su proliferación.

Comparando los gráficos de dosis baja y alta a las cuales se expusieron las células VERO, los sistemas únicos de SiO₂ y PECA causaron una mayor producción de radicales libres, a diferencia de los sistemas híbridos los cuales se observa una menor concentración de TBARS, por lo tanto una menor peroxidación lipídica.

Algunos investigadores suponen que el tamaño de las nanopartículas puede ser un factor importante ya que al ser tan pequeñas pueden atravesar la membrana celular sin modificar su estructura produciendo un mayor cantidad de radicales libres.

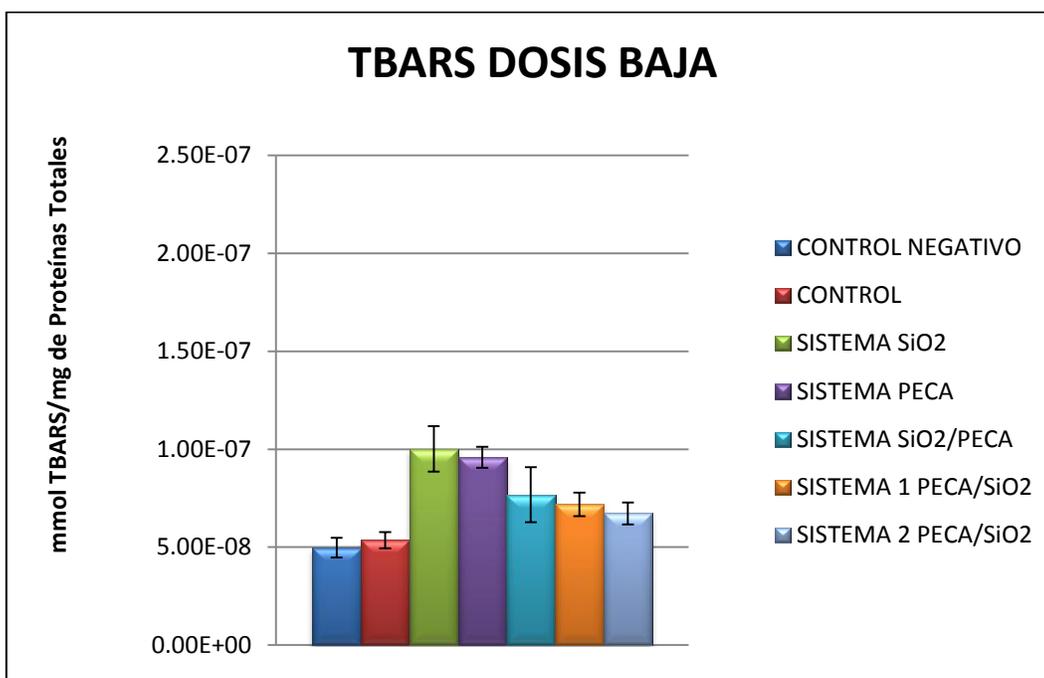


Gráfico 13. Comparación de la cantidad de TBARS entre los diferentes sistemas y controles a dosis baja en células VERO.

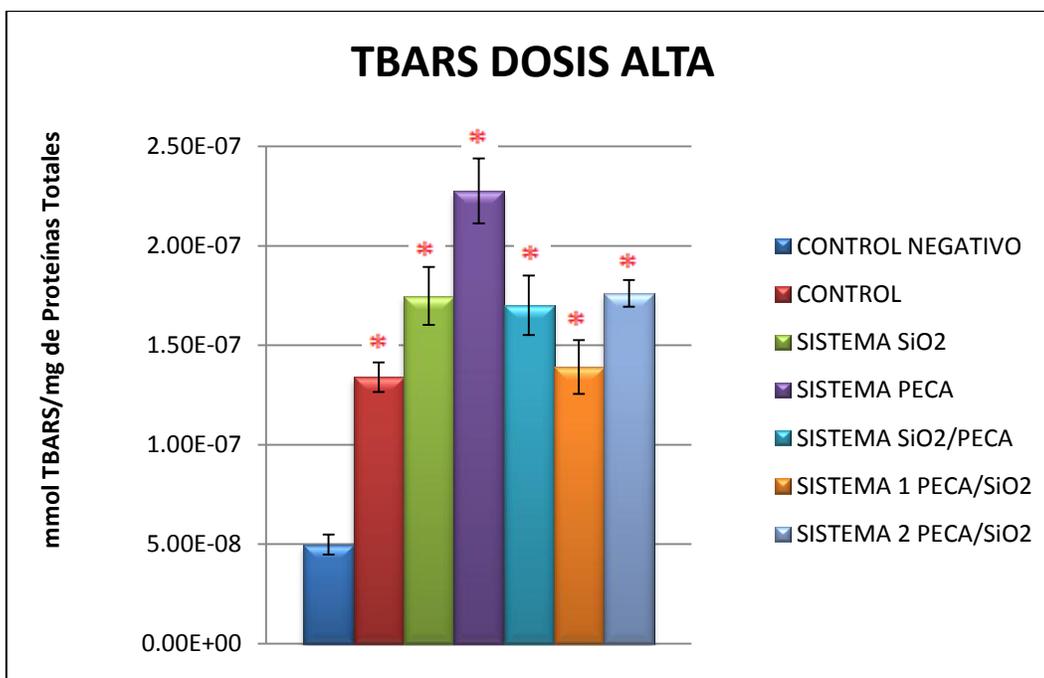


Gráfico 14. Comparación de la cantidad de TBARS entre los diferentes sistemas y controles a dosis alta en células VERO. Las barras marcadas con * muestran diferencias significativas con respecto al control negativo $p < 0.05\%$.

17.2.3. Glutación Reducido (GSH).

En respuesta al estrés celular asociado con un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ERO), las células requieren generar y mantener defensas antioxidantes de manera óptima e incrementarlas idealmente, acorde al tamaño de la agresión. Se ha demostrado que el organismo posee numerosos mecanismos que limitan la producción de ROS.

Los antioxidantes constituyen un eje de protección ante la producción de especies reactivas, éstas incluyen las de tipo enzimático y las no enzimáticas; el Glutación en su forma reducida es un tipo de defensa no enzimática, y es la principal defensa ante el daño oxidante. (Martínez, 2011).

Esto es importante ya que los resultados muestran que la capacidad de las nanopartículas por inducir un incremento dosis-respuesta en la cantidad de TBARS, también se presenta para el GSH (gráficos 15-19). Lo que sugiere que el incremento en la producción de radicales libres en las células expuestas pone en marcha los mecanismos de síntesis de GSH para disminuir el estrés oxidativo.

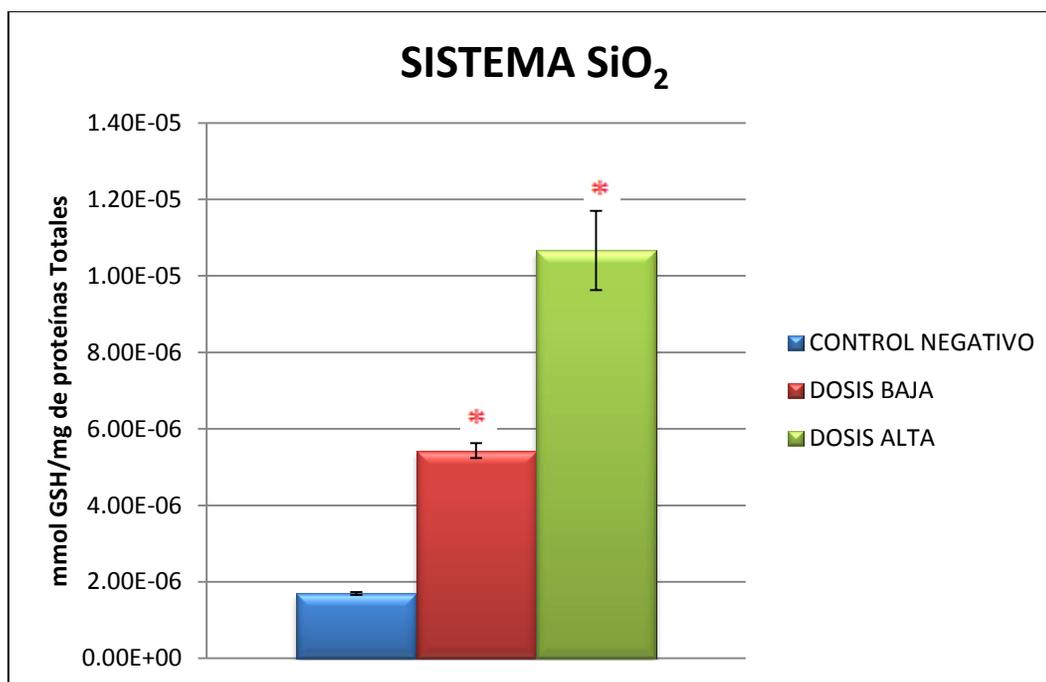


Gráfico 15. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de SiO₂ para GSH en células VERO. Las barras marcadas con * muestran diferencias significativas con respecto al control negativo p<0.05%.

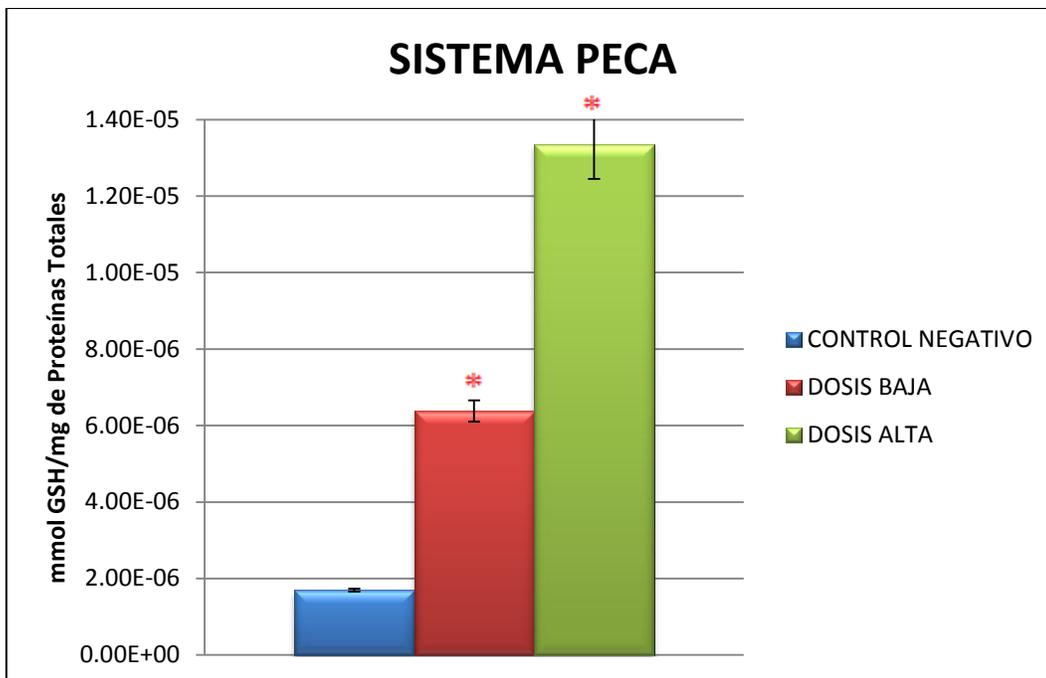


Gráfico 16. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de PECA para GSH en células VERO. Las barras marcadas con * muestran diferencia significativas con respecto al control negativo $p < 0.05\%$.

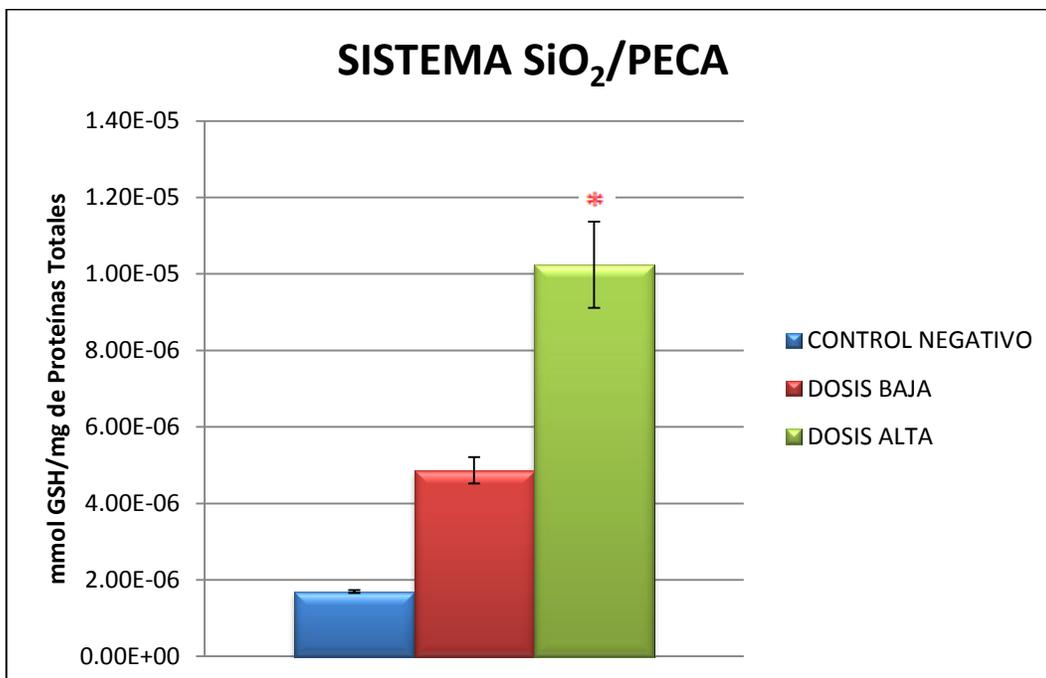


Gráfico 17. Efecto Dosis-Respuesta del sistema de nanopartículas de SiO₂/PECA para GSH en células VERO. Las barras marcadas con * muestran diferencias significativas con respecto al control negativo $p < 0.05\%$.

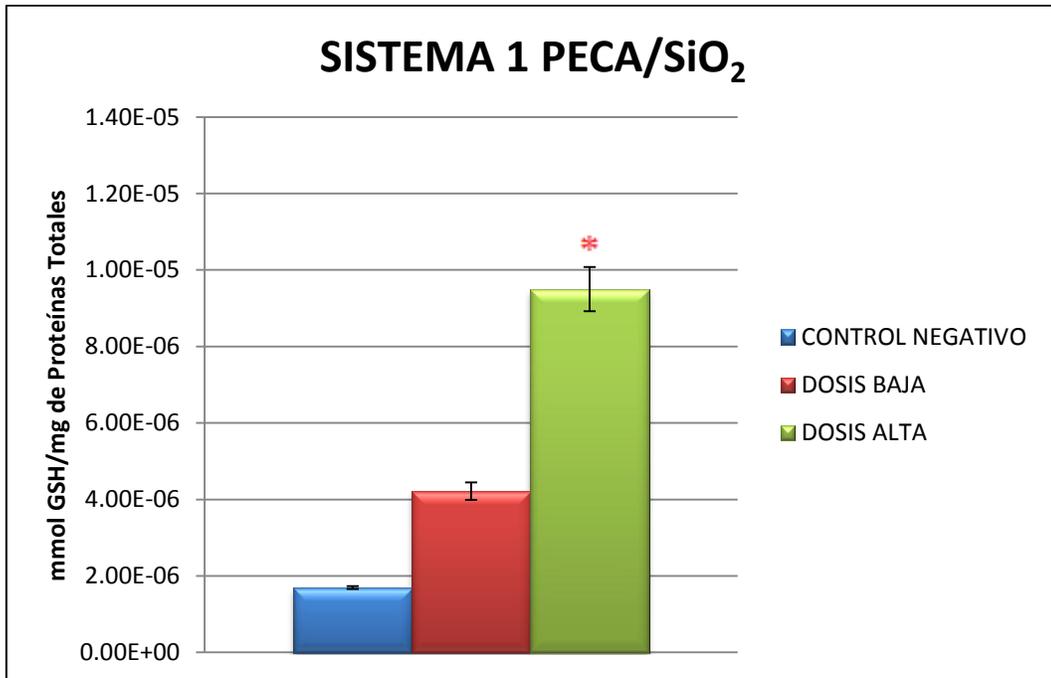


Gráfico 18. Efecto Dosis-Respuesta del sistema 1 de nanopartículas de PECA/SiO₂ para GSH en células VERO. Las barras marcadas con * muestran diferencias significativas con respecto al control negativo p<0.05%.

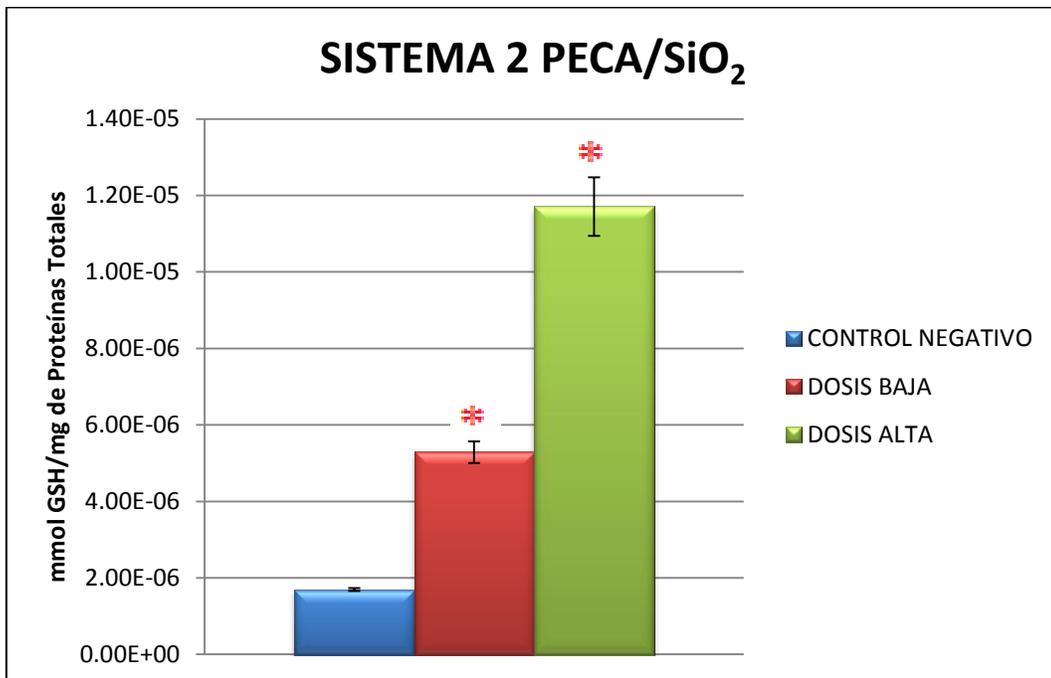


Gráfico 19. Efecto Dosis-Respuesta del sistema 2 de nanopartículas de PECA/SiO₂ para GSH en células VERO. Las barras marcadas con * muestran diferencias significativas con respecto al control negativo p<0.05%.

En los gráficos 20 y 21 se muestran comparativamente las estimaciones de GSH en dosis altas y bajas. En el gráfico 20 se pueden apreciar los niveles de GSH en las dosis bajas de los sistemas en estudio en donde a comparación con el control negativo y control (medio de dispersión de las nanopartículas) hay un aumento en la producción de Glutación. Esto confirma que la exposición a las nanopartículas si genera un daño y por lo tanto una respuesta antioxidante, siendo los sistemas únicos los que presentan una mayor concentración de Glutación, así como diferencia estadística significativa, en comparación con los sistemas híbridos.

Para el caso del gráfico 21 donde la dosis empleada de nanopartículas aumentó, el daño es mucho mayor en todos los sistemas con exposición a nanopartículas incluyendo el control. Estos resultados correlacionan con los observados en las evaluaciones de TBARS. El sistema PECA presentó una inducción mayor de Glutación en ambas dosis evaluadas.

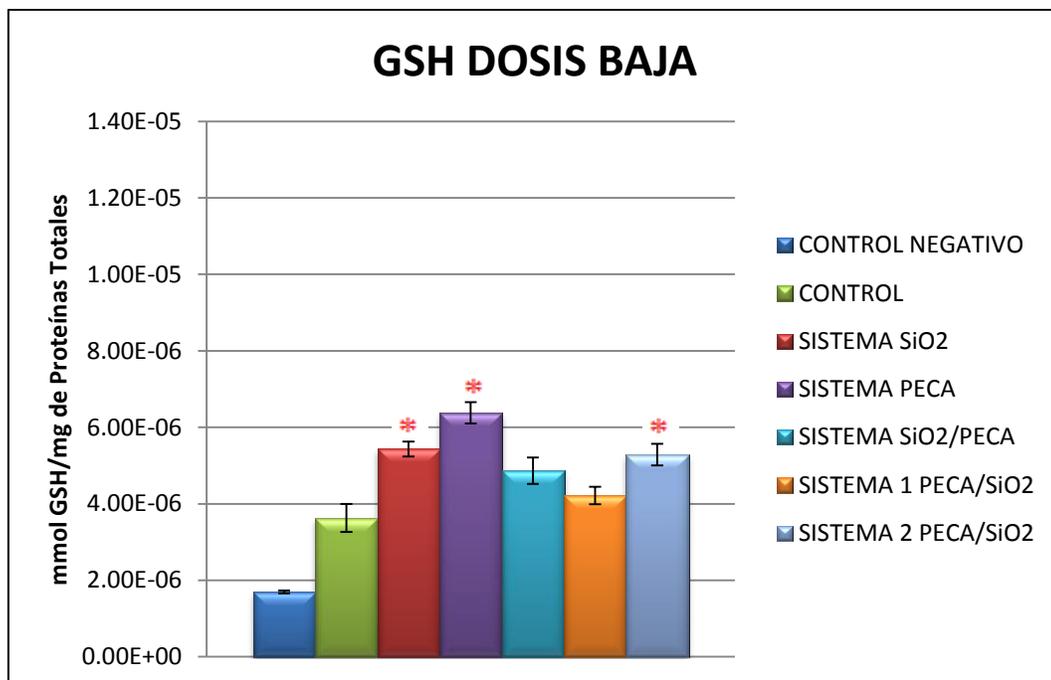


Gráfico 20. Comparación de la cantidad de GSH entre los diferentes sistemas y controles a dosis baja en células VERO. Las barras marcadas con * muestran diferencias significativas con respecto al control negativo $p < 0.05\%$.

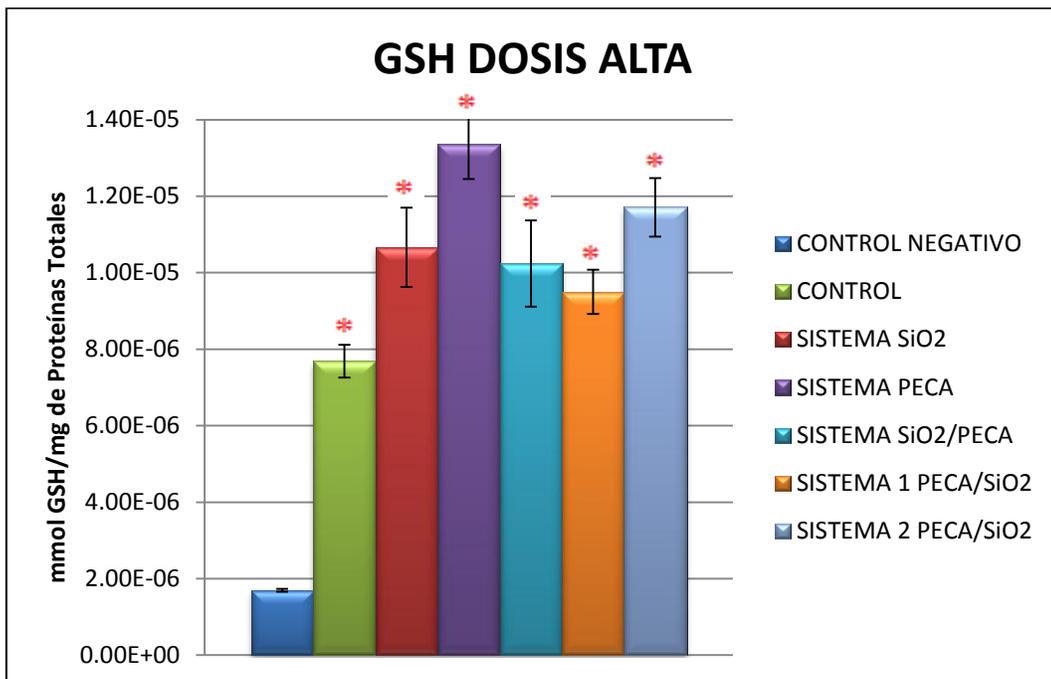


Gráfico 21. Comparación de la cantidad de GSH entre los diferentes sistemas y controles a dosis alta en células VERO. Las barras marcadas con * muestran diferencias significativas con respecto al control negativo $p < 0.05\%$.

18.CONCLUSIONES.

Se evaluó la capacidad citotóxica *in vitro* asociada al estrés oxidativo mediante la prueba de estimación de especies reactivas de oxígeno al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y cuantificación de Glutación reducido intracelular (GSH) después de la exposición aguda a diferentes sistemas nanoparticulados fabricados a base de Dióxido de Silicio (SiO_2) y Polietilcianoacrilato (PECA), así como de los sistemas híbridos obtenidos con ambos compuestos.

Se implementó un método para la elaboración de nanopartículas consiguiéndose 5 sistemas, 2 sistemas únicos (SiO_2 y PECA) y 3 sistemas híbridos obtenidos de la mezcla de ambos compuestos, bajo condiciones de concentración, adición y agitación específicas.

Se realizó la caracterización de los sistemas nanoparticulados obtenidos mediante microscopia electrónica de transmisión y microscopia electrónica de barrido, los cuales nos sirvieron para poder observar la morfología, la superficie y el tamaño que presentan las nanopartículas. También se determinó el potencial Z que nos indica la estabilidad de los sistemas elaborados, en este caso encontrándose con mayor estabilidad los sistemas SiO_2 y sistema 1 PECA/ SiO_2 . El tamaño de partícula se determinó por la técnica de DLS encontrándose tamaños en un rango de 4-6 nm.

Se logró establecer un diseño experimental para evaluar la citotoxicidad *in vitro* en la línea celular VERO, evaluándose la viabilidad celular (MTT), estimación de TBARS y la concentración de GSH, encontrándose que para el caso de viabilidad celular a dosis alta hay una disminución significativa respecto al control negativo, mientras que a dosis bajas se mantienen las células aun viables. Existe una correlación significativa entre la cantidad de TBARS y la concentración de GSH que presentaron las células expuestas a diferentes dosis de nanopartículas.

Los sistemas únicos preparados a base de SiO_2 y PECA fueron los que generaron una toxicidad mayor ($p < 0.05\%$ comparación múltiple de medias Tukey) y esa toxicidad parece estar asociada al estrés oxidativo. En comparación a estos sistemas los sistemas híbridos indujeron un menor daño

19.PERSPECTIVAS

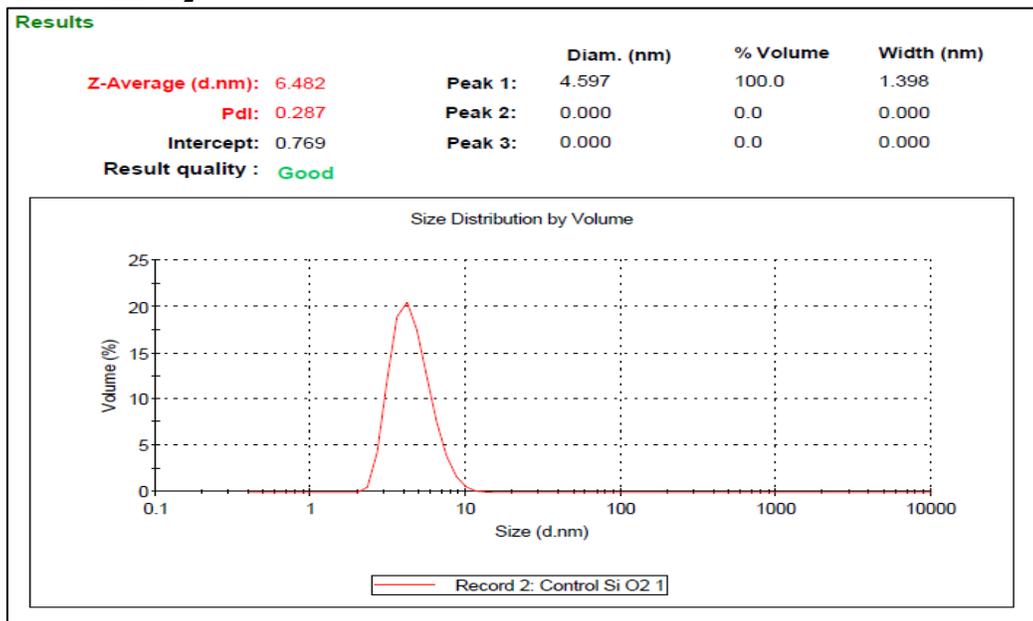
Este proyecto deja muchas interrogantes ya que solo es una pequeña parte de todas las pruebas que se deben realizar para determinar si un compuesto, en este caso las nanopartículas se consideran citotóxicos o genotóxicos. Se podría sugerir realizar más estudios sobre citotoxicidad y genotoxicidad tal vez modificando las dosis, líneas celulares o realizar una correlación *in vitro-in vivo* para poder decir si las nanopartículas fabricadas son realmente tóxicas.

De ahí la importancia de evaluar la toxicidad de estos sistemas para empezar a discriminar cuáles serán nocivos y cuáles no, así como las características que les confieren dicha toxicidad y mediante la modificación de éstas atenuar el daño tóxico sobre sistemas biológicos.

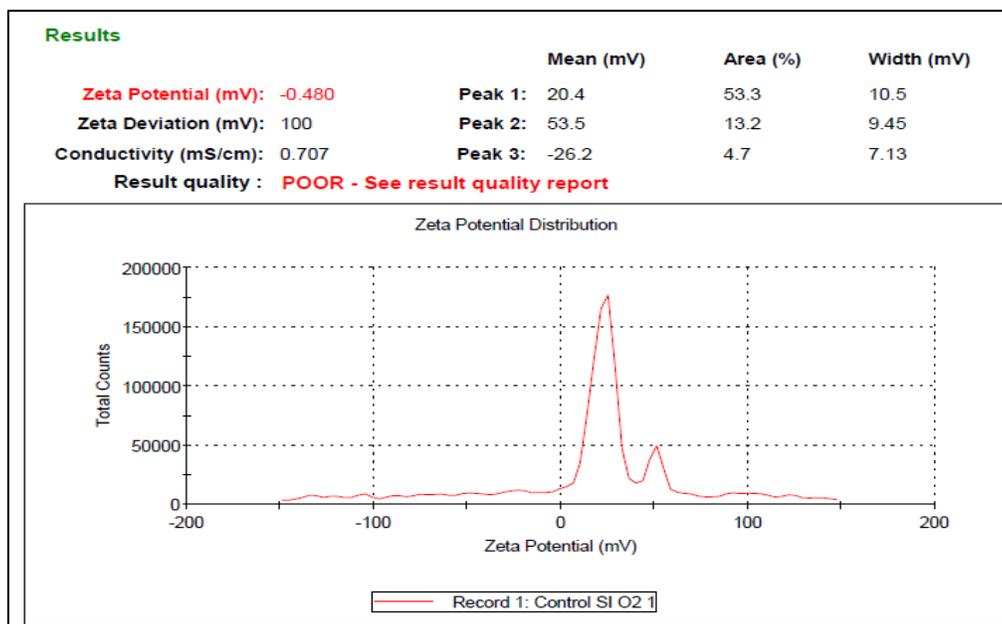
Todo lo anterior con el fin de tener la seguridad de utilizar las nanopartículas para el desarrollo de nuevos sistemas en el campo biomédico y biotecnológico que ayuden principalmente al diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

20.Anexo. Gráficos obtenidos de la Caracterización del Tamaño de Partícula y Potencial Z.

1. Sistema SiO₂.

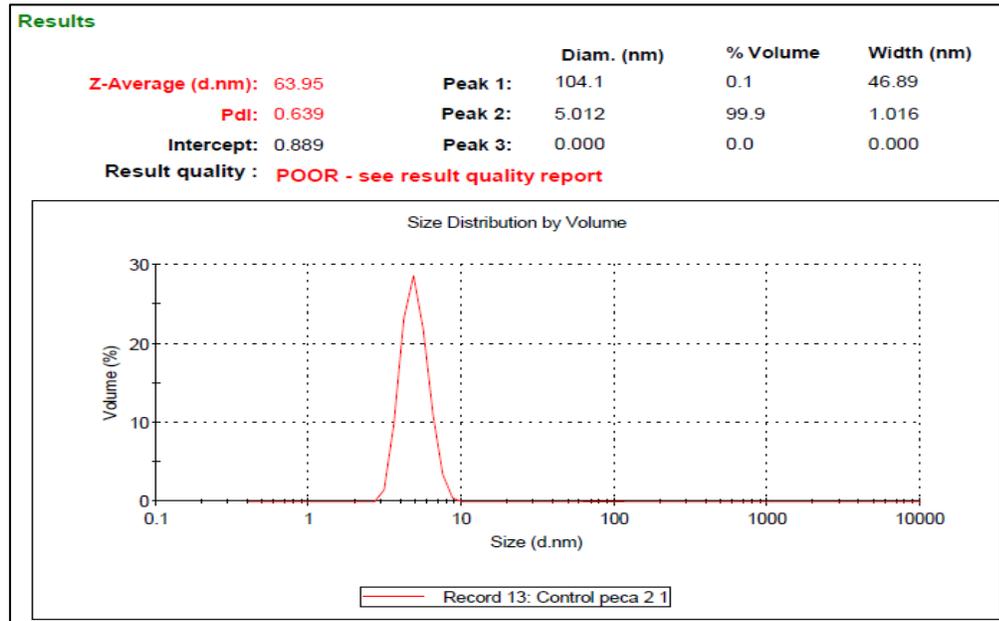


Distribución del tamaño de partícula por volumen sistema SiO₂.

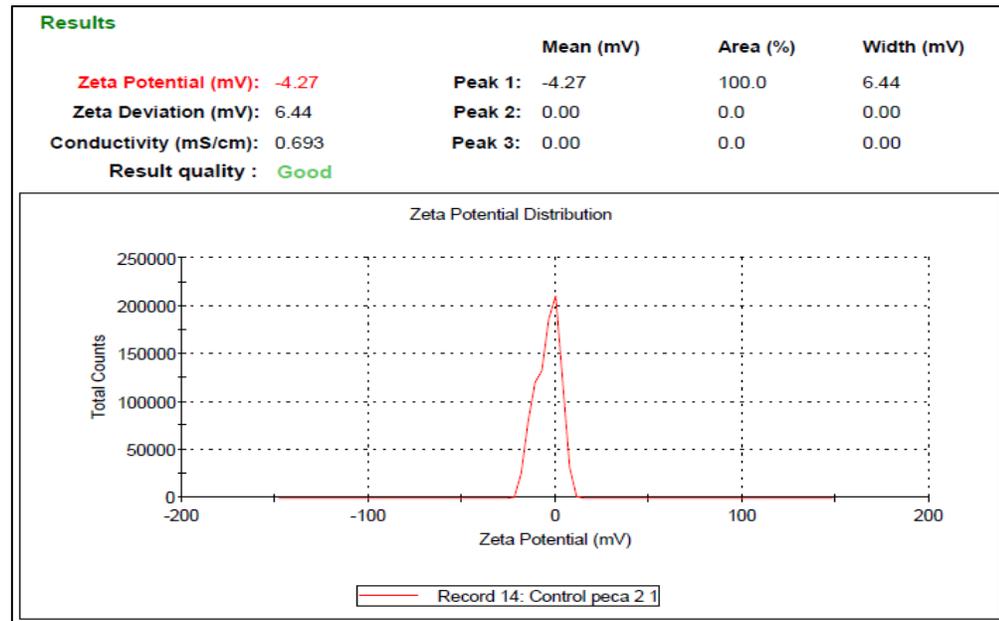


Potencial Z obtenido de sistema SiO₂.

2. Sistema PECA.

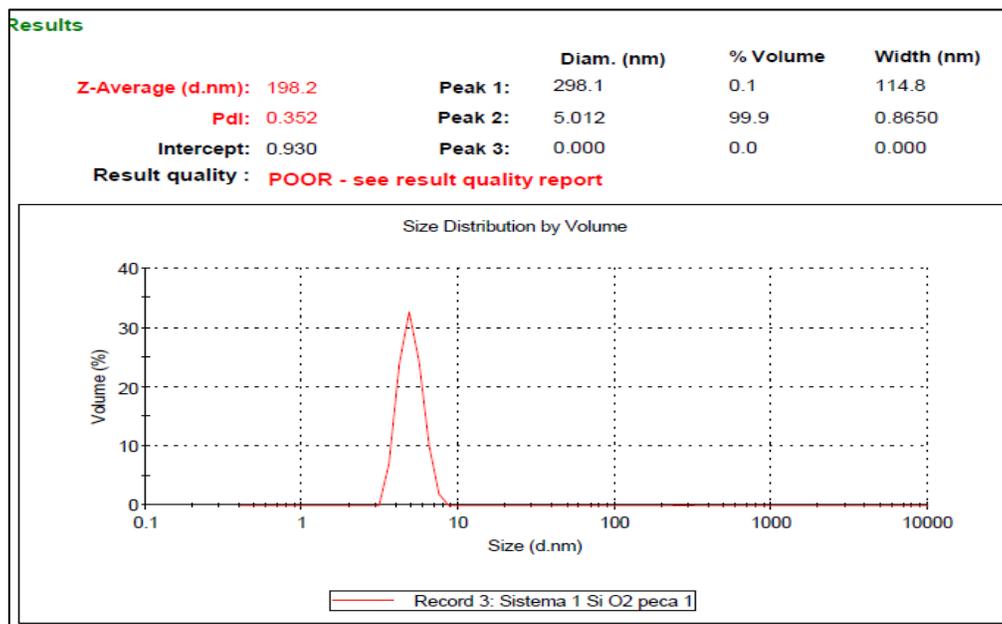


Distribución del tamaño de partícula por volumen sistema PECA.

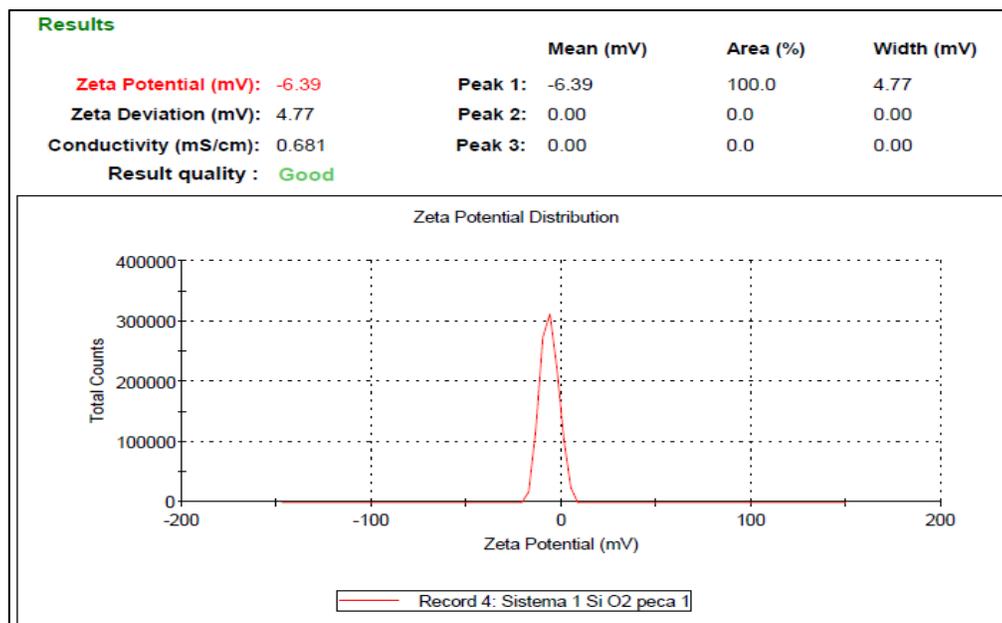


Potencial Z obtenido de sistema PECA.

3. Sistema SiO₂/PECA.

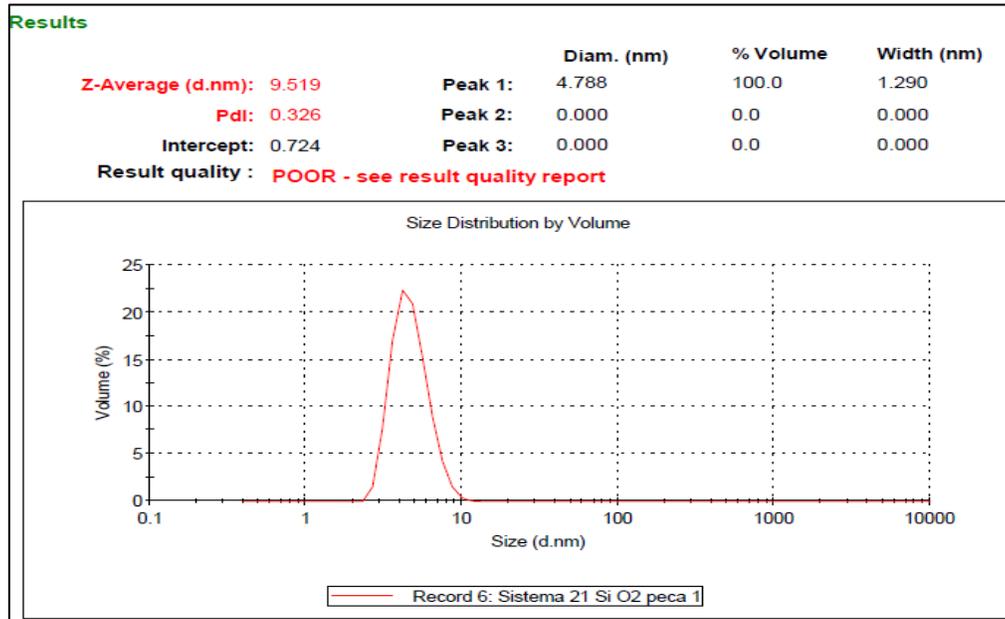


Distribución del tamaño de partícula por volumen sistema SiO₂/PECA.

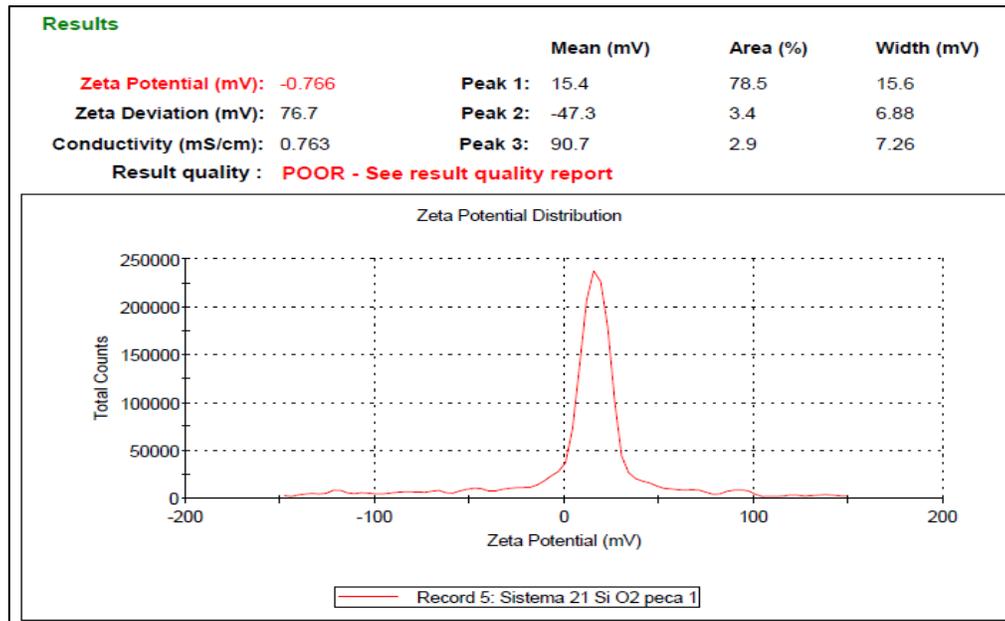


Potencial Z obtenido de sistema SiO₂/PECA.

4. Sistema 1 PECA/SiO₂.

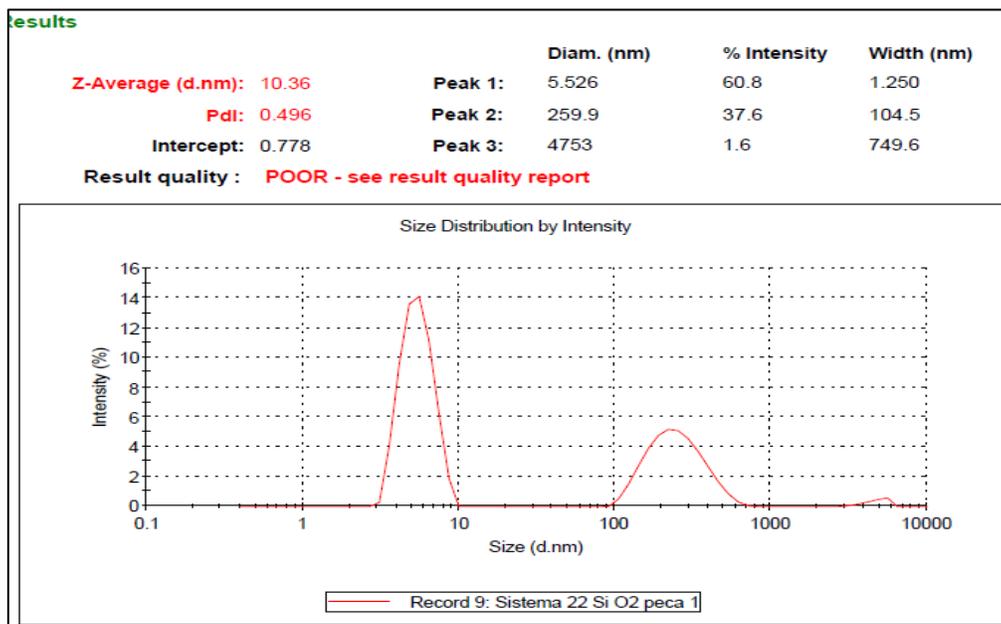


Distribución del tamaño de partícula por volumen sistema 1 PECA/SiO₂.

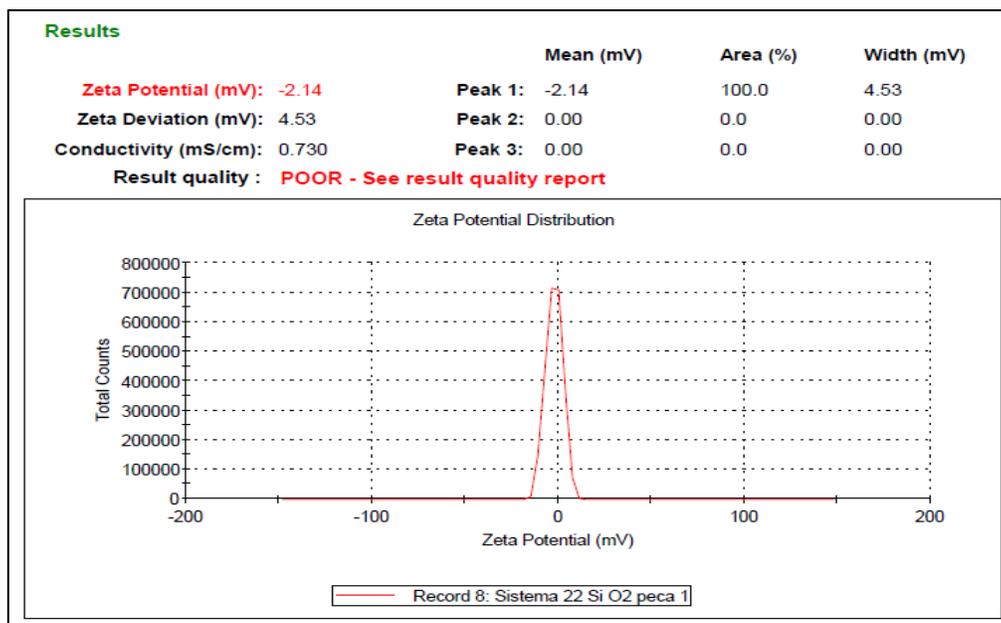


Potencial Z obtenido de sistema 1 PECA/SiO₂.

5. Sistema 2 PECA/SiO₂.



Distribución del tamaño de partícula por volumen sistema 2 PECA/SiO₂.



Potencial Z obtenido de sistema 2 PECA/SiO₂.

21.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Arce, V. (2010). *“Modificación y caracterización de nanopartículas de sílice”*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas.

Aranberri, I., et al. (2009). *“Emulsiones estabilizados por nanopartículas para formulaciones de productos agroquímicos”*. Rev. Iberoam. Polim., 10(1), 40-53.

Arias Mediano, J. L. (2003). *“Evaluación de nanopartículas de poli(etil-2-cianocrilato) con núcleos magnéticos como sistemas de liberación controlada del antineoplásico 5-fluorouracilo”*. Tesis doctoral. Universidad de Granada.

Babich, H. y E. Borenfreund. (1992). *“Neutral Red Assay for Toxicology in vitro. En: Ronald R. Watson (editor). In vitro Methods of Toxicology”*. Handbooks in Pharmacology and Toxicology. CRC Press, Boca Raton, EE.UU.

Birrenbach, G., Speiser, P.P., 1976. *“Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology”*. J. Pharm. Sci. 65, 1763–1766.

Bradford, M. M. (1976). *“A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”*. Analytical Biochemistry, 72:248-254.

Combs R.D. *“The ECVAM workshops: a critical assessment of their impact on the development, validation and acceptance of alternative methods”*. Alternatives to Laboratory Animals 2002; 30:151-165.

De Jaeghere, F., y Doelker E. *“Enciclopedia of Controlled Drug Delivery.”* Vol. 2. New York: John Wiley and Sons Inc., 1999.

De la Cruz Medina, M. (2010). *“Preparación, caracterización y uso de nanopartículas farmacéuticas. Investigación Bibliográfica”*. Tesis de Licenciatura para obtener el título de QFB. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México: FES Cuautitlán.

Denizot F., Lang R. *“Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability”*. J. Immunol. Methods 1986; 89: 271–277.

Escalona, C. et al. *“Biomateriales”*. Instituto Tecnológico de Tijuana. <http://www.slideshare.net/herovalrey/biomateriales>. (último acceso: 16 de Marzo de 2012).

Fentem J.H. *“The use of human tissues in in vitro toxicology, Summary of general discussions”*. Human Experimental Toxicology 1994; 13 (2):445-449.

Gálvez Pérez, V. y Tanarro Gonzalo C. (2010). *“Toxicología de las nanopartículas”*. Centro Nacional de Nuevas Tecnologías. Seguridad y salud en el trabajo. N° 56.

Gallardo-Montoya, J. M. “Evaluación del sistema antioxidante en el semen normal”. Rev. Invest. Clin. 2007; 59 (1): 42-47.

Gasca Zacarías, B. C. (2011). *“Evaluación de la capacidad citotóxica de sistemas nanoparticulados a base de Quitosán y Polietilcianocrilato (PECA)”*. Tesis de Licenciatura para obtener el título de QFB. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México: FES Cuautitlán.

Grágeda, M., y S. Montesinos. *“Aplicaciones del Microscopio Electronico de Barrido”*. Facultad de ciencias físicas y matemáticas, Universidad de Chile. <http://cabierta.uchile.cl/revista/28/articulos/pdf/edu3.pdf> (último acceso: 27 de Febrero de 2012).

Gutiérrez Salinas, J. & Cruz Tovar, L. (2008). *“Niveles séricos de Óxido Nítrico y Malondialdehído en sujetos con IgM positiva para el virus del herpes simplex”*. Rev Mex Patol Clin, Vol. 55, Núm. 2, pp 111-119.

Harivardhan R. (2003). *“Polimerización del n-butil cianoacrilato en presencia de surfactantes: estudio de la influencia de los factores de polimerización sobre propiedades de las partículas, carga de fármacos y evaluación de la cinética de liberación de fármacos”*. Ars Pharmaceutica, 44:4; 351-369.

Hernandez Herrero, G., Moreno Gonzalez, A., Zaragoza Garcia, F., Porras Chavariono, A. (2010). *“MediPharm. Tratado de Medicina Farmacéutica”*. Editorial medica Panamericana. España. Pág. 136-137.

Jiménez N, González M, Fernández C, López J. *“Estudio de la biocompatibilidad in vitro de polímeros metacrílicos derivados de pirrolidona/ina”*. Biomecánica 2007; 15 (1):63-71.

Klaine, S., Alvarez, P., Batley, G., Fernandez, T., Handy , R., Lyon, D., Y Otros. (2008). *“Nanomaterials In The Environment: Behavior, Fate, Bioavailability And Effects”*. Environ Toxicol Chem 27 (9), 1825-1851.

Kreuter, Jörg. (2007). *“Nanoparticles a historical perspective”*. International Journal of Pharmaceutics. n° 331, 1-10.

Kyung, C. and Myung, H. (2007). “*Cytotoxic Effects of Nanoparticles Assessed in vitro and in vivo*”. J. Microbiol. Biotechnol. 17(9), 1573–1578.

Lin, W., et al. “*In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells*”. Toxicology and Applied Pharmacology. 217 (2006) 252–259.

Llabot, J. M., Palma, S., Allemandi, D. (2008). “*Nanopartículas poliméricas sólidas*”. Farmacotecnia. Nuestra farmacia N° 53. 40-47.

M^a T. Frejo, M^a J. Díaz, M. Lobo, J. García, M. Capó. (2011). “*Nanotoxicología ambiental: retos actuales*”. Medicina Balear; 26 (2); 36-46

Manahan SE. “*Toxicological chemistry and biochemistry*”. : CRC; 2003.

Mantilla, C., Pedraza, J., Laverde, D. (2008). “*Utilización de estudios de potencial zeta en el desarrollo de un proceso alternativo de flotación de minerales feldespático*”. Dyna, 75 (154), 65-71.

Martínez Sámano, J. et al. (2011). “*El Glutathión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral*”. REB 30 (2): 56-67.

Medina C, Santos-Martínez MJ, Radomski A, Corrigan OI, Radomski MW (2007) “*Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance*”. Br J Pharmacol 150:552-558.

Meister A, Tate SS. “*Glutathione and related γ -glutamyl compounds: biosynthesis and utilization*”. Ann Rev Biochem 1976;45:559.

M. Fresta, G. Cavallarot , G. Giammonat , E. Wehrli and G. Puglisi. (1996). “*Preparation and characterization of polyethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs*”. Biomateriok 17. 751-756.

Nixon, W. (1969). “*Introduction to Scanning Electron Microscopy*”. Proceedings of and Annual Scanning Electron Microscopy Symposium, Patrocinado por IIT Research Institute.

Norton F. “*Dye exclusion viability assays using a hemacytometer*”. Tech Note: Nalge Nunc International Corp. 2000; vol 3 (25).p.67-68.

Potter, T., Neun, B. and Stern, S. (2011). “*Assay to Detect Lipid Peroxidation upon Exposure to Nanoparticles*”. Methods in Molecular Biology. Vol. 697 pp. 181-189.

Quezada Tristán, T. et al. (2002). “*Estudio comparativo de la concentración de glutatión reducido y actividades de gammaglutamiltransferasa y transferasa de glutatión en hígado y riñón de pollos y ratas*”. Vet. Méx., 33 (2).

Quintanar Escorza, Martha Angélica; Calderón Salinas, José Víctor. “*Capacidad de antioxodante total. Bases y aplicaciones*”. Revista de Educación Bioquímica, vol. 28, núm. 3, septiembre, 2009, pp. 89-101.

Reliene, R. and Schiestl, R. (2006). “*Glutathione depletion by buthionine sulfoximine induces DNA deletions in mice*”. Carcinogenesis vol.27 no.2 pp.240–244.

Repetto, M. (2002). “*Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro*”. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .Tercera edición. p.303-305.

Sajja HK, East MP, Mao H, Wang YA, Nie S, Yang L (2009). “*Development of multifunctional nanoparticles for targeted drug delivery and noninvasive imaging of therapeutic effect*”. Curr Drug Discov Technol 6:43-51.

Sandoval, L., et al. (2005). “*Potencial Z como una herramienta para determinar la aglomeración de las partículas en la reducción del volumen del lodo a disponer*”. Instituto Mexicano de la Tecnología del Agua.

Segretín, M. E. (s.f.). (2009). “*Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales)*”. INGEBI-CONICET Dpto. FBMyC, FCEyN-UBA, 6.

Schatztel, K. (1991). “*Suppression of multiple-scattering by photon cross-correlation techniques*”. J. Mod. Opt. 38: 1849.

Thassu, D., Deleers, M., & Pathak, Y. (2007). “*Nanoparticulate Drug-Delivery Systems: An Overview*”. New York: Informa Healthcare USA, Inc. 382.

Troncoso, L. “*Efecto antioxidante y hepatoprotector del Petroselinum sativum (perejil) en ratas, con intoxicación hepática inducida por paracetamol*”. An Fac Med Lima 2007; 68(4).

V.J. Mohanraj, Y. Chen. (June 2006). “*Nanoparticles A Review*”. Tropical Journal of Pharmaceutical Research; 5 (1): 561-573.

Wolfgang, Metchnert KM. “*Solid Lipid Nanoparticles. Production, characterization and applications*”. Adv. Drug Del. Rev., n° 47 (2001): 165-196.

Zeta-MeterInc. *“Potencial Zeta. Un curso completo en 5 minutos”*.
http://depa.pquim.unam.mx/amyd/archivero/PotencialZetaDLVO_3882.pdf (último acceso: 29 de Febrero de 2012).

Zúñiga Lemus, O. (2008). “Influencia del estrés oxidativo sobre la exposición de citoqueratina 18 en el hígado expuesto a arsénico”. Tesis de Maestría. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México: FES Cuautitlán.