



# UNIVERSIDAD DE SONORA

---

---

DEPARTAMENTO DE FÍSICA  
POSGRADO EN NANOTECNOLOGÍA

## “SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA PARA LA ADMINISTRACIÓN CONTROLADA DE 1,10 EPOXIPARTENÓLIDO”

**Tesis**

Que para obtener el grado de:

**Maestría en Ciencias**

Presenta:

**Q.B.C. Karol Yesenia Hernández Giottonini**

Dirigida por:

**Dr. Jesús Armando Lucero Acuña**

Hermosillo, Sonora

Septiembre de 2015

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## VOTOS APROBATORIOS

Hermosillo, Sonora, a 24 de Septiembre de 2015

**DR. MARIO ENRIQUE ÁLVAREZ RAMOS**

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis de Maestría: “**Síntesis y caracterización de nanopartículas de PLGA para la administración controlada de 1,10-epoxipartenólido**”, presentada por:

**KAROL YESENIA HERNÁNDEZ GIOTTONINI**

La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos para la obtención del Título de Maestra en Ciencias en Nanotecnología:

_____ Fecha	_____ DR. JESÚS ARMANDO LUCERO ACUÑA
_____ Fecha	_____ DRA. ADRIANA GARIBAY ESCOBAR
_____ Fecha	_____ DR. JOSUÉ ELÍAS JUÁREZ ONOFRE
_____ Fecha	_____ DR. PAUL ZAVALA RIVERA
_____ Fecha	_____ DR. ROBERTO GUZMÁN ZAMUDIO

## **Agradecimientos**

*A mis padres Cecilia y Antonio, por apoyarme a lo largo de toda mi trayectoria académica, y por su apoyo en todos los aspectos de mi vida, siempre estaré en deuda con ustedes, gracias.*

*A mis hermanos Antonio, Gina y Luis por animarme a seguir adelante y superarme. También a mis sobrinos, Andrea, Gema, Angi, Matteo y Ambar por alegrarme el día cada vez que los veo.*

*A mi novio, Sergio, por creer en mí, por siempre echarme porras, animarme y compartir conmigo tantas cosas durante estos dos años, gracias. *Te amo.**

*A mi asesor, el Dr. Jesús Armando Lucero Acuña por aceptarme en su equipo de trabajo, por compartir sus conocimientos conmigo y por su guía, paciencia y apoyo durante toda la realización de este trabajo de tesis.*

*A mis compañeros y amigos del posgrado y del exterior, especialmente a Cindy por su tiempo y ayuda.*

*A mis sinodales por sus observaciones y correcciones, contribuyendo en la realización de este trabajo.*

*Y al resto de las personas que estuvieron involucradas en mi estudio de maestría y en la realización de este proyecto. *Gracias a todos.**

**TABLA DE CONTENIDO**

LISTA DE FIGURAS..... iv

LISTA DE TABLAS ..... vi

RESUMEN ..... vii

ABSTRACT..... ix

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS..... 1

    1.1. Introducción ..... 1

    1.2. Objetivo General ..... 6

    1.3. Objetivos Específicos ..... 6

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO ..... 7

    2.1. Nanotecnología y Nanomedicina ..... 7

    2.2. Dispersiones coloidales ..... 8

        2.2.1. Fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas ..... 9

        2.2.2. Teoría DLVO ..... 11

        2.2.3. Emulsiones ..... 13

        2.2.4. Preparación de emulsiones ..... 14

        2.2.5. Tensioactivos ..... 15

2.2.6. Estabilización estérica y electrostática.....	15
2.3. Sistemas nanoestructurados para la liberación de fármacos .....	17
2.3.1. Liposomas .....	19
2.3.2. Micelas .....	19
2.3.3. Dendrímeros.....	20
2.3.4. Nanocápsulas y nanoesferas .....	21
2.4. Características generales de las nanopartículas en nanomedicina .....	22
2.4.1. Tamaño de las nanopartículas .....	22
2.4.2. Distribución de tamaño de las partículas .....	23
2.4.3. Evaluación morfológica .....	24
2.4.4. Potencial Zeta.....	25
2.5. Técnicas para medir el tamaño y potencial Z de las nanopartículas .....	26
2.5.1. Dispersión dinámica de luz (DLS).....	26
2.5.2. Electroforesis con láser Doppler (ELS) .....	27
2.6. Liberación de fármacos de nanopartículas poliméricas .....	28
2.6.1. Mecanismos de liberación de fármacos de nanopartículas poliméricas .....	28
2.7. Eficiencia de encapsulación y carga de fármaco en nanopartículas.....	31

2.8. Enfermedades infecciosas .....	32
2.8.1. Tuberculosis .....	34
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
3.1. Materiales .....	38
3.2. Curva patrón del fármaco EP .....	38
3.3. Preparación de las Nanopartículas Poliméricas (EP-NP).....	40
3.4. Caracterización de las NP .....	41
3.5. Cantidad de EP encapsulado en EP-NP y eficiencia de encapsulación .....	41
3.6. Cinética de la liberación de EP .....	42
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	44
4.1. Curva patrón del EP .....	44
4.2. Caracterización de las NP poliméricas.....	46
4.3. Cantidad de EP encapsulado en EP-NP y eficiencia de encapsulación .....	51
4.4. Cinética de la liberación de EP .....	51
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
5.1. Conclusiones .....	62
5.2. Recomendaciones.....	63
REFERENCIAS.....	64

---

---

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1.** Sistemas de liberación de fármacos, adaptada de la literatura (Qingguo Xu, Siva P Kambhampati, 2013). ..... 18
- Figura 2.** Distintos perfiles de liberación de fármacos en sistemas de administración de fármacos basados en PLGA, adaptada de la literatura (Fredenberg et al., 2011). ..... 30
- Figura 3.** 1,10-epoxipartenólido ( $C_{15}H_{20}O_4$ ). Molécula encontrada en la fracción F22A y F8E del extracto diclorometánico de *A. confertiflora*. Estructura adaptada de la literatura (Aceves, 2012). ..... 37
- Figura 4.** Procedimiento para la obtención de la curva patrón de EP. .... 39
- Figura 5.** Curvas patrón de EP variando la proporción volumétrica de agua – DMSO... 45
- Figura 6.** Variación del tamaño e índice de polidispersidad de las nanopartículas poliméricas en función del TDL de EP..... 49
- Figura 7.** Variaciones en el potencial zeta de EP-NP debido al TDL usado en la formulación de las nanopartículas poliméricas..... 50



**Figura 8.** Curva de liberación de EP de las nanopartículas poliméricas (EP-NP) preparadas con un TDL de 2% ..... 53

**Figura 9.** Curva de liberación de EP de las nanopartículas poliméricas (EP-NP) preparadas con un TDL de 5% (■).. ..... 55

**Figura 10.** Curva de liberación de EP de las nanopartículas poliméricas (EP-NP) preparadas con un TDL de 8%. ..... 56

**Figura 11.** Curvas de liberación de EP de las nanopartículas poliméricas (EP-NP) preparadas con un TDL de 2%, 5% y de 8%..... 58

**Figura 12.** Porcentajes de eficiencia de encapsulación (EE) y carga de fármaco (DL) de las nanopartículas poliméricas en función del TDL..... 60

---

---

**LISTA DE TABLAS**

- Tabla I.** Coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) del EP variando la proporción volumétrica de agua – DMSO en el solvente y sus correspondientes coeficientes de determinación..... 46
- Tabla II.** Resumen de los parámetros obtenidos en la caracterización de los sistemas EP-NP en función del TDL usado en la formulación de las nanopartículas..... 61

---

**RESUMEN**

En este trabajo se desarrolló un método efectivo para la preparación de nanopartículas poliméricas cargadas con el fármaco 1,10-epoxipartenólido (EP), el cual presenta actividad antimicobacteriana. Se encontró que el tamaño de las nanopartículas aumentó proporcionalmente con la cantidad inicial de fármaco utilizada en la preparación o cantidad teórica de fármaco (TDL), obteniendo tamaños de  $208.6 \pm 10.2$  nm,  $223.4 \pm 0.7$  nm y  $250.9 \pm 11.7$  nm para TDL de 2%, 5% y 8%, respectivamente. El índice de polidispersidad (PDI) y el potencial zeta ( $\zeta$ ) no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al TDL en el rango de estudio. El PDI presentó valores de  $0.057 \pm 0.010$ ,  $0.078 \pm 0.034$  y  $0.095 \pm 0.033$  para TDL de 2%, 5% y 8%, respectivamente, indicando homogeneidad en los tamaños de las partículas. Por otro lado, el potencial zeta ( $\zeta$ ) exhibió valores de  $-24.2 \pm 3.4$  mV,  $-21.0 \pm 2.3$  mV y  $-19.1 \pm 3.7$  mV para TDL de 2%, 5% y 8%, respectivamente, mostrando una relativamente buena estabilidad de las partículas. Los resultados del fármaco encapsulado (DL) fueron semejantes para el rango de TDL estudiado, con valores de  $1.37 \pm 0.002$  %,  $1.43 \pm 0.048$  % y  $1.30 \pm 0.026$  % para TDL de 2%, 5% y 8%, respectivamente, indicando que se alcanzó la saturación del sistema desde la concentración más baja utilizada de EP. En concordancia, en el rango de estudio la eficiencia de encapsulación (EE) disminuyó al aumentar la cantidad inicial de EP utilizada en las preparaciones, obteniéndose EE de  $68.72 \pm 0.092$  %,  $28.54 \pm 0.958$  % y  $16.27 \pm 0.326$  % para TDL de 2%, 5% y 8%, respectivamente. La cinética de liberación

del fármaco EP en condiciones fisiológicas para las diferentes preparaciones reveló perfiles de liberación semejantes, donde se observa una fase de liberación inicial rápida en los primeros días, seguida de otra fase más lenta hasta liberarse completamente el fármaco en alrededor de 20 días. Este sistema de nanopartículas tiene aplicaciones potenciales en la administración prolongada del fármaco EP.

---

**ABSTRACT**

In this work, an effective method for the preparation of 1,10-epoxyparthenolide (EP) loaded polymeric nanoparticles was developed. It was found that nanoparticle size increased proportionally to the initial amount of drug used in the preparation or the theoretical drug loading (TDL). The diameters of nanoparticles were  $208.6 \pm 10.2$  nm,  $223.4 \pm 0.7$  nm, and  $250.9 \pm 11.7$  nm for TDL of 2%, 5%, and 8%, correspondingly. Polidispersity index (PDI) and zeta potentials ( $\zeta$ ) do not show statistically significant differences in the range of TDL studied. The PDI values obtained were  $0.057 \pm 0.010$ ,  $0.078 \pm 0.034$ , and  $0.095 \pm 0.033$  for TDL of 2%, 5%, and 8%, respectively; indicating homogeneity of particle size. On the other hand, the  $\zeta$  values were  $-24.2 \pm 3.4$  mV,  $-21.0 \pm 2.3$  mV, and  $-19.1 \pm 3.7$  mV for TDL of 2%, 5%, and 8%, correspondingly; showing a fair stability of particles. Furthermore, similar quantities of DL in the range of TDL evaluated were founded, with values of  $1.37 \pm 0.002\%$ ,  $1.43 \pm 0.048\%$ , and  $1.30 \pm 0.026\%$  for TDL of 2%, 5%, and 8%, respectively; pointing that the system reaches saturation even with the lowest concentration of EP used. Accordingly, the EE decreased with respect to TDL (in the study range), with values of  $68.72 \pm 0.092\%$ ,  $28.54 \pm 0.958\%$ , and  $16.27 \pm 0.326\%$  for TDL of 2%, 5%, and 8%, correspondingly. Additionally, the experimental release of EP was evaluated under physiological conditions. Similar drug release profiles were obtained by varying the TDL. An initial burst phase was observed in

the first days, followed by a slow release stage until the entire drug was released (around 20 days). This nanoparticle system has potential applications for the extended drug administration of EP.

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1. Introducción

Actualmente un gran número de investigaciones a nivel mundial están dirigidas hacia el desarrollo de sistemas basados en nanopartículas poliméricas biodegradables para la administración de fármacos. El diseño de estos sistemas es múltiple, pero va orientado principalmente hacia el desarrollo de nuevos tratamientos para enfermedades drásticas como tuberculosis, cáncer, diabetes, SIDA, malaria, entre otras (Kumari et al., 2010). Dentro de las ventajas que ofrecen estos sistemas nanoestructurados están la liberación controlada de fármacos, la estabilización y protección de moléculas lábiles (por ejemplo, ciertos fármacos, proteínas, péptidos, ADN, etc.), y la administración específica del fármaco (Singh y Lillard, 2009). Estos sistemas también pueden presentar alta estabilidad (es decir, vida útil larga dentro del cuerpo); alta capacidad de portador (es decir, muchas moléculas de fármaco o componente activo se pueden incorporar en la matriz de partículas); viabilidad de incorporación simultánea de componentes activos hidrofílicos e hidrofóbicos y la posibilidad de seleccionar la ruta más viable para la administración, incluyendo la administración oral, la inhalación, entre otras (Panyam y Labhasetwar, 2003). En el diseño de un sistema nanoestructurado para la administración de fármacos se deben cuidar varios aspectos importantes, entre los que se encuentran: la elección del sistema polimérico adecuado, que permita la mayor eficiencia de encapsulación, la mejora de la biodisponibilidad tanto del sistema nanoestructurado como

del fármaco o componente activo, el tiempo de retención sistémico, la relación entre el polímero y el fármaco, entre otros (Mathuria, 2009).

A pesar del potencial actual que ofrece la química de polímeros, sólo hay un número limitado de polímeros que pueden utilizarse como constituyente de las nanopartículas diseñadas para suministrar fármacos *in vivo* (Manuscript, 2012). Para explicar este hecho, se debe considerar que un polímero adecuado debe cumplir varios requisitos para ser utilizado en una aplicación de este tipo. Uno de los principales requisitos es ser biodegradable, de lo contrario es necesario que al menos pueda ser procesado por el cuerpo en un período de tiempo aceptable, evitando así la acumulación sistémica incontrolada (Pillai y Panchagnula, 2001). Además, el polímero no debe ser tóxico ni inmunogénico, en otras palabras, debe ser biocompatible (Nair y Laurencin, 2007). En el caso de que sea biodegradable, sus productos de degradación tampoco deben ser tóxicos o inmunogénicos (Nair y Laurencin, 2007). Asimismo, estos polímeros deben de ser capaces de conformarse como nanoestructuras y presentar propiedades adecuadas en relación con el objetivo de administración de fármacos para el cual se diseñen. Algunos polímeros que no cumplen completamente con todas las características requeridas para usarse sistémicamente han recibido acuerdos para utilizarse solamente en formulaciones para rutas de administración orales o tópicas, o bien se utilizan en la industria alimentaria (Vauthier y Bouchemal, 2009). Dentro de los estudios reportados usando nanopartículas con polímeros biocompatibles y biodegradables, existe un gran número de trabajos con: Poliácido láctico (PLA), poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLG) y



ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) (PLGA) (Singh y Lillard, 2009). Dentro de estos polímeros usados en la administración de fármacos, uno de los más exitosos es el PLGA ya que es un polímero biodegradable cuya hidrólisis conduce a los metabolitos, ácido láctico y ácido glicólico (Danhier et al., 2012). Debido a que estos dos monómeros son endógenos y fácilmente metabolizados por el cuerpo a través el ciclo de Krebs, se asocia una mínima toxicidad sistémica con el uso de PLGA para la administración de fármacos o aplicaciones de biomateriales (Danhier et al., 2012). Además el PLGA está aprobado por la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en diversos sistemas de administración de fármacos en seres humanos (Tosi y Bortot, 2013). Los polímeros son comercialmente disponibles con diferentes pesos moleculares y composiciones (Sadat et al., 2014). El tiempo de degradación se puede variar desde días a meses, dependiendo del peso molecular y la relación de los monómeros (Park, 1995). Las formas de PLGA se identifican generalmente por la relación de monómeros utilizada. Por ejemplo, PLGA 50:50 identifica un copolímero cuya composición es 50% de ácido láctico y 50% ácido glicólico (Kumari et al., 2010). Otra ventaja del PLGA es que contiene grupos carboxilo que facilitan la funcionalización con otras moléculas, tanto antes como después de la preparación de nanopartículas. Prácticamente, cualquier fármaco hidrófobo o hidrófilo puede ser considerado para su encapsulación en nanopartículas poliméricas dependiendo de la relación polimérica (Danhier et al., 2012). Los fármacos o componentes activos que se encapsulan en las nanopartículas dependerán de la aplicación, es decir del tipo de

enfermedad que se quiera tratar. En este ámbito, para tratar enfermedades infecciosas se utilizan antibióticos específicos que sean capaces de producir un efecto terapéutico. Dentro de estas enfermedades infecciosas tenemos a la tuberculosis (TB), una enfermedad crónica contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) que infecta a 9 millones de personas y mata a 1,4 millones de personas cada año (Pandey et al., 2003a). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que un tercio de la población mundial se encuentra infectado con MTB (Nguyen Thi et al., 2014). A pesar de contar con un tratamiento efectivo, esta enfermedad sigue siendo un importante problema de salud en todo el mundo, ya que las opciones disponibles para el tratamiento cuentan con el inconveniente de tener tiempos extendidos de administración de fármacos que normalmente son de 6 meses, pero en algunos casos pueden llegar a durar hasta 2 años, dependiendo del tipo de TB. Además del tiempo prolongado del tratamiento, las dosis son generalmente diarias (en algunos casos semanales) y se administran múltiples fármacos antituberculosos simultáneamente. Basado en lo antes mencionado, muchas personas no siguen el régimen estricto del tratamiento, lo que a su vez ha ocasionado la aparición de cepas resistentes a alguno de los antibióticos utilizados como primera línea, lo cual es una señal de alarma en la actualidad (Alan, 2014).

Debido a los problemas antes descritos con los tratamientos convencionales para TB, que se relacionan a las dosis y a la duración de los mismos, se han buscado nuevas alternativas, dentro de las cuales se encuentran los sistemas de administración de fármacos basados en nanopartículas. Estos sistemas tienen el potencial de contribuir en la

reducción de las dosis y también de la frecuencia de dosificación, que son dos de los principales obstáculos en el control de TB (Gelperina et al., 2005). Asimismo, la aparición de cepas resistentes de MTB a los fármacos de primera línea ha generado interés en el desarrollo y búsqueda de nuevos compuestos antimicobacterianos. En este ámbito, el grupo de investigación de la Dra. Adriana Garibay Escobar de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad de Sonora logró aislar y cristalizar un compuesto, llamado 1,10-epoxipartenólido (EP), con fórmula  $C_{15}H_{20}O_4$ , el cual presenta actividad antimicobacteriana (Coronado, 2012).

Con base en todo lo anteriormente expuesto, en este trabajo se plantea sintetizar y caracterizar un sistema de nanopartículas poliméricas de PLGA para la administración controlada del fármaco EP. Las partículas se sintetizarán por el método de emulsión - evaporación del solvente y se caracterizarán usando dispersión dinámica de luz, electroforesis por láser Doppler y también se determinará la cantidad de EP encapsulado, la eficiencia de encapsulación y la cinética de liberación de EP de las nanopartículas poliméricas. La investigación propuesta podría contribuir en el desarrollo de tratamientos novedosos para TB, reduciendo la dosis y también la frecuencia de dosificación.

## **1.2. Objetivo General**

Sintetizar y caracterizar un sistema de nanopartículas poliméricas de PLGA para la administración controlada de EP.

## **1.3. Objetivos Específicos**

- Caracterizar el fármaco EP.
- Sintetizar nanopartículas poliméricas cargadas con EP.
- Caracterizar los sistemas nanoestructurados con dispersión dinámica de luz y electroforesis por láser Doppler.
- Determinar la cantidad de fármaco encapsulado en las nanopartículas y la eficiencia de encapsulación.
- Estudiar la cinética de liberación del fármaco EP en condiciones fisiológicas.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Nanotecnología y Nanomedicina

La nanotecnología puede definirse como la ciencia y la ingeniería involucradas en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos cuya organización funcional más pequeña tiene al menos una dimensión en la escala nanométrica (1 nm- 1000 nm) (Silva, 2004). En la actualidad la nanotecnología tiene aplicaciones en diversos campos que incluyen fibras y textiles, agricultura, electrónica, ciencia forense, aeroespacial, medicina, etc. Dentro de las aplicaciones médicas, se ha creado un nuevo campo llamado nanomedicina, el cual tiene como objetivo el desarrollo de herramientas para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades drásticas como tuberculosis, cáncer, diabetes, SIDA, malaria, entre otras, cuando están todavía en estados poco avanzados o en el inicio de su desarrollo (Kumari et al., 2010). Las aplicaciones actuales y prometedoras de la nanomedicina incluyen, pero no se limitan a, administración de fármacos, el diagnóstico *in vitro*, formación de imágenes *in vivo*, técnicas de terapia, biomateriales y la ingeniería de tejidos. Dentro de las aplicaciones terapéuticas de la nanomedicina, tenemos a las nanopartículas biodegradables (Nair y Laurencin, 2007).

## 2.2. Dispersiones coloidales

Para entender mejor a la nanotecnología y sus aplicaciones, como por ejemplo la nanomedicina, es necesario describir las características básicas que describen el comportamiento de los sistemas nanoestructurados cuando están en contacto o dispersos en otro sistema o en otra fase. Para tal fin, a continuación se presenta una descripción general de dicho comportamiento por medio de las dispersiones coloidales, las cuales comprenden a una colección de pequeñas partículas, gotas, o burbujas de una fase, que tienen al menos una dimensión en la escala nanométrica, y las cuales están dispersas en una segunda fase. Una o ambas fases pueden estar en gas, líquido, sólido, o estados de fase supercríticos. Una dispersión coloidal, exhibe propiedades fisicoquímicas que difieren de las de los átomos o moléculas constituyentes pero también son diferentes a partir de material macroscópico (Laurier, 2005).

El rango de tamaño coloidal y las proporciones altas de superficie de área - volumen da lugar a algunas propiedades físicas únicas. Considerando que las partículas de la química clásica pueden tener una o unas pocas cargas eléctricas, las partículas coloidales pueden llevar miles de cargas. Con tales fuerzas eléctricas, la disociación completa es la regla para las especies coloidales, sin excepción. Dado que para las especies coloidales las áreas superficiales específicas (área de superficie por unidad de masa) son relativamente grandes, las propiedades de las interfaces pueden tener una influencia importante en sus propiedades (Laurier, 2005).

Coloides liófilos se forman espontáneamente cuando las dos fases se reúnen porque la dispersión es termodinámicamente más estable que el estado original. El término liófilo se usa con menos frecuencia en la práctica moderna, porque muchas de las dispersiones que alguna vez fueron consideradas como liófilo son ahora reconocidas como sistemas monofásicos en el que se disuelven las moléculas grandes. Coloides liófobos no se forman espontáneamente en contacto de las fases, ya que son termodinámicamente inestables en comparación con los estados separados. Estas dispersiones se pueden formar con entrada de energía mecánica a través de alguna forma de agitación tal como la proporcionada por un mezclador de estilo hélice, un molino coloidal, o un generador de ultrasonidos. La suspensión resultante puede tener una estabilidad considerable como una dispersión metaestable. Ejemplos de dispersiones coloidales liófobas son emulsiones, espumas y suspensiones de partículas. Ejemplos de dispersiones coloidales liófilas son micelas de tensioactivo, soluciones de proteínas y virus (Laurier, 2005).

### **2.2.1. Fuerzas de Van der Waals e interacciones electroestáticas**

Es el nombre colectivo para un conjunto de fuerzas caracterizadas por la misma dependencia de potencia de la distancia. Los parámetros importantes en este tipo de interacciones son el momento dipolar, que surge de la distribución de carga desigual de la molécula y la polarizabilidad atómica, la cual básicamente indica la tendencia de la

redistribución de cargas cuando la molécula es sometida a un campo eléctrico. Una contribución importante para el campo de fuerza de las fuerzas de Van der Waals está dada por la interacción entre el momento dipolar instantáneo que surge de la posición instantánea de los electrones con respecto al núcleo. La importancia fundamental de las fuerzas de Van der Waals deriva del hecho de que siempre están involucradas en la interacción entre los cuerpos, a diferencia de otros tipos de fuerzas que requieren una característica particular (por ejemplo, una carga eléctrica o una capa de macromoléculas absorbidas). Hay al menos tres tipos de fuerzas que contribuyen al enlace de Van der Waals. La primera fuerza, de tipo atractivo, conduce a lo que se llama energía de ionización y está presente en las agrupaciones moleculares cuyas partículas constituyentes poseen un momento dipolar permanente. A una distancia razonable se percibe que los dipolos tienen a orientarse perfectamente uno con respecto a otro y la atracción de unos dipolos sobre otros conduce a la energía de orientación atractiva o interacción dipolo-dipolo (Companion, 1980).

El segundo tipo de fuerza atractiva es la que existe entre una molécula con un momento dipolar permanente y una molécula (o átomo) sin él. Si el átomo es polarizable, la nube electrónica se desplaza hacia el extremo positivo del dipolo, con lo que los centros de las cargas positiva y negativa del átomo ya no coinciden y se ha formado un dipolo atómico inducido. La interacción atractiva entre el dipolo permanente y un dipolo inducido recibe el nombre de energía de inducción (Companion, 1980).



La distribución de carga electrónica tiene, en promedio, simetría esférica, pero momentáneamente pueden existir dipolos. Estos dipolos de corta vida polarizan los átomos adyacentes originando dipolos inducidos y aumentando la fuerza de atracción, que se denomina fuerza de London o fuerza de dispersión, este es el tercer tipo de fuerza que contribuye al enlace de Van der Waals. La fuerza de dispersión aumenta al aumentar el tamaño y la polarizabilidad de los átomos de las moléculas (Douglas y Alexander, 1994).

Las interacciones electrostáticas pueden debilitarse cuando otros iones diferentes se encuentran en la cercanía, modificando el campo eléctrico, o bien, cuando los iones se disuelven en un solvente capaz de rodearlos y apantallar las cargas eléctricas (solvente altamente dieléctrico). Las fuerzas electrostáticas son repulsivas o atractivas, dependiendo de si las cargas que interactúan son de igual o distinto signo. La intensidad de una fuerza electrostática depende directamente de la carga de cada ion, y es inversamente proporcional a la constante dieléctrica del disolvente y a la distancia entre las cargas.

### **2.2.2. Teoría DLVO**

La materia desde escalas atómicas puede tener varios tipos de interacciones con el medio en el que está suspendida, especialmente cuando se tienen soluciones acuosas u otras soluciones con disolventes de alta constante dieléctrica y dichas interacciones están

relacionadas a las fuerzas de van der Waals. Por otro lado, si las superficies de los materiales en cuestión interactúan ya sea por las características intrínsecas de los materiales o por la adsorción específica de los iones de la solución, van a interactuar también electrostáticamente. La acción combinada de las fuerzas de van der Waals y las fuerzas electrostáticas en agua se describe por la llamada teoría DLVO de la estabilidad coloidal (de las iniciales de Derjaguin, Landau, Verwey and Overbeek). En la teoría DLVO, el total de energía libre total de la interacción es expresada por la suma de las fuerzas de van der Waals y electrostáticas (Garbassi et al., 1998).

En teoría DLVO la aglomeración y la estabilidad de las dispersiones de partículas se determinan por la suma de las fuerzas atractivas y repulsivas entre partículas individuales. La atracción entre partículas es debido a las fuerzas de van der Waals. La interacción de la doble capa eléctrica que rodea cada partícula se llama fuerza de repulsión electrostática. Las dos propiedades más importantes de la doble capa eléctrica son el potencial zeta y el espesor de la doble capa eléctrica. Un aumento en cualquiera se traducirá en un aumento en interacción electrostática repulsiva. La carga superficial se controla por varios mecanismos, incluyendo ionización de superficie y adsorción de iones, mientras que el espesor de la doble capa eléctrica es una función de la solución de fuerza iónica.

### 2.2.3. Emulsiones

Las emulsiones son dispersiones coloidales en las cuales un líquido es disperso en una fase líquida continua de diferente composición. La fase dispersa es algunas veces referida como la fase interna y la fase continua como la fase externa. En la mayoría de las emulsiones, uno de los líquidos es acuoso (W) mientras que el otro es un aceite o hidrocarburo (O) (Laurier, 2005). La mayoría de las emulsiones estables en la práctica contienen un agente emulsificante (o estabilizador) que usualmente es un tensioactivo (Valenzuela, 2014). Dos tipos de emulsión se distinguen fácilmente en principio, dependiendo del tipo de la fase continua: aceite-en-agua (O/W) para gotitas de aceite dispersa en agua, o agua-en-aceite (W/O) para las gotitas de agua dispersadas en aceite.

Las situaciones prácticas no siempre son tan simples y uno puede encontrar emulsiones dobles, es decir, emulsiones que son aceite-en-agua-en aceite (O/W/O) y agua-en-aceite-en-agua (W/O/W). Por ejemplo, O/W/O denota una emulsión doble, que contiene gotitas de aceite dispersadas en gotas acuosas que a su vez están dispersadas en una fase continua de aceite (Laurier, 2005). Las gotitas de emulsión doble pueden ser bastante grandes (decenas de mm) y pueden contener muchas decenas de gotitas de la fase interna final. El tipo de emulsión que se forma depende de un número de factores. Si la relación de volúmenes de fase es muy grande o muy pequeña, entonces la fase que tiene el volumen más pequeño es con frecuencia la fase dispersa. Si la relación está más cerca de uno, entonces otros factores determinan el resultado. La mayoría de las

emulsiones no son termodinámicamente estables. Un emulsionante puede ser necesario para establecer la formación de la emulsión más fácil, o puede formar una película protectora, que ayuda a mantener la emulsión sin que se rompa (Laurier, 2005).

#### **2.2.4. Preparación de emulsiones**

La mayoría de los tipos de emulsiones que se encontrarán en la práctica no se forman espontáneamente en contacto de las fases, ya que son termodinámicamente inestables en comparación con los estados separados. Estas dispersiones pueden formarse por otros medios, sin embargo. Una emulsión se puede formar si dos líquidos inmiscibles se mezclan simplemente juntos en un recipiente y luego se agitan bien, pero si no se agrega algún tipo de estabilizador (emulsionante) la emulsión probablemente será muy inestable. Los agentes estabilizadores para emulsiones puede comprender uno o más de los siguientes compuestos: electrolitos inorgánicos simples, agentes tensioactivos, macromoléculas, o sólidos finamente divididos (tales como el carbono, sulfatos, hidróxidos, o partículas de arcilla con recubrimientos orgánicos). El uso de un agente emulsificante puede ser necesario para reducir la tensión interfacial de la emulsión, por lo que es más fácil crear pequeñas gotas, o también pueden ser necesarios para estabilizar las pequeñas gotitas formadas con la emulsión, de modo que no se unan para formar gotas más grandes, o incluso se separan como una fase a granel (Laurier, 2005). En el método clásico de preparación de una emulsión, el agente emulsionante se disuelve en la

fase donde es más soluble, después de lo cual se añade la segunda fase y se aplica un esfuerzo cortante a la mezcla utilizando cualquier mecanismo para producir alta velocidad o una agitación vigorosa (Laurier, 2005).

### **2.2.5. Tensooactivos**

Los tensooactivos o agentes de superficie activa son moléculas anfifílicas con una parte hidrofílica polar, iónica, o de ion híbrido y una parte hidrófoba no polar que comprende normalmente una cadena de hidrocarburo o fluorocarburo. Pueden ser de naturaleza iónica o no iónica. Las fuertes interacciones dipolo entre la parte hidrofílica y agua les hacen solubles en agua, y el equilibrio entre las propiedades duales de hidrofiliidad e hidrofobicidad les dota con una característica única de propiedades de superficie activa en soluciones. Los tensooactivos tienden a acumularse en varias interfaces, reduciendo el contacto de la parte hidrófoba con el medio acuoso, y tienden a reducir la energía libre de la frontera de fase. La concentración crítica de adsorción del tensooactivo en la interfase depende de su estructura y la naturaleza de las dos fases que forman la interfaz (Fanun, 2010).

### **2.2.6. Estabilización estérica y electrostática**

El uso de dispersiones de nanopartículas estables es a menudo requerido para correlacionar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas con su potencial tóxico. Un importante conjunto de propiedades se ha identificado que debe ser abordado

en los estudios toxicológicos, e incluyen el tamaño, estado de dispersión, carga superficial, forma, composición química, y química de superficie.

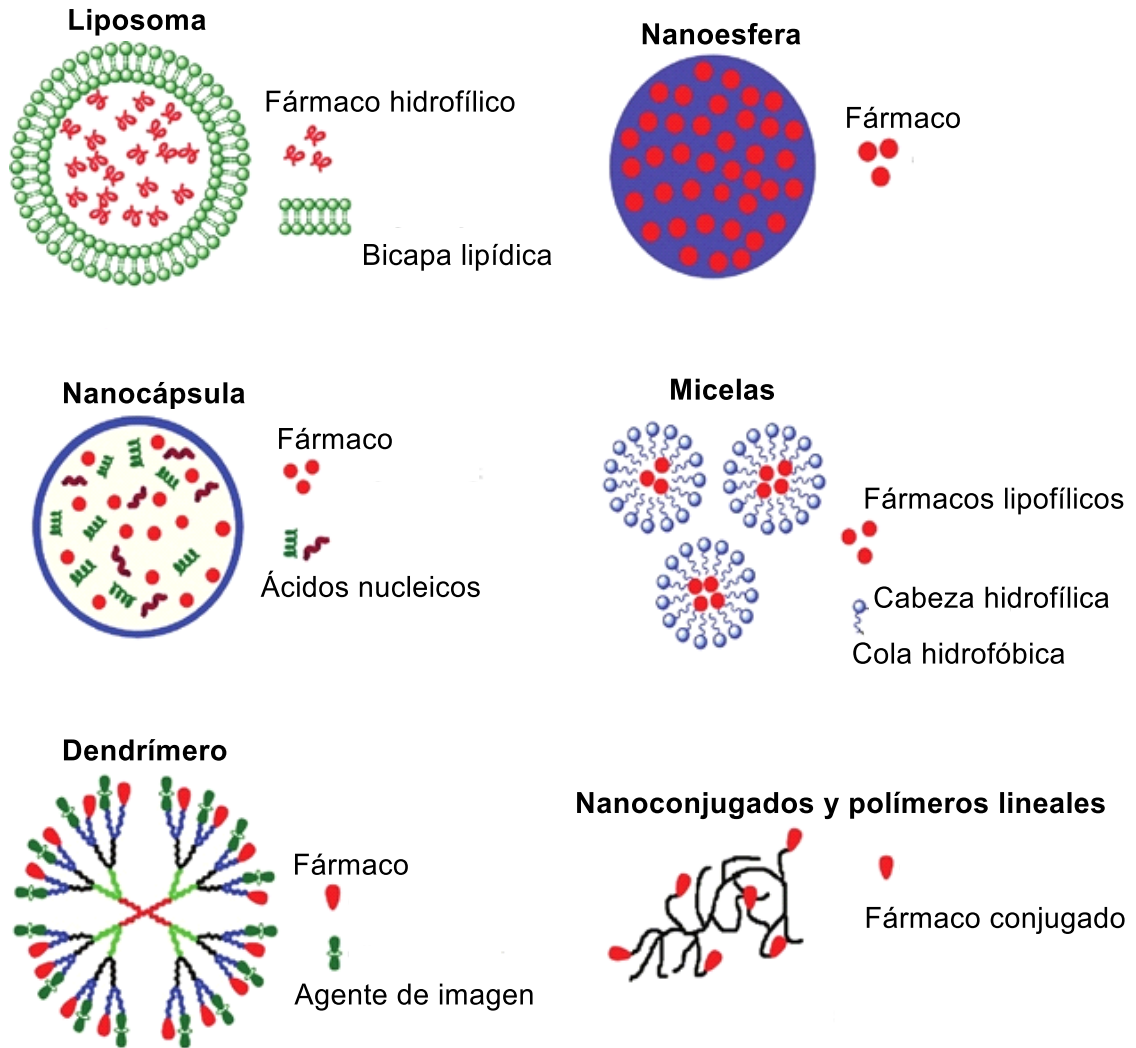
En teoría, es el equilibrio de las fuerzas repulsivas *versus* atractivas el que determina la estabilidad del sistema de nanopartículas; si las fuerzas repulsivas son mayores que las fuerzas de atracción, a continuación, la suspensión se mantiene estable (Tantra et al., 2010).

La estabilización electrostática, es decir, ajuste del pH para aumentar la carga superficial de la partícula puede aumentar la fuerza de repulsión entre partículas. Sin embargo, en muchas pruebas toxicológicas, el pH tiene que ser limitado a un estrecho rango apropiado para la función saludable de las células de prueba y organismos. La carga superficial se puede controlar alternativamente por el uso de una sal, que puede disociarse en múltiples iones cargados. Si una partícula es iónica o tiene grupos muy polares, los iones con carga múltiple pueden ser adsorbidos por la partícula en un entorno acuoso, que conduce a un aumento en la carga superficial de las partículas y potencial zeta. Los parámetros más importantes que rigen el estado y la estabilidad de dispersiones de nanopartículas, incluyen fuerza de la solución iónica, pH, carga superficial, y recubrimiento superficial. La fuerza iónica tiene influencia en la estabilidad de dispersión por el cambio de espesor de la capa doble eléctrica, mientras que el pH puede cambiar el estado de dispersión mediante la alteración del potencial zeta (carga de superficie). Iones de carga múltiple adsorbidos y recubrimientos de polímeros en superficies de nanopartículas puede

suprimir la aglomeración y estabilizar dispersiones de nanopartículas. Sonicación con sonda y la estabilización electrostática funcionan muy bien en la dispersiones con nanopartículas aglomeradas (Jiang et al., 2009).

### **2.3. Sistemas nanoestructurados para la liberación de fármacos**

Las nanopartículas utilizadas como vehículos de administración de fármacos tienen normalmente un tamaño entre 100 y 200 nm, y se componen de diferentes materiales biodegradables tales como polímeros naturales o sintéticos, lípidos, o metales. Las nanopartículas son incorporadas dentro de las células más eficientemente que varias macromoléculas grandes, y por tanto, pueden ser utilizadas como sistemas de transporte y entrega de compuestos activos, como fármacos. Cuando se utilizan nanopartículas en aplicaciones terapéuticas, los fármacos pueden ser integrados en la matriz de la partícula o pueden ser conjugados a la superficie de la misma. Un sistema de administración específico de fármacos debe ser capaz de controlar el destino de un fármaco al entrar en el entorno biológico. Nanosistemas con diferentes composiciones y propiedades biológicas como liposomas, micelas, dendrímeros y otras nanopartículas sólidas han sido ampliamente investigados para aplicaciones de administración de fármacos y genes como se muestra en la Figura 1 (Nimitt y Mayur, 2014).



**Figura 1.** Sistemas de liberación de fármacos, adaptada de la literatura (Qingguo Xu, Siva P Kambhampati, 2013).



### **2.3.1. Liposomas**

Los liposomas son vesículas esféricas compuestas de fosfolípidos anfifílicos y colesterol, que se autoasocian en bicapas para encapsular un interior acuoso, como se observa en la Figura 1. Las moléculas anfifílicas de los fosfolípidos forman una bicapa cerrada en forma de esfera de manera que intentan proteger sus grupos hidrófobos del medio acuoso, mientras se mantiene en contacto con la fase acuosa a través del grupo de la cabeza hidrofílica (Sharma y Sharma, 1997). Los medicamentos muy hidrofóbicos pueden ser encapsulados en estos liposomas, en el interior de la bicapa de fosfolipídica o en su interfase (Jáuregui-Haza y Oropesa-Nuñez, 2012).

Los liposomas han demostrado ser útiles para la entrega de agentes farmacéuticos. Estos sistemas utilizan el contacto facilitado para la administración de fármacos, que consiste en la unión o la interacción con la membrana de la célula blanco (Jáuregui-Haza y Oropesa-Nuñez, 2012). Los liposomas cuentan con el inconveniente de presentar tiempos de circulación cortos y bajas eficiencias de encapsulación.

### **2.3.2. Micelas**

Las micelas son partículas coloidales nanométricas, generalmente esféricas, con un interior hidrofóbico y un exterior hidrofílico, como se muestra en la Figura 1. Las micelas son ampliamente utilizadas en la preparación de formulaciones farmacéuticas como agentes solubilizantes y pueden utilizarse como portadores de fármacos

hidrofóbicos. Los fármacos pueden ser atrapados en el interior de las micelas o adherirse covalentemente a las superficies de ellas. El tamaño de estas partículas, las cuales generalmente tienen un tamaño inferior a los 50 nm de diámetro. Dichas micelas pueden circular durante períodos prolongados en la sangre, evadiendo el sistema inmunológico del paciente. Por ello, se pueden utilizar para la liberación gradual de fármacos y facilitar el diagnóstico *in vivo*. El exterior hidrofílico de las micelas está diseñado para ser termodinámicamente estable y biocompatible.

En particular, las micelas pueden proporcionar la administración prolongada de fármacos directamente en el tumor, haciéndolos capaces de cruzar la barrera hematoencefálica. Esto se logra mediante la funcionalización de la superficie del material con péptidos y ligandos permitiendo que el material cargado con la droga pueda ser administrado por vía sistémica, aunque estos aún se dirigen específicamente al endotelio del tumor (Jáuregui-Haza y Oropesa-Nuñez, 2012).

### **2.3.3. Dendrímeros**

Los dendrímeros son una clase única de macromoléculas, sintetizadas mediante una serie de reacciones sucesivas de adición (o condensación) controladas sobre un núcleo polifuncional. La estructura de estos polímeros consiste en una ramificación alrededor del núcleo central que da lugar a un patrón geométrico tridimensional casi

perfecto (Figura 1). En teoría, es posible sintetizar dendrímeros anfifílicos, con un núcleo hidrofóbico en el interior de las ramificaciones hidrofílicas (Gillies y Fréchet, 2005).

Los dendrímeros utilizados en la administración de fármacos son generalmente de 10 a 100 nm de diámetro, con múltiples grupos funcionales en su superficie, lo que hace que sean ideales como transportadores para la entrega de fármacos (Jáuregui-Haza y Oropesa-Nuñez, 2012).

#### **2.3.4. Nanocápsulas y nanoesferas**

Las nanopartículas sólidas son objetos esféricos que pueden ser fabricados con materiales biodegradables, como proteínas (por ejemplo, albúmina o colágeno), grasas, o polímeros. Las nanopartículas sólidas actuales, tienen un tamaño entre 10 nm a 1 000 nm, pueden realizar varias tareas, entre las que resaltan la obtención de imágenes y administración simultánea de fármacos. Las nanopartículas sólidas pueden ser modificadas superficialmente con moléculas para la administración dirigida de fármacos. Una de las principales ventajas de estas formulaciones es que estas nanopartículas se pueden preparar para proporcionar una liberación controlada de fármacos. Las nanopartículas sólidas se encuentran entre las nanoformulaciones más comunes (Jáuregui-Haza y Oropesa-Nuñez, 2012).

En la Figura 1 también se puede observar que las nanocápsulas son sistemas vesiculares en el que un fármaco se limita a una cavidad rodeada por una membrana de

polímero, mientras que nanoesferas son sistemas de matriz en la que el fármaco se dispersa físicamente y de manera uniforme (Rao y Geckeler, 2011).

## **2.4. Características generales de las nanopartículas en nanomedicina**

### **2.4.1. Tamaño de las nanopartículas**

Actualmente, el método más rápido y de rutina para la determinación de tamaño de las NP es mediante espectroscopia de correlación de fotones o dispersión dinámica de luz. Los resultados obtenidos por espectroscopia de correlación de fotones generalmente se verifican mediante microscopía de barrido o de transmisión de electrones (SEM o TEM) (Khlebtsov y Khlebtsov, 2011).

El tamaño de partícula y distribución de tamaño son las características más importantes de las NP. Ellos determinan la distribución *in vivo*, el destino biológico, toxicidad, y la capacidad de focalización de entrega de estos sistemas. Además, pueden influir en la carga de fármaco, la liberación del fármaco, y la estabilidad de las NP (Mohanraj y Chen, 2006).

Las partículas más pequeñas tienen una mayor relación superficie-volumen; Por lo tanto, la mayoría del fármaco asociado con pequeñas partículas está en la superficie o cerca de la superficie de la partícula, dando lugar a la liberación más rápida del fármaco. En contraste, las partículas más grandes tienen grandes núcleos, que permiten encapsular más fármaco por partícula y la liberación es más lenta. Así, el control del tamaño de

partícula proporciona un medio de ajuste de las tasas de liberación del fármaco (Singh y Lillard, 2009).

En el caso de las nanopartículas poliméricas, la degradación del polímero también puede ser afectada por el tamaño de partícula (Panyam et al., 2003). Por ejemplo, se encontró que la tasa de degradación del polímero PLGA aumenta a medida que la partícula aumenta de tamaño, se cree que este proceso es debido a los productos de degradación de PLGA que pueden difundir más fácilmente a través de distancias más cortas en nanopartículas más pequeñas, mientras que la matriz polimérica de las partículas más grandes aumenta el tiempo de la liberación debido a la mayor distancia y también puede causar la degradación autocatalítica del material polimérico (Singh y Lillard, 2009).

#### **2.4.2. Distribución de tamaño de las partículas**

De una forma general, las NP poliméricas obtenidas a través de diferentes métodos de preparación presentan una distribución unimodal, con una bajo índice de polidispersidad (Rao y Geckeler, 2011). Dependiendo de la formulación, las diferencias de tamaño se pueden observar dependiendo del método utilizado para su determinación, ya que la imagen de microscopio electrónico proporciona una partícula aislada del medio, mientras que la espectroscopia de correlación de fotones posibilita la determinación del radio hidrodinámico de partículas en suspensión (Rezende et al., 2003).

Varios estudios se han desarrollado para la evaluación de los principales factores que afectan el diámetro de las partículas de los sistemas nanoestructurados. Generalmente las nanopartículas poliméricas preparadas por diversos métodos presentan diámetros medios entre 100 y 300 nm, sin embargo, también podrían ser obtenidas partículas con diámetros inferiores a 50 nm.

La composición cualitativa y cuantitativa de las NP poliméricas y el método de preparación son factores determinantes del diámetro medio y la polidispersidad de las partículas. En el caso de nanocápsulas, un factor importante, que influencia el diámetro de las partículas, es la naturaleza del aceite usado como núcleo. Los resultados son atribuidos a diferencias de viscosidad, hidrofobicidad o la tensión interfacial de las sustancias empleadas (Rezende et al., 2003).

### **2.4.3. Evaluación morfológica**

La microscopia electrónica de barrido y la de transmisión han sido empleadas en la obtención de información relativa a la forma y tamaño de las NP. La microscopia de transmisión permite también diferenciar entre nanocápsulas y nanoesferas, posibilitando, inclusive, la determinación del espesor de la pared de las nanocápsulas (Akbari et al., 2011).

Otra técnica que también ha sido utilizada para la caracterización morfológica de la superficie de las nanopartículas es la microscopia de fuerza atómica, la cual ofrece

información con alta precisión en tres dimensiones, en escala nanométrica y es capaz de resolver detalles de superficie a nivel atómico (Rezende et al., 2003).

#### **2.4.4. Potencial Zeta**

El potencial zeta de las nanopartículas es el potencial en el plano de deslizamiento de la doble capa eléctrica y representa la carga de la superficie “efectiva” de las nanopartículas (Fanun, 2010). Se utiliza comúnmente para caracterizar la carga superficial de ellas. Refleja el potencial eléctrico de las partículas y depende de la composición de la partícula y el medio en el que se dispersa. Las nanopartículas con un potencial zeta por encima de  $\pm 30$  mV han demostrado ser estables en suspensión. El potencial zeta también se puede utilizar para determinar si un material cargado es encapsulado en el centro de la nanopartículas o en la superficie (Jáuregui-Haza y Oropesa-Nuñez, 2012).

Mediciones simples y rápidas pueden llevarse a cabo mediante la medición de la movilidad electroforética de las nanopartículas en una solución. Utilizando la siguiente ecuación general, la movilidad electroforética se puede usar entonces para calcular el potencial Zeta (Jáuregui-Haza y Oropesa-Nuñez, 2012):

$$\zeta = \frac{\mu E 4 \pi \eta}{\varepsilon} \quad (1)$$

Donde  $\zeta$  es el potencial zeta,  $E$  es la movilidad electroforética,  $\eta$  es la viscosidad del medio, y  $\varepsilon$  es la constante dieléctrica.

## 2.5. Técnicas para medir el tamaño y potencial Z de las nanopartículas

### 2.5.1. Dispersión dinámica de luz (DLS)

DLS es también conocida como espectroscopia de correlación de fotones (PCS) y dispersión de luz cuasi-elástica (QELS). Las partículas en solución tienen un movimiento browniano debido a colisiones aleatorias entre las moléculas de disolvente y las partículas, como consecuencia de este movimiento de las partículas, la dispersión de la luz del conjunto de partículas fluctúa con el tiempo. En DLS, la autocorrelación de estas fluctuaciones temporales en la intensidad de la luz dispersada se evalúa para determinar la intensidad ponderada del coeficiente medio de difusión ( $\text{m}^2/\text{s}$ ),  $D$ , de las partículas.

El diámetro hidrodinámico promedio,  $d_p$ , puede entonces ser calculado a partir del coeficiente de difusión utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d_p = \frac{kT}{3\pi\mu D} \quad (2)$$

Donde  $k$  es la constante de Boltzmann ( $\text{J K}^{-1}$ ),  $T$  es la temperatura absoluta y  $\mu$  es la viscosidad del medio ( $\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$ ). El diámetro hidrodinámico es el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión de las partículas (Jiang et al., 2009).



Considerando que varios grupos de tamaño de partículas están a menudo presentes en una solución, es necesaria una distribución de tamaño para describir la dispersión (Jiang et al., 2009).

### **2.5.2. Electroforesis con láser Doppler (ELS)**

Electroforesis láser Doppler (LDE) o velocímetro láser Doppler (LDV) se utiliza, para la medición del potencial zeta. Cuando un campo eléctrico se aplica a través de la dispersión, las partículas cargadas presentes en la dispersión se mueven hacia el electrodo de polaridad opuesta, este fenómeno se llama electroforesis. Si un rayo láser se pasa a través de la muestra de electroforesis, la luz dispersada por las partículas en movimiento será desplazada en frecuencia. Al medir el desplazamiento de frecuencia, la movilidad electroforética ( $M^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $U$ , puede determinarse dados la longitud de onda láser y el ángulo de dispersión. El potencial zeta, medido en volts (V), puede entonces calcularse a partir de la movilidad electroforética usando la Ecuación 1 (Morrison y Ross, 2002). Alrededor de la doble capa eléctrica que rodea hay un límite teórico (plano de deslizamiento), en el cual el líquido se mueve junto con partículas (Morrison y Ross, 2002).

## **2.6. Liberación de fármacos de nanopartículas poliméricas**

Actualmente existen dos métodos generales para la administración de fármacos, el primero se lleva a cabo por una liberación controlada, donde se trata de eliminar o reducir los efectos secundarios del fármaco por medio del uso de concentraciones reducidas del mismo y aumentando la estabilidad del fármaco en el organismo. En estos sistemas no suelen existir cambios en la concentración del fármaco en el organismo (comparándolo con los cambios intermitentes de concentración en las dosificaciones convencionales). El otro método para la administración de fármacos es llevado a cabo por una liberación dirigida hacia lugares específicos, donde se trata de asegurar que el fármaco sea liberado en el lugar requerido, y al mismo tiempo se mantenga controlada la acción del mismo en cualquier otro lugar del organismo (Sáez, Virginia; Hernáez, Estíbaliz; López, 2003)

### **2.6.1. Mecanismos de liberación de fármacos de nanopartículas poliméricas**

El conocimiento de los mecanismos de liberación y los procesos fisicoquímicos que influyen en la velocidad de liberación es vital en el desarrollo de la liberación controlada de fármacos. Los dos mecanismos de liberación principales asociados a la liberación del fármaco desde sistemas basados en PLGA son la difusión del fármaco y la degradación / erosión de la nanopartícula (Dinarvand et al., 2011). La velocidad de liberación se dice a menudo que es controlada por difusión inicialmente y por degradación / erosión durante la etapa final del período de liberación. Sin embargo,

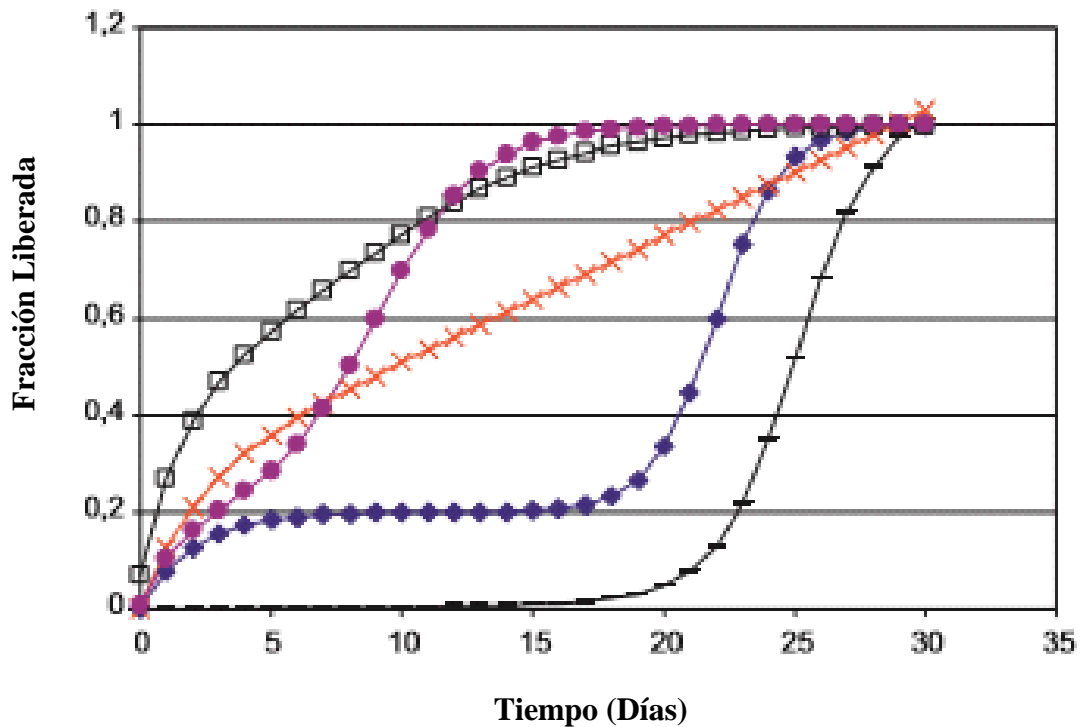
existen muchos procesos o eventos que influyen en la tasa de difusión del fármaco y la degradación, por ejemplo, las interacciones polímero-fármaco, las interacciones fármaco-fármaco, absorción de agua y el cierre de los poros (Fredenberg et al., 2011).

El mecanismo por el cual se da la liberación del fármaco es influenciado por diversos factores como el material del nanotransportador (composición, estructura, degradabilidad), el medio en el cuál se da la liberación (pH, enzimas, fuerza iónica, temperatura) y el tipo de fármaco (hidrofilicidad, estabilidad e interacción con la matriz) (Santa Cristian y López, 2013).

El perfil de liberación se utiliza a veces como la base para la evaluación mecanicista. La liberación del fármaco es a veces bifásica, pero es más común un perfil trifásico. Las partículas grandes o sistemas de liberación de fármacos a menudo presentan este perfil de liberación trifásico debido a la degradación heterogénea. Las partículas pequeñas y partículas recubiertas de una capa delgada de PLGA a menudo presentan un perfil de liberación bifásico con una segunda fase relativamente rápida. En la Figura 2 se dan algunos ejemplos de los diferentes perfiles de liberación (Fredenberg et al., 2011).

La fase I en el perfil de liberación trifásico clásico es generalmente descrita como una ráfaga de liberación, y se ha atribuido a fármaco no encapsulado en las partículas. Otras razones para la liberación de ráfaga pueden ser la formación de grietas y la desintegración de partículas. Después tenemos a la fase II, que a menudo es una fase de liberación lenta durante la cual el fármaco se difunde poco a poco, ya sea a través del

polímero relativamente denso o a través de los pocos poros existentes, mientras que la degradación del polímero y la hidratación proceden. Por último, en la fase III se presenta generalmente un periodo de liberación más rápida, a menudo atribuido al inicio de la erosión. Esta fase se llama a veces la segunda ráfaga.



**Figura 2.** Distintos perfiles de liberación de fármacos en sistemas de administración de fármacos basados en PLGA, adaptada de la literatura (Fredenberg et al., 2011).

## 2.7. Eficiencia de encapsulación y carga de fármaco en nanopartículas

La carga de fármaco durante la preparación de las nanopartículas y su posterior liberación de éstas, son propiedades importantes que tienen que ser evaluadas en un sistema de suministro de fármacos ya que determinan en gran medida la eficiencia y dosificación de tales sistemas. La carga de fármaco es el proceso de incorporación del fármaco en una matriz polimérica o cápsula. La liberación del fármaco es el proceso inverso por el cual las moléculas de fármaco se liberan de la fase sólida y se vuelven disponibles para la adsorción y la acción farmacéutica (De Villiers et al., 2009).

Dos términos comunes se utilizan en la literatura. Estos son la carga de fármaco (DL) y eficiencia de encapsulación (EE) los cuales son parámetros importantes para evaluar las propiedades de las nanopartículas (Wang et al., 2004). Estos parámetros se definen como:

$$\text{Carga de fármaco (\%)} = \frac{\text{Masa del fármaco en las nanopartículas}}{\text{Masa de nanopartículas}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \frac{\text{Carga experimental de fármaco}}{\text{Carga teórica de fármaco}} \times 100 \quad (4)$$

La eficiencia de encapsulación describe la eficacia del método de preparación para incorporar las drogas en el sistema de soporte. La cantidad de fármaco encapsulado también determina el rendimiento del sistema de administración de fármacos ya que influye en la velocidad y grado de liberación del fármaco desde el sistema (Tripathi et al., 2010). Tanto el DL como la EE dependen de las propiedades fisicoquímicas y las interacciones entre el fármaco, la matriz de soporte y el medio circundante (Melgardt et al., 2008). Por otro lado tenemos también al rendimiento del proceso, el cual nos da una indicación de la eficiencia para producir nanopartículas con el proceso analizado, y se define como:

$$\text{Rendimiento del proceso (\%)} = \frac{\text{Masa de nanopartículas final}}{\text{Masa inicial del fármaco + polímero}} \times 100 \quad (5)$$

## **2.8. Enfermedades infecciosas**

Las enfermedades infecciosas son el grupo de afecciones que mayor impacto ha tenido en la historia de la humanidad y aún hoy constituyen el principal motivo de las preocupaciones sanitarias para buena parte de las poblaciones del mundo. Un reciente informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se ha ocupado de recordarnos, que en 1995 las infecciones aún constituían la principal causa de muertes prematuras en el mundo, agrupando casi un tercio del total de fallecimientos (17 de un total de 52 millones), más de la mitad de los cuales (9 de los 17 millones) afectaban a niños de corta

edad. Por otra parte, la mitad de los habitantes del planeta continúa expuesta a infecciones endémicas de diversa índole.

En Europa Occidental y Norteamérica las infecciones epidémicas (peste, viruela, fiebre amarilla y cólera) fueron las enfermedades sociales dominantes hasta bien entrado el siglo XIX, en que de forma gradual perdieron protagonismo en favor de las enfermedades infectocontagiosas crónicas (tuberculosis, paludismo, fiebre tifoidea, enfermedades de transmisión sexual, entre otras). Desde los años ochenta surgieron de nuevo las afecciones de carácter infeccioso en el Occidente, a costa no sólo del retorno de enfermedades viejas ya conocidas como la tuberculosis y la sífilis, sino también de la aparición de «enfermedades emergentes» (Arrizabalaga, 2000).

Las enfermedades infecciosas “emergentes” pueden ser definidas como infecciones que recién han aparecido en una población o siempre han existido, pero están aumentando rápidamente su incidencia o rango geográfico. Entre los ejemplos recientes se encuentran SIDA, enfermedad de Lyme, y el síndrome urémico hemolítico (una infección transmitida por los alimentos causada por ciertas cepas de *Escherichia coli*) (Morse, 1995).

Muchos factores contribuyen a la aparición de enfermedades infecciosas, pero aquellos identificados frecuentemente incluyen al cambio y adaptación microbiana, cambios demográficos, cambios ambientales, la tecnología y el desarrollo económico,

ruptura de las medidas de salud pública y vigilancia, los viajes internacionales y el comercio (Wilson, 1995).

### **2.8.1. Tuberculosis**

Dentro de las enfermedades infecciosas, tenemos a la tuberculosis (TB), la cual es una enfermedad crónica contagiosa causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (Pandey et al., 2003b). Actualmente, la TB sigue siendo un importante problema de salud en todo el mundo ya que MTB, el principal organismo causante de la tuberculosis en humanos infecta a 9 millones de personas y mata a 1,4 millones de personas cada año. La OMS ha estimado que un tercio de la población mundial se encuentra infectado con MTB (Nguyen Thi et al., 2014).

A pesar de contar con una vacuna, una metodología diagnóstica y un tratamiento, la tuberculosis aún representa un problema de salud mundial, ya que éstas exhiben algunas desventajas, entre las que destacan las siguientes: la vacuna, solo se puede aplicar a niños para lograr su objetivo de inmunización y solo protege contra las formas graves de la tuberculosis, como la forma meníngea o miliar y no contra la forma pulmonar, siendo esta última la principal forma de diseminación del padecimiento. Por otro lado, se tiene que el tratamiento para TB a pesar de ser muy efectivo, cuenta con el gran inconveniente del tiempo extendido de administración, que como se mencionó anteriormente es el principal motivo por el cual muchas personas dejan de seguir el

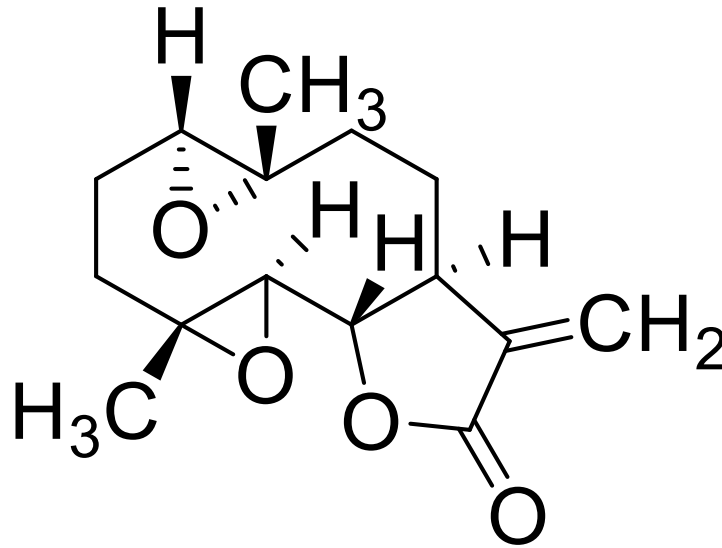


régimen estricto del tratamiento, lo que podría seleccionar cepas resistentes a alguno de los antibióticos utilizados como primera línea, por ello se recurre a los de segunda línea los cuales se utilizan en el caso de resistencia, algunos de ellos son: fluoroquinolonas, capreomicina, protionamida, etionamida, kanamicina y rifabutina.

El escenario que prevalece actualmente de tuberculosis resistente a los medicamentos es particularmente una señal de alarma en todo el mundo, ya que la infección viral puede debilitar el sistema inmune del huésped y predisponer a la reactivación endógena y la reinfección exógena con TB (Alan, 2014). Además, la creciente aparición de tuberculosis multirresistente (MDR TB) y extremadamente resistente (XDR TB) en la era del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) presenta una gran amenaza para el control efectivo de la tuberculosis.

Debido a la aparición de cepas resistentes a los medicamentos utilizados como tratamiento para la TB, se han buscado nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad, en este contexto, las plantas han demostrado ser una fuente potencial de nuevos agentes antimicrobianos y por lo tanto, la investigación de extractos de éstas ha sido de gran interés científico para el descubrimiento de drogas eficaces en el tratamiento de varias enfermedades. En este ámbito, la planta de *Ambrosia confertiflora* (Asteraceae), conocida comúnmente como estafiate, ha sido utilizada en la medicina tradicional sonorense, particularmente por las etnias yaqui y mayo, para tratar el dolor de estómago, la disentería y hemorroides.

En la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, un grupo de investigación del Programa de Posgrado en Ciencias de la Salud ha reportado el aislamiento biodirigido de compuestos de *Ambrosia confertiflora* con actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv, para lo cual obtuvieron extractos orgánicos con hexano, acetato de etilo, diclorometano y metanol, donde los extractos obtenidos con diclorometano fueron fraccionados mediante cromatografía en columna de sílica gel con fase móvil de polaridad creciente, monitorizada por cromatografía de capa fina. Posteriormente evaluaron la actividad antimicobacteriana de los extractos crudos, así como de las fracciones cromatográficas obtenidas, mediante el ensayo de azul alamar en microplaca (MABA). Los autores reportan que el extracto obtenido con diclorometano de *A. confertiflora* mostró una mínima concentración inhibitoria (MIC) de 120 µg/mL, así como una mínima concentración bactericida (MBC) de 140 µg/mL. Se logró aislar y cristalizar un compuesto de tipo lactona sesquiterpénica, llamado 1,10-epoxipartenólido, con fórmula  $C_{15}H_{20}O_4$  (Figura 3), el cual es responsable de la actividad antimicobacteriana del extracto diclorometánico de *A. confertiflora* (Coronado, 2012).



**Figura 3.** 1,10-epoxipartenólido ( $C_{15}H_{20}O_4$ ). Molécula encontrada en la fracción F22A y F8E del extracto diclorometánico de *A. confertiflora*. Estructura adaptada de la literatura (Coronado, 2012).

## CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

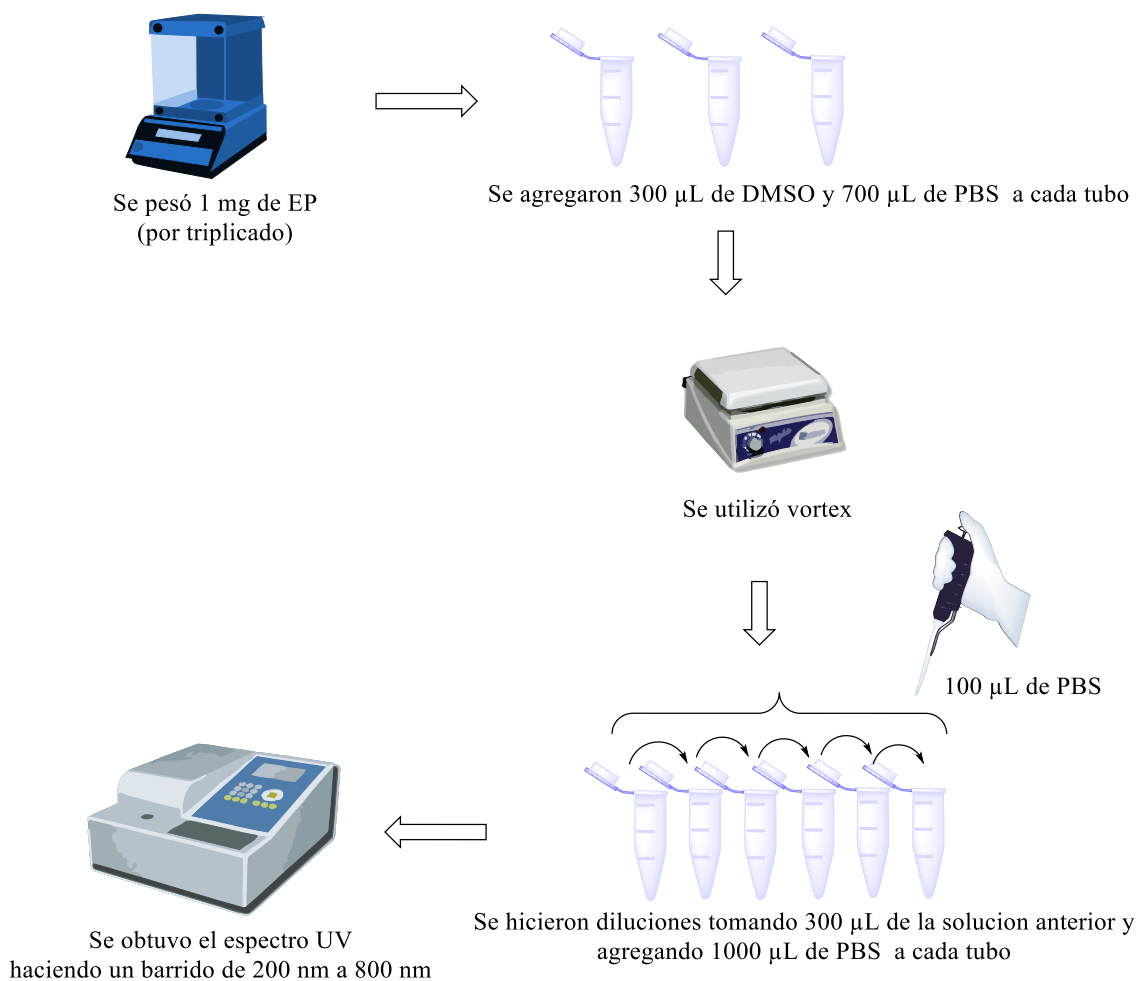
### 3.1. Materiales

El polímero poli(D,L-láctico-co-glicólico) 50:50 con terminación en ácido (PLGA) (0.2 dL/g) fue comprado de Corbion Purac, Gorinchem, (The Netherlands). Diclorometano (DCM) fue adquirido de Avantor Performance Materials, Inc. (Phillipsburg, NJ). El alcohol polivinílico (PVA) con un peso molecular promedio de 10-26 kDa y con 86-89 % en mol de hidrólisis fue obtenido de Alsa Aesar (Ward Hill, MA). El fármaco 1,10-epoxipartenólido (EP) fue proporcionado por el grupo de investigación de la Dra. Adriana Garibay Escobar de la Universidad de Sonora.

### 3.2. Curva patrón del fármaco EP

La caracterización de EP se llevó a cabo por espectrofotometría (Figura 4), para esto, se pesó 1 mg del fármaco y se disolvió en 100  $\mu$ L de DMSO usando agitación tipo vortex y después se aforó a 1 mL usando buffer 10 mM de PBS a pH 7.4 (el volumen de DMSO se varió a 200 y 300  $\mu$ L). Posteriormente se hicieron diluciones tomando 300  $\mu$ L de la dilución madre y agregando 1 mL de buffer PBS a cada tubo y repitiendo esta dilución sucesivamente. Finalmente se obtuvo el espectro UV-vis haciendo un barrido desde 200 nm hasta 800 nm usando el espectrofotómetro UV-Vis Genesis 10S, Thermo

Scientific, Madison, (Wisconsin, USA). Los resultados se graficaron para obtener la curva patrón de EP y cada estudio se realizó por triplicado.



**Figura 4.** Procedimiento para la obtención de la curva patrón de EP.

### 3.3. Preparación de las Nanopartículas Poliméricas (EP-NP)

La preparación de las nanopartículas poliméricas está adaptada de la técnica de emulsificación – evaporación del solvente (Lucero-Acuña et al., 2014). Brevemente, Se pesan 25 mg de PLGA y la cantidad correspondiente del fármaco EP (2%, 5% y 8% de carga teórica de EP (TDL), de acuerdo a la preparación). A continuación, el polímero y el EP se disuelven en 5 mL de DCM usando vortex y después se enfría la mezcla a -20°C. Luego se agregan 10 mL de una solución acuosa de PVA al 5% a 4°C, el cual será usado como agente estabilizante. Seguidamente se agita la muestra usando vortex hasta conseguir una microemulsión y después se sonica a 75% de amplitud en el ultrasonicador Qsonica LLC 500 (Newtown, CT) durante 1 minuto usando un baño de hielo (el baño de hielo se usa para evitar que se evapore el solvente orgánico antes de tiempo) para obtener la nanoemulsión. Después de la emulsificación, el solvente orgánico se remueve por evaporación en una campana de extracción, a temperatura ambiente y utilizando agitación magnética durante un periodo de 5 a 6 h. Finalmente se lleva a cabo la purificación de las nanopartículas, para lo cual, primeramente se realizó una centrifugación a 6,540 g y 4°C por 2 minutos en la centrifuga Sigma 3-30KS (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany), donde se descartó el precipitado y posteriormente se llevaron a cabo tres ciclos de centrifugación a 43,602 g y 4°C por 10 minutos, donde se descartó el sobrenadante y en cada ciclo el precipitado se resuspendió en 10 mL de agua DI.

### **3.4. Caracterización de las NP**

La caracterización de las nanopartículas se llevó a cabo midiendo el tamaño, polidispersidad y potencial Z usando el equipo Zetasizer Nano ZEN de Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, United Kingdom). Las mediciones del tamaño y polidispersidad de las nanopartículas purificadas se llevó a cabo usando la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Adicionalmente, el potencial Z de cada muestra fue determinado por duplicado a la misma temperatura usando electroforesis con láser Doppler. Cada muestra se midió por triplicado con diez corridas cada una, respectivamente. Los promedios del tamaño y potencial Z fueron tomados de tres experimentos independientes.

### **3.5. Cantidad de EP encapsulado en EP-NP y eficiencia de encapsulación**

La cantidad de EP encapsulado en el sistema EP-NP (DL) y la eficiencia de encapsulación (EE) fueron obtenidas directa e indirectamente. En el método directo se pesó 2 mg de EP-NP y se dispersaron en 1 mL del solvente diclorometano usando vortex, de esta manera el solvente elimina los enlaces electrostáticos que mantenían unido al polímero en la forma de nanoestructura y se libera el EP. Después se dejó evaporar el solvente orgánico a temperatura ambiente y el fármaco EP se disolvió en 1.5 mL de etanol usando vortex. A continuación se dejó precipitar el polímero PLGA, el cual no es soluble en etanol y se tomó una muestra del sobrenadante para analizarse

espectroscópicamente. Los resultados obtenidos se compararon con la curva de calibración de EP y se relacionaron a la cantidad de EP encapsulado en EP-NP y a la eficiencia de encapsulación. El método indirecto se llevó a cabo analizando los resultados de los estudios de liberación de EP, donde la masa final liberada se relacionó con la cantidad de nanopartículas usadas en el análisis para encontrar la cantidad de EP encapsulado en EP-NP y a la eficiencia de encapsulación.

### **3.6. Cinética de la liberación de EP**

Para el estudio de cinética de liberación de EP se preparó una solución buffer 10 mM de PBS a pH 7.4 con 10% de DMSO, esto último para evitar la saturación de fármaco en la solución, o bien, simular condiciones de disolución infinita. El estudio de liberación se llevó a cabo pesando 1 mg de EP-NP, el cual se disolvió en 1 mL de la solución buffer. Después se colocó esta solución conteniendo a las EP-NP dentro de una membrana de diálisis estándar de celulosa de 25 mm de diámetro y con longitud de 5 cm srecta/por de 12-14 kD MWCO (Spectrum Labs, Rancho Domínguez, CA, USA.), la cual se acondicionó previamente con lavados en agua DI, de acuerdo al fabricante. Posteriormente, la membrana se incubó en un tubo falcón de 50 mL conteniendo 30 mL de la solución buffer a 37°C. A ciertos intervalos de tiempo, se tomaron muestras de 1 mL del medio de incubación y se analizaron en un espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 247 nm, utilizando como blanco a la solución buffer. Los resultados



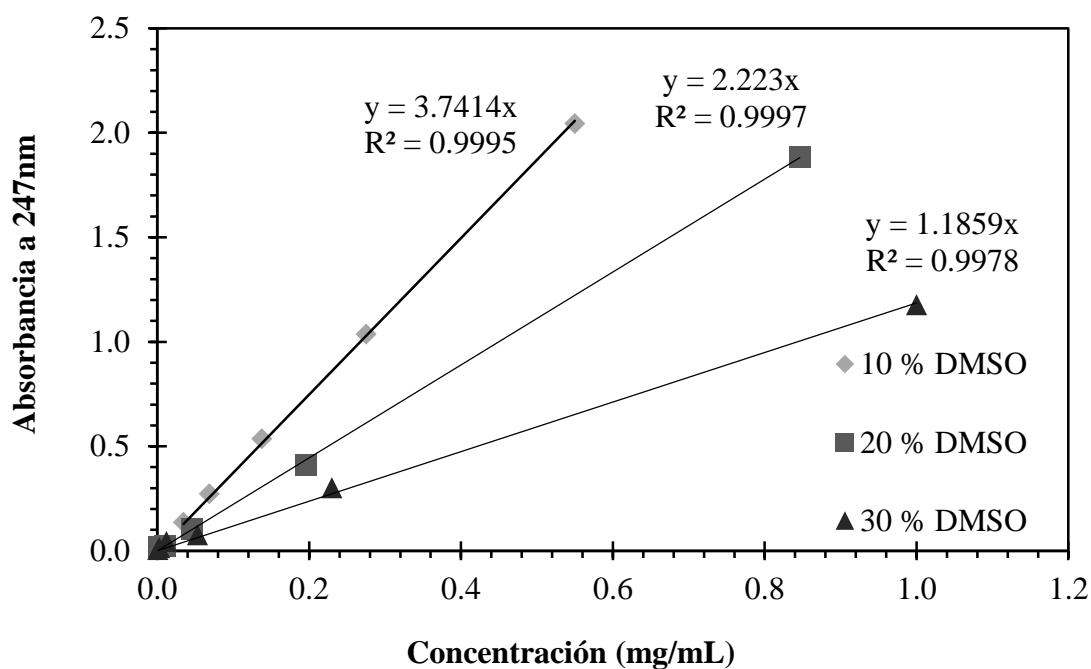
obtenidos por el espectrofotómetro UV-vis se compararon con la curva de calibración del EP para determinar la concentración de fármaco liberada. Cada volumen de muestra tomado para cuantificar al fármaco se recuperó con el mismo volumen de solución buffer para mantener un volumen de liberación constante.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Curva patrón del EP

Como parte de la caracterización del EP, se estudiaron las propiedades espectroscópicas del mismo en el UV-vis, utilizando como solvente una mezcla de buffer PBS 10 mM pH 7.4 con diferentes concentraciones de DMSO (10%, 20% y 30% V/V). Usando barridos en el UV-vis se encontró que el EP presenta un pico de absorción a una longitud de onda de 247 nm. A la longitud de onda antes mencionada se analizó la absorbancia de diferentes soluciones de EP usando el espectrofotómetro UV-vis (Génesis 10S, Thermo Scientific) y se realizó una gráfica de concentración vs absorbancia a 247 nm (Figura 5). En dicho gráfico se observa que la curva de calibración obtenida con la solución de buffer PBS con 10% de DMSO muestra un coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de 3.7414 y un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.9995. Asimismo, la curva de calibración de EP obtenida con la solución de buffer PBS con 20% de DMSO muestra un  $\epsilon$  de 2.223 y una  $R^2$  de 0.9997. Por último, en la Figura 5 también se puede observar que la curva de calibración de EP cuando se usa una solución de buffer PBS con 30% de DMSO presenta un  $\epsilon$  de 1.1859 y una  $R^2$  de 0.9978. Las tres curvas patrón del EP, cuando se varía la concentración de DMSO en el solvente, muestran buena correlación a una línea recta, con valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) cercanos a 1, como se resume en la Tabla I. Asimismo, en la Tabla I se resumen los coeficientes de extinción

molar ( $\epsilon$ ) para cada una de las curvas patrón usando diferentes concentraciones de DMSO, observándose que al aumentar la concentración de DMSO disminuye el coeficiente de extinción molar.



**Figura 5.** Curvas patrón de EP variando la proporción volumétrica de agua – DMSO (♦ 10% de DMSO, ■ 20% de DMSO y ▲ 30% de DMSO) y medidas a una longitud de onda de 247 nm.

**Tabla I.** Coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) del EP variando la proporción volumétrica de agua – DMSO en el solvente y sus correspondientes coeficientes de determinación.

DMSO (%)	$\epsilon$ (Abs/(M cm))	R <sup>2</sup>
10	3.7414	0.9995
20	2.223	0.9997
30	1.1859	0.9978

#### 4.2. Caracterización de las NP poliméricas

En este trabajo se llevó a cabo la preparación de nanopartículas poliméricas de PLGA por la técnica de emulsificación-evaporación del solvente, las cuales actuaron como vehículo para el fármaco EP. El fármaco EP se utiliza contra cepas del complejo *Mycobacterium*. Las propiedades de las nanopartículas poliméricas preparadas usando la técnica antes mencionada se muestran en las figuras 6 a 8 y se resumen en la Tabla II. Los sistemas

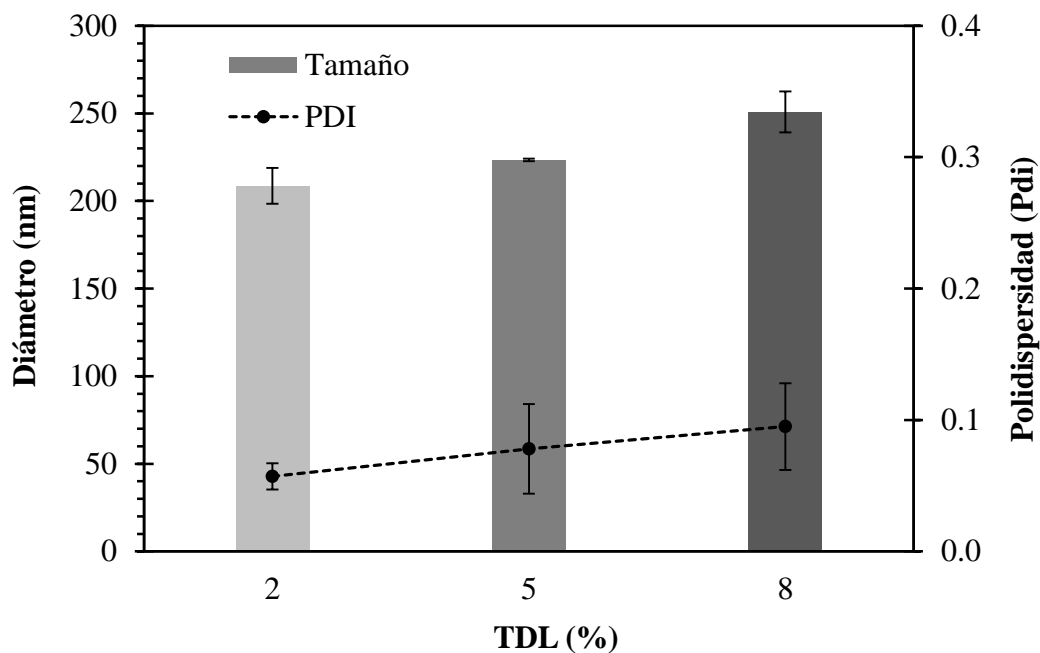
nanoestructurados se caracterizaron por dispersión dinámica de luz para la medición de tamaño y polidispersidad y por láser Doppler para el potencial zeta. Tres diferentes concentraciones de EP o TDL (2%, 5% y 8%) se estudiaron en el proceso de síntesis de las nanopartículas.

El análisis de la Figura 6 muestra que el tamaño promedio de las nanopartículas aumenta conforme aumenta la concentración de EP. Para un TDL de 2% las nanopartículas tuvieron un tamaño promedio en nm de  $208.6 \pm 10.2$ , para las de TDL 5% un tamaño de  $223.4 \pm 0.7$  nm y las de TDL de 8% un tamaño de  $250 \pm 11.7$ . Nanopartículas de tamaño semejante fueron reportadas por Esmaeili *et al*, donde los autores obtuvieron NP de PLGA de 200 nm a 260 nm (Esmaeili et al., 2007).

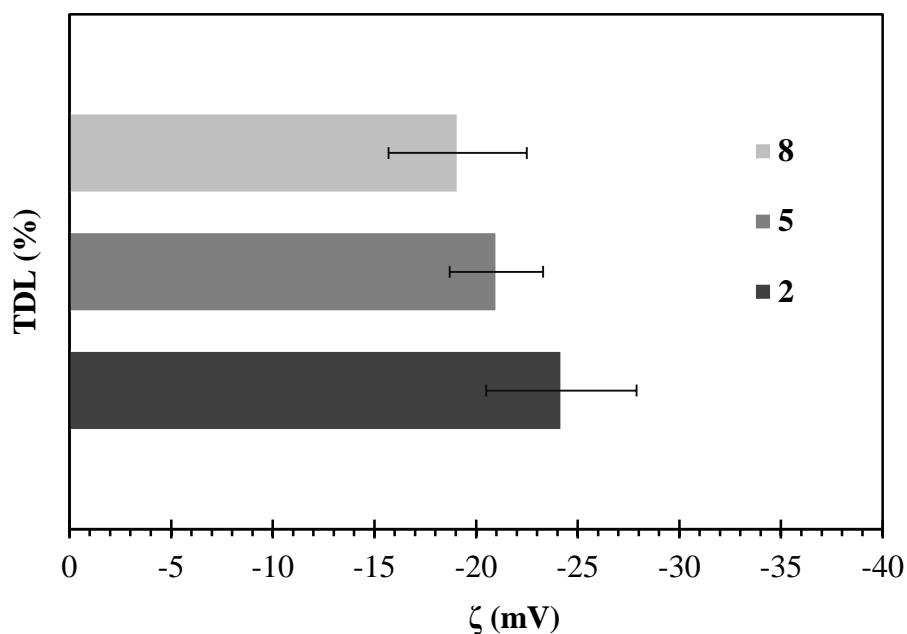
Comparando las barras del gráfico de la Figura 6, se puede observar que para el caso de TDL 8% el tamaño de las nanopartículas es mayor, lo cual hace referencia a que a mayor cantidad de EP utilizada en la síntesis aumenta el tamaño de las nanopartículas. Este efecto fue reportado por Rajan y Raj, observando que conforme aumentó la concentración del fármaco encapsulado, aumento también el tamaño de las nanopartículas (Rajan y Raj, 2012). Asimismo, en esta figura también se muestra que el índice de polidispersidad promedio, en el rango de amplitud estudiado, varía de forma proporcional al TDL, aunque se puede observar que el índice de polidispersidad de las tres preparaciones se encuentra en un rango que oscila de  $0.057 \pm 0.010$  a  $0.095 \pm 0.03$ . Obteniéndose el mejor índice de polidispersidad para las nanopartículas con un TDL de

2%. Para las tres preparaciones se observa que la polidispersidad es baja, lo que nos indica que la distribución de tamaños de las nanopartículas es homogénea. La incertidumbre de los valores del índice de polidispersidad es baja, por lo que se considera que no existe un cambio en la polidispersidad entre los TDL estudiados 2%, 5% y 8%.

También como parte de la caracterización del sistema de nanopartículas poliméricas se obtuvieron los valores de potencial Z, para las tres preparaciones de nanopartículas. En la figura 7 se muestra el efecto del TDL en el potencial zeta. Se presenta una ligera tendencia de disminución del potencial Z promedio conforme aumenta la concentración de EP en las nanopartículas, teniéndose valores de  $-24,2 \pm 3.4$ ,  $-21.0 \pm 2.3$  y  $-19.1 \pm 3.7$ , para TDL de 2, 5 y 8%, respectivamente, lo cual concuerda con lo reportado por Rajan y Raj, donde los autores observaron disminución del potencial Z conforme aumentó el TDL, los autores obtuvieron resultados de potencial zeta de  $-36 \pm 1.8$ ,  $-34 \pm 1.3$ ,  $-29.7 \pm 2.2$ , para nanopartículas con rifampicina con TDL de 10, 20 y 30, respectivamente (Rajan y Raj, 2012).



**Figura 6.** Variación del tamaño e índice de polidispersidad de las nanopartículas poliméricas en función del TDL de EP. Las barras de los colores ■, ■ y ■ representan el tamaño de las partículas para un TDL de 2%, 5% y 8%, respectivamente. Para cada TDL analizado se representa con un marcador puntual (•) al índice de polidispersidad. Datos presentados como promedios  $\pm$  DE ( $n = 3$ ).



**Figura 7.** Variaciones en el potencial zeta de EP-NP debido al TDL usado en la formulación de las nanopartículas poliméricas. Las barras de color ■, ■ y ■ representan el potencial Z de las nanopartículas para un TDL de 8%, 5% y 2%, respectivamente. Datos presentados como promedios  $\pm$  DE ( $n = 3$ ).



### 4.3. Cantidad de EP encapsulado en EP-NP y eficiencia de encapsulación

El DL y la EE se obtuvieron por dos métodos, el primero fue por una extracción del fármaco usando solventes, seguido de su caracterización espectrofotométrica y su comparación con la curva de calibración de EP. El segundo fue usando los resultados de los estudios de liberación de EP, donde la masa final liberada se relacionó con la cantidad de nanopartículas usadas en el análisis. En ambos métodos se emplearon las siguientes fórmulas para relacionar los resultados obtenidos con el DL y la EE:

$$DL (\%) = \frac{\text{Masa del fármaco en las nanopartículas}}{\text{Masa de nanopartículas}} \times 100 \quad (3)$$

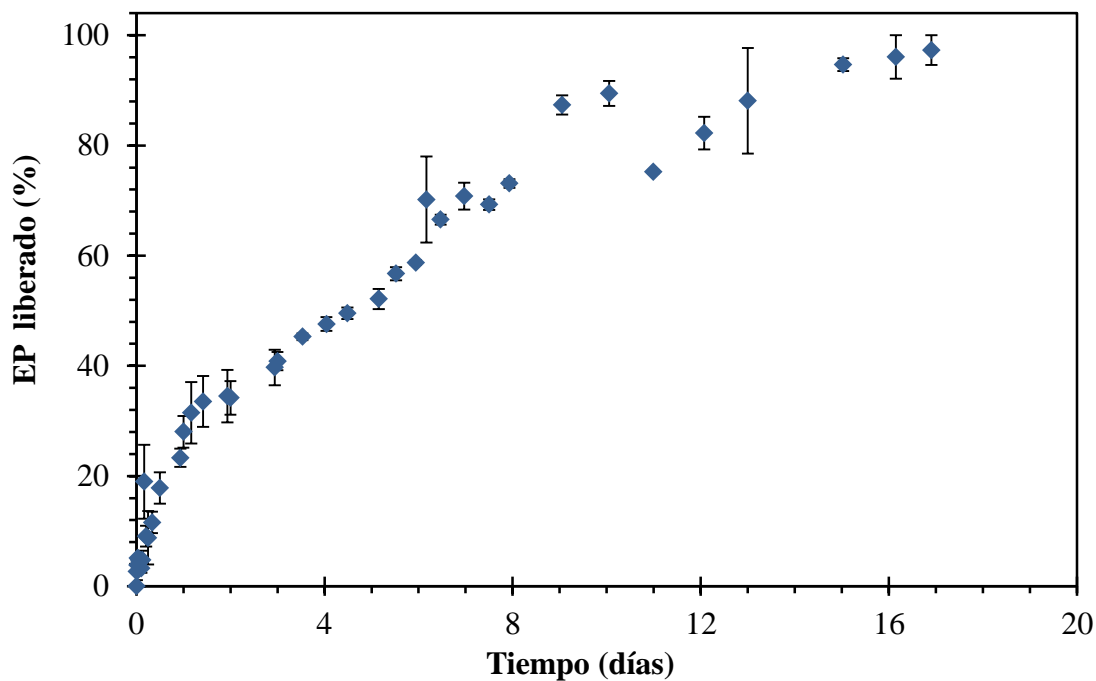
$$EE (\%) = \frac{\text{Carga experimental de fármaco}}{\text{Carga teórica de fármaco}} \times 100 \quad (4)$$

Los valores obtenidos se resumen en la Tabla II y el análisis de estos resultados se lleva a cabo en la discusión de la Figura 12.

### 4.4. Cinética de la liberación de EP

Se llevó a cabo el estudio de cinética de la liberación de EP de las nanopartículas poliméricas, para lo cual se midió la absorbancia de muestras tomadas a diferente tiempo de soluciones de EP en PBS con 10% de DMSO y posteriormente utilizando el dato de la

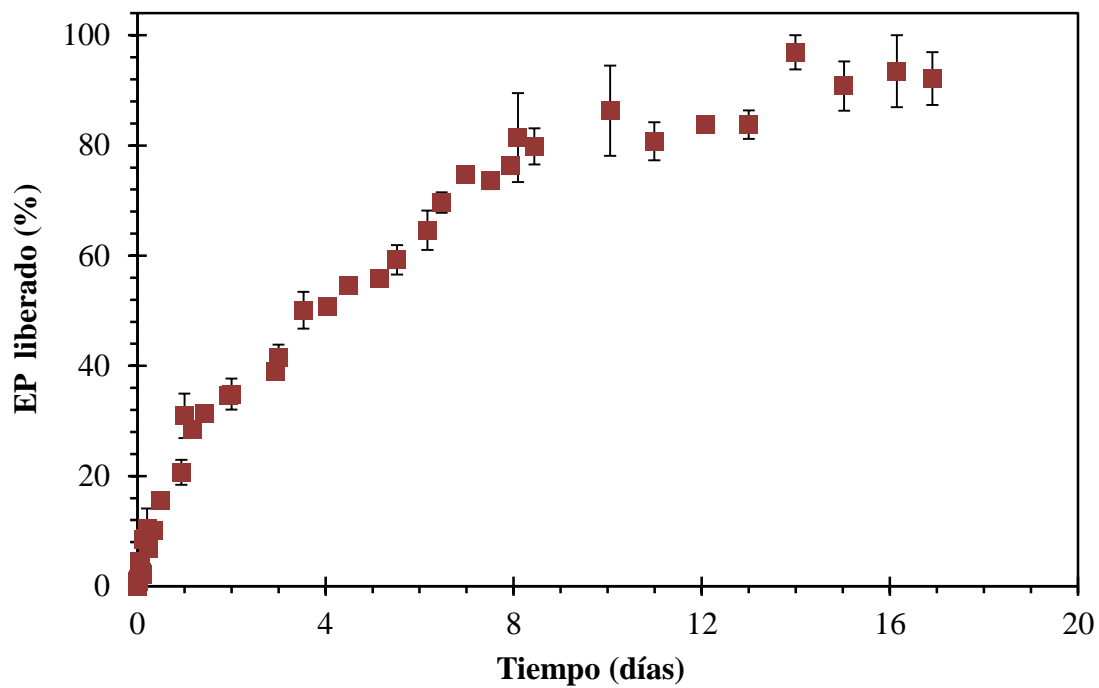
absorbancia de cada muestra se obtuvo el porcentaje de EP liberado para cada una de las tres preparaciones. En la Figura 8, se observa el porcentaje de EP liberado de las nanopartículas de PLGA con TDL de 2%, primero se observa que hay una liberación ráfaga de EP, liberándose un poco más del 20% de EP en los primeros 2 días del estudio de liberación, del día 2 en adelante se da una liberación lenta, hasta llegar a una tercera fase alrededor del día 9 donde se observa que la liberación de EP es más lenta, alrededor del día 20 del estudio, se observa que se liberó el 100% de EP de las nanopartículas. Tripathi *et al* reportan un perfil de liberación con una liberación ráfaga inicial (7.266%) en el día 1 del estudio, la cual atribuyen a droga asociada en la superficie de las nanopartículas que se libera rápidamente al entrar en contacto con el medio de disolución (Tripathi et al., 2010).



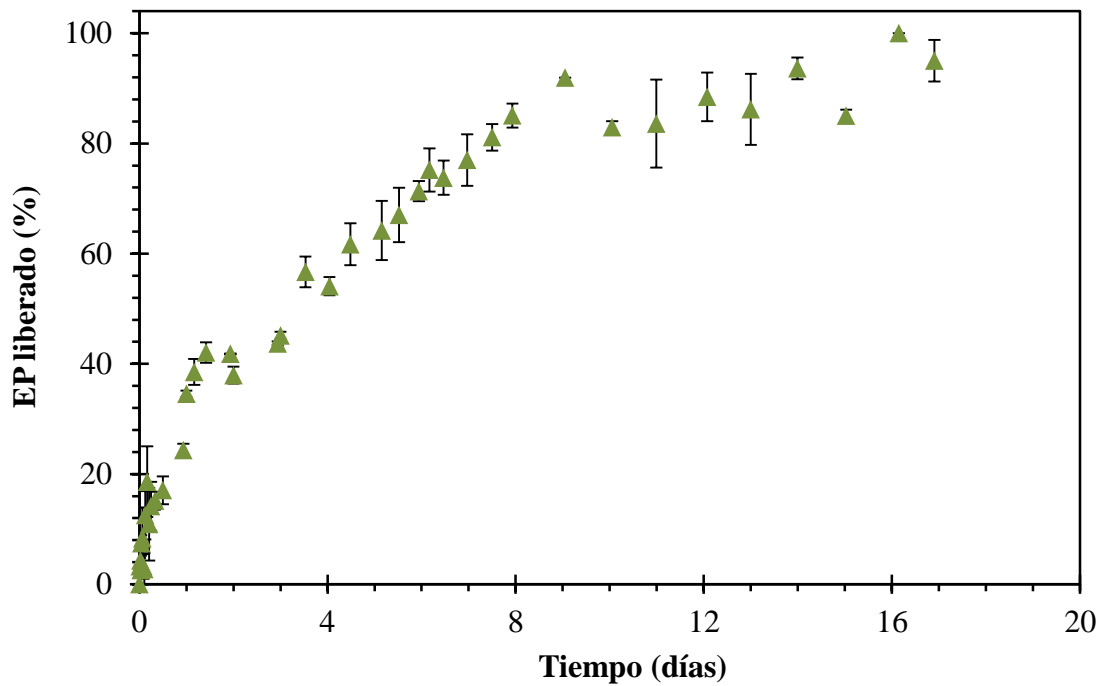
**Figura 8.** Curva de liberación de EP de las nanopartículas poliméricas (EP-NP) preparadas con un TDL de 2% (♦). Datos presentados como promedios  $\pm$  DE (n = 3).

En la Figura 9, se observa el porcentaje de EP liberado de las nanopartículas de PLGA con TDL de 5%, se observa un perfil de liberación semejante al observado para las nanopartículas con TDL de 2%, en el cual primero hay una liberación ráfaga de EP, liberándose alrededor del 20% de EP en el día 1 del estudio de liberación, del día 2 en adelante se da una liberación lenta, hasta llegar a una tercera fase alrededor del día 14 donde se observa que la liberación de EP es muy lenta y que se mantiene prácticamente contante el % de EP liberado hasta el día 18.

Realizando el mismo análisis para la Figura 10, se observa que para la preparación de TDL 8%, en el día 1 del estudio hay una liberación ráfaga de EP, liberándose alrededor del 20%, del día 2 en adelante se da una liberación lenta, hasta llegar a una tercera fase alrededor del día 12 donde se observa que la liberación de EP es muy lenta, y que se mantiene prácticamente contante el % de EP liberado hasta el día 18.



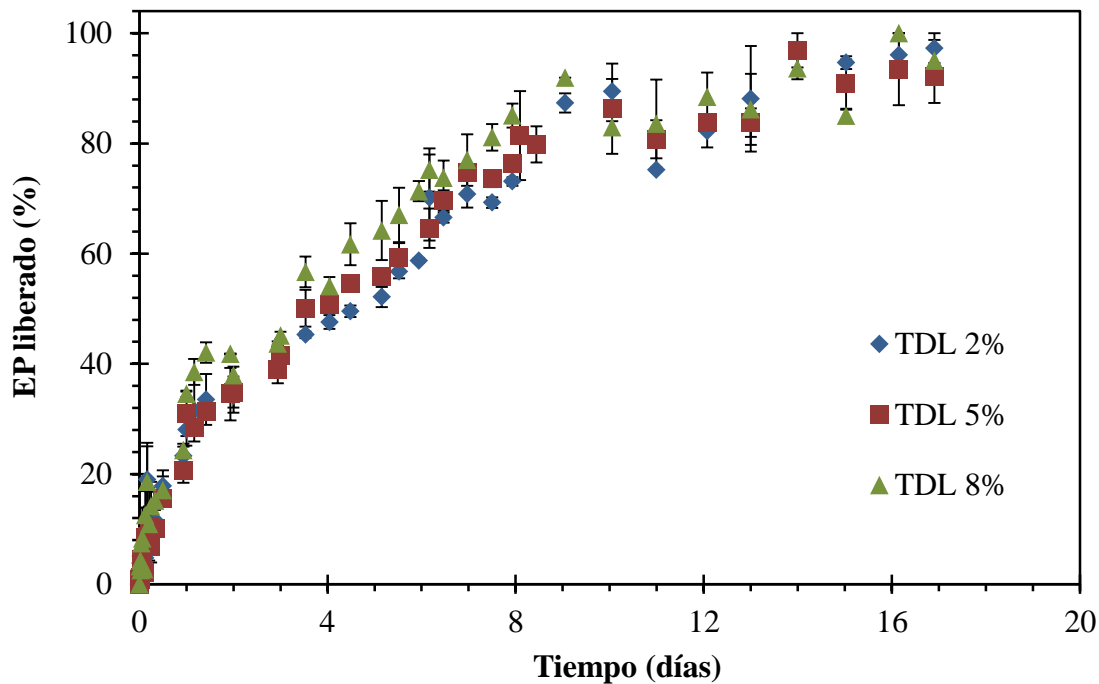
**Figura 9.** Curva de liberación de EP de las nanopartículas poliméricas (EP-NP) preparadas con un TDL de 5% (■). Datos presentados como promedios  $\pm$  DE ( $n = 3$ ).



**Figura 10.** Curva de liberación de EP de las nanopartículas poliméricas (EP-NP) preparadas con un TDL de 8% ( $\blacktriangle$ ). Datos presentados como promedios  $\pm$  DE (n = 3).

En la Figura 11, se presentan los tres perfiles de liberación anteriores para comparación con el fin de poder cotejar fácilmente el perfil de liberación de EP para cada formulación de las nanopartículas. Se observa que para las tres formulaciones con las que se trabajó 2%, 5% y 8% de EP, el perfil de liberación es semejante, dándose primero una liberación ráfaga del EP de las nanopartículas, después se observa que la liberación de EP es más lenta y culminando en una fase donde no se presentan cambios significativos en el porcentaje de EP liberado, esta fase se presentó para los tres casos en los últimos 5 días del estudio de cinética de liberación.

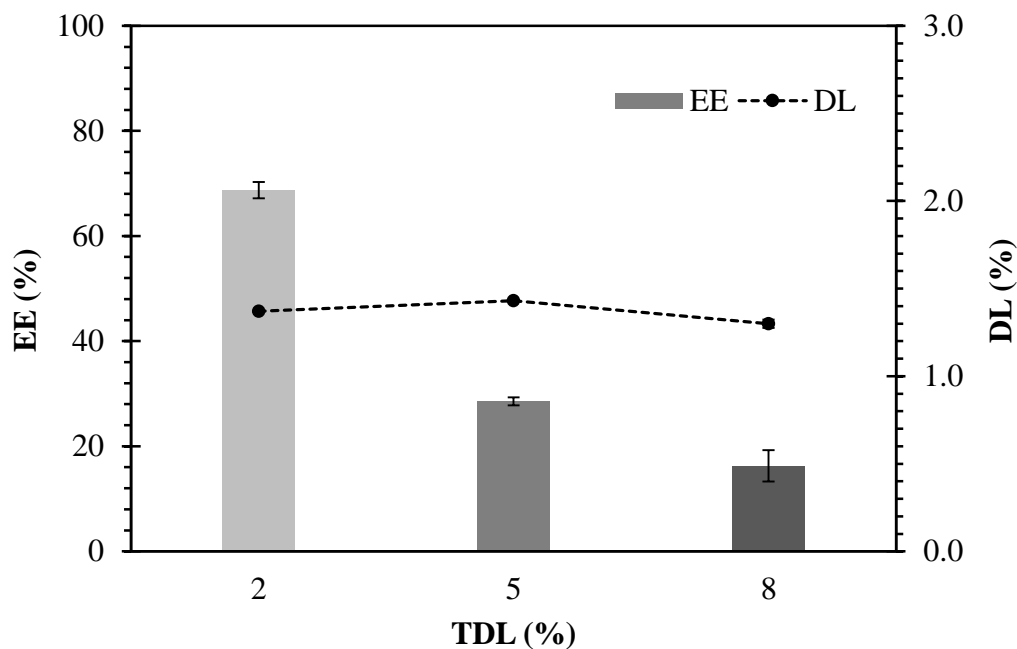
Cabe destacar que la degradación de PLGA es lenta, por lo cual la liberación de EP de las nanopartículas depende principalmente de la difusión del fármaco, en el tiempo de los estudios experimentales.



**Figura 11.** Curvas de liberación de EP de las nanopartículas poliméricas (EP-NP) preparadas con un TDL de 2% (◆), de 5% (■) y de 8% (▲). Datos presentados como promedios  $\pm$  DE (n = 3).



Después de realizar el estudio de cinética de liberación de EP de las nanopartículas poliméricas, se procedió a calcular la cantidad de EP encapsulado en EP-NP y la eficiencia de encapsulación. En la Figura 12 se muestra el DL de las tres preparaciones, el cual fue de  $1.37 \pm 0.002$  %,  $1.43 \pm 0.048$  % y  $1.30 \pm 0.026$  % para las preparaciones de TDL de 2% ,5 % y 8%, respectivamente. En la Figura 12 también se observa que conforme aumenta el TDL disminuye el porcentaje de la EE. Se obtuvo una EE de  $68.72 \pm 0.092$  % para un TDL de 2 %, de  $28.54 \pm 0.958$  % para TDL 5 % y una EE de  $16.27 \pm 0.326$  % para el TDL de 8%. Analizando los porcentajes de DL y EE obtenidos, suponemos que se alcanzó la saturación del sistema, por lo cual ya no se encapsuló más cantidad de fármaco y al encapsularse prácticamente la misma cantidad de fármaco en las tres preparaciones, se obtuvo un mayor porcentaje de EE para la preparación de 2%, ya que fue en la que se usó menor cantidad de fármaco. Estos resultados difieren con los resultados reportados por Rajan y Raj, los autores obtuvieron eficiencias de encapsulación de 43%, 53% y 62.6%, para preparaciones con TDL de 10%, 20% y 50%, respectivamente. Se puede observar que conforme aumentó el TDL de rifampicina aumentó la eficiencia de encapsulación (Rajan y Raj, 2012). Esta diferencia en los resultados pudiera deberse a que en las nanopartículas poliméricas preparadas en este trabajo se llegó a la saturación del sistema obteniendo así mayor EE para la preparación con menor TDL.



**Figura 12.** Porcentajes de eficiencia de encapsulación (EE) y carga de fármaco (DL) de las nanopartículas poliméricas en función del TDL. Las barras de color ■, ■ y ■ representan el porcentaje de EE de EP en las nanopartículas preparadas con un TDL de 2%, 5% y 8%, respectivamente. El porcentaje de DL de cada preparación se representa con un marcador puntual (•). Datos presentados como promedios  $\pm$  DE ( $n = 3$ ).

En la Tabla II se resumen los parámetros obtenidos en la caracterización de las nanopartículas y los datos obtenidos en los estudios de cinética de liberación de EP, se observa que para las EP-NP de TDL 2% el tamaño es de 208.6 nm con una desviación estándar de 10.2, para las de 5% el tamaño fue de  $223.4 \pm 0.7$  nm y para las de 8% el tamaño fue de  $250.9 \pm 11.7$  nm, el índice de polidispersidad (PDI) fue de  $0.057 \pm 0.010$ ,  $0.078 \pm 0.034$  y  $0.095 \pm 0.033$ , para las preparaciones de TDL de 2%, 5% y 8%, respectivamente. En la medición del  $\zeta$  se obtuvieron los siguientes valores:  $-19.1 \pm 3.7$ ,  $-21.0 \pm 2.3$  y  $-24.2 \pm 3.4$  para los TDL de 2%, 5% y 8%, respectivamente.

**Tabla II.** Resumen de los parámetros obtenidos en la caracterización de los sistemas EP-NP en función del TDL usado en la formulación de las nanopartículas.

Muestra	TDL (%)	Tamaño (d.nm)	PDI	$\zeta$ (mV)	DL (%)	EE (%)
EP-NP	2	$208.6 \pm 10.2$	$0.057 \pm 0.010$	$24.2 \pm 3.4$	$1.37 \pm 0.002$	$68.72 \pm 0.092$
EP-NP	5	$223.4 \pm 0.7$	$0.078 \pm 0.034$	$21.0 \pm 2.3$	$1.43 \pm 0.048$	$28.54 \pm 0.958$
EP-NP	8	$250.9 \pm 11.7$	$0.095 \pm 0.033$	$19.1 \pm 3.7$	$1.30 \pm 0.026$	$16.27 \pm 0.326$

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

Se desarrolló un método efectivo de síntesis de nanopartículas poliméricas cargadas con el fármaco EP. Se varió la cantidad inicial de EP utilizada en la síntesis de las nanopartículas, encontrándose que el tamaño de estas aumenta proporcionalmente con la cantidad teórica de EP utilizada. El PDI y el  $\zeta$  no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al TDL en el rango de estudio. Los valores obtenidos del PDI indican homogeneidad en los tamaños de las partículas. Por otro lado, el  $\zeta$  mostró una relativamente buena estabilidad de las partículas. Asimismo, se observó que la cantidad final de EP encapsulada dentro de las nanopartículas fue semejante para todas las preparaciones, indicando que se alcanzó la saturación del sistema desde la concentración más baja utilizada de EP. En otras palabras, se obtuvieron valores de DL semejantes para las tres preparaciones. En concordancia con esto, la eficiencia de encapsulación en el rango de estudio disminuyó al aumentar la cantidad inicial de EP utilizada en las preparaciones, por lo que se concluye que la preparación con menor cantidad de EP utilizada inicialmente tiene el mejor rendimiento. Se evaluó la cinética de liberación del fármaco EP en condiciones fisiológicas, encontrándose para las diferentes preparaciones perfiles de liberación semejantes, donde se observa una fase de liberación inicial rápida en los primeros días, seguida de otra fase más lenta hasta liberarse completamente el

fármaco en alrededor de 20 días. El sistema estudiado presenta potencial para usarse en tratamientos de administración prolongada del fármaco EP.

## 5.2. Recomendaciones

- Se recomienda purificar más cantidad de EP para estudiar mejor a la molécula en diferentes condiciones de pH y temperatura.
- Se recomienda hacer preparaciones de nanopartículas usando TDL menores al 2%, para optimizar el DL y la EE.
- Se recomienda realizar estudios *in vitro* con las EP-NP en cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

---

---

## REFERENCIAS

- Akbari, B., Tavandashti, M.P., Zandrahimi, M., 2011. Particle size characterization of nanoparticles- a practical approach. *Iran. J. Mater. Sci. Eng.* 8, 48–56.
- Alan, P.A.J., 2014. Formación de biopelículas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv sobre compósitos cerámico-cerámico de hidroxiapatita-alúmina. *Univ. Son.* 59.
- Arrizabalaga, J., 2000. Las «enfermedades emergentes» en las postrimerías del siglo XX: El sida 35, 93–100.
- Companion, A., 1980. Enlaces químicos.
- Coronado, E.W., 2012. Aislamiento y Caracterización Química de Compuestos con Actividad Contra *Mycobacterium tuberculosis* Cepa H37Rv del Extracto Diclorometánico de *Ambrosia confertiflora* y *Ambrosia ambrosioides*. *Univ. Son.* 98.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., Coco, R., Le Breton, A., Prétat, V., 2012. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Control. Release* 161, 505–522.
- De Villiers, M.M., Aramwit, P., Kwon, G.S., 2009. Nanotechnology in drug delivery. *Intech* 662.
- Dinarvand, R., Sepehri, N., Manoochehri, S., Rouhani, H., Atyabi, F., 2011. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. *Int. J. Nanomedicine* 6, 877–895.
- Douglas, B., Alexander, J., 1994. Conceptos y modelos de química inorgánica.
- Esmaeili, F., Hosseini-Nasr, M., Rad-Malekshahi, M., Samadi, N., Atyabi, F., Dinarvand, R., 2007. Preparation and antibacterial activity evaluation of rifampicin-loaded poly lactide-co-glycolide nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 3, 161–167.
- Fanun, M., 2010. Colloids in drug delivery.

- Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M., Axelsson, A., 2011. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review. *Int. J. Pharm.* 415, 34–52.
- Garbassi, F., Morra, M., Occhiello, E., 1998. *Polymer Surfaces: From Physics to Technology*.
- Gelperina, S., Kisich, K., Iseman, M.D., Heifets, L., 2005. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 1487–1490.
- Gillies, E.R., Fréchet, J.M.J., 2005. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov. Today* 10, 35–43.
- Jáuregui-Haza, R., Oropesa-Nuñez, U., 2012. Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas Nanoparticles as drug carriers: characteristics and perspectives 43.
- Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P., 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *J. Nanoparticle Res.* 11, 77–89.
- Khlebtsov, B.N., Khlebtsov, N.G., 2011. On the measurement of gold nanoparticle sizes by the dynamic light scattering method. *Colloid J.* 73, 118–127.
- Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 75, 1–18.
- Laurier, S., 2005. *Emulsions, Foams, and Suspensions*.
- Lucero-Acuña, A., Jeffery, J., Abril, E.R., Nagle, R.B., Guzman, R., Pagel, M.D., Meuillet, E.J., 2014. Nanoparticle delivery of an AKT/PDK1 inhibitor improves the therapeutic effect in pancreatic cancer. *Int. J. Nanomedicine* 9, 5653–5665.
- Manuscript, A., 2012. NIH Public Access. *Changes* 29, 997–1003.
- Mathuria, J.P., 2009. Nanoparticles in tuberculosis diagnosis, treatment and prevention: A hope for future. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* 4, 309–312.

- Melgardt, M. de V., Aramwit, P., Glen, K.S., 2008. Nanotechnology in Drug Delivery.
- Mohanraj, V.J., Chen, Y., 2006. Nanoparticles – A Review 5, 561–573.
- Morrison, I., Ross, S., 2002. Colloidal dispersions: suspensions, emulsions, and foams.
- Morse, S.S., 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 1, 7–15.
- Nair, L.S., Laurencin, C.T., 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 32, 762–798.
- Nguyen Thi, L.T., Sarmiento, M.E., Calero, R., Camacho, F., Reyes, F., Hossain, M.M., Gonzalez, G.S., Norazmi, M.N., Acosta, A., 2014. Immunoinformatics study on highly expressed Mycobacterium tuberculosis genes during infection. *Tuberculosis* 94, 475–481.
- Nimitt, C., Mayur, P., 2014. Nanotechnology Based Drug Delivery Systems for the Treatment of Tuberculosis 83, 382481.
- Pandey, R., Sharma, A., Zahoor, A., Sharma, S., Khuller, G.K., Prasad, B., 2003a. Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 981–986.
- Pandey, R., Zahoor, A., Sharma, S., Khuller, G.K., 2003b. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. *Tuberculosis* 83, 373–378.
- Panyam, J., Dali, M.M., Sahoo, S.K., Ma, W., Chakravarthi, S.S., Amidon, G.L., Levy, R.J., Labhasetwar, V., 2003. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *J. Control. Release* 92, 173–187.
- Panyam, J., Labhasetwar, V., 2003. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 329–347.
- Park, T.G., 1995. Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: Effect of copolymer composition. *Biomaterials* 16, 1123–1130.



- Pillai, O., Panchagnula, R., 2001. Polymers in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 447–451.
- Qingguo Xu, Siva P Kambhampati, R.M.K., 2013. Nanotechnology approaches for ocular drug delivery. *MEAJO* 20, 26–37.
- Rajan, M., Raj, V., 2012. Encapsulation, characterisation and in-vitro release of anti-tuberculosis drug using chitosan - poly ethylene glycol nanoparticles. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 4, 255–259.
- Rao, J.P., Geckeler, K.E., 2011. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog. Polym. Sci.* 36, 887–913.
- Rezende, S., Stanisçuaski, S., Lucca, L. De, Raffin, A., 2003. *Revisão* 26, 726–737.
- Sadat, F., Mirakabad, T., Nejati-koshki, K., Yamchi, M.R., Milani, M., Zeighamian, V., Rahimzadeh, A., 2014. PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems 15, 517–535.
- Sáez, Virginia; Hernáez, Estíbaliz; López, L., 2003. Liberación controlada de fármacos. aplicaciones biomédicas. *Rev. Iberoam. Polímeros* 4, 111–122.
- Santa Cristian, F., López, B., 2013. Materiales poliméricos en nanomedicina: transporte y liberación controlada de fármacos. *Rev.Acad.Columb.* 37, 115–124.
- Sharma, A., Sharma, U.S., 1997. Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. *Int. J. Pharm.* 154, 123–140.
- Silva, G. a., 2004. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surg. Neurol.* 61, 216–220.
- Singh, R., Lillard, J.W., 2009. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp. Mol. Pathol.* 86, 215–223.
- Tantra, R., Schulze, P., Quincey, P., 2010. Effect of nanoparticle concentration on zeta-potential measurement results and reproducibility. *Particuology* 8, 279–285.
- Tosi, G., Bortot, B., 2013. Potential use of polymeric nanoparticles for drug delivery across the blood-brain barrier. *Curr. Med. Chem.* 20, 2212–25.

- Tripathi, A., Gupta, R., Saraf, S. a, 2010. PLGA Nanoparticles of Anti Tubercular Drug: Drug Loading and Release Studies of a Water in soluble drug. *Int. J. PharmTech Res.* 2, 2116–2123.
- Valenzuela, A., 2014. Síntesis y caracterización de nanopartículas poliméricas de PLGA por el método emulsificación- evaporación para su utilización en nanomedicina 1, 49.
- Vauthier, C., Bouchemal, K., 2009. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm. Res.* 26, 1025–1058.
- Wang, S. Bin, Chen, A.Z., Weng, L.J., Chen, M.Y., Xie, X.L., 2004. Effect of Drug-loading Methods on Drug Load, Encapsulation Efficiency and Release Properties of Alginate/Poly-L-Arginine/Chitosan Ternary Complex Microcapsules. *Macromol. Biosci.* 4, 27–30.
- Wilson, M.E., 1995. Travel and the Emergence of Infectious-Diseases. *Emerg. Infect. Dis.* 1, 39–46.