



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE TAMAÑO DE NANOPARTÍCULAS DE
POLIETILCIANOACRILATO-QUITOSÁN SOBRE LA VIABILIDAD
CELULAR *IN VITRO*, POR MEDIO DEL ENSAYO DE “MTT” Y
EXCLUSIÓN DE AZUL TRIPÁN”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

RODOLFO JESÚS NÚÑEZ RODRÍGUEZ

ASESORES:

DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA

DR. ROBERTO DÍAZ TORRES

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

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

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

Evaluación del efecto de tamaño de nanopartículas de Polietilenoacrilato-quitosán sobre la viabilidad celular in vitro, por medio del ensayo de "MTT" y exclusión de azul tripán

Que presenta el pasante: **Rodolfo Jesús Núñez Rodríguez**
Con número de cuenta: **407053755** 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 02 de septiembre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	
VOCAL	Dr. José Juan Escobar Chávez	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
2do. SUPLENTE	QFB. Adriana Gil García	

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

HHA/iac

Agradecimientos:

Hay tantas personas a quienes agradecer en mi vida, que mencionarlas a todas me llevaría otras ochenta páginas, sin embargo quiero resaltar algunas que han sido parte fundamental de mi formación personal y profesional; por eso agradezco primeramente a mis padres, Carmen y Efraín, a quienes prácticamente les debo todo, son ellos quienes me han instruido desde pequeño y guiado sabiamente, además su paciencia es digna de admiración, ya que soy consciente de todas las situaciones intrincadas que les he hecho pasar, este y todos mis logros, son suyos realmente, gracias por todo.

A mis asesores de tesis, Roberto y Paty, son personas excelentes e increíbles, siempre admiraré sus logros y su estupendo trabajo en equipo, gracias por la orientación, la paciencia y las experiencias compartidas, les deseo el mejor de los éxitos.

A mi hermano Sergio que me ha acompañado desde siempre, y que ha estado en momentos claves de mi vida ayudándome, orientándome y regañándome, deseo que alcances todas tus metas.

A toda mi hermosa familia, que ha influenciado en mi vida enormemente, a mis primos y primas, que me han llenado de alegría de tantas formas y que han sido cómplices de muchas aventuras, a mis tíos de los que he aprendido mucho, al abuelo que siempre ha sido una figura enigmática, en fin gracias a todos y cada uno.

A mis amigos que he hecho a lo largo de toda la vida, ya que sin ellos no hubiera entendido tantas cosas de la vida, y que su influencia la llevo marcada en mi mente y mi corazón.

Por último quiero agradecer a un grupo especial de amigos que fueron el verdadero motor para que continuara en los momentos difíciles, un grupo del que aprendí enormemente y quienes me enseñaron las lecciones más valiosas de la vida, gracias “Bugas”, que con su enorme compromiso por combatir el mal, ahora la facultad es un mejor lugar. Decidí no nombrarlos porque no quería omitir a ninguno, pero el agradecimiento es especial para cada uno de ustedes.

Menciones especiales:

Este trabajo de tesis fue desarrollado en el Laboratorio de Toxicología y Genética de la UIM en la FES-Cuautitlán y fue apoyado con recursos del proyecto UNAM, DGAPA-PAPIIT IN220612 a cargo de Dra. Patricia Ramírez Noguera.

El Técnico Rodolfo Robles del Laboratorio de Microscopía brindó el apoyo en la realización de este trabajo de tesis en el análisis microscópico de las nanopartículas.

La Dra. Elizabeth García brindó el apoyo en la realización de este trabajo de tesis en las estimaciones del potencial Z en la empresa Psicofarma S.A. de C.V.

Índice General

Pág.

1. Índice de tablas	iii
2. Índice de ilustraciones	iii
3. Índice de gráficas.....	iv
4. Abreviaturas.....	iv
5. Introducción.....	1
6. Marco Teórico.....	2
6.1. Nanotecnología.....	2
6.2. Nanotecnología en sistemas de liberación controlada	2
6.3. Nanopartículas farmacéuticas	4
6.3.1. Aplicación de las nanopartículas en sistemas de liberación controlada.....	5
6.3.2. Ventajas de las nanopartículas como sistemas de liberación controlada	7
6.4. Propiedades de las nanopartículas	8
6.4.1. Tamaño de partícula.....	8
6.4.2. Propiedades cinéticas	9
6.4.2.1. Velocidad de disolución.....	9
6.4.2.2. Velocidad de sedimentación.....	9
6.4.2.3. Movimiento Browniano.....	10
6.4.3. Propiedades de superficie.....	10
6.5. Métodos de preparación de nanopartículas.....	12
6.6. Métodos de preparación de NP a partir de polimerización	12
6.6.1. Emulsión polimerización.....	12
6.6.1.1. Polimerización y nucleación micelar	13
6.6.1.2. Polimerización y nucleación homogénea.....	14
6.6.2. Polimerización interfacial.	14
6.6.3. Dispersión polimerización	14
6.6.4. Polimerización aniónica.....	15
6.6.5. Gelación iónica.....	15
6.7. Caracterización de nanopartículas.....	15
6.7.1. Caracterización del tamaño de partícula	16
6.7.1.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	16
6.7.1.2. Dispersión de luz dinámica.....	17
6.7.2. Potencial Z	17
6.8. Aplicación farmacéutica de nanopartículas de PECA-Quitosán.....	18
6.9. Toxicidad de nanopartículas de PECA-Quitosán	19
6.10. Efecto del tamaño de nanopartículas en la toxicidad celular	22
6.11. Nanotoxicología.....	23
6.11.1. Pruebas de nanotoxicidad <i>in vitro</i>	25
6.12. Componentes de los modelos experimentales de toxicidad <i>in vitro</i>	25
6.13. Citotoxicidad.....	28
6.13.1. Viabilidad celular	28
6.13.1.1. Ensayo de MTT	29
6.13.2. Membranas celulares.....	30
6.13.2.1. Ensayo de Azul de tripán.....	32

7. Planteamiento del problema	34
8. Objetivos	35
8.1. Objetivo general.....	35
8.2. Objetivos particulares	35
9. Materiales y métodos	36
9.1. Reactivos.....	36
9.2. Equipos.....	37
9.3. Metodología.....	38
9.3.1. Fabricación de nanopartículas.....	38
9.3.1.1. Preparación de los sistemas de nanopartículas de PECA-Quitosán.....	38
9.3.1.2. Acondicionamiento de nanopartículas para caracterización	39
9.3.1.3. Caracterización de nanopartículas	39
9.3.2. Evaluación citotóxica.....	40
9.3.2.1. Mantenimiento de cultivos celulares.....	40
9.3.2.2. Ensayo de viabilidad celular MTT	41
9.3.2.3. Ensayo de azul de tripán.....	42
10. Resultados y análisis.....	43
10.1. Potencial Z y distribución de tamaño de partícula	43
10.2. Micrografía electrónica de barrido.....	46
10.3. Ensayo de viabilidad celular MTT.....	49
10.4. Ensayo de viabilidad celular por exclusión de azul de tripán.....	50
11. Conclusiones.....	54
12. Perspectivas.....	55
13. Anexos.....	I
13.1. Anexo I- Gráficos de tamaño promedio de partícula de los ocho sistemas fabricados.....	I
13.2. Anexo II- Gráficos de tamaño promedio de partícula de sistemas 1, 3 y 5.....	III
13.3. Anexo III- Gráficos de potencial Z de los sistemas fabricados.	IV
13.4. Anexo IV- Promedio de resultados de viabilidad celular para MTT	VI
13.5. Anexo V- Promedio de resultados de viabilidad celular para y Azul de Tripán	VI
13.6. Anexo VI- Resultados de análisis de varianza para MTT.....	VII
13.7. Anexo VII- Resultados de análisis de varianza para azul de tripán.....	VII
14. Referencias.....	VIII

1. Índice de tablas

Tabla 1 Aplicaciones de diversos tipos de NP (Swarbrick, 2002) (Shayne Cox, 2008).....	6
Tabla 2 Principales propiedades de las NP con fines farmacéuticos (Viswanathan, 2009).....	8
Tabla 3 Principales factores causantes del efecto tóxico de las NP (Ricaud & Witschger, 2009).	24
Tabla 4 Evaluaciones <i>in vitro</i> de acuerdo al criterio de evaluación (Hillegass, Shukla, & Sherrill, 2010).....	25
Tabla 5 Sustratos biológicos e indicadores de toxicidad empleados en ensayos <i>in vitro</i> (Repetto & Menendez, 1995).	26
Tabla 6 Clasificación general de biomarcadores (Silbergeld & Lee Davis, 1994).....	27
Tabla 7 Matriz experimental para fabricación de NP.....	38
Tabla 8 Resultados de tamaño de partícula y potencial Z de cada sistema.	43
Tabla 9 Resultados de tamaño de partícula y potencial Z de sistemas elegidos.....	46
Tabla 10 Micrográficas electrónicas de sistemas 1, 3 y 5.....	47

2. Índice de ilustraciones

Ilustración 1 Representación esquemática de los dos principales tipos de nanopartículas poliméricas. De lado izquierdo, se muestra una nanoesfera (matriz polimérica), mientras del lado derecho aparece una nanocápsula (sistema reservor) (Bei, Meng, & Youan, 2013).....	5
Ilustración 2 El sistema coloidal crea una disposición espacial de doble capa ordenada de iones alrededor de las partículas. La vista de la izquierda muestra el cambio de densidad de iones alrededor del coloide. La de la derecha muestra la distribución de los iones positivos y negativos alrededor de la partícula cargada negativamente (Pedraze & Laverde, 2013).....	11
Ilustración 3 Representación esquemática de formación de NP por emulsión-polimerización (Amici, 2013).....	13
Ilustración 4 Estructura química del polietilcianoacrilato (ChemSpider, 2013).....	20
Ilustración 5 Estructura del química del Quitosán, a la izquierda se muestra la unidad de D-Glucosamina y a la derecha la unidad de N-Acetil-Glucosamina (Jaime Retuert, 2000)	21
Ilustración 6 Reducción del MTT (Dojindo Molecular Technologies, 2013).	30
Ilustración 7 Modelo del mosaico fluido (Fisiología, 2007).	32
Ilustración 8 Estructura de la molécula de azul de tripán (Toxnet, 2013).....	33

3. Índice de gráficas

Gráfico 1 Promedio de tamaño de partícula para cada sistema.	44
Gráfico 2 Polidispersión de los sistemas.	44
Gráfico 3 Potencial Z de cada sistema.....	45
Gráfico 4 Viabilidad celular por ensayo de MTT.	49
Gráfico 5 Viabilidad celular para ensayo de azul de tripán.	51

4. Abreviaturas

HeLa	Línea celular Hela (Henrietta Lacks)
LD₅₀	Dosis letal para el 50% de un conjunto de animales de prueba
LDH	Lactato deshidrogenasa
MTA	Ensayo de microcultivo tetrazolio
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazolio
MWNT	Nanotubulo multicapas
mV	miliVolts
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm	Nanómetro
NP	Nanopartículas
PACA	Poli-alquilcianoacrilatos
PECA	Poli-etilcianoacrilato
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMMA	Polimetacrilato de metilo
RPA	Protección de ribonucleasas
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SLC	Sistema de liberación controlada
SMF	Sistema fagocítico mononuclear
SWNT	Nanotubulo de una capa
WST-1	Sodio-4-(3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benceno disulfonato
XTT	Sodio-2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida

5. Introducción

Buena parte de los científicos en todo el mundo han volcado su investigación hacia el desarrollo y aplicación de la nanotecnología, ya que esta última representa la solución a infinidad de problemas y cuestiones presentes en todos los sectores del desarrollo tecnológico. Uno de los sectores más influenciados por el progreso de la nanotecnología es sin duda el de la salud, donde su aplicación se extiende en varias aplicaciones médicas. Las aplicaciones de la nanotecnología en este campo abarcan el diagnóstico de enfermedades, aplicaciones terapéuticas, implantes artificiales, entre otras. Dentro de este contexto, se han desarrollado diversas líneas de investigación en el área farmacéutica; una de esas líneas de investigación corresponde a la aplicación de nanopartículas para el desarrollo de sistemas de liberación controlada, surgiendo como una alternativa de las formas de dosificación convencionales (De la Cruz Medina, 2010) (Viswanathan, 2009).

La aplicación de las nanopartículas con fines farmacéuticos y médicos, tiene más de 35 años. Desde el comienzo del desarrollo de estos sistemas, existió la preocupación de que pudieran tener efectos tóxicos. La polémica en este tema 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 (Kreuter, 2007).

El desarrollo de esta tesis pretende aportar información para establecer un criterio más amplio acerca de la influencia del tamaño de partículas de Polietilenoacrilato-Quitósán (PECA-Quitósán) sobre la viabilidad celular en la línea HeLa, con el fin de contribuir en el esclarecimiento de las actuales controversias sobre el tema. La viabilidad celular se define a menudo como el número o proporción de células vivas contenidas en una muestra. Dentro de este proyecto se plantea la aplicación de dos ensayos ampliamente empleados para la determinación de la viabilidad celular, MTT (Bromuro de 3-(4, 5-dimetil-2-tiazol)-2, 5-difeniltetrazolio), basado en la reducción del colorante por las células viables, y azul de tripán (((3Z, 3'Z)-3,3'-[[3, 3'-dimetilbifenil-4, 4'-diil] di (1Z) hidracina-2-il-1-iliden] bis (5-amino-4-oxo-3, 4-dihidronaftaleno-2, 7-ácido disulfónico))), basado en la exclusión del colorante por parte de las células viables (Stoddart, 2011).

6. Marco Teórico

6.1. Nanotecnología

Como se ha mencionado anteriormente el interés de parte de la comunidad científica en el desarrollo y aplicación de la nanotecnología, han llevado a plantearse diversas cuestiones acerca de su posible daño a la salud, sin embargo sus beneficios parecen ser mayores. Jackie Ying, director del instituto de bioingeniería y nanotecnología en Singapur y profesor de ingeniería química en el instituto tecnológico de Massachusetts, vislumbra a la nanotecnología como una caja de herramientas que permite la construcción de nuevos materiales, dispositivos y sistemas de talla nanométrica, que presentan propiedades físico-químicas únicas. Una aceptada definición de nanotecnología puede detallarse como “el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas por manipulación controlada del tamaño y forma en la escala nanométrica (atómica, molecular y a escala macromolecular), que produce estructuras, dispositivos y sistemas con al menos una nueva y/o superior característica o propiedad” (Viswanathan, 2009).

6.2. Nanotecnología en sistemas de liberación controlada

Un gran número de avances han sido hechos recientemente en el desarrollo de nuevas técnicas de liberación controlada de fármacos. Estas técnicas son capaces de regular la velocidad de liberación de fármaco, sosteniendo la duración de la acción terapéutica, y/o dirigiendo la liberación del fármaco hacia un tejido específico. Estos avances han llevado al desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos de talla nanométrica que podrían proporcionar uno o más de los siguientes beneficios (Shayne Cox, 2008):

- Administración controlada de una dosis terapéutica en una velocidad deseable de liberación.
- Mantenimiento de la concentración del fármaco dentro de un rango terapéutico durante una prolongada duración del tratamiento.
- Maximización de la relación dosis-efecto.
- Reducción de los efectos secundarios.
- Minimización de la necesidad de toma frecuente de multidosis.
- Aumenta la conformidad del paciente.

Sin embargo, también existen desventajas relacionadas con el uso de las NP como SLC, como lo son (Shayne Cox, 2008):

- Posible citotoxicidad de materiales y sistemas nanoparticulados utilizados.
- Capacidad limitada de orientación a blancos específicos.
- La interrupción del tratamiento no es posible o es complicada.
- Falta de regulación y lineamientos legales para su aplicación.
- Se requieren instalaciones altamente sofisticadas para su fabricación.

No obstante lo anterior, el desarrollo de sistemas terapéuticos nanoparticulados representa una opción importante, ya que aunque existe un gran avance en el descubrimiento y desarrollo de fármacos convencionales y no convencionales (antibióticos, péptidos y proteínas, ácidos nucleicos, etc.), en los recientes años se ha evidenciado que el desarrollo de nuevos fármacos por si solos no es suficiente para asegurar el progreso en la farmacoterapia. La pobre solubilidad en agua de moléculas potencialmente activas, biodisponibilidad insuficiente, fluctuaciones en los niveles plasmáticos y la alta dependencia de su ingesta, junto o posterior a las comidas, son algunos de los problemas más comunes. Los mayores esfuerzos han sido enfocados en el desarrollo de acarreadores de fármacos específicos para superar el destino que sufre el fármaco (excreción del fármaco inalterado, inactivación, etc.) al ser administrado *in vivo*, es aquí donde las nanopartículas han tomado un importante lugar dentro de la tecnología farmacéutica, al ser una opción de formulación viable para los fármacos en desarrollo (Shayne Cox, 2008).

El destino de un fármaco después de su administración *in vivo* está determinado por una combinación de varios procesos: distribución, biotransformación y eliminación cuando es administrado por vía intravenosa, absorción, distribución, biotransformación y eliminación cuando se trata de una ruta extravascular. Sin tomar en cuenta el mecanismo involucrado, el resultado depende principalmente de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y por lo tanto de su estructura química. Durante las últimas décadas, mucho trabajo de investigación ha sido dirigido hacia el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos que puedan permitir que el destino de los fármacos dentro de los pacientes sea controlado por modificaciones en estos procesos. Aunque los acarreadores de fármacos usualmente actúan en el proceso de distribución dentro del organismo, también pueden afectar la absorción, biotransformación y la eliminación (Barratt, 2003).

En la forma tradicional de liberación de fármacos, estos serán llevados a través de la sangre hacia el sitio de interés. La desventaja de este proceso es el daño que se provoca a otras células y órganos sanos por efecto de la toxicidad del fármaco, ya sea por sí mismo o por su biotransformación. Sin embargo este hecho ha sido superado por la liberación dirigida de fármacos, donde el fármaco, por acción del acarreador, es liberado hacia el objetivo sin afectar ninguna otra célula, tejido u órgano. En este aspecto, siempre ha habido un considerable interés en el desarrollo de nanopartículas biodegradables como dispositivos de liberación de fármacos (Viswanathan, 2009) (Swarbrick, 2002).

6.3. Nanopartículas farmacéuticas

La aplicación de las nanopartículas (NP) con fines farmacéuticos y médicos, tiene más de 35 años, una de las definiciones más aceptadas y utilizadas dentro del ámbito farmacéutico, acerca de lo que es una nanopartícula, corresponde a la propuesta por Kreuter en 1983. El define a las nanopartículas con propósitos farmacéuticos como partículas coloidales sólidas, que se encuentran en un rango de tamaño de 1 a 1000 nm (1 μ m). Estas consisten de materiales macromoleculares y pueden ser usadas terapéuticamente como acarreadores de fármacos, en las cuales el principio activo (fármaco o material biológicamente activo) se encuentra disuelto, atrapado, encapsulado o incluso, que este principio activo se encuentre adsorbido o enlazado a las NP. Esta definición fue posteriormente adoptada por la Enciclopedia de Tecnología Farmacéutica y por la Enciclopedia de Nanotecnología (Kreuter, 2007).

Dentro del desarrollo de NP como SLC se pueden distinguir de manera general dos tipos: nanoesferas, que son sistemas matriciales en donde el fármaco es físicamente y uniformemente dispersado, tiene una estructura tipo matriz donde el fármaco es adsorbido en la superficie, atrapado o disuelto dentro de la partícula; por otra parte tenemos a las nanocápsulas, que son sistemas vesiculares compuestas de una membrana polimérica que rodea un núcleo oleoso o acuoso, donde el fármaco es confinado a la cavidad rodeada por la membrana polimérica. En la ilustración 1 se pueden observar los dos tipos de NP antes descritos (Swarbrick, 2002).

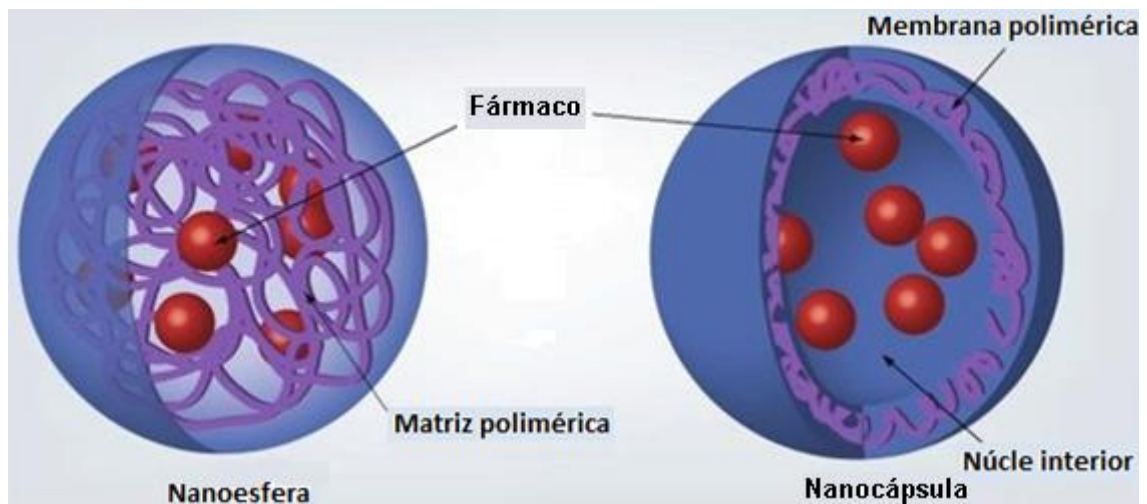


Ilustración 1 Representación esquemática de los dos principales tipos de nanopartículas poliméricas. De lado izquierdo, se muestra una nanoesfera (matriz polimérica), mientras del lado derecho aparece una nanocápsula (sistema reservor) (Bei, Meng, & Youan, 2013).

6.3.1. Aplicación de las nanopartículas en sistemas de liberación controlada

Uno de los sectores donde más ampliamente se ha aplicado el desarrollo de nanopartículas, es sin duda el de la tecnología farmacéutica, donde se puede aplicar en terapia génica, diagnóstico, imagenología, acarreadores de agentes terapéuticos, detección y prevención de enfermedades en etapas tempranas de desarrollo, cirugía, ingeniería de tejidos, implantes, etc. Dentro de sus aplicaciones como sistemas de liberación se encuentran las siguientes (Shayne Cox, 2008):

- Sistemas de liberación dirigida a tumores.
- Prolongación de fármacos en circulación.
- Reversión de la resistencia de células tumorales.
- Sistemas de liberación oral para péptidos y proteínas.
- Liberación dirigida de nanopartículas a células epiteliales en el tracto gastrointestinal, usando ligandos.
- Sistemas de liberación de genes.
- Sistemas de liberación en el cerebro.

A continuación se muestra en la tabla 1, los tipos de nanopartículas más ampliamente estudiados, sus características y su aplicación farmacéutica.

Tabla 1 Aplicaciones de diversos tipos de NP (Swarbrick, 2002) (Shayne Cox, 2008).

Tipo de NP	Características	Aplicación Farmacéutica
Nanopartículas	Partículas sólidas que consisten de polímeros, lípidos, o materiales inorgánicos de forma esférica en la mayoría de los casos, el componente activo se encuentra disperso por toda la partícula.	Cargar todo tipo de agentes activos, incluidos fármacos, vacunas, agentes de diagnóstico e imagenología, para mejorar su biodisponibilidad, liberación dirigida y controlada.
Nanocápsulas	Partículas con núcleo donde el componente es confinado.	Cargar todo tipo de agentes activos con los mismos objetivos que las nanopartículas, con la posibilidad de proteger el agente por acción de la membrana.
Liposomas	Vesículas lipídicas donde los componentes se pueden encontrar dentro de la fase interior o en la bicapa dependiendo de las propiedades fisicoquímicas.	Cargar todo tipo de agentes activos para mejorar su biodisponibilidad, liberación dirigida y controlada.
Niosomas	Vesículas de tensoactivos no iónicos con propiedades similares a los liposomas.	Cargar todo tipo de agentes activos con los mismos objetivos que los liposomas.
Nanoemulsiones	Emulsiones de talla nanométrica.	Cargar fármacos, es también un método para preparar nanopartículas.
Micelas poliméricas	Micelas que consisten de polímeros anfifílicos.	Cargar fármacos hidrofóbicos en el núcleo para su solubilización, liberación dirigida y controlada.
Nanogeles	Hidrogeles de talla nanométrica que consisten en polímeros hidrofílicos reticulados.	Cargar varios componentes para liberación dirigida y controlada.
Dendrimeros	Macromoléculas monodispersas bien definidas, de talla nanométrica con estructuras ramificadas.	Cargar todo tipo de agentes activos para mejorar su biodisponibilidad, liberación dirigida y controlada.
Nanotubos de carbono (CNTs)	Tubos de carbono de talla nanométrica. Si se enrollara una hoja de grafito, dando una sola capa, se obtiene un CNTs de una sola pared: SWNTs, o si se enrollaran varias capas para formar cilindros concéntricos se obtiene un CNTs multipared: MWNTs.	Vinculación de una gran variedad de moléculas activas con CNTs.
Fulerenos	Son esferas muy pequeñas que consisten en 60 átomos de carbono, con un diámetro de alrededor de 0.7 nm.	Sus derivados pueden actuar como antibióticos, se comienza a vincularlos con varias moléculas activas.

Puntos Cuánticos	Más comúnmente llamados "Quantum Dots", son pequeños nanocristales, comúnmente hechos de materiales semiconductores del rango de 2-10 nm, brillan al ser expuestos bajo luz ultravioleta.	Mayormente probados como marcadores de anticuerpos, virus, proteínas o ácidos desoxirribonucleicos (DNA) <i>in vivo</i> .
Nanosuspensiones	Nanocristales de fármaco dispersos en medio acuoso comúnmente estabilizado por tensoactivos.	Adecuado para fármacos insolubles para obtener una buena biodisponibilidad y una liberación dirigida.
Nanoestructuras de autoensamblaje	Nanoestructuras que consisten en profármacos anfifílicos.	Adecuadas para fármacos hidrofílicos para obtener una buena biodisponibilidad, liberación dirigida y controlada.

6.3.2. Ventajas de las nanopartículas como sistemas de liberación controlada

Las ventajas del uso de NP radican en sus interesantes propiedades. Debido a su pequeño tamaño, las nanopartículas pueden penetrar a través de pequeños capilares y ser captadas por las células, donde se permite la eficiente acumulación del fármaco en los sitios específicos. El uso de materiales biodegradables para fabricación de NP, permite mantener la liberación del fármaco desde la matriz de la NP hacia el sitio específico durante periodos de tiempo largos (días o semanas). Por otra parte las NP tienen el potencial de atravesar la barrera hematoencefálica, siendo este un particular problema en una gran cantidad de fármacos. Las NP también pueden proteger el fármaco de las interferencias gastrointestinales y degradaciones enzimáticas. Todo esto permite la reducción de la dosis y la frecuencia de dosificación, reduciendo los efectos secundarios, así como la reducción de la toxicidad por efecto del fármaco. Además es posible lograr una muy alta estabilidad, manipulando sus propiedades de superficie, así como el tamaño de la partícula. Existen además, una gran cantidad de materiales disponibles para la formulación de NP. Es factible incorporar sustancias hidrofílicas e hidrofóbicas; es factible también el suministro de las NP por varias rutas de administración, como lo pueden ser, vía oral, parenteral, sublingual, gastroentérica, transdérmica y oftálmica. (Viswanathan, 2009) (Gelperina, Kisich, Iseman, & Heifets, 2005) (Mohanraj & Chen, 2006).

Algunos de los principales aspectos a resaltar durante el desarrollo y uso de NP como sistemas de liberación incluyen los siguientes (Gelperina, Kisich, Iseman, & Heifets, 2005):

- Las características de tamaño y superficie de las NP pueden ser fácilmente manipuladas para lograr liberación dirigida del fármaco hacia el sitio de acción.

- El control y la liberación sostenida del fármaco durante la transportación hacia el sitio de acción, altera la distribución del fármaco en el tejido y subsecuentemente la depuración del fármaco, además incrementa el efecto terapéutico y reduce los efectos adversos.
- Las características de liberación controlada y la degradación de las partículas pueden ser moduladas por la elección de los materiales que constituyen la matriz.
- La carga de las NP con el agente activo es relativamente alta y los fármacos pueden ser incorporados en los sistemas sin una reacción química; esto es un factor importante para la preservación de la actividad del fármaco.
- El sitio específico de liberación, puede ser alcanzado al incorporar ligandos a la superficie de la NP o usando una guía magnética.
- Estos sistemas pueden ser usados por varias rutas de administración, incluyendo oral, nasal, parenteral, intraocular, etc.

6.4. Propiedades de las nanopartículas

Como ya se mencionó anteriormente, las características únicas de las NP se deben a su escala nanométrica, a continuación se muestran en la tabla 2, las principales propiedades de las NP con fines farmacéuticos.

Tabla 2 Principales propiedades de las NP con fines farmacéuticos (Viswanathan, 2009).

Propiedad	Evaluación
Tamaño de partícula	• Talla de la NP.
Propiedades cinéticas	• Velocidad de disolución. • Velocidad de sedimentación. • Movimiento Browniano.
Propiedades de superficie	• Potencial Z.

6.4.1. Tamaño de partícula

Las propiedades únicas de las nanopartículas se deben al pequeño tamaño que presentan, así principalmente el tamaño determina su distribución *in vivo*, el destino biológico, la toxicidad y la capacidad de dirigirse hacia blancos específicos. En adición a esto, también puede influenciar la cantidad de principio activo cargado, su liberación y la estabilidad de las NP. Existen estudios previos, que han demostrado que las NP en general tienen una mayor captación intracelular en comparación con las micropartículas, además tiene un rango mayor de objetivos biológicos, debido a su pequeño tamaño y su relativa movilidad. Las NP debido a su tamaño son capaces de

atravesar diversas barreras y mucosas, por otra parte, son captadas eficientemente por algunas líneas celulares, lo que no ocurre con micropartículas. Al decrecer el tamaño de partícula incrementa el área superficial para una determinada cantidad de material. En adición a esto, al incrementar el área superficial, el porcentaje de moléculas en la superficie también incrementa. La liberación del fármaco se ve afectada por el tamaño de partícula, esto se debe a que las partículas pequeñas tienen una gran área superficial lo que facilita una rápida liberación a diferencia de las partículas grandes que poseen una menor área, por lo que la difusión del fármaco es lenta (Viswanathan, 2009).

6.4.2. Propiedades cinéticas

Las propiedades cinéticas de las NP juegan un rol crítico dentro del desarrollo y caracterización de las mismas, pues nos permiten evaluar cómo se comporta el sistema nanoparticulado a través de membranas, en diferentes medios, la velocidad de disolución, así como la estabilidad de las mismas (Ober & Gupta, 2011).

6.4.2.1. Velocidad de disolución

El incremento del área superficial de la nanopartículas puede incrementar significativamente la pobre disolución de los fármacos en agua, esto es una ventaja sobresaliente, ya que se estima que alrededor del 40% de los fármacos bajo desarrollo presentan baja solubilidad en agua. La relación entre el área superficial y la disolución del fármaco está dada por la ecuación de Noyes-Whitney (Ober & Gupta, 2011):

$$\text{Velocidad de disolución} = \frac{A \cdot D}{h} (C_s - C_b)$$

Donde A es el área superficial del fármaco, D es el coeficiente de difusión, h es el grosor de la capa de difusión, C_s es la concentración del sólido en la capa de difusión que rodea al sólido y C_b es la concentración del sólido en el medio de disolución principal.

6.4.2.2. Velocidad de sedimentación

Por otra parte, debido a su pequeño tamaño, las nanopartículas son menos propensas a la sedimentación gravitacional y pueden ser fácilmente suspendidas en formulaciones líquidas. La

velocidad de sedimentación, v , de una partícula está dada por la ley de Stokes (Ober & Gupta, 2011):

$$v = \frac{d^2 g (\rho_s - \rho)}{18 \mu_l}$$

Donde d es el diámetro de la partícula, g es la aceleración gravitacional, ρ_s es la densidad del sólido, ρ es la densidad del líquido y μ_l es la viscosidad del líquido.

6.4.2.3. Movimiento Browniano

La resistencia a la sedimentación resulta del movimiento térmico aleatorio, movimiento Browniano, para este desplazamiento Browniano, x , se puede calcular por la siguiente ecuación (Ober & Gupta, 2011):

$$x = \sqrt{\frac{2k_b T t}{\pi \mu d}}$$

Donde k_b es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, t es el tiempo, μ es la viscosidad el líquido y d es el diámetro de la partícula. Al disminuir el tamaño de partícula, la velocidad de sedimentación es menor que su movimiento browniano, permitiendo que las partículas permanezcan suspendidas en solución. Usando nanopartículas en suspensiones farmacéuticas líquidas, se obtiene un producto más homogéneo con una mayor vida de anaquel y se evita la necesidad de agitar antes de usar.

6.4.3. Propiedades de superficie

Otra propiedad importante de las NP es la carga superficial, que influye en la distribución de las cargas (iones) alrededor de la partícula desarrollando un campo eléctrico formado por una carga circundante, formada por una región interior donde los iones se encuentran fuertemente enlazados (capa de Stern) y una región donde los iones están menos enlazados (capa difusa o de Nernst); al conjunto de las capas de Stern y la capa difusa se le denomina doble capa eléctrica o doble capa de Helmholtz. Las cargas eléctricas determinan la interacción de las partículas, dando como resultado la estabilidad física de la dispersión coloidal. La fuerza de repulsión entre partículas es definida por el potencial zeta, que es una medida de la fuerza eléctrica que existe entre partículas en un líquido. De tal manera el potencial Z es utilizado para caracterizar la carga de la superficie de una partícula en solución, sin embargo no es propiamente la carga de la

partícula. El potencial Z (ζ), puede definirse como la diferencia del potencial electrostático que existe entre la separación de la capa rígida que rodean a la partícula (capa de Stern) y la región de la capa difusa, además el potencial Z es influenciado por la composición de la matriz y por el medio en el que las NP son dispersadas. El ζ está dado por la siguiente ecuación (Ober & Gupta, 2011):

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\epsilon}$$

Donde ϵ , es la constante dieléctrica del buffer, e , es el exceso total de cargas en solución por unidad de área y δ es el espesor de la doble capa difusa. Se muestra la representación gráfica de las capas mencionada en la explicación en la ilustración 2.

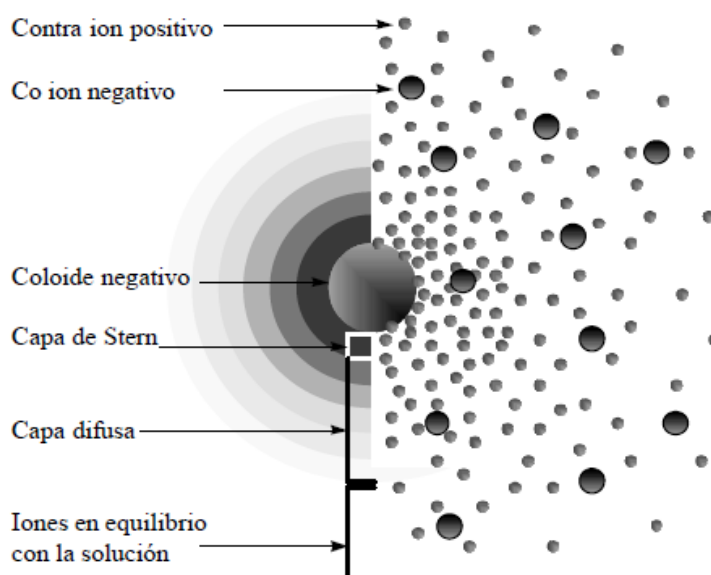


Ilustración 2 El sistema coloidal crea una disposición espacial de doble capa ordenada de iones alrededor de las partículas. La vista de la izquierda muestra el cambio de densidad de iones alrededor del coloide. La de la derecha muestra la distribución de los iones positivos y negativos alrededor de la partícula cargada negativamente (Pedraze & Laverde, 2013).

Además de las propiedades anteriormente señaladas, las nanopartículas pueden ofrecer otras propiedades únicas, como las magnéticas y ópticas, con una gran relevancia en el tratamiento y diagnóstico clínico, así como en el campo de la imagenología (Ober & Gupta, 2011).

6.5. Métodos de preparación de nanopartículas

En los recientes años se han desarrollado numerosos métodos para la obtención de NP, que incluyen desde sofisticados procesos como electrodispersión y dispersión por plasma, ablación laser, aplicación de fluidos supercríticos, hasta procesos más simples que no involucran equipo altamente sofisticado. Sin embargo el desarrollo de NP como sistemas de liberación de fármacos, se ha enfocado más hacia el desarrollo de métodos de sistemas coloidales que proporcionen partículas poliméricas con las propiedades adecuadas para su aplicación, como son el tamaño, propiedades de superficie, carga del fármaco, etc. La aplicación de estas NP poliméricas se debe, como ya se mencionó, a su obtención relativamente sencilla con respecto a las técnicas más sofisticadas, los polímeros utilizados son biodegradables y pueden ser fácilmente desechados por el organismo, además pueden ser cargadas con una buena cantidad de fármaco, entre otras características (Swarbrick, 2002).

Los métodos de obtención de NP poliméricas pueden clasificarse en dos grupos dependiendo la manera en que la NP es formada, por una parte, dependiendo si las nanopartículas son formadas al mismo tiempo que el polímero, requiriendo una reacción de polimerización, y por otra parte, si las nanopartículas son obtenidas directamente de un polímero preformado. En el presente trabajo se obtuvieron las NP a partir del método de polimerización aniónica; proceso que involucra la formación del polímero a partir de los monómeros presentes en la matriz de reacción (Swarbrick, 2002).

6.6. Métodos de preparación de NP a partir de polimerización

A continuación son descritos algunos de los métodos más comunes dentro del ámbito farmacéutico para la obtención de NP a partir de polimerización, ya que a pesar de la diversidad de métodos documentados y agentes químicos disponibles, así como a la extensa combinación de métodos para obtener nanopartículas, sólo unos cuantos de éstos ofrecen potencial real para el desarrollo de aplicaciones farmacéuticas debido al estricto marco regulatorio que deben cumplir los excipientes para la liberación de fármacos (F. M. Goycoolea, 2009).

6.6.1. Emulsión polimerización

En este método el monómero es emulsificado bajo agitación en una fase continua donde este no es soluble. La polimerización es usualmente iniciada por la reacción del iniciador con las

moléculas de monómero que son disueltas en la fase continua de la emulsión. La polimerización continúa por la adición de moléculas de monómero que difunden hacia la cadena polimérica en crecimiento a través de la fase continua. La cadena de polímero en crecimiento sigue siendo soluble hasta que llega a un cierto peso molecular en el que se vuelve insoluble. Por lo tanto, la separación de fases lleva a la nucleación de las partículas poliméricas y a la formación del efecto Tyndall. Además, el crecimiento de las partículas nucleadas se produce de acuerdo con un mecanismo que depende de las condiciones de estabilidad de todo el sistema. Esto incluye la captura de nuevas cadenas poliméricas en crecimiento, fusión o colisión entre partículas nucleadas. El proceso puede ser convencional o inverso, dependiendo de la fase continua en la emulsión. En el caso convencional, la fase continua es acuosa, o/w, mientras que en caso inverso la fase continua es orgánica, w/o. En la ilustración 3 se muestra el mecanismo general de formación de NP, por emulsión polimerización (Swarbrick, 2002).

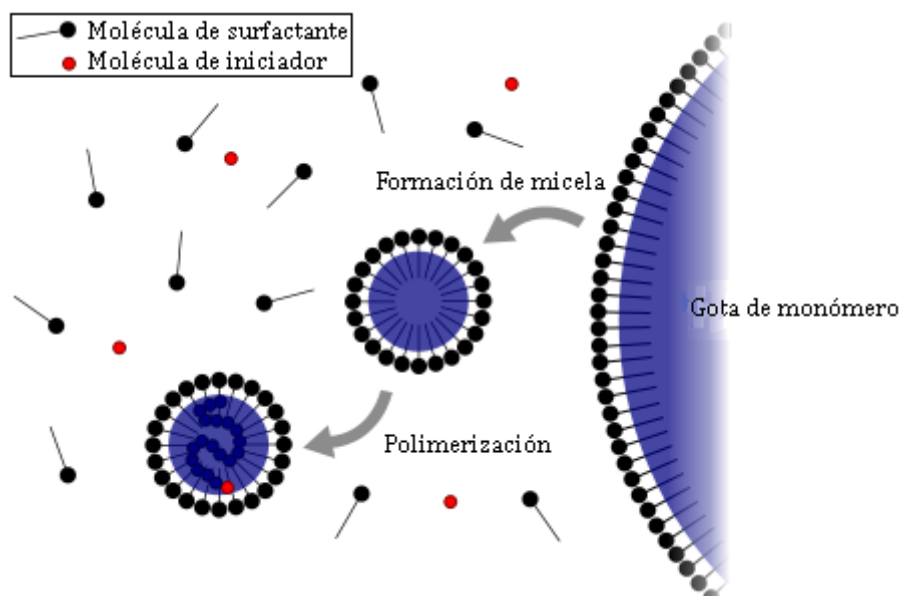


Ilustración 3 Representación esquemática de formación de NP por emulsión-polimerización (Amici, 2013).

Los dos métodos propuestos para el proceso de Emulsión-polimerización, son clasificados en “polimerización y nucleación micelar” y “polimerización y nucleación homogénea” por Jörg Kreuter:

6.6.1.1. Polimerización y nucleación micelar

En este método el monómero es emulsificado en la fase continua donde este no es miscible con ayuda de un tensoactivo. Esto genera la formación de micelas llenas de monómero y gotas de

monómero estabilizado. Estas micelas tienen una talla de rango nanométrico y tienen más área superficial que las gotas de monómero. La polimerización ocurre con la presencia de un iniciador químico o físico. La energía proveniente por el iniciador crea monómeros reactivos libres en la fase continua, los cuales chocan con los monómeros no reactivos que los rodean e inician la reacción de polimerización en cadena. Las moléculas de monómero alcanzan las micelas y difunden de las gotas de monómero a través de la fase continua, permitiendo la polimerización hasta las micelas. En este caso las gotas de monómero actúan como reservas de monómero. En este proceso los monómeros son ligeramente solubles en la fase continua (Rangasamy, 2011).

6.6.1.2. Polimerización y nucleación homogénea

Este proceso se aplica ampliamente en los casos donde el monómero es lo suficientemente soluble en la fase continua. La nucleación y polimerización ocurre directamente en esta fase, formando cadenas primarias llamadas oligómeros. Tanto las micelas como las gotas actúan como reservas de monómeros durante el crecimiento de la cadena polimérica. Cuando los oligómeros han alcanzado una cierta longitud, estos precipitan y forman partículas primarias, las cuales son estabilizadas por las moléculas de surfactante provistas por las micelas y las gotas. Dependiendo las condiciones y la estabilidad del sistema, el producto final da las nanopartículas, que son formadas por la adición de monómeros dentro de las partículas primarias o por la fusión de partículas primarias (Rangasamy, 2011).

6.6.2. Polimerización interfacial.

En este método, la polimerización ocurre cuando un monómero soluble en la fase acuosa y un monómero soluble en la fase orgánica son llevados a la interface de las fases del sistema. De tal forma que cada una de las fases contiene un monómero capaz de reaccionar entre sí. Como consecuencia, la formación del polímero es el resultado de una reacción interfacial entre los monómeros, llevando a la formación de nanopartículas. Posterior a la formación inicial de la nanopartícula, la polimerización interfacial es controlada por difusión. El tamaño de estas últimas depende de la talla de la emulsión inicial (Rangasamy, 2011).

6.6.3. Dispersión polimerización

En este proceso el monómero es disuelto en un medio acuoso, que actúa como precipitante para el polímero formado subsecuentemente. A diferencia de los métodos mencionados

anteriormente, la nucleación para la formación de las NP es inducida directamente en la solución acuosa del monómero y la presencia de estabilizante o tensoactivos no es absolutamente necesario para la formación de nanoesferas estables. Este método es comúnmente utilizado para preparar NP biodegradables de poliacrilamida y polimetacrilato de metilo (PMMA) (Rangasamy, 2011).

6.6.4. Polimerización aniónica

Este método fue utilizado para la obtención de las NP de PECA/Quitosán; el proceso de obtención es similar al de polimerización y nucleación homogénea, con la diferencia de que no es necesaria la formación de micelas para la formación de NP, el monómero con un doble enlace puede ser polimerizado por vía aniónica, dependiendo de la densidad de electrones en el doble enlace y esta densidad de electrones depende de los grupos sustituyentes presentes, los atractores de electrones disminuyen la densidad de estos sobre el doble enlace y por ello favorecen la polimerización aniónica. Couvreur et al., demostraron que las NP pueden obtenerse por la dispersión del monómero en una solución ácida acuosa con un pH bajo que contenga el emulsificante (Behan, Birkinshaw, & Clarke, 2001).

6.6.5. Gelación iónica

Este método involucra la mezcla de dos fases acuosas, de las cuales una es el polímero, como el quitosán, y la otra fase contiene tripolifosfato de sodio. En este método las cargas positivas del grupo amino del quitosán, interactúan con las cargas negativas del tripolifosfato, formando coacervados de tamaño nanométrico. Los coacervados son formados como resultado de la interacción electrostática entre las dos fases acuosas; sin embargo la gelación iónica implica la transición del material de líquido a gel, debido a las condiciones de interacción iónica a temperatura ambiente (Nagavarma & Hemant, 2012).

6.7. Caracterización de nanopartículas

La caracterización de las NP es bastante similar en todas las disciplinas, sin embargo, hay un número de parámetros relevantes que deben ser considerados para su aplicación como sistemas de liberación. Estos parámetros incluyen la caracterización de (Swarbrick, 2002):

- Tamaño de partícula.
- Índice de polidispersión.

-
-
- Forma.
 - Potencial Z.
 - Cristalinidad.
 - Composición.
 - Disolución.

Para las NP fabricadas en el presente trabajo de tesis, fueron caracterizadas la morfología, tamaño de partícula, la distribución y potencial Z.

6.7.1. Caracterización del tamaño de partícula

El tamaño de partícula junto con el índice de polidispersión son factores críticos para el desarrollo de NP como sistemas de liberación controlada, ya que determinan el éxito para alcanzar un blanco específico. En el trabajo presentado el tamaño de partícula y el índice de polidispersión se evaluaron por dispersión de luz dinámica, por otra parte la morfología se determinó por microscopía electrónica de barrido (Swarbrick, 2002).

6.7.1.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En este método se utiliza un haz enfocado de electrones de alta energía para generar una variedad de señales en la superficie del espécimen sólido. Las señales derivan de las interacciones entre el electrón y la muestra, revelando información acerca de la muestra; incluida la morfología externa (textura), composición química, estructura cristalina y orientación del material. En la mayoría de las aplicaciones, los datos son colectados a lo largo de un área seleccionada en la superficie de la muestra y una imagen en dos dimensiones es generada, mostrando las variaciones espaciales de estas propiedades. La aceleración de los electrones en SEM lleva a aumentos significativos de la energía cinética, y esta energía es disipada en una variedad de señales producidas por las interacciones entre el electrón y la muestra, donde los electrones incidentes son desacelerados en la muestra sólida. Estas señales incluyen electrones secundarios, que dan lugar a las imágenes en SEM, electrones retrodispersados, fotones, luz visible y calor. Los electrones secundarios y los retrodispersados son comúnmente usados para la formación de imágenes, los electrones secundarios son más valiosos para mostrar la morfología y topografía en la muestra, mientras que los electrones retrodispersados tiene mayor valor para las ilustraciones de contraste en composición y muestras multifases. En la SEM la muestra es recubierta con una capa de metal delgado y después se hace incidir un haz de

electrones acelerados enviados desde un cañón. Este haz se focaliza sobre la superficie de la muestra de forma que realiza un barrido de ésta; la señal emitida por los electrones y radiación resultantes del impacto se recoge mediante un detector y se amplifica. Este método tiene una resolución de 3 y 20 nm y un rango de aumentos que varía desde 10 hasta 200,000 con una distancia focal de 35 mm. El poder de resolución del microscopio es determinado directamente por el área mínima que la sonda es capaz de escanear. La alta resolución e imágenes tridimensionales proporcionan información topográfica, morfológica y de composición, lo hace muy versátil la aplicación del SEM a la caracterización de NP (UNED, 2012).

6.7.1.2. Dispersión de luz dinámica

Este es uno de los métodos más populares usados para determinar el tamaño de partícula, también conocido como espectroscopía de fotocorrelación o dispersión luz cuasielástica. En este método se realizan seguimientos de las fluctuaciones de la dispersión de luz debido al movimiento Browniano de las partículas en suspensión en función del tiempo. La velocidad en que las fluctuaciones en la dispersión de luz se presentan, es dependiente del tamaño de partícula, permitiendo obtener la velocidad del movimiento Browniano. Al correlacionar la velocidad del movimiento Browniano con las fluctuaciones de la dispersión de luz por medio de la ecuación de Stokes-Einstein es posible obtener el valor de diámetro hidrodinámico y correlacionarlo para discernir el tamaño de partícula (Malvern, 2012).

6.7.2. Potencial Z

El potencial Z, es un parámetro comúnmente usado 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 Z mayor a $(\pm) 30$ mV muestran una gran estabilidad en suspensión, ya que la carga superficial previene la agregación de las partículas. 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. Es de suma importancia el conocimiento del potencial Z, ya que no solo afecta directamente en la formulación y estabilidad, sino que las propiedades de superficie de las NP afectan directamente sobre su distribución y degradación, influenciado así la posible toxicidad de los sistemas nanoestructurados administrados (Mohanraj & Chen, 2006).

El cálculo de potencial Z por el método de electroforesis por efecto Doppler con láser, se fundamenta en la medición de la desviación Doppler causada por una partícula que es movida electroforéticamente. Los electrodos son insertados en la muestra del fluido por medio de los cuales el sistema aplica un campo eléctrico que hace que las partículas alcancen una velocidad, que es conocida como velocidad electroforética. Los electrodos positivo y negativo son cambiados de polaridad de tal forma que las partículas se mueven continuamente de un electrodo hacia el otro. La muestra que está entre los electrodos es iluminada con un rayo láser y la dispersión de este rayo láser es usada para determinar la desviación Doppler causada por el movimiento de las partículas. Con la desviación Doppler medida y las propiedades ópticas y geométricas del dispositivo de medición conocida, se determina la movilidad electroforética. Con la movilidad electroforética conocida se usa la aproximación de Smoluchowski para obtener el potencial zeta (ζ) (Tibaquirá & Posner, 2007).

6.8. Aplicación farmacéutica de nanopartículas de PECA-Quitósán

Aunque el estudio de NP obtenidas a partir de estos materiales resulta de gran interés para algunos científicos desarrolladores de sistemas acarreadores de fármacos, la información acerca de estas nanoestructuras continúa siendo escasa, por lo que a continuación se aborda la aplicación de NP fabricadas de estos materiales individualmente y posteriormente se plantean algunas aplicaciones ya reportadas de la combinación de estos materiales.

A lo largo de las últimas décadas el quitósán se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de sistemas potencialmente innovadores para la liberación de fármacos, donde su versatilidad permite la formulación de diversos activos. Gracias a la compatibilidad del quitósán con muchos compuestos orgánicos como surfactantes, almidones, sales de amonio cuaternario, otros polímeros y aniones polivalentes, se pueden formar geles y precipitados. La naturaleza catiónica del polímero permite formar complejos con fármacos o excipientes de carga opuesta, con lo cual se modifican algunas de sus características físico-químicas. La reacción del quitósán con aniones polivalentes, da lugar a uniones tanto en medio ácido, básico o neutro. El quitósán se ha estudiado por la capacidad que presenta de liberación controlada de principios activos por su habilidad para formar geles. Las nanopartículas recubiertas con quitósán son más efectivas y de acción más prolongada, en comparación con las no recubiertas debido a que, por la mayor adhesividad a las mucosas, se prolonga el tiempo de residencia en los lugares de absorción, mejorando así la liberación localizada y la absorción del fármaco. Además, la aplicación de quitósán en la liberación de genes permite ventajas, algunas de las cuáles son: incorporación de

agentes que disminuyen la degradación de ADN en los compartimentos lisosomiales y endosomiales, coencapsulación de otros agentes bioactivos para plásmidos múltiples. Se está considerando la posible utilización de quitosán como vector no viral para la liberación de genes (Veiga Ochoa MD, 2004).

Por otra parte, las NP derivadas de poli-alquilcianoacrilatos, son de fundamental importancia ya que estos polímeros biodegradables poseen características adecuadas para su funcionamiento como vehículos de fármacos, ya se han realizado estudios previos donde NP cargadas con genes alcanzan el sitio específico de liberación, por otra parte, presentan versatilidad durante la formulación al permitir la obtención de nanocápsulas y nanoesferas. De manera general las NP derivadas de poli-alquilcianoacrilatos han demostrado tener baja toxicidad permitiendo extender su uso con bajas posibilidades de riesgo; permiten también modificar las propiedades de superficie de las NP, permiten alcanzar blancos específicos en el tejido o célula diana (Julien Nicolas, 2009).

La combinación de ambos materiales, el quitosán y el polietilcianoacrilato, para la formación de las NP presenta ventajas interesantes sobre su utilización por separado de cada uno de los materiales para ciertos tratamientos, como en la liberación de genes sobre sitios específicos, tratamientos para el cáncer y enfermedades autoinmunes, ya que además de proporcionar estabilidad a las nanoestructuras formadas, incrementa el transporte transcelular y paracelular a través del tejido epitelial. También se ha reportado la versatilidad para la obtención de nanocápsulas y nanoesferas, brindando la oportunidad de incluir diversos tipos de bioactivos en la formulación. Permiten también modificar las propiedades de superficie. Aun continúan estudios sobre aplicaciones de NP formadas de la dupla de estos materiales (Duan, Zhang, & Chen, 2008) (Julien Nicolas, 2009).

6.9. Toxicidad de nanopartículas de PECA-Quitosán

La toxicidad de nanopartículas fabricadas por la combinación de estos materiales realmente no está bien documentada, sin embargo existen estudios preliminares de pruebas *in vitro* que revelan el incremento de la bioadhesión en la mucosa del epitelio intestinal; este hecho repercute directamente en la toxicidad al incrementar el tiempo en que interactúan las entidades químicas propias de las partículas, y por ende, el tiempo en que los residuos interactúan con los tejidos, incrementando también el transporte paracelular al abrir las estrechas uniones entre las células (I. Bravo-Osuna, 2008).

La citotoxicidad de los materiales depende del tipo de célula, el recubrimiento del material, entre otros factores, que deberían ser tomados en cuenta en cada caso particular. Es bien sabido que la citotoxicidad de las nanopartículas de poli-alquilocianoacrilatos (PACA) se correlaciona con la velocidad de su degradación y la toxicidad generada por sus productos de degradación. La degradación de los materiales de PACA puede involucrar la hidrólisis de los enlaces éster (Yordanov & Bedzhova, 2011) (Mediano, 2003).

El poli-etilcianoacrilato (PECA) pertenece a la familia de los poli-alquilocianoacrilatos (PACA), 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 fármaco. Su aplicación en el caso concreto del diseño de vehículos de fármaco 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, al ser un polímero biodegradable y a que su amplio uso como adhesivo quirúrgico en humanos constituye una garantía de baja toxicidad, sin embargo las partículas de PECA se degradan relativamente más rápido que otros materiales de PACA con cadenas alquílicas mayores, esto puede resultar en una mayor toxicidad respecto a otras partículas de PACA. La estructura del PECA se muestra en la ilustración 4 (Mediano, 2003) (Yordanov & Bedzhova, 2011).

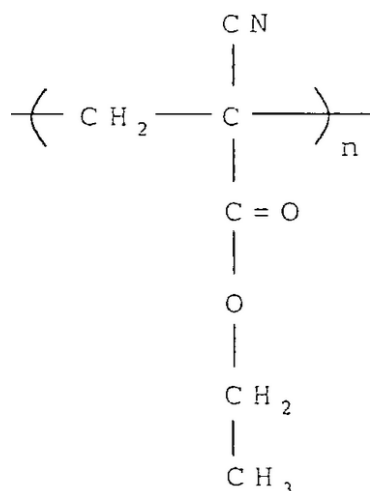


Ilustración 4 Estructura química del polietilcianoacrilato (ChemSpider, 2013).

Estudios *in vitro* muestran que la viabilidad celular es influenciada por la longitud de la cadena del polímero al evaluar partículas de PACA, se observaron cambios morfológicos en la membrana celular, así como perforaciones después de la administración. Un segundo mecanismo de daño es

debido a la alteración en la adhesión de la membrana; el poli-etilcianoacrilato es más tóxico respecto a otras partículas de PACA, porque las partículas primero se adhieren a la membrana celular, se degradan y posteriormente se liberan sus productos de biodegradación localmente (Christine Vauthie R., 2003).

Por otra parte el quitosán es un polímero natural que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. Es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina, unidades desacetiladas, y por otra parte, N-acetil-D-glucosamina, unidad acetilada, la estructura se muestra en la ilustración 5. La fuente y el método de obtención determinan la composición y tamaño de las cadenas de quitosán. Debido a su carácter catiónico y a sus propiedades gelificantes y filmogénicas, el quitosán ha sido estudiado en la industria farmacéutica por su potencial en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos. Constituye un vehículo para la encapsulación del fármaco, protegiéndolo y liberándolo de forma controlada, además de promover su absorción a través del epitelio. Así mismo, el quitosán presenta propiedades necesarias para su uso en dicha industria, como son su biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja toxicidad. La toxicidad del quitosán por vía oral es baja; se ha descrito una LD_{50} (dosis letal para el 50% de un conjunto de animales de prueba) de 16 g/Kg en ratas. El grado de desacetilación y el peso molecular promedio del quitosán son dos características físico-químicas fundamentales, ya que afectan a las propiedades de las formulaciones farmacéuticas basadas en este polímero (Harris, 2010).

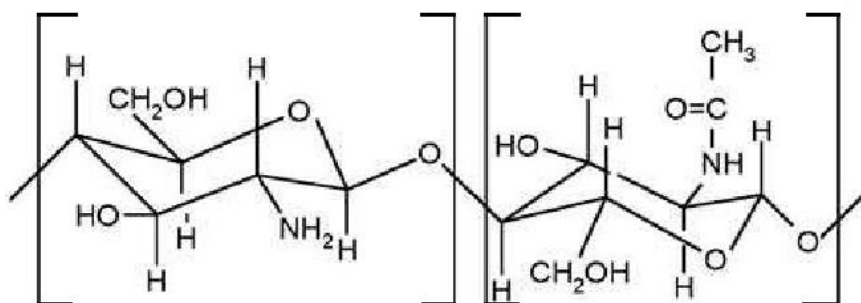


Ilustración 5 Estructura química del Quitosán, a la izquierda se muestra la unidad de D-Glucosamina y a la derecha la unidad de N-Acetilglucosamina (Jaime Retuert, 2000)

Las nanopartículas de quitosán pueden exhibir diferentes perfiles de citotoxicidad dependiendo de las propiedades del material usado para la síntesis de las nanopartículas, como el grado de desacetilación y el tamaño de las nanopartículas, además de las interacciones con el tipo de células. Sin embargo, en algunos estudios la viabilidad celular se ve reducida por la acción de nanopartículas de quitosán en comparación con el material a macroescala (Lifeng Qi, 2005).

6.10. Efecto del tamaño de nanopartículas en la toxicidad celular

El tamaño de los nanomateriales y su composición desempeñan un papel destacado en la respuesta celular. Además, esta respuesta es variable entre los diferentes tipos de células y materiales, probablemente se relaciona con la función fisiológica de los tipos de células. De manera general la citotoxicidad causada por el tamaño de partícula ha sido documentada, reportándose que a menor tamaño de partícula incrementa la toxicidad; sin embargo aún existe una discusión entre si las NP por sí mismas son las causantes del daño celular, o si es el material por sí mismo el causante del daño sin importar la talla de partícula (Napierska, Thomassen, Rabolli, & Lison, 2009) (Sohaebuddin, Thevenot, & Baker, 2010).

Al administrar nanopartículas *in vivo*, son generalmente capturadas por los macrófagos del sistema fagocítico mononuclear (SMF) después de la administración intravenosa. Dependiendo de sus características de superficie y tamaño las NP pueden ser más o menos opsonizadas. Dependiendo del recubrimiento con que se fabriquen las NP puede incrementar o disminuir su degradación por los macrófagos, el recubrimiento con polímeros hidrofílicos resulta en una modificación significativa en el perfil de distribución del cuerpo. Es evidente que el perfil de distribución de las partículas en el cuerpo puede influenciar la toxicidad por la entidad polímero-fármaco. Diversos estudios muestran que el diámetro de los complejos formados por las NP y los principios activos cargados en ellas es un factor importante al atravesar la membrana celular, ya que generalmente a menor diámetro, mayor transporte a través de la membrana (Christine Vauthie R., 2003) (Shi-Won Pang a, 2002).

Por otra parte se han observado resultados de diversos investigadores en los cuales, por diversos mecanismos y variables, la citotoxicidad es menor en partículas nanométricas de mayor tamaño, en comparación con partículas de la misma composición de menor tamaño. Para ejemplificar lo anterior, a continuación se describen algunos interesantes experimentos donde se reporta este resultado.

La evaluación citotóxica con nanotúbulos multicapas (MWNTs) de tres diferentes tamaños de población (MWNTs < 8 nm, MWNTs 20 – 30 nm, MWNTs > 50 nm) administrado a la misma dosis en macrófagos cultivados, reporta que los nanotúbulos de mayor tamaño causaron mayor citotoxicidad y apoptosis celular que los de menor tamaño. Posiblemente se pueda explicar este resultado por la rápida fagocitosis no específica de los macrófagos sobre las NP, por lo que estas células son propensas a sobrecargarse, ocasionando daño en la maquinaria celular, además de

que la expulsión de los MWNTs toma más tiempo por su geometría cilíndrica y no esférica (Sohaebuddin, Thevenot, & Baker, 2010).

Otros autores reportan que las NP de ferrita de níquel de tamaño de 150 nm fueron más tóxicas que las de 10 nm tras la exposición a la misma concentración, usando como modelo la línea celular Neuro-2A. Para explicar este fenómeno se plantea la posibilidad de que la interacción del área de las NP y lugares específicos de la célula se dé más efectivamente provocando mayores estímulos tóxicos en la célula (H. Yina, 2005).

Es claro por los estudios reportados previos a este trabajo de tesis, que el tamaño y composición de las NP juegan distintos roles en la respuesta celular. En adición, esta respuesta es variable entre tipos de células. Así mismo, el material puede causar diferentes respuestas intracelulares y mecanismos de toxicidad distintos dependiendo de la célula expuesta. La citotoxicidad de nanopartículas puede ser debido a muchos factores, como sus propiedades de superficie, el tiempo de exposición, la liberación de productos degradados, la estimulación de células y la subsecuente liberación de mediadores inflamatorios, la adhesión a la membrana e incluso la geometría; por lo que no se puede generalizar un mecanismo único de toxicidad. Además, la alteración farmacocinética y la disposición del fármaco cuando está asociado con nanopartículas podrían inducir nuevas respuestas celulares, de tejido o exposiciones a receptores, así como nuevos metabolismos e interacciones del fármaco (Christine Vauthie R., 2003) (Sohaebuddin, Thevenot, & Baker, 2010).

6.11. Nanotoxicología

La nanotoxicología está emergiendo como una importante subdisciplina de la nanotecnología, y hace referencia al estudio de las interacciones de las nanoestructuras con sistemas biológicos con un énfasis en elucidar la relación entre las propiedades fisicoquímicas de las nanoestructuras con la inducción de la respuesta biológica tóxica (Fischer & Warren, 2007).

Estudios recientes sugieren que las especiales propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales, representan un riesgo potencial para la salud humana. Dado el tamaño que presentan, pueden tener el potencial, basado en su geometría, composición, tamaño y transportación o durabilidad en el cuerpo, de causar efectos adversos en la salud humana (Hillegass, Shukla, & Sherrill, 2010).

Existen diversos factores responsables del efecto tóxico de las NP en los sistemas biológicos, dentro de los principales factores se encuentran los mencionados en la tabla 3:

Tabla 3 Principales factores causantes del efecto tóxico de las NP (Ricaud & Witschger, 2009).

Factor	Ejemplo
Exposición	<ul style="list-style-type: none"> • Rutas de entrada al sistema • Duración y frecuencia de exposición
Individualidad del organismo	<ul style="list-style-type: none"> • Susceptibilidad individual • Sitios de deposición • Evolución de la ruta de las NP después de la penetración
Características de nanopartículas	<ul style="list-style-type: none"> • Composición química • Tamaño • Área superficial específica • Superficie reactiva • Forma • Cristalinidad • Forma • Solubilidad • Carga eléctrica • Grado de agregación y aglomeración • Porosidad

Para las formulaciones farmacéuticas de sistemas de liberación, las nanopartículas son llevadas dentro del cuerpo humano intencionalmente por diversas vías de administración y las evaluaciones toxicológicas son particularmente necesarias. Por lo tanto, considerables esfuerzos han sido enfocados en la identificación del potencial tóxico de las nanopartículas en células y organismos. A pesar de los intensivos esfuerzos por parte de diversos grupos de investigación, los reportes de la respuesta celular de los nanomateriales son a menudo inconsistentes e incluso contradictorios. Adicionalmente, la relación entre la respuesta del tipo de célula y el nanomaterial no están bien entendidas (Sohaebuddin, Thevenot, & Baker, 2010) (De Jong & Borm, 2008) (Hillegass, Shukla, & Sherrill, 2010).

Las pruebas *in vitro* representan una opción para las evaluaciones preliminares de los materiales. De tal forma que se pueden aplicar diversas técnicas de biología celular y toxicología para la elucidación de los efectos toxicológicos y la posible capacidad de los nanomateriales de provocar enfermedad. Es importante resaltar que los modelos animales para evaluar la nanotoxicidad de los nanomateriales son prohibitivos en términos de tiempo y costo, además de tener otros inconvenientes, sin embargo las pruebas *in vitro* no pueden sustituir por completo a las pruebas *in vivo*. Es así como los datos de los estudios obtenidos por ensayos *in vitro* pueden ser engañosos

y requieren una verificación con experimentación animal (Hillegass, Shukla, & Sherrill, 2010) (De Jong & Borm, 2008).

6.11.1. Pruebas de nanotoxicidad *in vitro*

Dentro de la evaluación nanotoxicológica *in vitro*, Hillegass y sus colaboradores, clasifica las evaluaciones *in vitro* en cuatro categorías de acuerdo al criterio de evaluación, a continuación se presentan en la tabla 4 algunos de los ensayos según el criterio de evaluación:

Tabla 4 Evaluaciones *in vitro* de acuerdo al criterio de evaluación (Hillegass, Shukla, & Sherrill, 2010).

Criterio de evaluación	Ensayo
Citotoxicidad	<ul style="list-style-type: none"> • Azul de tripán • Viabilidad celular • Potasio intracelular • MTA • MTT • MTS • XTT • Eficiencia de formación de colonias o Clonogénico (CFE) • Lactato deshidrogenasa (LDH)
Proliferación celular	<ul style="list-style-type: none"> • Contenido de DNA • Incorporación de timidinatriada • Incorporación de bromodeoxiuridina • Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)
Genotoxicidad	<ul style="list-style-type: none"> • Determinación de mutaciones en los genes por ensayo Ames en <i>S. typhimurium</i> y <i>E. coli</i> • Identificación de bases modificadas en DNA por medición de bases de guanina oxidadas • Evaluación citogenética de daño cromosomal a través de análisis de inducción de aberraciones cromosómicas y micronúcleos • Evaluación de ruptura de cadena usando electroforesis en gel sobre placa simple (Ensayo cometa)
Expresión de genes	<ul style="list-style-type: none"> • Protección de ribonucleasas (RPA) • Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) • Análisis de microarreglos

6.12. Componentes de los modelos experimentales de toxicidad *in vitro*

La configuración de los modelos experimentales empleados *in vitro* para la evaluación tóxica de los componentes químicos se fundamentan en dos pilares básicos, que son el sustrato biológico y los indicadores de toxicidad. El sustrato biológico es el material, vivo o no, sobre el que se aplica

in vitro el xenobiótico, y cuyas reacciones ante tal estímulo queremos extrapolar a organismos más complejos. Estas alteraciones se valoran mediante los denominados indicadores de toxicidad, que son los parámetros que determinamos para cuantificar las modificaciones producidas en la estructura o fisiología de los componentes del sustrato de ensayo. El valor predictivo del modelo experimental *in vitro* dependerá de la buena conjunción entre su sustrato biológico y los indicadores de toxicidad aplicados, aunque también presentan gran trascendencia el protocolo utilizado para la exposición del tóxico y el procedimiento empleado para la evaluación la significación estadística de los resultados. Existen diversos tipos de sustratos biológicos e indicadores de toxicidad empleados dentro de los ensayos *in vitro*, los más comunes se muestran en la tabla 5 (Repetto & Menendez, 1995).

Tabla 5 Sustratos biológicos e indicadores de toxicidad empleados en ensayos *in vitro* (Repetto & Menendez, 1995).

Sustratos biológicos	Indicadores de toxicidad
<ul style="list-style-type: none"> • Cultivo de embriones. • Cultivo y baños de órganos. • Órganos perfundidos. • Explantes. Cultivos organotípicos. • Cultivo de reagregados celulares. • Cultivo de células dispersas. • Cultivo de líneas celulares. Clones celulares. • Modelos libres de células. 	<ul style="list-style-type: none"> • Morfología celular y tisular <ul style="list-style-type: none"> – Técnicas invasivas – Técnicas no invasivas • Viabilidad celular • Proliferación celular • Actividad metabólica celular <ul style="list-style-type: none"> – Sustancias reguladoras – Uso de energía, enzimas – Síntesis de macromoléculas – Inducción selectiva de proteínas • Membranas celulares <ul style="list-style-type: none"> – Composición y estabilidad – Permeabilidad iónica – Sistemas de transporte • Comunicación intracelular • Indicadores específicos

Dentro de los indicadores generales de toxicidad para el diagnóstico biológico de toxicidad se encuentran clasificados los biomarcadores, o marcadores biológicos, que pueden definirse como la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico y/o las alteraciones inducidas por el mismo sobre los componentes celulares o bioquímicos o sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra. A continuación se presenta en la tabla 6, la clasificación general y más aceptada por los investigadores acerca de los biomarcadores (Silbergeld & Lee Davis, 1994) (Repetto, 1997).

Tabla 6 Clasificación general de biomarcadores (Silbergeld & Lee Davis, 1994).

Biomarcador	Definición	Ejemplos
Exposición	<p>Sustancias exógenas, metabolitos y/o productos de biotransformación dentro del organismo que reflejan la exposición de éste a uno o varios xenobióticos. Usualmente se dividen en dos subgrupos basándose en la especificidad de las pruebas de detección:</p> <p>Selectivos: Se basan en la medida directa de los tóxicos, metabolitos o productos de biotransformación en fluidos biológicos.</p> <p>No selectivos: Constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Plomo en sangre. • Tioéteres en orina como indicadores de exposición a sustancias electrófilas y, por tanto, reflejo de la absorción de sustancias mutagénicas y cancerígenas.
Susceptibilidad	<p>Sustancias indicadoras de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Se deben generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN y sus fragmentos de restricción, clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas. Podemos distinguir dos tipos:</p> <p>Marcadores de polimorfismos de sistemas activadores: Medida de la actividad de las enzimas del citocromo P-450, implicadas en la toxicidad de numerosos xenobióticos.</p> <p>Marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores: Medida de la actividad de enzimas específicas detoxificadoras.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Polimorfismo de citocromo IID6 relacionado con la metabolización de la clorzoxazona, halotano, paracetamol. • Polimorfismo de la paraoxonasa sérica en la hidrólisis de varios compuestos organofosforados.
Respuesta (efecto)	<p>Sustancias indicativas de cambios bioquímicos en el organismo como resultado de la exposición a xenobióticos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Alteraciones en la actividad de la enzima ácido delta-amino levulínico deshidratasa, altamente sensible y específica en la exposición al plomo.

Los ensayos aplicados en el presente trabajo de tesis se realizaron sobre el cultivo de la línea celular HeLa, perteneciente a la clasificación de cultivo de líneas celulares como sustrato biológico y la evaluación de la viabilidad celular como indicadores de citotoxicidad. De manera general, la procedencia de las células para cultivo de líneas celulares puede ser animal o humana,

que se han adaptado a vivir en cultivo (aunque existen algunas derivadas de plantas). Esta adaptación está dada por proceso denominado transformación, que puede ocurrir espontáneamente o inducido por compuestos químicos, radiaciones o virus, las células pasan a tener una vida infinita convirtiéndose en una línea celular establecida. Por vida infinita se entiende la capacidad de éstas células de multiplicarse *in vitro* durante periodos prácticamente ilimitados. La línea celular HeLa, es una línea de células (inmortalizada) epiteliales provenientes de un tumor cervical, ampliamente usada en los estudios *in vitro* por todo el mundo (Repetto & Menendez, 1995).

6.13. Citotoxicidad

La citotoxicidad son todos aquellos efectos adversos o interferencias con estructuras y/o propiedades esenciales para supervivencia, proliferación y/o función celular. Entre todas las estructuras o compuestos celulares, cada una de ellas son más susceptibles a los agentes tóxicos en grado y mecanismo de acción diferente, por lo tanto han de monitorizarse adecuadamente en los estudios *in vitro* (Fernández Freire, 2008).

Para el estudio *in vitro* de los efectos tóxicos de los compuestos químicos, hemos de considerar dos tipos de mecanismos, referidos como citotoxicidad general y citotoxicidad órgano-célula específica. En primer lugar, los mecanismos de citotoxicidad general se deben a las interferencias producidas por un xenobiótico o sus productos de biotransformación, sobre los procesos basales comunes de la mayor parte de las células del organismo. La citotoxicidad órgano-célula específica, por su parte, concreta la existencia de órganos o células específicas que son diana para ciertos tóxicos y explica la mayor susceptibilidad y sensibilidad de éstos (Repetto & Menendez, 1995).

A continuación se desglosan los indicadores de citotoxicidad evaluados dentro del trabajo de tesis, así como el ensayo realizado para su evaluación.

6.13.1. Viabilidad celular

La viabilidad celular es a menudo definida como el número de células vivas en una muestra. Comúnmente el mismo ensayo usado para determinar viabilidad es usado repetidamente a lo largo de un periodo de tiempo para investigar la proliferación celular dentro de una población. Los métodos para evaluar la viabilidad celular pueden fácilmente ser categorizados dentro de

dos clases, por una parte los que analizan toda la población, y en otra clasificación los que involucran el análisis de una célula individual. Generalmente, el análisis poblacional es más rápido, pero da resultados menos detallados que los análisis que involucran el análisis de células individuales (Stoddart, 2011).

La evaluación de la viabilidad celular es una característica fundamental en todos los tipos de cultivos celulares. Es común que la viabilidad celular sea el principal propósito de la experimentación, tal como en los ensayos toxicológicos. Alternativamente, la viabilidad celular puede ser usada para correlacionar el comportamiento celular con el número de células, dando una visión más precisa de, por ejemplo, la actividad anabólica. Con el tiempo los ensayos para viabilidad se han vuelto más complejos, sin embargo el uso de colorantes se mantiene como una buena opción para su evaluación, además el desarrollo de colorantes cada vez más específicos, mantiene en vigencia la aplicación de estos ensayos. La medición final además puede ser llevada a cabo en un lector de placas en donde se montan una gran cantidad de muestras dando una mayor ventaja sobre otros ensayos. Dentro de los colorantes más aplicados para la evaluación de la viabilidad celular se encuentran el bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS), sodio-2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT) y el sodio-4-(3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benceno disulfonato (WST-1) (Stoddart, 2011).

6.13.1.1. Ensayo de MTT

El ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difeniltetrazolio) es usado para determinar los niveles de actividad metabólica en células eucariotas, incluyendo células animales, de plantas y hongos. Si la tasa metabólica es constante, la técnica puede ser empleada para contar células vivas en una muestra (viabilidad celular). Una vez que se establece, el método es muy robusto y puede ser automatizado para ser aplicado en un gran número de muestras. La determinación está basada en el cambio de color de la sal de tetrazolio como resultado de someterse a una reducción. Las bases químicas del ensayo son la reducción del colorante MTT, la cual es una sustancia ligeramente amarilla, que forma cristales de formazán azul después de la reducción. En la ilustración 6 se puede observar el cambio en la estructura molecular del colorante por la reducción (Stoddart, 2011).

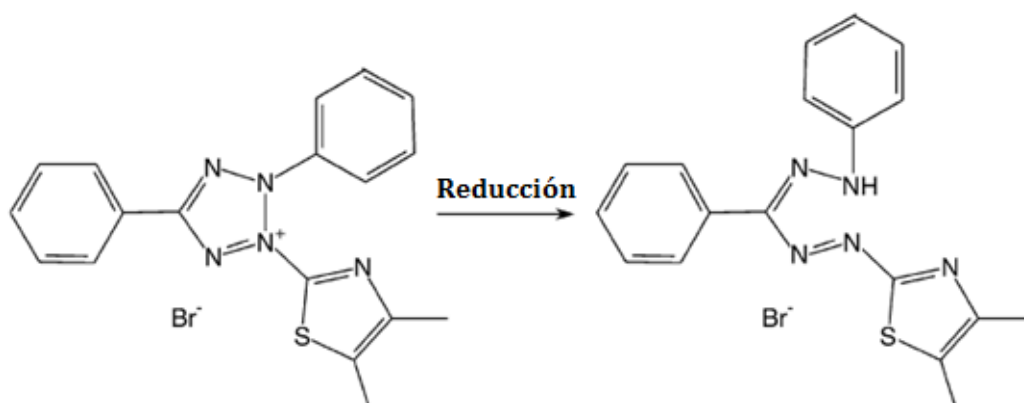


Ilustración 6 Reducción del MTT (Dojindo Molecular Technologies, 2013).

El proceso primario toma lugar en el citoplasma, por los endosomas, lisosomas y la mitocondria. La actividad de la reductasa en el retículo endoplasmático es altamente dependiente de la concentración intracelular de NADH y NADPH. La abundancia de estos cofactores nucleótidos es asociada con la disponibilidad de glucosa extracelular. Por lo tanto, medios de cultivo celulares agotados pueden causar bajas lecturas de MTT debido a esa baja concentración de glucosa. La succinato deshidrogenasa mitocondrial y el citocromo C también toman parte en la reducción del MTT. Por lo tanto, cualquier sustancia o tratamiento que interfiera con esas enzimas o con la glicolisis, cambia la velocidad de reducción del MTT, y consecuentemente altera los resultados del conteo celular. Como una consecuencia de estos procesos metabólicos, los cristales de formazán de color púrpura oscuro en forma de aguja se presentan en las células en unas pocas horas. Los cristales de formazán pueden ser solubilizados por una mezcla de diferentes solventes orgánicos, principalmente alcoholes. La cuantificación de los cristales de formazán puede llevarse a cabo mediante métodos espectrofotométricos, dentro de un intervalo de longitud de onda de 570 a 590 nm. La absorción es proporcional al número de células viables en la muestra. De tal forma, que la determinación de la capacidad de las células de reducir el MTT en formazán posterior a la exposición de un agente xenobiótico, permite obtener información acerca del potencial citotóxico de estos agentes (Stoddart, 2011).

6.13.2. Membranas celulares

Todas las células biológicas se hallan rodeadas por una capa limítrofe denominada membrana plasmática, que se compone principalmente de proteínas y lípidos polares. Dentro de sus principales funciones se encuentra el brindar protección a la célula y sus sensibles organelos internos, proporciona integridad a la célula, dándole su aspecto y forma; actúa como filtro de selectividad dejando entrar nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo, y

permitiendo que salgan los productos de desecho del metabolismo. La selectividad del transporte a través de la membrana se lleva a cabo por canales proteicos, bombas y compuertas que regulan el flujo de biomoléculas y la composición iónica del medio celular. La célula también se comunica con el medio que la rodea, al tener insertadas en el lado externo de la membrana plasmática proteínas receptoras donde se unen hormonas como adrenalina y la insulina, donde transmiten una señal química que regula los procesos metabólicos del interior de la célula (Boyer, 1999).

La membrana celular está constituida principalmente por proteínas, carbohidratos y lípidos; la proporción de estos varía según la fuente de la membrana. Cada tipo de célula y organelo tienen funciones particulares que dependen de las propiedades de sus membranas. La diversidad en la composición de la membrana puede dar lugar a que ésta desempeñe funciones muy específicas que son necesarias para la individualidad de la célula. El soporte estructural básico de las membranas lo provee una doble capa de lípidos. Los lípidos de la membrana poseen características estructurales comunes que favorecen su ensamblaje en el medio acuoso como una bicapa estable que se mantiene unida mediante interacciones hidrófobas, no covalentes. La bicapa de lípidos polares se forma por un proceso espontáneo; por consiguiente, esto debe representar una organización con baja energía libre. Las propiedades dinámicas de la membrana celular las llevan a cabo las proteínas de membrana. Dichas proteínas son de distintos tipos funcionales, incluidas las enzimas, las proteínas receptoras y las proteínas de transporte. La imagen que mejor representa lo que conocemos acerca de la estructura química y función biológica de las membranas es el modelo de mosaico fluido. Este modelo consiste de una bicapa lipídica con proteínas incrustadas, algunas en la superficie (periféricas) y otras atravesando la bicapa completa (integrales). Este modelo presupone que existe un contacto íntimo entre lípidos y proteínas, se muestra una representación de la estructura de la membrana en la ilustración 7. Las proteínas flotan con cierta libertad dentro y sobre la bicapa, creando un patrón de mosaico fluido. Las propiedades dinámicas de transporte también pueden explicarse con este modelo. Las moléculas no polares, posiblemente difunden a través de la membrana por la naturaleza hidrófoba de la región central. Las moléculas polares, hidrofílicas, deben ser transportadas con ayuda de proteínas específicas localizadas en la membrana. La membrana es fluida y constantemente está cambiando por la difusión lateral de las proteínas (Boyer, 1999).

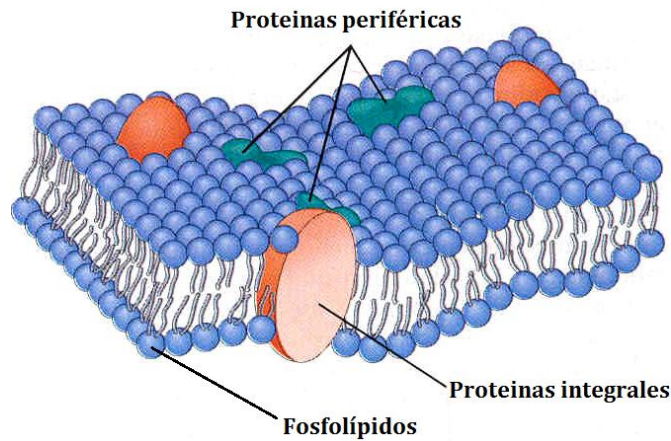


Ilustración 7 Modelo del mosaico fluido (Fisiología, 2007).

Las membranas pueden ser alteradas por los tóxicos de varias formas influyendo en su composición, estabilidad y permeabilidad iónica. Una membrana es permeable para ciertas partículas que pueden pasar a través de ella e impermeable para otras. La porción lipídica de la bicapa de la membrana es permeable para la mayoría de las moléculas apolares y sin carga, como las de oxígeno, dióxido de carbono y esteroides, pero es impermeable a los iones y a las moléculas con carga, como la glucosa (Tortora & Reynolds Grabowski, 2005) (Repetto & Menendez, 1995).

6.13.2.1. Ensayo de Azul de tripán

Los métodos de exclusión de colorantes son tradicionalmente usados para la evaluación de la viabilidad celular, de esta manera el uso de azul de tripán es uno de los más comunes. El azul de tripán ((3Z,3'Z)-3,3'-[(3,3'-dimetilbifenil-4,4'-diil)di(1Z)hidracina-2-il-1-iliden]bis(5-amino-4-oxo-3,4-dihidronaftaleno-2,7-ácido disulfónico) es una molécula orgánica, con una carga negativa neta, que deja a las células no viables con un característico color azul cuando se observa bajo el microscopio, mientras que las células viables aparecen sin teñir, la estructura de la molécula se muestra en la ilustración 8. Las células viables tienen intactas las membranas celulares y por lo tanto no toman el tinte a partir del medio circundante. Por otro lado, las células no viables no tienen una membrana intacta y funcional, por lo tanto toman el tinte de su entorno, es probable que la exclusión de la amina sea un proceso de membrana dependiente de energía. Esto se traduce en la capacidad de distinguir fácilmente entre las células viables y no viables, ya que las primeras aparecen sin mancha, mientras que las segundas se tiñen y se hinchan. El método no distingue entre células apoptóticas y necróticas. El método tradicional de realizar el análisis de

viabilidad celular con azul de tripán, implica la tinción manual y el uso de un hemocitómetro (Stoddart, 2011) (López, 2008).

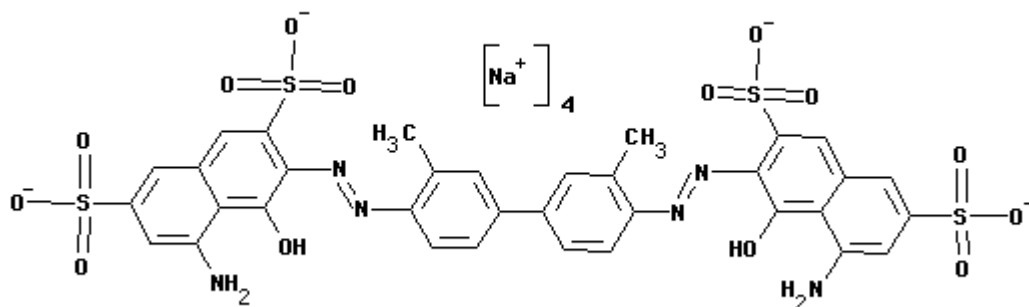


Ilustración 8 Estructura de la molécula de azul de tripán (Toxnet, 2013).

7. Planteamiento del problema

El desarrollo de sistemas nanoestructurados se encuentra en constante innovación y desarrollo, cada día surgen nuevas tecnologías y aplicaciones que conllevan a la exposición de los organismos con los materiales desarrollados, por lo que la nanotoxicología ha cobrado una fuerza importante en los últimos años, al demostrarse que los materiales nanométricos producen respuestas biológicas distintas al que presentan a gran escala o “bulk material”

Una de las áreas que más han sido influenciadas por la aplicación de sistemas nanoestructurados es el de la salud, donde las aplicaciones son variadas, como ingeniería de tejidos, imagenología, y sistemas de liberación controlados; en esta última aplicación es donde se centra el presente trabajo, explicando como la aplicación de nanopartículas como sistemas de liberación controlados presenta varias ventajas sobre los sistemas convencionales de liberación, sin embargo existen evidencias de que los materiales usados para desarrollar estos sistemas representan un riesgo potencialmente tóxico; así mismo es de gran importancia establecer en que escala de tamaño son realmente tóxicos los materiales empleados; cabe mencionar que esta información es escasa e incluso contradictoria.

Con lo anterior en mente el presente trabajo pretende aportar información acerca de cómo diferentes tamaños de nanopartículas de PECA-Quitosán afectan la viabilidad celular sobre la línea celular HeLa, aplicando los ensayos espectrofotométricos de MTT y el de exclusión de azul de tripán. Para este fin se fabricaron diversos sistemas nanoparticulados modificando variables de proceso que permitieran obtener diversas tallas de nanopartículas, posteriormente se hicieron las evaluaciones biológicas *in vitro*.

8. Objetivos

8.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto del tamaño de nanopartículas obtenidas a partir de PECA y quitosán sobre la viabilidad celular en la línea celular “HeLa”, por medio del ensayo de MTT y de exclusión de azul de tripán.

8.2. Objetivos particulares

- Fabricar nanopartículas a partir de PECA y quitosán con diversos tamaños por medio de la técnica “polimerización aniónica”.
- Realizar la caracterización de las nanopartículas Quitosán-PECA fabricadas mediante la determinación de la forma, tamaño y el potencial Z, por medio de microscopia electrónica de barrido, dispersión de luz y electroforesis de efecto Doppler (Zetasizer).
- Aportar información que permita establecer un criterio más claro sobre la influencia del tamaño de partículas de Quitosán-PECA sobre la viabilidad celular en la línea celular “HeLa”, por medio del ensayo espectrofotométrico de MTT y de exclusión de azul de tripán, basados en la reducción metabólica y exclusión de colorante respectivamente.

9. Materiales y métodos

9.1. Reactivos

➤ Preparación de nanopartículas:

- Quitosán de cáscara de camarón $\geq 75.0\%$ desacetilado (Sigma-Aldrich)
- Pluronic F-68 (Sigma-Aldrich)
- Tripolifosfato 96.2% (Procter & Gamble Manufactura)
- Etil 2-cianoacrilato (ECA) (Sigma-Aldrich)
- Ácido acético glacial 99.8% (J.T. Backer)

➤ 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)

➤ Preparación de cultivos celulares:

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X) (GIBCO U.S.A.)
- L-Glutamina 200 mM 100X (GIBCO U.S.A.)
- Pen Strep (Penicilin Streptomycin) (GIBCO U.S.A.)
- Suero Fetal Bovino (FBS) (GIBCO U.S.A.)
- Tripsina Tryple Express (GIBCO U.S.A.)

➤ Ensayo de MTT:

- MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) 97.5% (Sigma-Aldrich)
- 2-Propanol $\geq 99.0\%$ (Sigma-Aldrich)
- Ácido clorhídrico 36.5-38.0% (Técnica Química S.A. México)
- Nonidet P40 Substitute (nonylphenylpolyethyleneglicol) $\geq 99.0\%$ (FlukaBioChemika)

➤ Ensayo de azul de Tripán:

- Trypan Blue Solution 0.4% (Sigma-Aldrich)

9.2. Equipos

- ▶ Agitador magnético MRC®
- ▶ Agitador magnético IKA U.S.A.
- ▶ Balanza analítica Sartorius BL 120S
- ▶ Balanza analítica METTLER AT200
- ▶ Potenciómetro OAKTON pH 510 series pH/mV/°C meter
- ▶ Incubadora para cultivos celulares ShellLab CO2 Incubator
- ▶ Cámara de Neubauer (Hemocitómetro)
- ▶ Campana de flujo laminar Industrias FigursaMod. CFV-90
- ▶ Ultracentrífuga Optima XL-100K BeckmanCoulter
- ▶ Microcentrífuga con control de temperatura Microfuge® 22R CentrifugeBeckmanCoulter
- ▶ Espectrofotómetro UV-Vis Spectrophotometer Ultrospec 1100 pro AmershamBioscience
- ▶ Vórtex Vortex-2 Gene Scientific Industries
- ▶ Agitador Orbital Shaker MRC
- ▶ Microscopio Electrónico de Barrido JEOL Mod. 25SII
- ▶ Zetasizer Nano Series ZEN3600
- ▶ Filtro MILLIPORE® V1 para matraces
- ▶ Desionizador ELGA PurelabClassic
- ▶ Tacómetro Extech Tachometer Counter 461920

9.3. Metodología

9.3.1. Fabricación de nanopartículas

Se obtuvieron ocho sistemas coloidales distintos de NP de PECA-Quitósán. Para la obtención de las NP de diferentes tamaños se modificaron tres variables del proceso de fabricación, para lo cual se aplicó una matriz experimental obtenida a partir del software “Statgraphics®Plus”, determinando como variables experimentales, la cantidad de tensoactivo, la cantidad de monómero adicionado y el tiempo de agitación; el resultado del modelo se presenta en la tabla 7.

Tabla 7 Matriz experimental para fabricación de NP.

Sistema	Tensoactivo %	Monómero ECA(μ L)	t agitación (hrs)
1	3	35	1
2	1	35	1
3	1	50	1
4	3	50	1
5	1	50	2
6	1	35	2
7	3	35	2
8	3	50	2

El número de sistemas de la tabla 7 corresponde a la denominación de los sistemas coloidales de nanopartículas preparados, siguiendo las modificaciones de las variables marcadas en la tabla.

9.3.1.1. Preparación de los sistemas de nanopartículas de PECA-Quitósán

A continuación se presenta la metodología general de la preparación de los sistemas, la cantidad de monómero y tensoactivo, así como el tiempo de agitación están basados en la tabla 7.

1. Se tomaron 20 mL de la solución de Quitósán al 0.3 % (solución preparada con ácido acético al 1 %) y se adicionó la cantidad correspondiente de tensoactivo (Pluronic F-68) para obtener el porcentaje correspondiente al sistema marcado en la tabla 7, el Pluronic se agregó lentamente hasta su completa hidratación.
2. Una vez que el Pluronic F-68 se encontró totalmente hidratado, el sistema se colocó en el agitador magnético a una velocidad constante de 560 rpm.

-
-
3. Al iniciar la agitación se adicionó 20 mL de la solución de TPP al 0.1 % (solución preparada con ácido acético al 1 %).
 4. Inmediatamente que se completó el paso 3., se adicionó la cantidad correspondiente de ECA según la tabla 7.
 5. Se mantuvo la agitación del sistema durante el tiempo marcado para cada sistema (el tiempo corresponde marcado en la tabla 7).

9.3.1.2. Acondicionamiento de nanopartículas para caracterización

1. Una vez obtenidos los 8 sistemas de NP, según la tabla 7, fueron centrifugados a 21 000 rpm durante 15 minutos, con ultracentrífuga.
2. Trascurrido el tiempo de centrifugación, el sobrenadante se recuperó por decantación y el botón fue eliminado.
3. Los sistemas se filtraron por membrana de 0.45 μm , con filtro Millipore[®].
4. Se realizó el estudio de tamaño de partícula y potencial Z de los ocho sistemas obtenidos (por medio del equipo Zetasizer Nano Series).
5. En base a los resultados de tamaño de partícula obtenidos durante el análisis de dispersión de luz dinámica, los sistemas 1, 3 y 5 se eligieron para conocer los efectos asociados sobre la viabilidad celular por presentar diferencias entre los tamaños de NP de cada sistema.
6. Al presentar diferentes tamaños de NP los sistemas 1, 3 y 5 se esterilizaron por filtración con membrana de 0.20 μm , con filtro Millipore[®] bajo condiciones estériles.

9.3.1.3. Caracterización de nanopartículas

Todos los sistemas fabricados fueron caracterizados con ayuda del Zetasizer Nano Series, una vez filtrados por la membrana de 0.45 μm , en base a los resultados obtenidos, los sistemas 1, 3 y 5 fueron caracterizados nuevamente una vez filtrados por membrana 0.20 μm con Zetasizer Nano Series y microscopía electrónica de barrido. A continuación se muestran los pasos consecutivos para la caracterización de las NP:

1. Todos los sistemas una vez filtrados por membrana de 0.45 μm , se analizaron con el equipo "Zetasizer Nano Series ZEN3600", para determinar el tamaño de partícula y el potencial Z de los sistemas
2. Las mediciones realizaron en dos diferentes celdas; DTS0012 específica para tamaño de partícula; y DTS1060 donde se realizó la medición de potencial Z.

-
-
3. Las lecturas se realizaron en la empresa Psicofarma S. A. de C. V.
 4. A partir de los resultados obtenidos en el Zetasizer Nano Series, los sistemas 1, 3 y 5 se eligieron para continuar con el proceso de caracterización y evaluación, por lo que se filtraron nuevamente por membrana de 0.20 μm y se volvieron a realizar las mediciones en el Zetasizer Nano Series.
 5. Se obtuvieron micrografías electrónicas de los sistemas 1, 3 y 5. Para la obtención de las micrografías, las muestras se recubrieron con una capa de oro.
 6. Las micrografías se obtuvieron con el equipo Microscopio Electrónico de Barrido JEOL Mod. 25SII de la FESC-1.

9.3.2. Evaluación citotóxica

Todos las pruebas y ensayos realizados en el presente trabajo se realizaron bajo condiciones de esterilidad, para evitar que la presencia de contaminantes y/o agentes externos pudieran afectar el desarrollo del experimento. Los sistemas 1, 3 y 5 se esterilizaron con membrana de 0.20 μm antes de su uso y se mantuvieron en refrigeración.

9.3.2.1. Mantenimiento de cultivos celulares

1. Se preparó medio de cultivo DMEM suplementado al 6 %; con suero fetal bovino, glutamina al 1 % y estreptomycin-penicilina al 1 %; se incubó a una temperatura de 37 °C.
2. Se extrajeron células de la línea inmortalizada Hela, de un vial congelado en nitrógeno líquido previamente almacenado.
3. Una vez que las células almacenadas se encontraron descongeladas y atemperadas se depositaron en una caja Petri de cultivo de tejidos en presencia de medio de cultivo DMEM suplementado y a una temperatura de 37 °C, formándose una suspensión celular.
4. Se incubó a 37 °C, con una atmósfera de 5 % de dióxido de carbono y 90 % de humedad relativa.
5. Los cultivos llegaron a confluencia transcurrido un periodo de tiempo de entre 48 y 40 horas.
6. Una vez en confluencia, se procedió a obtener una suspensión celular. Los cultivos se lavaron con PBS a pH 7.4 y se tripsinizaron utilizando TRYPLEX (Invitrogen) necesario para recuperar la suspensión celular.
7. A partir de la suspensión recuperada en el paso 6., se realizaron subcultivos celulares sobre placas de cultivo de doce pozos, y se incubaron bajo las mismas condiciones mencionadas en el paso 4.

-
-
8. Los cultivos llegaron a confluencia transcurrido un periodo de tiempo de entre 18 y 24 horas, en ese momento se sometieron a la exposición de los sistemas nanoparticulados en estudio.

9.3.2.2. Ensayo de viabilidad celular MTT

1. Se sembraron placas de cultivo de doce pozos con la línea celular Hela.
2. Una vez en confluencia, se lavaron con PBS pH 7.4 y se retiró el medio.
3. Se adicionó 1 mL de medio de DMEM suplementado nuevo a cada pozo de la placa.
4. Las células se trataron con un esquema de dosis alta y dosis baja, el cual representó 100 y 10 μ L respectivamente, de los sistemas de NP 1, 3 y 5, así como un control de ácido acético al 1 % igualmente en dosis alta de 100 μ L y dosis baja de 10 μ L; adicionalmente se tenían pozos de células sin tratamiento como blanco.
5. Se sembraron tres pozos por cada dosis y sistema utilizado, así como por cada control y el blanco.
6. Transcurridas dos horas de exposición, se agregaron 10 μ L de MTT a cada pozo, bajo condiciones estériles.
7. Se incubó durante cuatro horas más, completando seis horas de exposición.
8. Al término del periodo de incubación, se retiró el medio de cultivo sin dañar las células.
9. Se agregó 1 mL de solución de alcohol isopropílico, HCl 4 mM y Nonidet 0.1 %, a cada pozo.
10. Se agitaron las placas a 150 rpm durante 10 minutos.
11. Se recuperó el medio de cada pozo por separado y se vertió en tubos Eppendorf.
12. Se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 590 nm de cada muestra; la calibración del espectrofotómetro, se realizó con la solución de alcohol isopropílico, HCl 4 mM y Nonidet 0.1 % como blanco.
13. El ensayo se realizó de manera independiente tres veces.
14. El porcentaje de viabilidad celular se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\% Viabilidad = \frac{Abs_{tratdas}}{Abs_{Blanco}} * 100$$

9.3.2.3. Ensayo de azul de tripán

1. Se sembraron placas de cultivo de doce pozos con la línea celular Hela.
2. Una vez en confluencia, se lavaron con PBS y se retiró el medio.
3. Se adicionó 1 mL de medio de DMEM suplementado al 6 % nuevo a cada pozo de la placa.
4. Las células se trataron con un esquema de dosis alta y dosis baja, el cual representó 100 y 10 μL respectivamente, de los sistemas de NP 1, 3 y 5, así como un control de ácido acético al 1 % igualmente en dosis alta de 100 μL y dosis baja de 10 μL ; adicionalmente se tenían pozos de células sin tratamiento como blanco.
5. Se sembraron tres pozos por cada dosis y sistema utilizado, así como por cada control y el blanco.
6. La exposición de las células se realizó durante seis horas.
7. Posterior al periodo de exposición, se retiró el medio y se añadió 1mL de medio nuevo.
8. Se rasuraron los pozos con rastrillos para cultivos celular, con objeto de obtener una suspensión celular.
9. Se recuperó la suspensión celular (resuspendida con ayuda de la micropipeta).
10. Se adicionó 10 μL de la suspensión del punto 9., y se adicionó 90 μL de una solución de azul de tripán al 0.4 %, homogenizando suavemente.
11. De la suspensión formada en el punto 10., se tomaron 10 μL y se adicionaron a cada campo de la cámara de Neubauer.
12. La lectura de cada muestra se realizó por el conteo de dos campos de la cámara de Neubauer.
13. El porcentaje de viabilidad celular se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = \left(1 - \frac{Cél_{teñidas}}{Cél_{totes}} \right) * 100$$

10. Resultados y análisis

10.1. Potencial Z y distribución de tamaño de partícula

Se realizó la caracterización de cada sistema preparado, filtrado por membrana 0.45 μm , por medio del equipo Zetasizer Nano Series ZEN3600, de la empresa Psicofarma S. A. de C. V.; los resultados se condensan en la tabla 8. Los valores de tamaño de partícula representan el valor promedio de las poblaciones presentes en los sistemas de NP, se presenta el índice de polidispersión (PDI) y el potencial Z de cada sistema.

Tabla 8 Resultados de tamaño de partícula y potencial Z de cada sistema.

Sistema	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencia Z (mV)
1	5.532	0.637	7.75
2	328.3	1.000	26.1
3	319.3	1.000	24.8
4	290.0	0.786	13.9
5	258.8	0.472	28.0
6	225.2	1.000	2.94
7	375.0	1.000	6.30
8	325.9	0.436	5.47

La variación de los tamaños de población de las partículas obtenidas por el método de polimerización aniónica, modificando las variables del proceso de obtención, muestra que el tamaño de las NP es afectado por las modificaciones en las variables de proceso de obtención. Se tomo la población con mayor intensidad para establecer el tamaño promedio de la población de NP. Cabe señalar que existen más variables que condicionan la formación de las partículas, como lo son la temperatura y el pH, por lo que los sistemas se fabricaron a una temperatura aproximada de 24 $^{\circ}\text{C}$ y un pH de ≈ 2.2 , fue importante establecer este valor de pH, ya que es el óptimo para la obtención de partículas de este tipo (Behan, Birkinshaw, & Clarke, 2001). Por otra parte, no se contaba con el equipo adecuado para fabricar a una temperatura constante; lo que también puede explicar la dispersión de los datos del tamaño de la población de partículas. Para los fines del presente trabajo la obtención de diversos tamaños de población en los sistemas resultó adecuado, al poder disponer de tamaños diferentes entre cada sistema fabricado. Se muestra en el gráfico 1 el tamaño de partícula para ilustrar la diferencia de los tamaños de la población.

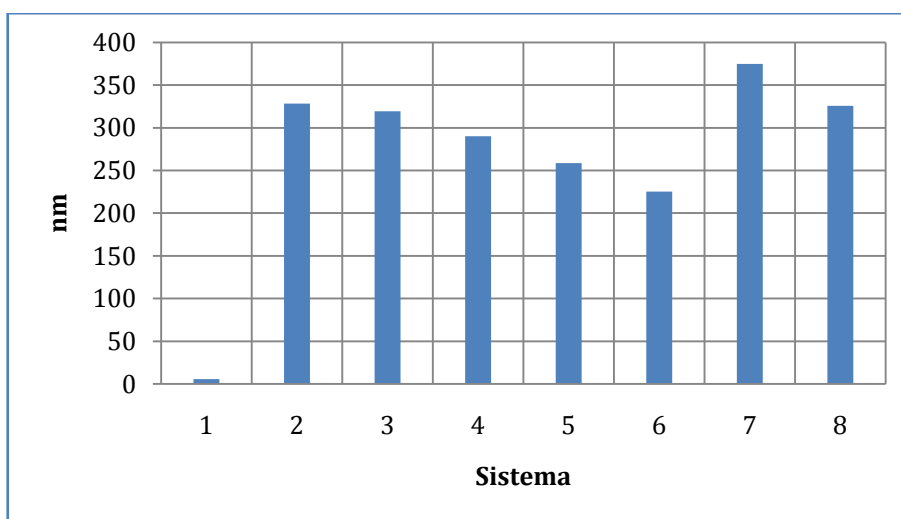


Gráfico 1 Promedio de tamaño de partícula para cada sistema.

En el gráfico 1 resulta evidente la diferencia de tamaño del sistema 1 respecto al resto, este sistema también contiene una cantidad de partículas de tamaños similares a los demás sistemas, pero se tomó como valor principal de población el pico de mayor intensidad, por permitir tener mediciones de partículas más finas, independientes del resto de las partículas presentes en la matriz del sistema (Malvern, 2012).

Por otra parte, se muestra a continuación en el gráfico 2, los valores de los índices de polidispersión (PDI). Los valores de PDI son arbitrariamente asignados en un intervalo de 0 a 1, siendo un valor cercano a cero una población de partículas monodispersa, mientras que un valor cercano a uno indica una población polidispersa (Malvern, 2012).

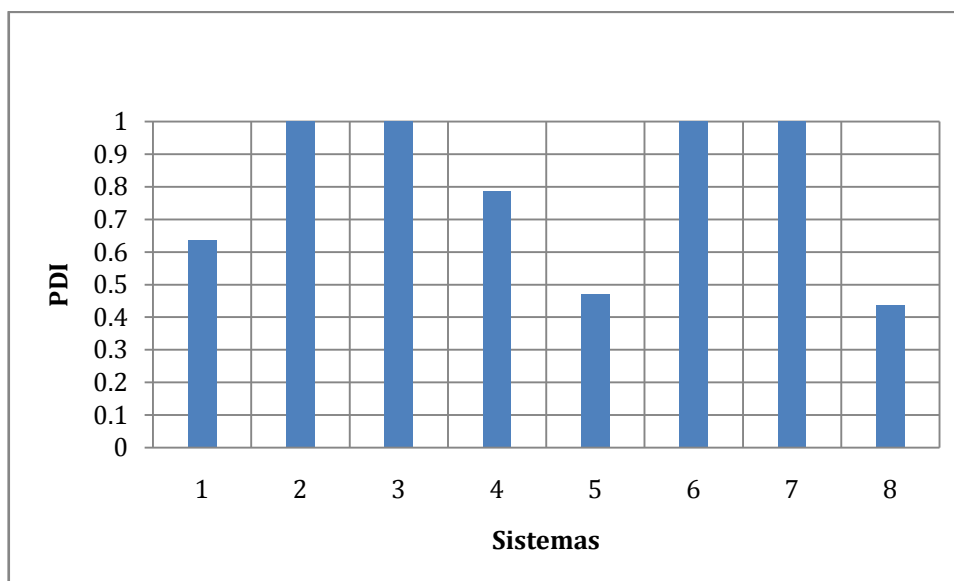


Gráfico 2 Polidispersión de los sistemas.

Los resultados observados en el gráfico 2 revelan que el proceso de fabricación de las NP no resulto en poblaciones homogéneas al presentar valores altos de PDI, este hecho también es posible explicarlo por la posible floculación no reversible de las partículas (Yang, Ge, Hu, & Jiang, 2000). La ultracentrifugación fue necesaria para reducir la cantidad de materia prima que no formó NP durante el proceso de fabricación, con el objetivo de reducir en lo posible las interferencias durante las mediciones del tamaño promedio de las partículas.

La estabilidad fue fundamental para la elección de los sistemas que serían evaluados, ya que una mayor estabilidad nos permite tener una menor floculación de las NP, dándonos sistemas con tiempo de vida más largo, permitiendo el almacenaje y manipulación sin alteraciones en sus propiedades. Así, el potencial Z fue tomado como parámetro de estabilidad, teniendo como referencia que una medición de (\pm) 30 mV corresponde a sistemas muy estables; cuanto mayor sean los valores de potencial Z, mayor es la densidad de carga, y mayor es, por tanto, la fuerza de repulsión mutua que mantiene separadas las partículas, dando así mayor estabilidad. (Mohanraj & Chen, 2006).

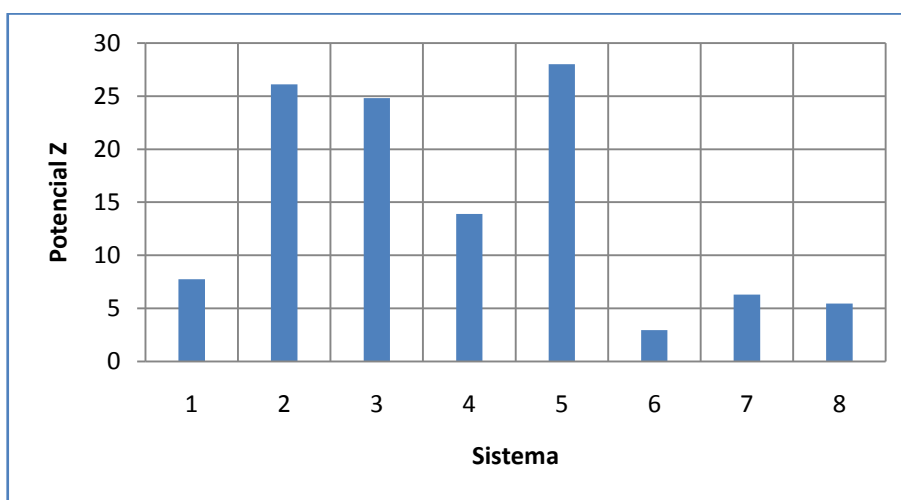


Gráfico 3 Potencial Z de cada sistema.

Los valores positivos del potencial Z indican la adsorción de las cargas positivas en la superficie de las NP obtenidas, posiblemente de los H^+ en solución, esto es atribuible a que los grupos amino del quitosán presentes en la superficie de la partícula se encuentran protonados por el pH ácido impuesto (Nadia Rodríguez Hamamura, 2010). Los valores de potencial Z mostrados en el gráfico 3, muestran que los sistemas fabricados tienen una estabilidad que va de moderada, sistema 2 y 5, a baja con los sistemas 6 y 8, respecto a lo reportado en la literatura, por lo que estos últimos podrían formar agregados a una tasa más alta que el resto de los sistemas. En base

a los resultados del tamaño promedio de población y el potencial Z, fueron elegidos tres sistemas para su evaluación citotóxica, en función de su tamaño y de la estabilidad presentada; estos sistemas correspondieron al sistema 1, 3 y 5, las razón de esta decisión está fundamentada en que estos sistemas presentan tamaños promedio diferentes entre sí, además de que resultaron ser los más estables, a excepción del sistema 1 que presenta una baja estabilidad, pero tiene una población más pequeña que el resto de los sistemas, sin embargo cuando se volvió a realizar el estudio de tamaño de partícula, los resultados fueron muy parecidos a los resultados preliminares, por lo que se puede inferir que la estabilidad aun no era afectada, como se puede ver en la tabla 9. Con la elección de los sistemas de NP, se filtraron nuevamente por membrana de 0.20 μm , arrojando los siguientes resultados.

Tabla 9 Resultados de tamaño de partícula y potencial Z de sistemas probados.

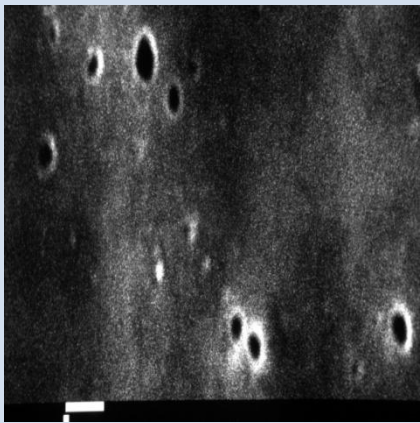
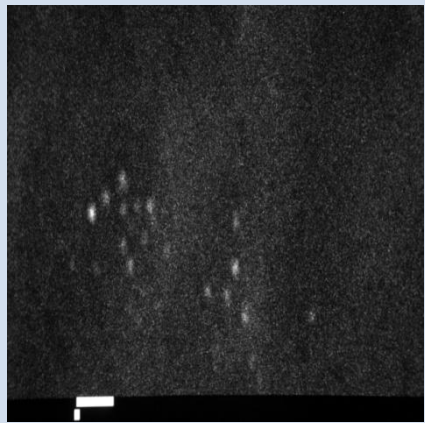
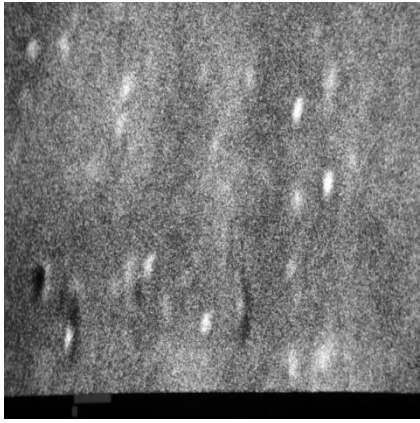
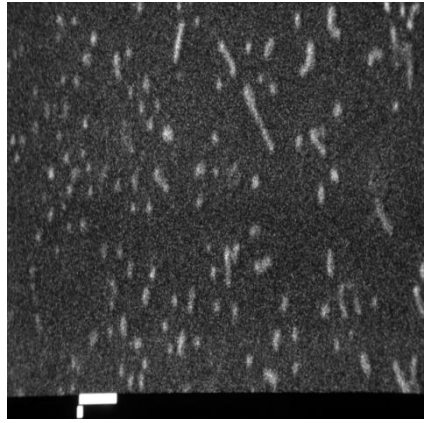
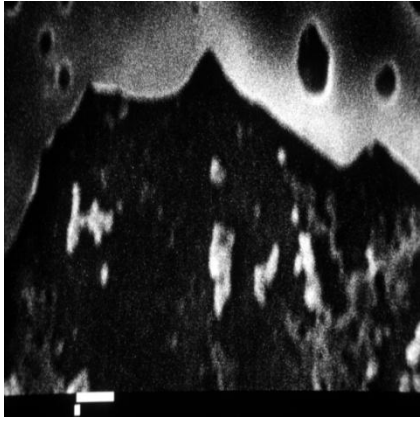
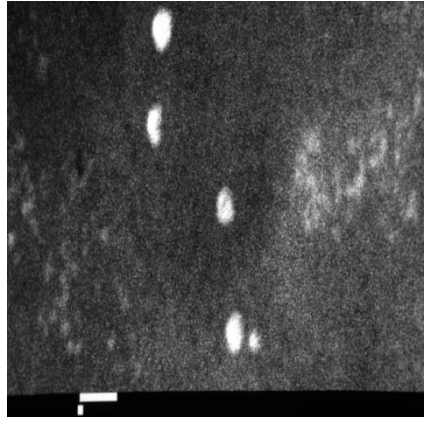
Sistema	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencia Z (mV)
1	5.607	0.468	7.75
3	535.3	0.921	24.8
5	226.8	0.624	28.0

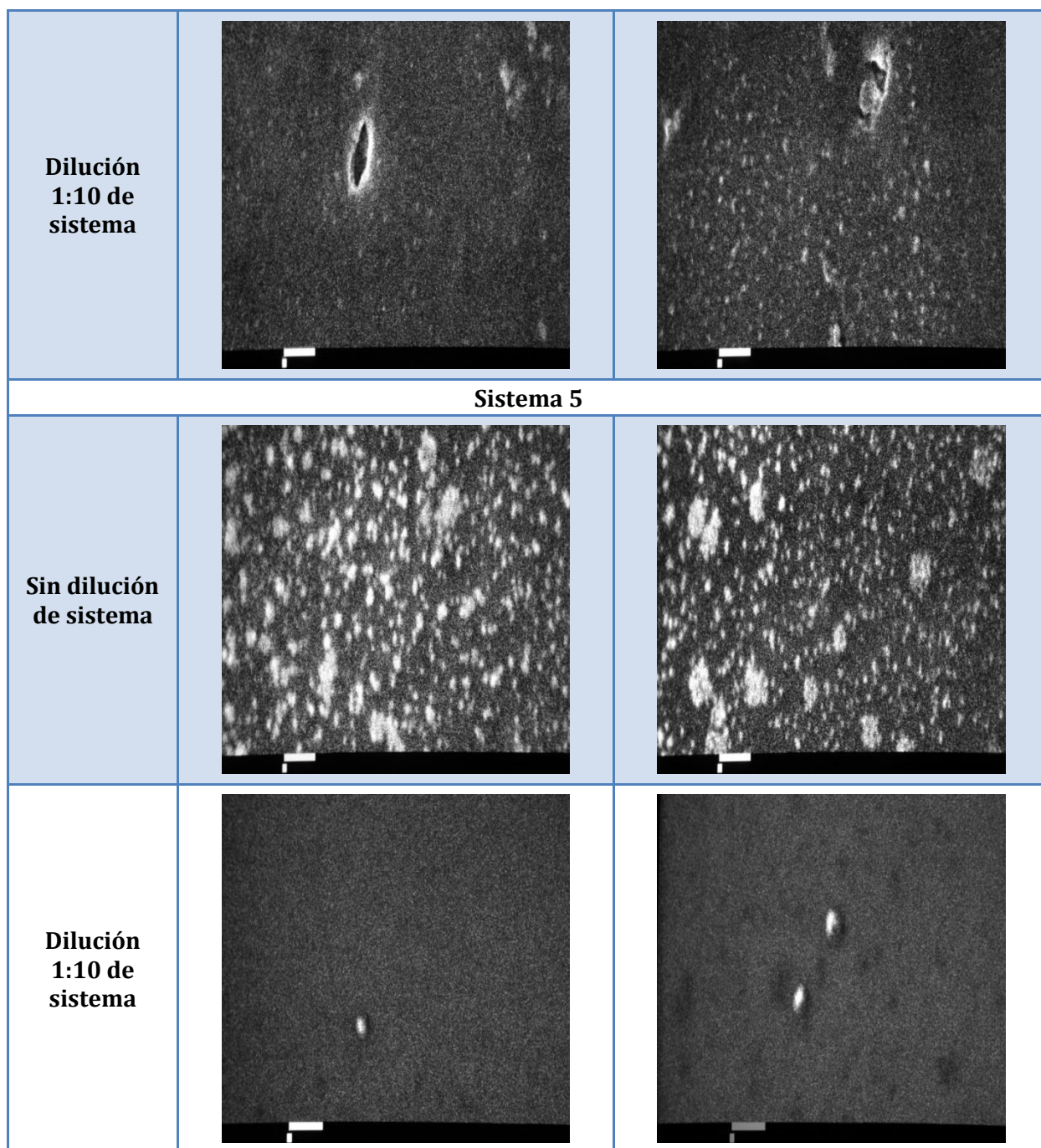
La variación de las mediciones respecto la medición inicial, resulta normal ya que por los PDI tan altos no permiten obtener mediciones reproducibles. No obstante para fines prácticos del trabajo realizado se puede establecer un criterio en base a los resultados obtenidos, de tres niveles de tamaño, como muestra la tabla 9. Existen trabajos anteriores que reporten la aplicación de diversos tamaños de NP sobre la línea celular HeLa, NP de plata de entre 70-200 nm resultaron altamente tóxicas sobre esta línea, en contraste NP de ácido dimercaptosuccínico de 4-17 nm presentan nula toxicidad, reforzando el hecho de que la toxicidad de las NP depende del material y el tipo de célula (Roca, 2009) (Pimentel, Pinto, Garcia, & J, 2013).

10.2. Micrografía electrónica de barrido

En base a los resultados obtenidos de tamaño de partícula, se determinó que los sistemas 1, 3 y 5 fueran evaluados para obtener micrografías electrónicas mostradas en la tabla 10, como parte de su caracterización. Los sistemas fueron filtrados por membrana 0.20 μm para la caracterización, también se presentan micrografías donde se realizó una dilución de los sistemas 1:10 para poder obtener imágenes de las NP individualmente y evitar que el material presente en la matriz del sistema afectara la observación. Las lecturas se realizaron a un aumento de 10 000 X, la escala presente en la esquina inferior izquierda de cada imagen representa 1 μm .

Tabla 10 Micrografías electrónicas de sistemas 1, 3 y 5

Sistema 1		
Sin dilución de sistema		
Dilución 1:10 de sistema		
Sistema 3		
Sin dilución de sistema		



Imágenes tomadas por el Técnico Académico Rodolfo Robles en el Campo 1 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Las micrografías permiten observar la morfología de las partículas obtenidas, apreciándose partículas esféricas, de bordes irregulares, este hecho puede apreciarse en las micrografías de los tres sistemas; donde claramente se observan los bordes irregulares de las partículas. Las variables de fabricación cambiadas durante la obtención de NP, no parecen afectar

significativamente la forma de las partículas al observarse en todos los sistemas la misma morfología. A pesar de las filtraciones realizadas en los sistemas, es posible, observar materia remanente polimerizada que no formó NP y que se encontraba presente en la matriz del sistema, este hecho es fácilmente observable en el sistema 3. Dadas las condiciones de microscopio utilizado, no es posible visualizar más a detalle la superficie de las NP. Aunque estas fotografías sirven para corroborar la existencia y las dimensiones de las NP, no fue posible visualizar las partículas de 5 nm presentes en el sistema 1, donde solo se alcanzaron a visualizar algunas de unos 50-100 nm. Es necesario que para tener más información de la forma, tamaño y superficie de las nanopartículas obtenidas, se realicen en un futuro ensayos de microscopía de transmisión que permitan en conjunto a los obtenidos en este trabajo, confirmar las características de los sistemas nanoparticulados de interés.

10.3. Ensayo de viabilidad celular MTT

Se realizó la evaluación de los ensayo de MTT tomando el valor de viabilidad, como promedio de los tres pruebas realizadas. Los resultados que se muestran en la gráfica 4, corresponden a los resultados de viabilidad celular para los sistemas 1, 3 y 5; se incluyó también un control de ácido acético al 1 % con un pH de 2.2 que representa el medio de dispersión de las nanopartículas y los datos de un cultivo blanco (Bco) que representa los cultivos de células sin ningún tratamiento, este último se tomó como el 100 % de viabilidad.

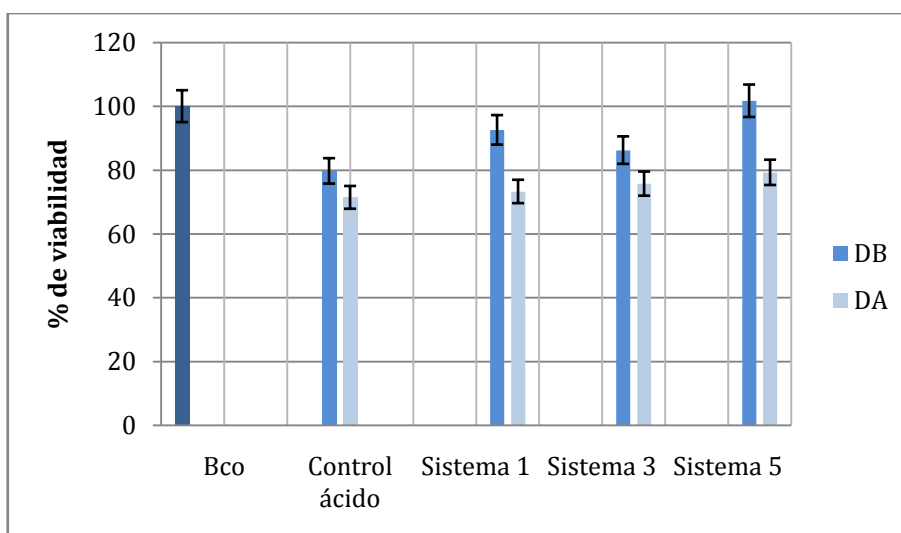


Gráfico 4 Viabilidad celular por ensayo de MTT.

Se puede observar en el gráfico 4 que existe una escasa disminución en la viabilidad celular en los cultivos tratados, sin embargo, las células se mantuvieron por encima de 70 % de viabilidad en comparación con el blanco (células sin tratamiento), por lo que se puede considerar que las células expuestas se mantienen viables (Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, 2008), aun cuando la influencia del pH (pH ácido ≈ 2.2) es importante en el mantenimiento de la homeóstasis celular ya que puede presentarse daño en la función y estructura afectando la maquinaria intracelular, incluida la responsable de la reducción del MTT (Stoddart, 2011), las células fueron sensibles a la exposición de NP sin comprometer la viabilidad celular en el esquema experimental empleado en esta tesis. Es importante considerar estos resultados en trabajos posteriores cuando el objetivo es obtener y optimizar sistemas de nanopartículas de uso potencial en el área biológica.

Se realizó un tratamiento estadístico de análisis de varianza con el software “Statgraphics®Plus”, para comprobar si existe una diferencia significativa entre los tratamientos aplicados, incluyéndose también el blanco sin tratamiento y el control ácido, el análisis muestra que no existe una diferencia significativa entre las medias, al obtener un P-Value de 0.7247, con un nivel de confianza del 95 %.

Los resultados muestran que no se alteró la viabilidad en los cultivos expuestos a nanopartículas en comparación con el control ácido incluido en la experimentación, no es posible asociar alteraciones en la viabilidad estimada mediante la reducción de sales de tetrazolio en las células Hela con una propiedad fisicoquímica de los sistemas como es el tamaño de los sistemas nanoestructurados estudiados en esta tesis.

10.4. Ensayo de viabilidad celular por exclusión de azul de tripán

Se realizó la evaluación de los ensayo de azul de tripán, tomando como valor de viabilidad, el promedio de las lecturas de dos campos del hemocitómetro, los experimentos independientes se realizaron por duplicado. Los resultados que se muestran en la gráfica 5, corresponden a los resultados de viabilidad celular para los sistemas 1, 3 y 5; se incluyó también un control de ácido acético al 1 % con un pH de ≈ 2.2 , mismo valor de los sistemas nanoparticulados, el blanco (Bco) representa los cultivos de células sin ningún tratamiento.

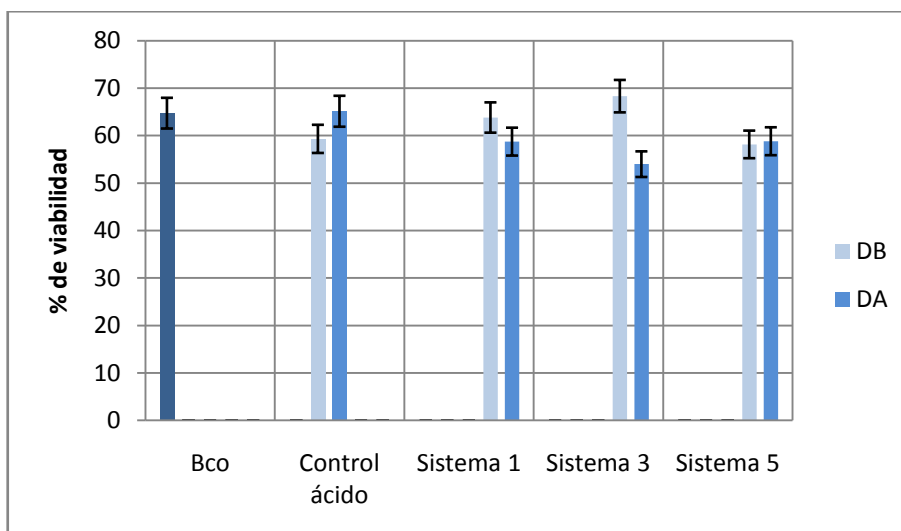


Gráfico 5 Viabilidad celular para ensayo de azul de tripán.

Se puede observar en el gráfico 5 que existe una disminución en la viabilidad celular en todos los cultivos en los que se implementó el ensayo de azul de tripán, al presentarse valores por debajo del 70 %, mínimo necesario para considerar a los cultivos viables (Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, 2008). Como en el caso de la estimación de la viabilidad por el método de MTT, la disminución de la viabilidad celular estimada por la exclusión del azul tripán en los cultivos puede atribuirse en parte al bajo pH (≈ 2.2) de los tratamientos al que fueron expuestos los cultivos. La exposición a las nanopartículas pudo afectar directamente la adecuada función celular, ya que el medio de cultivo de las células, en este caso medio de DMEM, y a las dosis evaluadas en este trabajo de tesis, no fue capaz de amortiguar la influencia del medio ácido de dispersión de las NP durante las exposiciones, generando susceptibilidad al daño membranal.

Por otro lado la viabilidad del blanco sin tratamiento disminuyó también. Esto lo atribuimos a la remoción mecánica del estrato celular (a través del rasurado de la monocapa). Este procedimiento era necesario realizarlo para evitar lastimar la integridad de la membrana celular por el tratamiento enzimático para hacer la resuspensión celular. Es decir la integridad de las células se comprometió también al rasurar los cultivos para obtener la suspensión celular, obteniéndose valores disminuidos de la viabilidad celular, provocando daño mecánico directo, probablemente irreversible. Los eventos biológicos comprometidos en células cuya naturaleza es la proliferación en monocapa, representa un inconveniente al aplicar este protocolo en cultivos epiteliales y células adherentes. De manera habitual como se mencionó anteriormente se realiza la disgregación de la monocapa con enzimas proteasas para desacoplar las uniones celulares. Sin

embargo algunos autores han reportado la aplicación de métodos mecánicos en este tipo de cultivos, por lo que en este trabajo se decidió emplear el rasurado de la monocapa con un rastrillo para evitar la influencia de las proteasas en el resultado de viabilidad celular (Napierska, Thomassen, Rabolli, & Lison, 2009). Cabe mencionar entonces que este procedimiento no fue el más adecuado para este tipo de cultivos por lo que los resultados obtenidos de viabilidad celular por el método de exclusión de azul de tripán deben ser interpretados con cautela.

Tomando en cuenta los porcentajes de viabilidad obtenidos, podemos concluir que la disminución del pH en los medios de cultivo, expuestos a los sistemas nanoparticulados puede eventualmente comprometer la viabilidad celular. Sin embargo se puede inferir que no existe un efecto citotóxico aditivo o sinérgico sobre los cultivos por efecto de las NP estudiadas ya que no se observó una mayor disminución de la viabilidad entre los cultivos expuestos a los sistemas nanoparticulados y al control ácido. En este trabajo la disminución de la viabilidad de los sistemas nanoparticulados en comparación al cultivo blanco sin tratamiento tomado como referencia, no representa diferencia significativa. (Repetto, 1997) (Stoddart, 2011).

Existen diversos trabajos en la literatura que cuestionan ampliamente si los métodos empleados en estudios de toxicología *in vitro* e *in vivo* puedan ser aplicados en la estimación de la capacidad tóxica de nanopartículas. Idealmente, los resultados de los ensayos *in vitro* deben predecir si las pruebas hechas a las nanoestructuras obtenidas generan algún riesgo celular *in vitro*, lo que permite conocer algunos eventos celulares comprometidos. En el caso de la nanotoxicología es importante que los protocolos diseñados puedan ser adaptados, ya que en muchos de los casos estos no pueden ser aplicados como en estudios de toxicología convencional *in vitro* (M. Balbus, D. Maynard, & al., 2007). Es importante resaltar que para poder establecer un criterio más pertinente sobre el efecto de las NP sobre la línea celular HeLa, se debe modificar el medio de dispersión de las NP para disminuir el daño celular causado por el ácido, cuidando la estabilidad de las Nanopartículas en estudio. También es importante evaluar el efecto de las NP a diferentes tiempos de exposición para poder conocer el efecto dependiente del tiempo a diferentes dosis.

Existen evidencias publicadas por expertos en la evaluación del riesgo a la exposición a nanoestructuras, que consideran que se debe desarrollar conocimiento con objeto de tener nuevos y mejores métodos eficientes que permitan estimar el riesgo y el potencial de exposición, lo que creará nuevos conocimientos para guiar el desarrollo futuro de las nanopartículas. Además de las prioridades de investigación que pueda tener cada laboratorio interesado en las

nanoestructuras y sus efectos, los participantes expertos en diversos foros de discusión académica han hecho hincapié en la necesidad de estudiar los riesgos asociados a la exposición *in vitro* e *in vivo* así como de los métodos experimentales que se deben emplear en la evaluación de la capacidad tóxica de sistemas nanoestructurados. Por esta razón consideramos que la información y resultados que puede ofrecer este tipo de trabajos de experimentación permitirán abundar en la disección y rediseño de los métodos empleados (M. Balbus, D. Maynard, & al., 2007).

11. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos por la experimentación realizada y los análisis implementados, se puede concluir lo siguiente:

- El método implementado para la obtención de NP, por el proceso de polimerización aniónica, permite la obtención de poblaciones de partículas de diversos tamaños según la manipulación de las variables de fabricación, sin embargo, el proceso debe ser mejorado y optimizado para que los PDI de los sistemas sean minimizados en lo posible, así como reducir la cantidad de material que no forma partículas, mejorando el rendimiento.
- La caracterización de las NP, mostró que los potenciales Z de las partículas corresponde a una estabilidad media e incluso baja para algunos sistemas, reforzando el hecho de la necesidad de optimizar el proceso de obtención de las partículas.
- Las NP de menos de alrededor de 50 μm no fueron posibles de observar, ya que el modelo y condiciones del microscopio no son óptimas para su detección, por lo que se infirió que las NP de menor talla, tendrían la misma morfología observada en las partículas de talla mayor, sin embargo este hecho se tiene que comprobar.
- La viabilidad celular evaluada por los ensayos de MTT y azul de Tripán en la línea celular HeLa, no fue alterada significativamente por los tres tamaños diferentes de nanopartículas al que fue expuesta, con respecto a los cultivos tratados con el medio de dispersión de las partículas (control ácido) y al blanco sin tratamiento.
- La viabilidad reportada para el ensayo de azul de tripán, disminuyó a niveles inferiores de 70 %, incluidos el blanco y el control ácido, por lo que los resultados obtenidos en este ensayo deben ser considerados con cautela, tomando en cuenta las limitaciones técnicas de este ensayo para la evaluación de células epiteliales *in vitro*.

12. Perspectivas

Tras los ensayos aplicados para la evaluación de la viabilidad celular en línea celular HeLa después de la exposición a sistemas de NP de PECA-Quitósán de diferentes tamaños, se estableció que por los ensayos aplicados, no existió una disminución de la viabilidad celular significativa, sin embargo, este indicador no es suficiente para establecer un criterio definitivo sobre la citotoxicidad de este tipo de NP para concluir totalmente al respecto habrá de hacer otro tipo de pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad que permitan abundar en el estudio de la relación entre el tamaño de partícula y el riesgo tóxico producto de la exposición *in vitro* e *in vivo* a las NP de PECA-Quitósán obtenidas en este trabajo de tesis.

Además, es importante resaltar que la toxicidad depende tanto de las propiedades fisicoquímicas de las NP, así como del tipo de célula expuesta, entre muchas otras variables. Por lo que una batería de pruebas estandarizadas y aceptadas internacionalmente que permitan establecer criterios concretos y unificados al estudiar las NP, permitirá generar bases de datos para eliminar las contradicciones reportadas y avanzar más rápido en la investigación de los nuevos materiales.

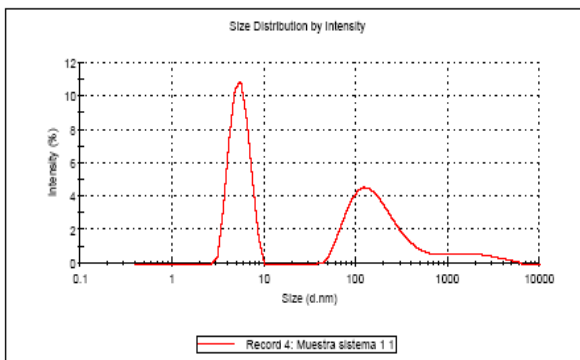
Finalmente la gran cantidad de información generada para la aplicación de las NP como sistemas de liberación controlada, no se refleja aun en un beneficio masivo en la sociedad, precisamente por la falta de una regulación adecuada del uso y aplicación de nanoestructuras como tratamientos farmacológicos, este hecho lleva a continuar con los trabajos de investigación y desarrollo dentro del campo de la nanotoxicología, a la formación de profesionistas en el campo y a la regulación y legislación de estatutos que permitan la aplicación segura de los materiales.

13. Anexos

13.1. Anexo I- Gráficos de tamaño promedio de partícula de los ocho sistemas fabricados.

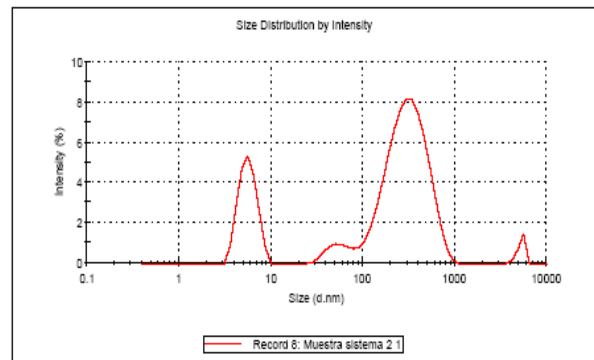
Gráficos de intensidad contra tamaño de partícula de los ocho sistemas fabricados y filtrados por membrana 0.45 μm de NP de PECA-Quitosán.

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 13.84	Peak 1: 5.532	47.3	1.274
Pdl: 0.637	Peak 2: 194.3	46.2	146.2
Intercept: 0.896	Peak 3: 2074	6.5	1151
Result quality : POOR - see result quality report			



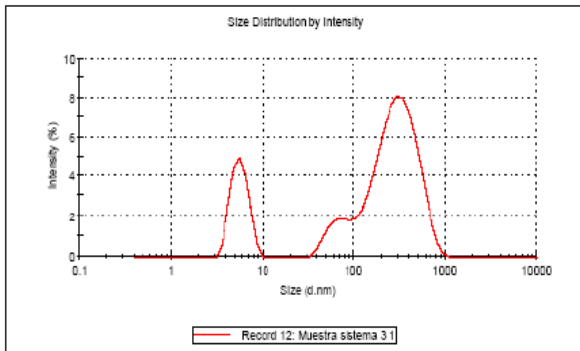
Sistema 1

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 65.32	Peak 1: 328.3	71.3	156.9
Pdl: 1.000	Peak 2: 5.703	21.3	1.229
Intercept: 0.900	Peak 3: 55.11	5.2	14.05
Result quality : POOR - see result quality report			



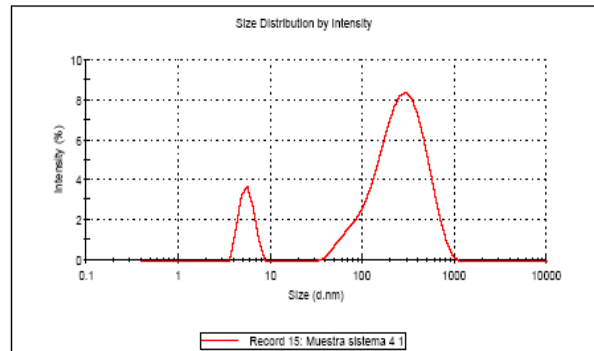
Sistema 2

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 50.39	Peak 1: 319.3	71.3	156.9
Pdl: 1.000	Peak 2: 5.699	19.0	1.192
Intercept: 0.892	Peak 3: 67.50	9.7	15.86
Result quality : POOR - see result quality report			



Sistema 3

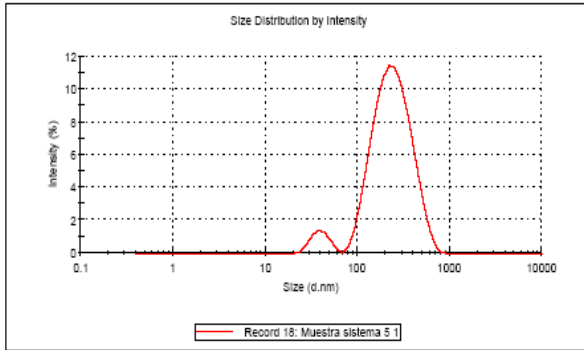
	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 113.3	Peak 1: 290.0	88.0	166.9
Pdl: 0.786	Peak 2: 5.588	12.0	0.9376
Intercept: 0.955	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : POOR - see result quality report			



Sistema 4

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 155.7	Peak 1: 258.8	94.4	117.5
Pdl: 0.472	Peak 2: 40.03	5.6	8.615
Intercept: 0.955	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

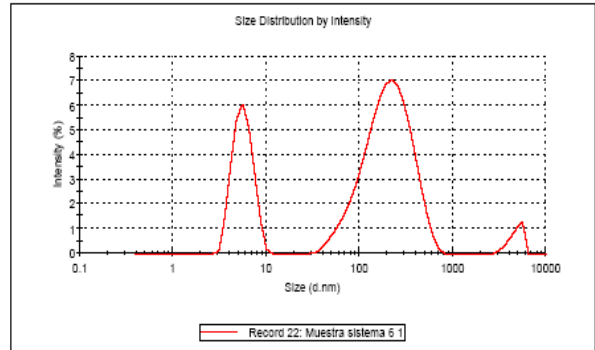
Result quality : POOR - see result quality report



Sistema 5

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 32.45	Peak 1: 225.2	69.9	121.7
Pdl: 1.000	Peak 2: 5.734	26.7	1.380
Intercept: 0.869	Peak 3: 4791	3.4	729.5

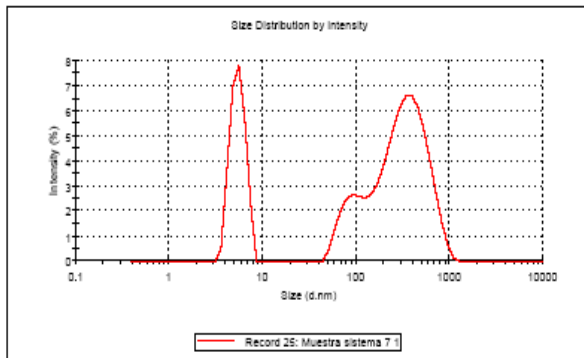
Result quality : POOR - see result quality report



Sistema 6

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 27.88	Peak 1: 375.0	60.2	186.9
Pdl: 1.000	Peak 2: 5.536	26.2	0.9851
Intercept: 0.899	Peak 3: 89.93	13.6	21.53

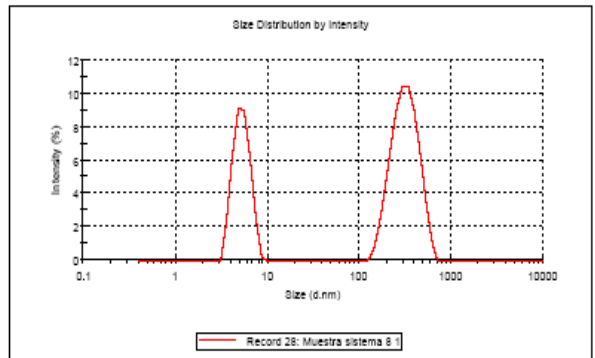
Result quality : POOR - see result quality report



Sistema 7

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 148.9	Peak 1: 325.9	64.1	104.4
Pdl: 0.435	Peak 2: 5.349	35.9	1.085
Intercept: 0.922	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : POOR - see result quality report



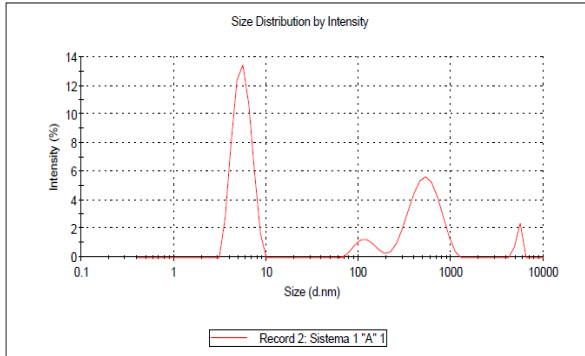
Sistema 8

13.2. Anexo II- Gráficos de tamaño promedio de partícula de sistemas 1, 3 y 5.

Gráficos de intensidad contra tamaño de partícula de los tres sistemas elegidos para caracterización y evaluación toxicológica, filtrados por membrana 0.20 μm de NP de PECA-Quitosán.

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 78.96	Peak 1: 5.607	54.6	1.213
Pdl: 0.468	Peak 2: 539.7	36.5	188.9
Intercept: 0.872	Peak 3: 121.5	5.7	29.27

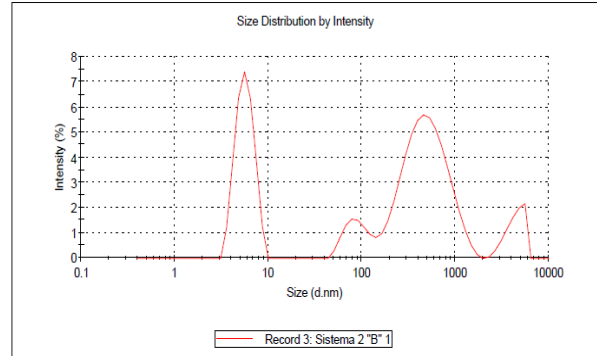
Result quality : POOR - see result quality report



Sistema 1

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 58.40	Peak 1: 535.3	53.6	282.9
Pdl: 0.921	Peak 2: 5.749	29.9	1.247
Intercept: 0.885	Peak 3: 91.33	8.5	25.62

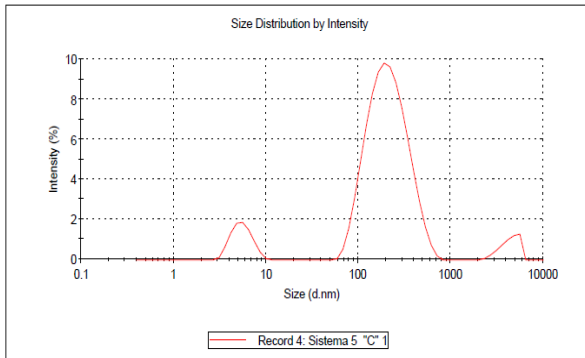
Result quality : POOR - see result quality report



Sistema 3

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 127.7	Peak 1: 226.8	86.3	111.7
Pdl: 0.624	Peak 2: 5.579	8.7	1.380
Intercept: 0.938	Peak 3: 4384	5.1	929.1

Result quality : POOR - see result quality report

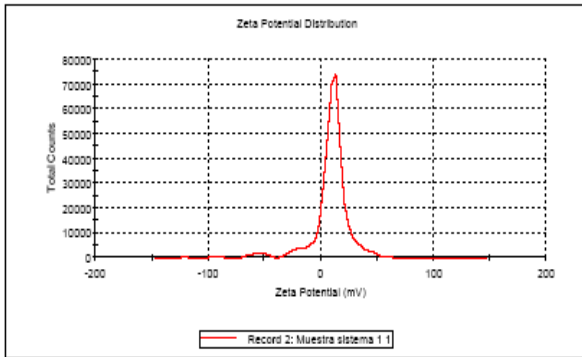


Sistema 5

13.3. Anexo III- Gráficos de potencial Z de los sistemas fabricados.

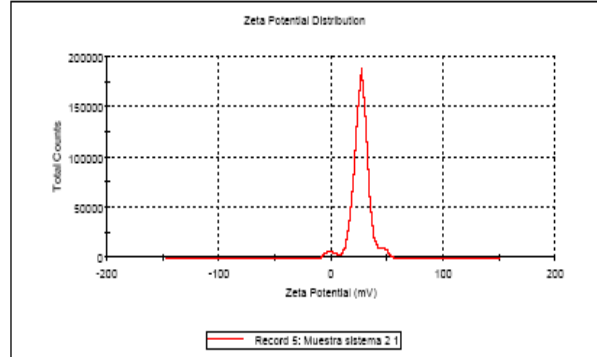
Gráficos de potencial Z de los ocho sistemas fabricados de NP de PECA-Qitosán.

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 7.75	Peak 1: 12.1	92.2	10.9
Zeta Deviation (mV): 20.8	Peak 2: -23.2	4.0	5.45
Conductivity (mS/cm): 1.19	Peak 3: -55.2	2.8	6.99
Result quality: Good			



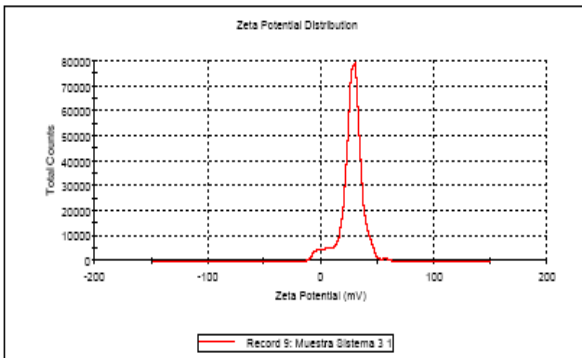
Sistema 1

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 26.1	Peak 1: 26.2	92.4	5.87
Zeta Deviation (mV): 8.23	Peak 2: 45.7	4.3	3.48
Conductivity (mS/cm): 1.06	Peak 3: 0.357	3.3	4.73
Result quality: Good			



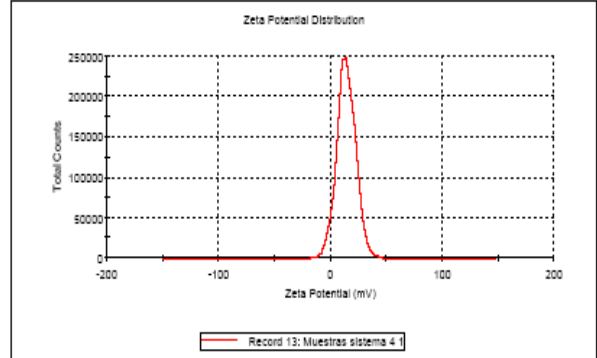
Sistema 2

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 24.8	Peak 1: 27.8	95.4	6.38
Zeta Deviation (mV): 29.9	Peak 2: -3.05	3.9	3.29
Conductivity (mS/cm): 0.932	Peak 3: 56.5	0.7	2.81
Result quality: Good			



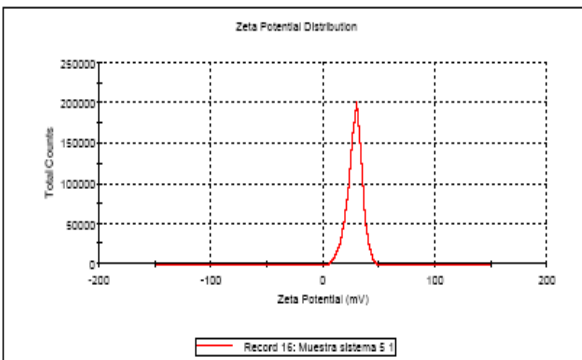
Sistema 3

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 13.9	Peak 1: 13.9	100.0	8.51
Zeta Deviation (mV): 8.51	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 1.04	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality: Good			



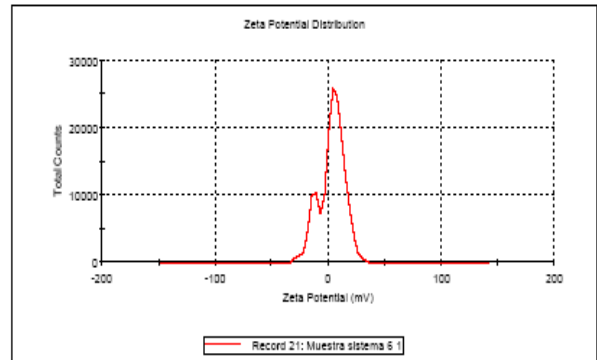
Sistema 4

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 28.0	Peak 1: 28.0	100.0	6.55
Zeta Deviation (mV): 6.55	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 1.04	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality: Good			



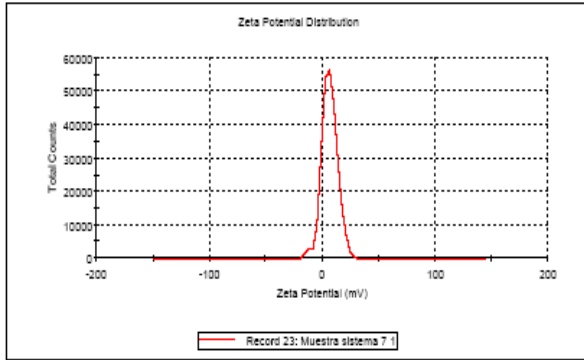
Sistema 5

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 2.94	Peak 1: 6.96	78.6	7.74
Zeta Deviation (mV): 12.1	Peak 2: -13.5	21.4	5.24
Conductivity (mS/cm): 0.860	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality: Good			

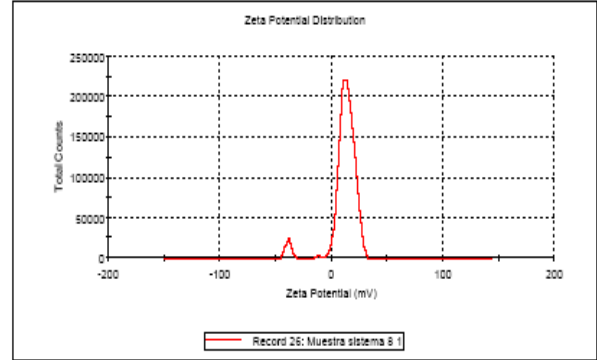


Sistema 6

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)		Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 6.30	Peak 1: 6.30	100.0	6.95	Zeta Potential (mV): 5.47	Peak 1: 13.6	95.1	6.34
Zeta Deviation (mV): 6.95	Peak 2: 0.00	0.0	0.00	Zeta Deviation (mV): 46.1	Peak 2: -38.8	4.4	2.48
Conductivity (mS/cm): 0.861	Peak 3: 0.00	0.0	0.00	Conductivity (mS/cm): 0.954	Peak 3: -11.2	0.5	1.67
Result quality: Good				Result quality: Good			



Sistema 7



Sistema 8

13.4. Anexo IV- Promedio de resultados de viabilidad celular para MTT

Tabla de promedio de resultados para viabilidad celular para el ensayo de MTT.

Sistema	Viabilidad (%)
Blanco (sin tratamiento)	100.00
Control ácido DA	71.41
Sistema 1 DA	73.26
Sistema 3 DA	75.72
Sistema 5 DA	79.26
Control ácido DB	79.712
Sistema 1 DB	92.58
Sistema 3 DB	86.23
Sistema 5 DB	101.67

*DA = Dosis alta (100 μ L)

**DB = Dosis baja (10 μ L)

13.5. Anexo V- Promedio de resultados de viabilidad celular para y Azul de Tripán

Tabla de promedio de resultados para viabilidad celular para el ensayo de azul de tripán.

Sistema	Viabilidad (%)
Blanco (sin tratamiento)	64.75
Control ácido DA	65.15
Sistema 1 DA	58.75
Sistema 3 DA	54.00
Sistema 5 DA	58.83
Control ácido DB	59.33
Sistema 1 DB	63.83
Sistema 3 DB	68.33
Sistema 5 DB	58.17

*DA = Dosis alta (100 μ L)

**DB = Dosis baja (10 μ L)

13.6. Anexo VI- Resultados de análisis de varianza para MTT

Tabla de resultados del análisis de varianza para viabilidad por sistema, realizado con el software "Statgraphics®Plus".

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados libertad	Media de cuadrados	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	3313.91	8	414.239	0.65	0.7247
Dentro de grupos	11420.5	18	634.475		
Total	14734.5	26			

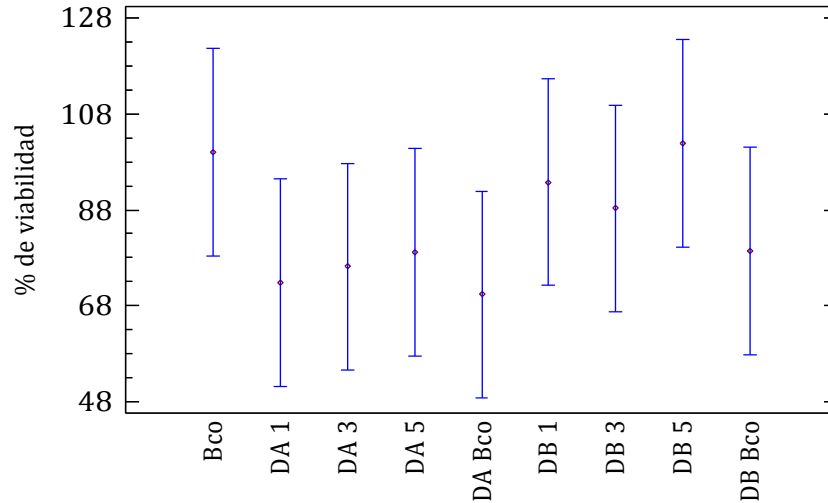


Gráfico de comparación de medias con 95 % de confianza.

13.7. Anexo VII- Resultados de análisis de varianza para azul de tripán

Tabla de resultados del análisis de varianza para viabilidad por sistema, realizado con el software "Statgraphics®Plus".

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados libertad	Media de cuadrados	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	486.455	8	60.8069	0.78	0.6270
Dentro de grupos	1406.44	18	78.1356		
Total	1892.9	26			

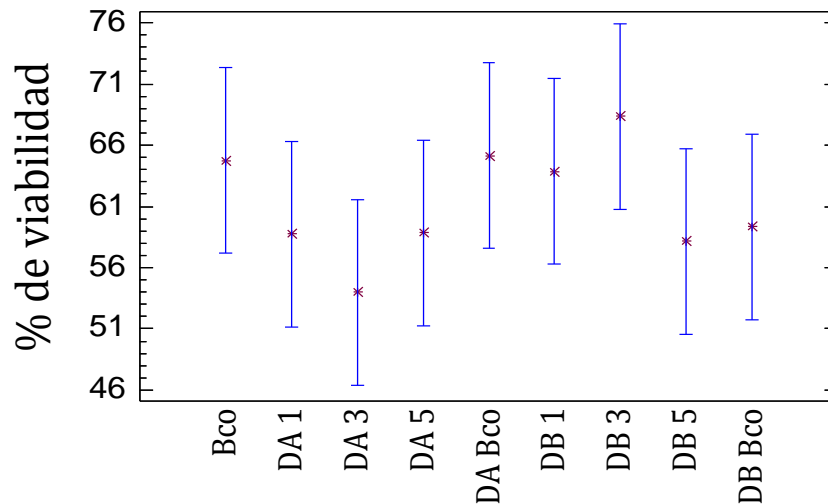


Gráfico de comparación de medias con 95 % de confianza.

14. Referencias

- Amici, J. (2013). *Irradiated Solids Laboratory*. Recuperado el 22 de Junio de 2013, de <http://www.lsi.polytechnique.fr/home/research/physics-and-chemistry-of-nano-objects/polymeric-coated-metal-oxide-and-metal-nanoparticles-for-biomedical-applications-97026.kjsp>
- Barratt, G. (2003). "Colloidal drug carriers: achievements and perspectives". *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60 (1), 21-37.
- Behan, N., Birkinshaw, C., & Clarke, N. (2001). "Poly n-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerisation and particle formation". *Biomaterials*, 22 (11), 1335-1344.
- Bei, D., Meng, J., & Youan, B.-B. C. (2013). *Medscape*. Recuperado el 22 de Junio de 2013, de http://www.medscape.com/viewarticle/734055_3
- Boyer, R. (1999). *"Conceptos de Bioquímica"*. México: International Thomson.
- ChemSpider. (20 de Septiembre de 2013). *Search and share chemistry*. Recuperado el 20 de Septiembre de 2013, de <http://www.chemspider.com/RecordView.aspx?id=73564>
- Christine Vauthie R., C. D.-A. (2003). "Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 519-548.
- De Jong, H. W., & Borm, J. A. (2008). "Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards". *International Journal Of Nanomedicine*, 3 (2), 133-149.
- De la Cruz Medina, M. (2010). *"Preparación, caracterización y uso de nanopartículas farmacéuticas: Investigación Bibliográfica (Tesis de grado UNAM-FESC)"*. México.
- Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research. (Abril de 2008). Guidance for FDA Reviewers and Sponsors. *Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Somatic Cell Therapy Investigational New Drug Applications (INDs)*. Rockville, Estados Unidos de América.
- Dojindo Molecular Technologies, I. (2013). *Dojindo*. Recuperado el 2013 de Enero de 16, de <http://www.dojindo.com/store/p/302-MTT.aspx>
- Duan, J., Zhang, Y., & Chen, W. (2008). "Cationic Polybutyl Cyanoacrylate Nanoparticles for DNA Delivery". *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1-9.
- F. M. Goycoolea, C. R.-L. (2009). *"Nanotecnología Farmacéutica: Realidades y posibilidades farmacoterapéuticas."*. Madrid, España.: Real Academia Nacional de Farmacia.

Fernández Freire, P. (marzo de 2008). "Aplicación de un modelo celular para la evaluación de la citotoxicidad de los compuestos químicos". *Tesis doctoral*. Madrid, España.

Fischer, C. H., & Warren, C. W. (2007). "Nanotoxicity: the growing need for *in vivo* study". *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (6), 565-571.

Fisiología, D. d. (2007). *Escuela de Medicina, Universidad de Costa Rica*. Recuperado el 18 de Febrero de 2013, de http://163.178.103.176/Fisiologia/gen_activ_basica5_1.html

Gelperina, S., Kisich, K., Iseman, M. D., & Heifets, L. (2005). "The Potential Advantages of Nanoparticle Drug Delivery Systems in Chemotherapy of Tuberculosis". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172 (12), 1487-1490.

H. Yina, H. T. (2005). "The effects of particle size and surface coating on the cytotoxicity of nickel ferrite". *Biomaterials*, 26 (2005), 5818-5826.

Harris, R. E. (2010). Tesis doctoral. "*Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos.*". Madrid, España: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

Hillegass, J. M., Shukla, A., & Sherrill, A. L. (2010). "Assessing nanotoxicity in cell *in vitro*". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2 (3), 219-231.

I. Bravo-Osuna, C. V. (2008). "Specific permeability modulation of intestinal paracellular pathway by chitosan-poly(isobutylcyanoacrylate) core-shell nanoparticles". *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69 (2), 436-444.

Jaime Retuert, S. F. (2000). "Thermal effect on the microhardness of chitosan films". *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 45 (2), 323-327.

Julien Nicolas, P. C. (2009). "Synthesis of poly(alkyl cyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1 (1), 111-127.

Kreuter, J. (2007). "Nanoparticles-a historical perspective". *International Journal of Pharmaceutics*, 331 (1), 1-10.

Lifeng Qi, Z. X. (2005). "Cytotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles". *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15 (5), 1397-1399.

López, L. A. (Abril de 2008). Tesis para obtener el grado de Maestro en Biología Experimental. "*Expresión de la acetilcolinesterasa en linfocitos*". D.F., México: UAM.

M. Balbus, J., D. Maynard, A., & al., e. (2007). "Meting Report: Hazard Assessment for Nanoparticles—Report from an Interdisciplinary Workshop". *Environmental Health Perspectives*, 115 (11), 1654-1659.

Malvern. (Mayo de 2012). *Malvern Instruments*. Obtenido de <http://www.malvern.com>

Mediano, J. L. (2003). Tesis Doctoral. "*Evaluación de nanopartículas de poli (etil-2-cianocrilato) como nucleo magnético como sistemas de liberación controlada del antineoplásico 5-fluorouracilo*". Granada, España: Universidad de Granada.

Mohanraj, V., & Chen, Y. (2006). "Nanoparticles-A Review". *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5 (1), 561-573.

Nadia Rodríguez Hamamura, A. V. (2010). "Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol". *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76 (4), 336-354.

Nagavarma, B., & Hemant, K. Y. (2012). "Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles - a review". *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5 (3), 16-23.

Napierska, D., Thomassen, L. C., Rabolli, V., & Lison, D. (2009). "Size-Dependent Cytotoxicity of Monodisperse Silica Nanoparticles in Human Endothelial Cells". *Wiley InterScience Small-Journal*, 5 (7), 846-853.

Ober, C. A., & Gupta, R. B. (2011). "Nanoparticle Technology for Drug Delivery". *CONCYTEG*, 6 (72), 719-731.

Pedraze, J., & Laverde, D. (2013). *Scielo*. Recuperado el 22 de Junio de 2013, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0012-73532008000100007&script=sci_arttext

Pimentel, C., Pinto, S., Garcia, M., & J, H. (2013). Tesis doctoral. "*Vectorización de Nanotransportadores Poliméricos de Nanopartículas de Plata para Tratamiento de Cáncer*". México, México: Instituto Politécnico Nacional.

Rangasamy, M. (2011). "Nano Technology: A Review". *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01 (2011), 08-16.

Repetto, M. (1997). "*Toxicología Fundamental*". Madrid, España: Díaz de Santos S.A.

Repetto, M., & Menendez, M. (1995). "*Toxicología Avanzada*". Madrid, España: Díaz de Santos, S.A.

Ricaud, M., & Witschger, O. (Junio de 2009). "Nanomaterials: Definitions, toxicological risk, characterization of occupational exposure and prevention measures". 1-29.

Roca, A. G. (2009). Tesis doctoral. "*Preparación de nanopartículas magnéticas uniformes y de alta cristalinidad para biomedicina*". Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.

Shayne Cox, G. (2008). "*Pharmaceutical manufacturing handbook*". North Carolina, USA: John Wiley & Sons, Inc. Publication.

Shi-Won Pang a, H.-Y. P.-S.-S. (2002). "Effects of charge density and particle size of poly(styrene/(dimethylamino)ethyl methacrylate) nanoparticle for gene delivery in 293 cells". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* , 26 (3), 213-222.

Silbergeld, E. k., & Lee Davis, D. (1994). "Role of Biomarkers in Identifying and Understanding Environmentally Induced Disease. *Clinical Chemistry* , 40 (7), 1363-1367.

Sohaebuddin, K. S., Thevenot, T. P., & Baker, D. (2010). "Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type depent". *Particle and fibre toxicology* , 7 (22), 1-17.

Stoddart, M. J. (2011). "*Mammalian Cell Viability*". Davos Platz, Switzerland: Humana Press.

Swarbrick, J. (2002). "*Encyclopedia of pharmaceutical technology*". Wilmington, North Carolina. USA: Mercel Dekker, Inc.

Tibaquirá, G. J., & Posner, J. D. (2007). "Mediciones de potencial zeta de microesferas de vidrio en glicol de etileno y en soluciones tampón de fosfato". *Scientia et Technica* , 8 (35), 219-224.

Tortora, G. J., & Reynolds Grabowski, S. (2005). "*Principios de anatomía y fisiología*". México: Oxford University Press.

Toxnet. (2013). *Toxicology Data Network*. Recuperado el 29 de Marzo de 2013, de <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+2945>

UNED. (2012). *Microscopía Electrónica*. Recuperado el 06 de enero de 2012, de <http://www.uned.es/cristamine/mineral/metodos/sem.htm>

Veiga Ochoa MD, R. C. (2004). "El Quitosano: usos farmacéuticos y biológicos". *Organización de Farmacéuticos Ibero-Latinoamericanos* , 14 (2), 33-42.

Viswanathan, B. (2009). "*Nano Materials*". USA: Alpha Science Intl Ltd.

Yang, S., Ge, H., Hu, Y., & Jiang, X. (2000). "Formation of positively charged poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles stabilized with chitosan". *Colloid and Polymer Science* , 278 (4), 278-292.

Yordanov, G., & Bedzhova, Z. (2011). "Poly(ethyl cyanoacrylate) colloidal particles tagged with Rhodamine 6G: preparation and physicochemical characterization". *Central European Journal of Chemistry*, 9 (6).