



EL SABER DE MIS HIJOS  
HARÁ MI GRANDEZA

# UNIVERSIDAD DE SONORA

---

---

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA  
Y METALURGIA

## “PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PLGA CARGADAS CON EL FÁRMACO ETAMBUTOL”

Tesis

Que para obtener el título de:

**INGENIERO QUÍMICO**

Presenta

**Francisco Javier Noriega Zazueta**

Hermosillo, Sonora

Noviembre de 2023

# 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

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## VOTOS APROBATORIOS

Hermosillo, Sonora, a 01 de noviembre de 2023.

**DR. PAUL ZAVALA RIVERA**  
**JEFE DEL DEPARTAMENTO**  
**INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA**

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional **“PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PLGA CARGADAS CON EL FÁRMACO ETAMBUTOL”**, presentada por:

**FRANCISCO JAVIER NORIEGA ZAZUETA**

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

**INGENIERO QUÍMICO**

01/11/2023

Fecha

*Karol Hdez.*

DRA. KAROL YESENIA HERNÁNDEZ GIOTTONINI

01/11/2023

*Rosalva J. Rodríguez C.*

DRA. ROSALVA JOSEFINA RODRÍGUEZ CÓRDOVA

01/11/2023

*[Signature]*  
DR. OMAR PEÑUÑURI MIRANDA

01/11/2023

*[Signature]*  
DR. JESÚS ARMANDO LUCERO ACUÑA

**ÍNDICE DE CONTENIDO**

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
RESUMEN .....	viii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1. Introducción .....	1
1.2. Objetivo General .....	2
1.3. Objetivos Específicos.....	3
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES .....	4
2.1. Nanotecnología y nanomedicina .....	4
2.2. Nanopartículas poliméricas (NP) .....	4
2.3. Polímeros utilizados para la preparación de las NP .....	6
2.3.1. Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) .....	7
2.4. Técnicas empleadas en la preparación de nanopartículas poliméricas.....	8
2.4.1. Doble emulsión.....	8
2.4.2. Nanoprecipitación .....	9

2.5. Características generales de las nanopartículas en nanomedicina	10
2.5.1. Tamaño de las nanopartículas y distribución de tamaños	10
2.5.2. Potencial zeta	10
2.6. Enfermedades infecciosas	11
2.6.1. Tuberculosis	11
2.6.1.1. Tuberculosis resistente a múltiples fármacos (MDR-TB)	12
2.6.1.2. Etambutol (EMB)	12
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	14
3.1. Materiales	14
3.2. Espectro Uv-visible y curva de calibración del fármaco etambutol	14
3.3. Preparación de las Nanopartículas Poliméricas de PLGA cargadas con etambutol (NP-EMB)	14
3.4. Caracterización de las NP-EMB	15
3.5. Cantidad de etambutol encapsulado en las NP-EMB y eficiencia de encapsulación	15
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1. Espectro Uv-visible del EMB	17
4.2. Caracterización de las NP-EMB	18
4.3. Carga de fármaco y eficiencia de encapsulación	19

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	21
5.1. Conclusiones .....	21
5.2. Recomendaciones .....	21
BIBLIOGRAFÍA .....	22

**ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura de nanopartículas poliméricas (nanocápsulas y nanoesferas). Imagen adaptada de Zielińska et al., 2020..... 6

**Figura 2.** Estructura química del PLGA, tomada de Elmowafy et al., 2019. .... 8

**Figura 3.** Método de doble emulsión-evaporación del solvente. Imagen adaptada de Zielińska et al., 2020..... 9

**Figura 4.** Estructura química de EMB (Nazari et al., 2009)..... 13

**Figura 5.** Barrido UV-visible de etambutol en PBS con 1% de DMSO medido en un rango de 210 nm a 810 nm. .... 17

**Figura 6.** Distribución de tamaños obtenida a partir de las mediciones por DLS. Promedio  $\pm$  D.E (n = 3)..... 18

**Figura 7.** Distribución del potencial zeta obtenida a partir de las mediciones por electroforesis Doppler con láser. Obtenida del reporte del equipo. .... 19

**ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla I.** Resumen de resultados de la caracterización fisicoquímica de las NP-  
EMB preparadas por el método de doble emulsión-evaporación del solvente.  
..... 19



## RESUMEN

El Etambutol (EMB) es un fármaco antituberculoso de primera línea y también desempeña un papel crucial en el tratamiento de la tuberculosis resistente a múltiples fármacos. En esta investigación, se describe la preparación de nanopartículas poliméricas (NP) de ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) cargadas con EMB (NP-EMB) mediante la técnica de doble emulsión-evaporación del solvente. Las nanopartículas resultantes se caracterizaron midiendo su tamaño (diámetro en nm), índice de polidispersidad y potencial zeta. La medición del tamaño y la polidispersidad se realizó mediante la técnica de dispersión dinámica de luz, mientras que el potencial zeta se determinó mediante electroforesis con láser Doppler. Las nanopartículas presentaron un tamaño de alrededor de 170 nm, con una distribución de tamaños uniforme. Además, el valor del potencial zeta fue de  $-15.3 \pm 2.5$ , lo que indica que el sistema es relativamente estable. Asimismo, se determinaron los valores de carga de fármaco y eficiencia de encapsulación, los cuales concuerdan con la naturaleza hidrofílica del fármaco. Estos resultados sugieren que la técnica empleada es efectiva para la preparación de nanopartículas con características adecuadas para su potencial uso en sistemas biológicos.

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1. Introducción

La complejidad de algunas enfermedades y los posibles efectos tóxicos de ciertos tratamientos demandan la búsqueda constante de nuevos sistemas para la administración de fármacos (Begines et al., 2020). Las nanopartículas poliméricas (NP) son de gran relevancia en el ámbito de la investigación en la administración de fármacos, ya que posibilitan la entrega eficiente de una amplia gama de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos a diferentes áreas del cuerpo por un período de tiempo sostenido (Anwar et al., 2021). Además, las NP ofrecen la mejora de la solubilidad y disponibilidad de los fármacos, la minimización de los efectos secundarios y la superación de las barreras del cuerpo humano (Luo et al., 2021). Estas nanopartículas empleadas en la administración de fármacos pueden prepararse con diferentes materiales. En la actualidad, se ha observado un aumento en la utilización de polímeros sintéticos biodegradables, como el ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA), debido a sus características de biodegradabilidad, capacidad de ser compatible con el cuerpo, flexibilidad en cuanto a su formulación y posibilidad de funcionalización (Ghitman et al., 2020; Su et al., 2021). También, la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU. (FDA) aprobó el uso del PLGA para diversas aplicaciones farmacéuticas. En 1989, se lanzó el primer sistema de administración de medicamentos aprobado por la FDA, Lupron® Depot, basado en un polímero biodegradable (Alsaab et al., 2022). Estas nanopartículas de PLGA se han desarrollado buscando nuevos tratamientos para múltiples enfermedades, como las enfermedades infecciosas. Las enfermedades infecciosas generalmente son causadas por microorganismos. Su importancia deriva del tipo y extensión del daño que sus agentes causantes infligen a los órganos y/o sistemas cuando ingresan a un huésped. Dentro de las enfermedades infecciosas tenemos a la tuberculosis (TB),

la cual hoy en día es todavía una causa importante de morbimortalidad en el mundo (segunda causa de muerte originada por un solo agente infeccioso) (Barba Evia, 2020). El tratamiento actual se basa en una combinación de fármacos de primera línea, que incluye etambutol (EMB), rifampicina, isoniazida y pirazinamida. A pesar de la disponibilidad de estos antibióticos eficaces, los efectos secundarios graves, incluida la hepatotoxicidad, limitan la dosis que se puede utilizar clínicamente (Yunus Basha et al., 2019). Además, el tratamiento actual contra la tuberculosis es de la larga duración, lo que a menudo conduce a la falta de adherencia al tratamiento por parte de los pacientes (Sarkar et al., 2022). Este problema de salud mundial ha empeorado aún más en los últimos años debido al aumento de la tuberculosis multirresistente (MDR-TB, *M. tuberculosis* resistente al menos a la rifampicina y la isoniazida), con un estimado de 490, 000 nuevos pacientes en 2016 (Pradipta et al., 2018).

Por tanto, es clara la necesidad de buscar nuevas alternativas para los tratamientos convencionales de la tuberculosis. En este sentido, la investigación de nanopartículas poliméricas como sistemas de administración de fármacos ha sido de gran interés. En este trabajo se plantea preparar y caracterizar nanopartículas poliméricas de PLGA cargadas con el fármaco etambutol. Las nanopartículas se prepararán por el método de doble emulsión - evaporación del solvente y se caracterizarán usando dispersión dinámica de luz y electroforesis por láser Doppler, para obtener su tamaño, índice de polidispersidad y potencial zeta. También, se determinará la cantidad de EMB encapsulado y la eficiencia de encapsulación.

## **1.2. Objetivo General**

Preparar y caracterizar nanopartículas poliméricas de PLGA cargadas con el fármaco etambutol.

## **1.3. Objetivos Específicos**

- Caracterizar el fármaco etambutol por espectroscopia UV-visible.
- Preparar nanopartículas poliméricas de PLGA cargadas con el fármaco etambutol utilizando la técnica de doble emulsión – evaporación del solvente.
- Caracterizar las nanopartículas poliméricas para obtener su tamaño, índice de polidispersidad y potencial zeta mediante dispersión dinámica de luz y electroforesis por láser Doppler.
- Determinar la carga de fármaco en las nanopartículas poliméricas y la eficiencia de encapsulación.

## CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

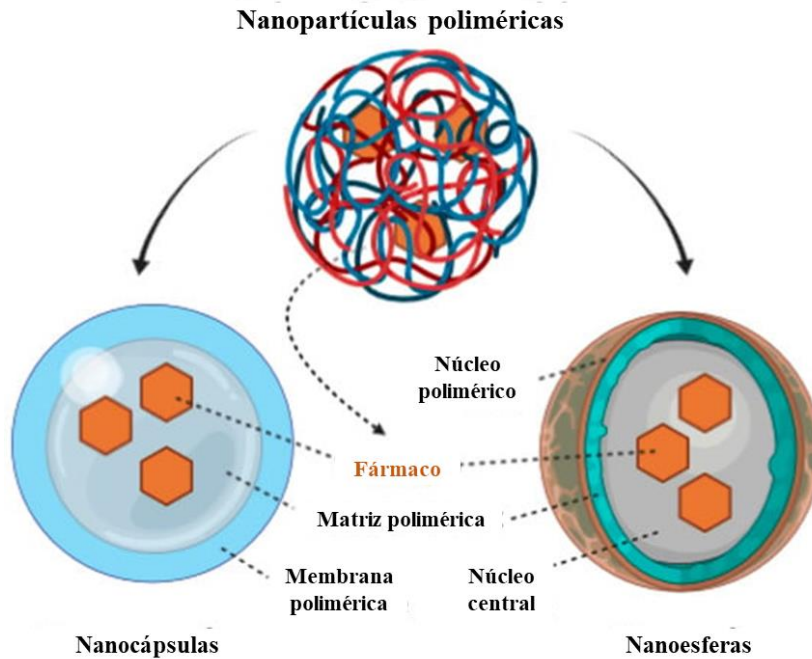
### 2.1. Nanotecnología y nanomedicina

La nanociencia y la nanotecnología representan un área de investigación en expansión, que involucra estructuras, dispositivos y sistemas con propiedades y funciones novedosas debido a la disposición de sus átomos en la escala de 1 a 100 nm (Bayda et al., 2020). La nanotecnología implica trabajar de arriba hacia abajo, es decir, reducir el tamaño de estructuras grandes a estructuras más pequeñas, o de arriba hacia abajo o de abajo hacia arriba, que implica transformar átomos y moléculas individuales en sistemas nanoestructurados (Pratima Nikalje, 2015). El diseño y aplicación médica de estos sistemas nanoestructurados para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades representan un área importante de la investigación actual en nanotecnología (Donahue et al., 2019). Esta aplicación de la nanotecnología con fines terapéuticos y de diagnóstico se conoce como nanomedicina (Ajazuddin et al., 2019). La nanomedicina tiene las ventajas potenciales de superar las barreras biológicas, administrar eficazmente fármacos y productos biológicos y atacar preferentemente los sitios de la enfermedad (Wu et al., 2020). Las nanopartículas son atractivas para utilizarse en nanomedicina debido a sus características únicas, como su relación superficie-masa que es mucho mayor que la de otras partículas, sus propiedades cuánticas y su capacidad para adsorber y transportar diferentes compuestos (Luo et al., 2021; Saidi et al., 2018). Algunos de los sistemas nanoestructurados comúnmente utilizados son cristales líquidos, estructuras organometálicas, nanoesferas de sílice, liposomas, micelas y nanopartículas poliméricas.

## **2.2. Nanopartículas poliméricas (NP)**

Las nanopartículas poliméricas (NP) han generado un creciente interés en los últimos años debido a las propiedades que derivan de su reducido tamaño. Para diseñar un sistema de administración de nanopartículas poliméricas de manera óptima, es esencial lograr un control eficiente de sus propiedades superficiales y tamaño de partícula. Esto permitirá regular la capacidad de infiltración, ajustar la solubilidad, mejorar la elasticidad y gestionar el patrón de liberación de los medicamentos contenidos en las NP (El-Say and El-Sawy, 2017). Entre los beneficios de las NP como portadores de fármacos se encuentran su potencial uso en la liberación controlada, la capacidad de proteger fármacos y otros compuestos con actividad biológica frente al entorno, y su capacidad para aumentar la biodisponibilidad y el índice terapéutico de dichas sustancias (Zielinska et al., 2020). Las NP pueden transportar fármacos, proteínas o material de ADN para dirigirse a un órgano o célula específica. Dependiendo del método de preparación utilizado, la naturaleza del fármaco u otro compuesto terapéuticamente activo, este puede disolverse, unirse, encapsularse o atraparse en la matriz de las nanopartículas (Sur et al., 2019). Dependiendo de su estructura interna, las nanopartículas poliméricas pueden clasificarse como nanoesferas o nanocápsulas (Figura 1).

Las nanoesferas se caracterizan por ser una estructura de matriz sólida homogénea en la que una o más sustancias están impregnadas uniformemente, por otra parte, las nanocápsulas contienen una región central, que puede ser hueca o rellena, y un material que forma una capa que cubre la estructura encapsulada (Lima et al., 2022).



**Figura 1.** Representación esquemática de la estructura de nanopartículas poliméricas (nanocápsulas y nanoesferas). Imagen adaptada de Zielińska et al., 2020.

### 2.3. Polímeros utilizados para la preparación de las NP

Los polímeros biocompatibles se han empleado ampliamente en la ciencia farmacéutica como excipientes para formulaciones farmacéuticas tradicionales y, más recientemente, en nanomedicinas para mejorar los resultados terapéuticos de fármacos potentes (Hwang et al., 2020). Una de las áreas donde están adquiriendo cada vez más importancia es biomedicina. Las NP utilizadas en biomedicina para la administración de fármacos se pueden sintetizar a partir de una variedad de precursores naturales o sintéticos, como colágeno, quitosano,

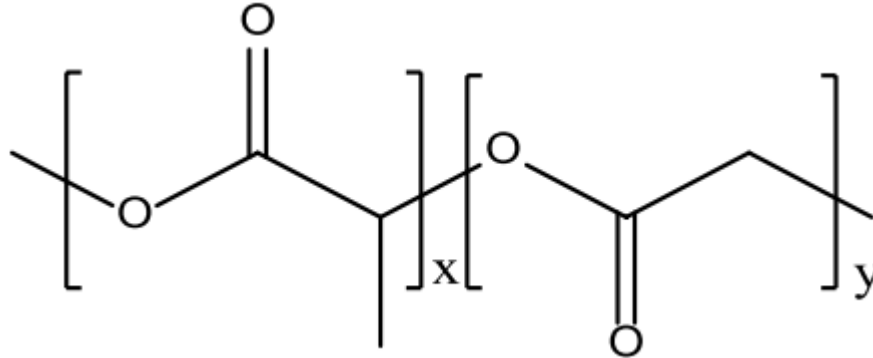
gelatina o albúmina, y polietilenglicol, ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), entre otros (Spirescu et al., 2021).

### **2.3.1. Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA)**

El ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) es uno de los polímeros más ampliamente explorados (Rocha et al., 2022). Es un copolímero sintético prometedor que ha sido autorizado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en varios sistemas de administración de medicamentos (Elsayed et al., 2023). Con estos sistemas basados en PLGA se ha buscado desarrollar nuevos tratamientos para tratar distintas enfermedades drásticas. El PLGA se adapta fácilmente a sistemas de administración de fármacos de diversas arquitecturas y es soluble en muchos disolventes, incluidos cloroformo, diclorometano, tetrahidrofurano (THF), acetona y acetato de etilo. Es insoluble en agua; sin embargo, absorben agua y se degradan por hidrólisis de su enlace éster (Elmowafy et al., 2019)

El tiempo de degradación controlable es una característica esencial del PLGA. El proceso de hidrólisis del PLGA podría dividirse en dos etapas. En la primera etapa, el peso molecular del PLGA disminuye gradualmente, mientras que el peso total permanece estable. En la segunda etapa, el peso molecular del PLGA disminuye hasta que los productos son solubles en agua, y aparecerá una rápida disminución del peso total (Zhao et al., 2021). La degradación del PLGA es más rápida para los polímeros con mayor cantidad de unidades de ácido glicólico. Los polímeros con una proporción de 50:50 de ácidos láctico y glicólico tienen la tasa de degradación más rápida y, por lo tanto, son uno de los polímeros más utilizados en nanomedicina (Swider et al., 2018). En la Figura 2 se muestra la estructura del PLGA.





**Figura 2.** Estructura química del PLGA, tomada de Elmowafy et al., 2019.

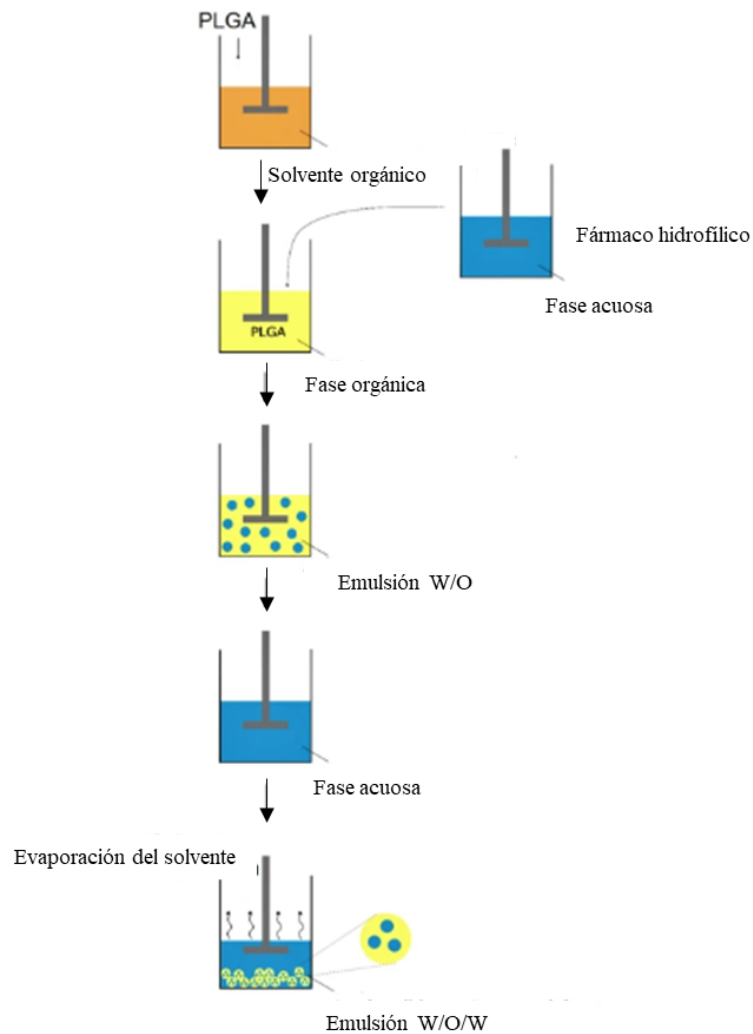
#### **2.4. Técnicas empleadas en la preparación de nanopartículas poliméricas**

Los enfoques convencionales para la preparación de nanopartículas de PLGA se basan principalmente en métodos basados en disolventes, incluidos métodos basados en emulsificación simple o doble con evaporación/difusión de disolvente, polimerización interfacial y nanoprecipitación, seleccionados en función de las características del fármaco y del polímero (Chiesa et al., 2018).

##### **2.4.1. Doble emulsión**

El término emulsión se define básicamente como la mezcla de una fase líquida con otra total o parcialmente inmisible, mediante el uso de moléculas tensioactivas anfifílicas (surfactantes) que reducen la tensión interfacial entre los dos líquidos para lograr estabilidad (Crucho and Barros, 2017). La técnica de doble emulsión (Figura 3) es el método principal para encapsular fármacos solubles en agua (Lagrega et al., 2020). Para este método, se emulsiona una solución acuosa que contiene los compuestos a encapsular en una fase orgánica que contiene PLGA bajo agitación vigorosa. A continuación, esta emulsión de

agua en aceite (W/O) se añade a una solución acuosa que contiene tensioactivo y se sónica para obtener la segunda emulsión (W/O/W). Luego, se deja que el solvente orgánico se evapore (Rocha et al., 2022).



**Figura 3.** Método de doble emulsión-evaporación del solvente. Imagen adaptada de Zielińska et al., 2020.

### **2.4.2. Nanoprecipitación**

La nanoprecipitación fue patentada por Fessi et al. en 1989 (Fessi et al., 1989). En este método se requiere la preparación de las fases solvente y no solvente, seguida de la adición de una fase a otra bajo agitación magnética moderada. La evaporación de disolventes orgánicos a temperatura ambiente o con rotavapor permite la obtención de nanopartículas en suspensión en agua. La ultracentrifugación y la liofilización son dos métodos que podrían emplearse en el siguiente paso para la eliminación de la fase acuosa (Martínez Rivas et al., 2017).

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

Las propiedades fisicoquímicas, que incluyen el tamaño, la forma, la química de la superficie, entre otras, desempeñan un papel crítico en el destino *in vivo* de las nanopartículas, ya que influyen en una serie de procesos, como la formación de coronas de proteínas, la circulación sanguínea, la biodistribución y la interacción celular *in vivo* (Zhao et al., 2019).

### **2.5.1. Tamaño de las nanopartículas y distribución de tamaños**

El tamaño de las partículas y la distribución de tamaños en los sistemas de nanopartículas afectan el destino biológico, la toxicidad, la distribución y la capacidad de orientación. Además, también pueden influir en la liberación y carga del fármaco y en la estabilidad de las nanopartículas (Kumar et al., 2017; Rizvi and Saleh, 2018). Por lo tanto, la formulación exitosa de medicamentos seguros y nanoportadores estables y eficientes requiere la preparación de poblaciones de nanoportadores homogéneas (monodispersas) de un cierto tamaño (Danaei et al., 2018).

### **2.5.2. Potencial zeta**

El potencial zeta refleja el potencial eléctrico de las partículas y se usa comúnmente para caracterizar la propiedad de carga superficial de las nanopartículas. Se ve afectado por la composición de la partícula y el medio en el que se disuelve (Kumar et al., 2017). Es una característica fundamental de las partículas que se puede medir rápidamente utilizando técnicas de dispersión de luz. En una solución iónica, una doble capa eléctrica rodea la superficie de una partícula cargada (Manaia et al., 2017). Además, la carga superficial de las NP juega un papel importante en su toxicidad, porque determina en gran medida las interacciones de las NP con los sistemas biológicos (Sukhanova et al., 2018). Además, el potencial zeta es uno de los factores cruciales para mantener el equilibrio en la nanosuspensión acuosa (Dilnawaz et al., 2023).

### **2.6. Enfermedades infecciosas**

La infección bacteriana es una de las mayores amenazas a la salud pública en la historia de la humanidad. En la era anterior a los antibióticos, las infecciones bacterianas presentaban una morbilidad y mortalidad extremadamente altas (Wang et al., 2020). A pesar de los avances en el sector farmacéutico, las tasas de enfermedades infecciosas están aumentando debido a los cambios en el comportamiento humano, las ciudades más grandes y densas, el aumento del comercio y los viajes, el uso inadecuado de antibióticos y la aparición de patógenos nuevos y resurgentes (Verikios, 2020).

### **2.6.1. Tuberculosis**

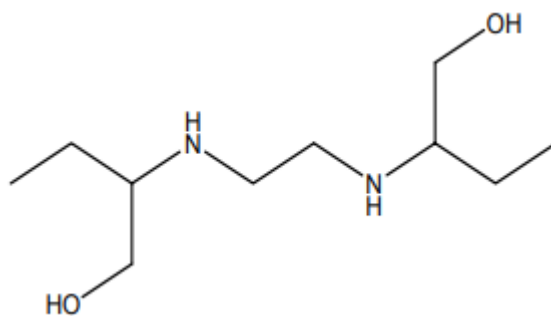
La tuberculosis (TB) ha matado a más personas en los últimos dos milenios que cualquier otra enfermedad infecciosa en todo el mundo. El tratamiento de la tuberculosis es particularmente difícil, como lo indican la transmisión continua y la alta mortalidad asociadas con esta infección (Kirtane et al., 2021). Según la Organización Mundial de la Salud, la tuberculosis sigue siendo un importante problema de salud pública: 1,5 millones de personas murieron a causa de la tuberculosis en 2020, lo que la convierte en la decimotercera causa de muerte a nivel mundial (Yang et al., 2023). La formulación de fármacos nuevos y existentes en vehículos de tamaño nanométrico promete superar varios desafíos generales asociados con el tratamiento de esta enfermedad (Kirtane et al., 2021).

#### **2.6.1.1. Tuberculosis resistente a múltiples fármacos (MDR-TB)**

Aunque la tuberculosis es tratable, hay varios factores que han contribuido en gran medida a su enorme transformación en una cepa resistente a los medicamentos. Entre estos factores se incluyen: medicamentos de mala calidad, prescripciones incorrectas, uso inadecuado de medicamentos y finalización prematura del tratamiento (Muthukrishnan, 2021; Park et al., 2019). La aparición de tuberculosis multirresistente (MDR-TB) representa una amenaza creciente para la salud pública y el crecimiento económico. Nunca en la historia de la humanidad tantos pacientes se habían visto afectados por MDR-TB (Lange et al., 2019).

### 2.6.1.2. Etambutol (EMB)

El etambutol (EMB) es un fármaco clave de primera línea contra la tuberculosis que se utiliza en combinación con rifampicina, isoniazida y pirazinamida. La detección temprana de la resistencia a EMB en pacientes con tuberculosis es importante ya que la resistencia a EMB se ha asociado con la resistencia a múltiples fármacos de MTB (Chauhan et al., 2018). El EMB es bacteriostático (inhibe la síntesis de la pared celular de las bacterias) y ayuda a prevenir la aparición de resistencia a la rifampicina, cuando hay resistencia a la isoniazida (Santos et al., 2019; Xiang et al., 2021). EMB es un cristal blanco, soluble en agua y resistente al calor, sintetizado químicamente, con una fórmula química de  $C_{10}H_{24}N_2O_2$  (Xiang et al., 2021), se muestra la estructura química del etambutol en la Figura 4.



**Figura 4.** Estructura química de EMB (Nazari et al., 2009).

## CAPÍTULO III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 3.1. Materiales

El copolímero ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) 50:50 de peso molecular 0.2 dL/g fue obtenido de Corbion Purac (Gorinchem, The Netherlands). Diclorometano (DCM) fue obtenido de Avantor Performance Materials, Inc. (Phillipsburg, NJ). El alcohol polivinílico (PVA) de peso molecular promedio 10-26 kDa y con un grado de hidrólisis del 86-89 % fue comprado de Alsa Aesar (Ward Hill, MA). El fármaco etambutol, MW=277.2, fue adquirido de MP Biomedicals.

### 3.2. Espectro Uv-visible y curva de calibración del fármaco etambutol

Se realizó la caracterización del fármaco etambutol mediante espectrofotometría UV-visible. Primeramente, se obtuvo el espectro UV-visible en un rango de 210 nm a 810 nm utilizando el espectrofotómetro UV-Vis Genesis 10S de Thermo Scientific, Madison, (Wisconsin, USA). Después, se realizó una curva de calibración del fármaco, para esto, se pesó 1 mg del fármaco y se disolvió una solución tamponada de fosfato salino (PBS) con una concentración de 10 mM y un pH de 7.4, con 1% de DMSO. A continuación, se hicieron diluciones y se tomarán mediciones de la absorbancia en la longitud de onda máxima obtenida en el barrido. Este procedimiento se realizó por triplicado.

### **3.3. Preparación de las Nanopartículas Poliméricas de PLGA cargadas con etambutol (NP-EMB)**

La preparación de las nanopartículas de PLGA cargadas con etambutol (NP-EMB) se llevó a cabo mediante el método de doble emulsión y evaporación del solvente. Primeramente, se emulsionó una solución acuosa del fármaco, que contiene 10 mg de EMB, con una solución de 50 mg de PLGA en DCM sonicando durante 1 minuto a una amplitud del 22% en el ultrasonicador Qsonica LLC 500 (Newtown, CT). Luego, se añaden 25 ml de una solución acuosa al 3% de PVA y se sónica durante 1 minuto a una amplitud del 75%. Después, el solvente orgánico se elimina mediante evaporación a temperatura ambiente con agitación magnética durante un período de 4 horas en una campana de extracción. Para la purificación de las nanopartículas, se realizaron tres ciclos de centrifugación a  $22,096 \times g$  durante 34 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , utilizando la centrifuga Sigma 3-18KS, Sigma Laborzentrifugen (GmbH, Osterode am Harz, Germany). En cada ciclo, el precipitado se suspendió en agua desionizada. En el último ciclo de centrifugación, se tomó 1 mL para su posterior caracterización. Finalmente, la suspensión de NP-EMB se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se liofilizó en un liofilizador Freezone 4.5 (Labconco, Kansas City, Missouri, EE. UU.).

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

Para la caracterización de las nanopartículas se utilizó el equipo Zetasizer Nano ZEN de Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, United Kingdom). Para obtener las mediciones del tamaño e índice de polidispersidad (PDI) se emplea la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) y la técnica de electroforesis con láser Doppler para obtener el potencial Z. Cada muestra se medirá por triplicado con



diez corridas cada una. Los promedios del tamaño y potencial Z se tomar de tres experimentos independientes.

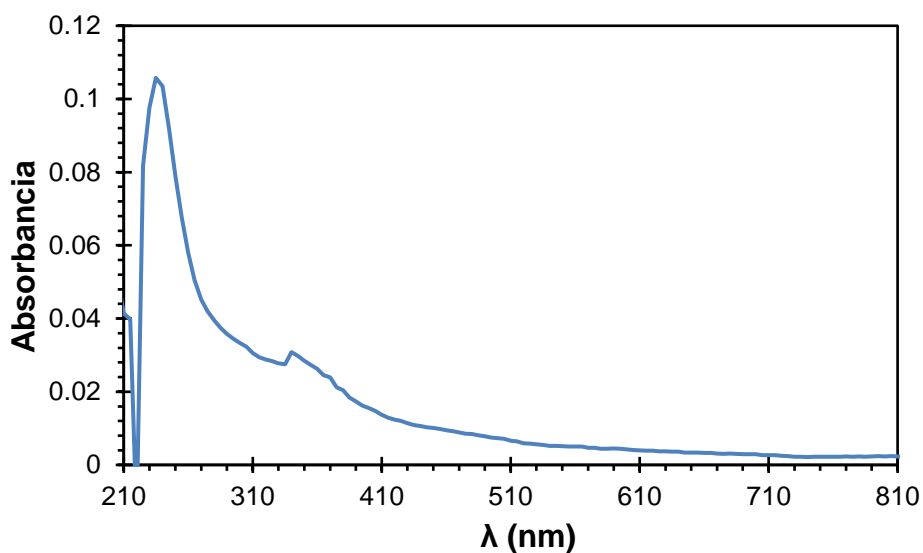
### **3.5. Cantidad de etambutol encapsulado en las NP-EMB y eficiencia de encapsulación**

La determinación de la cantidad de etambutol contenida en el sistema NP-EMB y la eficiencia de su encapsulación se llevaron a cabo mediante el método directo. Brevemente, se toma una cantidad preestablecida de NP-EMB y se dispersa en 1 mL de DCM utilizando un agitador de vortex. A continuación, el solvente orgánico se evapora a temperatura ambiente, y el fármaco se disuelve en PBS. Después, se permite que el polímero precipite, y se toma una muestra del sobrenadante para su posterior análisis utilizando espectroscopía UV-vis. Para calcular la eficiencia de encapsulación se considera la carga inicial o la carga teórica de fármaco.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.1. Espectro Uv-visible del EMB

Se obtuvo el barrido del fármaco y se encontró que presenta un pico de absorción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 235 nm (Figura 5). Se utilizó una cantidad (mg) alta del fármaco para obtener este barrido, ya que presenta baja absorbancia en el espectrofotómetro Uv-visible.



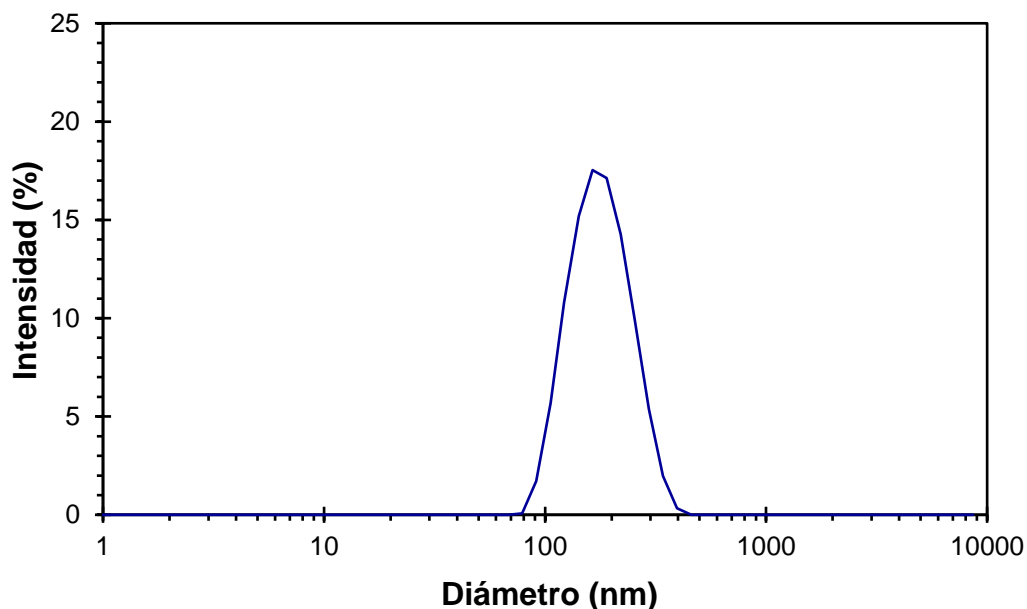
**Figura 5.** Barrido UV-visible de etambutol en PBS con 1% de DMSO medido en un rango de 210 nm a 810 nm.

Posteriormente, se midió la absorbancia de una serie de diluciones del fármaco en PBS con 1% de DMSO (se midieron en 235 nm) para realizar una curva de calibración (datos no mostrados). Debido a la baja absorbancia y a la estructura

de la molécula se dificulta poder medir soluciones con concentraciones bajas de etambutol.

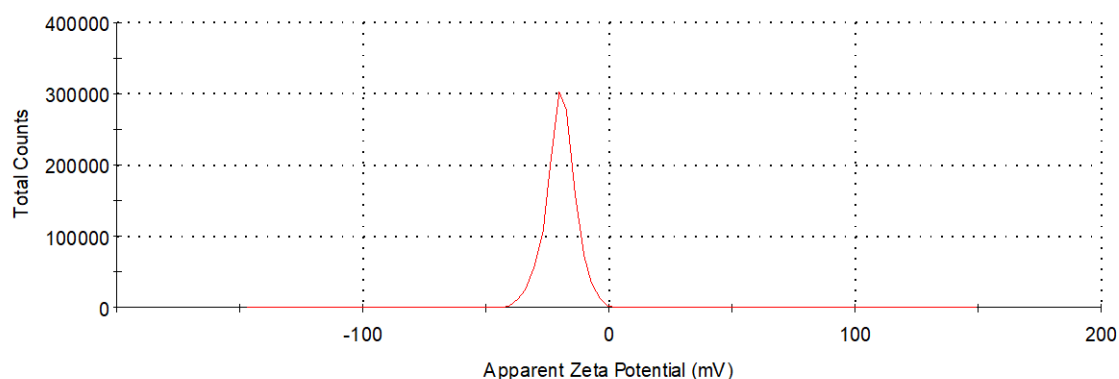
#### 4.2. Caracterización de las NP-EMB

Se caracterizaron estas nanopartículas para obtener su tamaño, índice de polidispersidad y potencial Z (Tabla I). Además, en la Figura 6 se presenta la distribución de tamaños resultante de las mediciones mediante dispersión dinámica de luz. El tamaño promedio de las NP-EMB fue de  $167.8 \pm 4.20$  y se observó una distribución de tamaños homogénea. Como se mencionó anteriormente, la obtención del tamaño y la distribución de tamaños son parámetros muy importantes ya que influyen en su destino en sistemas biológicos, la liberación del fármaco de las nanopartículas, etc.



**Figura 6.** Distribución de tamaños obtenida a partir de las mediciones por DLS. Promedio  $\pm$  D.E (n = 3).

Por otra parte, se observa una distribución de potencial Z (Figura 7) estrecha y un valor negativo de  $-15.3 \pm 2.5$ , lo que indica una relativa buena estabilidad de las nanopartículas.



**Figura 7.** Distribución del potencial zeta obtenida a partir de las mediciones por electroforesis Doppler con láser. Obtenida del reporte del equipo.

**Tabla I.** Resumen de resultados de la caracterización fisicoquímica de las NP-EMB preparadas por el método de doble emulsión-evaporación del solvente.

Tamaño (nm)	PDI	Potencial Z (mV)	CF (%)	EE (%)
$167.80 \pm 4.20$	$0.098 \pm 0.016$	$-15.3 \pm 2.5$	$0.10 \pm 0.06$	$1.00 \pm 0.58$

### **4.3. Carga de fármaco y eficiencia de encapsulación**

La cantidad de etambutol encapsulada en las NP-EMB y la eficiencia de encapsulación se midieron por el método directo. Los valores obtenidos fueron de  $0.09 \pm 0.14$  % y  $0.90 \pm 0.35$  %, respectivamente. Estos valores bajos de carga de fármaco y eficiencia de encapsulación corresponden con la naturaleza hidrofílica del fármaco. En literatura se reporta que la encapsulación de fármacos hidrofílicos es un desafío, debido a la propensión a lixiviarse de la fase acuosa interna a la fase acuosa externa durante la preparación de las nanopartículas, resultando en cargas de fármaco bajas (Leite et al., 2023).

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

Se prepararon con éxito nanopartículas de PLGA cargadas con el fármaco etambutol. Se utilizó una carga de fármaco del 10%. Se obtuvieron nanopartículas de un tamaño adecuado para su posible aplicación en sistemas biológicos, obteniendo un valor promedio cercano a los 170 nm. Su obtuvo un valor del índice de polidispersidad de 0.098, este valor indica homogeneidad en los tamaños de las partículas. Por otro lado, el potencial zeta mostró una relativamente buena estabilidad de las partículas, resultando en un valor cercano a los -16 mV. Además, se obtuvieron valores de carga de fármaco y eficiencia de encapsulación en concordancia a la naturaleza hidrofílica del fármaco. El sistema estudiado presenta potencial para usarse en tratamientos de administración del fármaco EMB.

### 5.2. Recomendaciones

- Se recomienda estudiar métodos alternativos para la caracterización del fármaco.
- Se recomienda estudiar otras cargas teóricas de fármaco para optimizar la carga de fármaco y la eficiencia de encapsulación.
- Se recomienda realizar la cinética de liberación del fármaco de las NP-EMB en condiciones fisiológicas.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Ajazuddin, Sabahuddin, S., Amit, A., Pooja, Y., Mukta, A., Ahmed, M.S., Mahmoud, A.S., Syed, A.U.R., Mohi, I.M.A., Mohamed, A.S., 2019. Nanomedicines: Challenges and perspectives for future nanotechnology in the healthcare system. *Scientific Research and Essays* 14, 32–38. <https://doi.org/10.5897/sre2019.6604>
- Alsaab, H.O., Alharbi, F.D., Alhibs, A.S., Alanazi, N.B., Alshehri, B.Y., Saleh, M.A., Alshehri, F.S., Algarni, M.A., Almugaiteeb, T., Uddin, M.N., Alzhrani, R.M., 2022. PLGA-Based Nanomedicine: History of Advancement and Development in Clinical Applications of Multiple Diseases. *Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122728>
- Anwar, M., Muhammad, F., Akhtar, B., 2021. Biodegradable nanoparticles as drug delivery devices. *J Drug Deliv Sci Technol*. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102638>
- Barba Evia, J.R., 2020. Tuberculosis. ¿Es la pandemia ignorada? *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio* 67, 93–112. <https://doi.org/10.35366/95554>

- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., Rizzolio, F., 2020. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- Begines, B., Ortiz, T., Pérez-Aranda, M., Martínez, G., Merinero, M., Argüelles-Arias, F., Alcudia, A., 2020. Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects. *Nanomaterials*. <https://doi.org/10.3390/nano10071403>
- Chauhan, D.S., Sharma, R., Parashar, D., Das, R., Sharma, P., Singh, A. V., Singh, P.K., Katoch, K., Katoch, V.M., 2018. Rapid detection of ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by real-time polymerase chain reaction hybridisation probe method. *Indian J Med Microbiol* 36, 211–216. [https://doi.org/10.4103/ijmm.ijmm\\_14\\_304](https://doi.org/10.4103/ijmm.ijmm_14_304)
- Chiesa, E., Dorati, R., Modena, T., Conti, B., Genta, I., 2018. Multivariate analysis for the optimization of microfluidics-assisted nanoprecipitation method intended for the loading of small hydrophilic drugs into PLGA nanoparticles. *Int J Pharm* 536, 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.11.044>



- Crucho, C.I.C., Barros, M.T., 2017. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Materials Science and Engineering C* 80, 771–784. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.004>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., Khorasani, S., Mozafari, M.R., 2018. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- Dilnawaz, F., Acharya, S., Kanungo, A., 2023. A clinical perspective of chitosan nanoparticles for infectious disease management. *Polymer Bulletin*. <https://doi.org/10.1007/s00289-023-04755-z>
- Donahue, N.D., Acar, H., Wilhelm, S., 2019. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Adv Drug Deliv Rev*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008>
- Elmowafy, E.M., Tiboni, M., Soliman, M.E., 2019. Biocompatibility, biodegradation and biomedical applications of poly(lactic acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) micro and nanoparticles. *J Pharm Investig*. <https://doi.org/10.1007/s40005-019-00439-x>

- El-say, K.M., El-sawy, H.S., 2017. Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery. *Int J Pharm* 528, 675–691. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.06.052>
- Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.P., Ammoury, N., Benita, S., 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 55, 1–4. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90281-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90281-0)
- Ghitman, J., Biru, E.I., Stan, R., Iovu, H., 2020. Review of hybrid PLGA nanoparticles: Future of smart drug delivery and theranostics medicine. *Mater Des.* <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.108805>
- Hwang, D., Ramsey, J.D., Kabanov, A. V., 2020. Polymeric micelles for the delivery of poorly soluble drugs: From nanoformulation to clinical approval. *Adv Drug Deliv Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.09.009>
- Kirtane, A.R., Verma, M., Karandikar, P., Furin, J., Langer, R., Traverso, G., 2021. Nanotechnology approaches for global infectious diseases. *Nat Nanotechnol.* <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00866-8>
- Kumar, B., Jalodia, K., Kumar, P., Gautam, H.K., 2017. Recent advances in nanoparticle-mediated drug delivery. *J Drug Deliv Sci Technol* 41, 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.07.019>

- Lagreca, E., Onesto, V., Di Natale, C., La Manna, S., Netti, P.A., Vecchione, R., 2020. Recent advances in the formulation of PLGA microparticles for controlled drug delivery. *Prog Biomater*. <https://doi.org/10.1007/s40204-020-00139-y>
- Lange, C., Aarnoutse, R.E., Alffenaar, J.W.C., Bothamley, G., Brinkmann, F., Costa, J., Chesov, D., Van Crevel, R., Dediccoat, M., Dominguez, J., Duarte, R., Grobbel, H.P., Günther, G., Guglielmetti, L., Heyckendorf, J., Kay, A.W., Kirakosyan, O., Kirk, O., Koczulla, R.A., Kudriashov, G.G., Kuksa, L., Van Leth, F., Magis-Escurra, C., Mandalakas, A.M., Molina-Moya, B., Peloquin, C.A., Reimann, M., Rumetshofer, R., Schaaf, H.S., Schön, T., Tiberi, S., Valda, J., Yablonskii, P.K., Dheda, K., 2019. Management of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 23, 645–662. <https://doi.org/10.5588/ijtld.18.0622>
- Leite, J.M. da S., Santana, L.M. de, Nadvorny, D., Abreu, B.O. de, Rebouças, J. de S., Formiga, F.R., Soares, M.F. de L.R., Soares-Sobrinho, J.L., 2023. Nanoparticle design for hydrophilic drugs: Isoniazid biopolymeric nanostructure. *J Drug Deliv Sci Technol* 87. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104754>
- Lima, A.L., Gratieri, T., Cunha-Filho, M., Gelfuso, G.M., 2022. Polymeric nanocapsules: A review on design and production methods for pharmaceutical purpose. *Methods* 199, 54–66. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.07.009>

- Luo, M.X., Hua, S., Shang, Q.Y., 2021. Application of nanotechnology in drug delivery systems for respiratory diseases (Review). *Mol Med Rep.* <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.11964>
- Manaia, E.B., Abuçafy, M.P., Chiari-Andréo, B.G., Silva, B.L., Oshiro Junior, J.A., Chiavacci, L.A., 2017. Physicochemical characterization of drug nanocarriers. *Int J Nanomedicine.* <https://doi.org/10.2147/IJN.S133832>
- Martínez Rivas, C.J., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q.A., Galindo Rodríguez, S.A., Román, R.Á., Fessi, H., Elaissari, A., 2017. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. *Int J Pharm.* <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064>
- Muthukrishnan, L., 2021. Multidrug resistant tuberculosis – Diagnostic challenges and its conquering by nanotechnology approach – An overview. *Chem Biol Interact.* <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109397>
- Nazari, M.A., Kobarfard, F., Tabarsi, P., Azimi, M., Salamzadeh, J., 2009. Effect of Antituberculosis Regimen Containing Ethambutol on Serum magnesium Level in Pulmonary Tuberculosis Patients.

- Park, M., Satta, G., Kon, O.M., 2019. An update on multidrug-resistant tuberculosis, *Clinical Medicine*.
- Pradipta, I.S., Forsman, L.D., Bruchfeld, J., Hak, E., Alffenaar, J.W., 2018. Risk factors of multidrug-resistant tuberculosis: A global systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.10.004>
- Pratima Nikalje, A., 2015. Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Med chem* 5, 81–89. <https://doi.org/10.1002/bjs.7074>
- Rizvi, S.A.A., Saleh, A.M., 2018. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal* 26, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012>
- Rocha, C.V., Gonçalves, V., da Silva, M.C., Bañobre-López, M., Gallo, J., 2022. PLGA-Based Composites for Various Biomedical Applications. *Int J Mol Sci*. <https://doi.org/10.3390/ijms23042034>
- Saidi, T., Fortuin, J., Douglas, T.S., 2018. Nanomedicine for drug delivery in South Africa: A protocol for systematic review. *Syst Rev* 7. <https://doi.org/10.1186/s13643-018-0823-5>

- Santos, F., Leitão, M.I.P.S., Duarte, A.R.C., 2019. Properties of therapeutic deep eutectic solvents of L-arginine and ethambutol for tuberculosis treatment. *Molecules* 24. <https://doi.org/10.3390/molecules24010055>
- Sarkar, K., Kumar, M., Jha, A., Bharti, K., Das, M., Mishra, B., 2022. Nanocarriers for tuberculosis therapy: Design of safe and effective drug delivery strategies to overcome the therapeutic challenges. *J Drug Deliv Sci Technol* 67, 1–13.
- Spirescu, V.A., Chircov, C., Grumezescu, A.M., Andronescu, E., 2021. Polymeric nanoparticles for antimicrobial therapies: An up-to-date overview. *Polymers (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/polym13050724>
- Su, Y., Zhang, B., Sun, R., Liu, W., Zhu, Q., Zhang, X., Wang, R., Chen, C., 2021. PLGA-based biodegradable microspheres in drug delivery: recent advances in research and application. *Drug Deliv* 28, 1397–1418. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1938756>
- Sukhanova, A., Bozrova, S., Sokolov, P., Berestovoy, M., Karaulov, A., Nabiev, I., 2018. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Res Lett*. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2457-x>

- Sur, S., Rathore, A., Dave, V., Reddy, K.R., Chouhan, R.S., Sadhu, V., 2019. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. *Nano-Structures and Nano-Objects* 20, 100397. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2019.100397>
- Swider, E., Koshkina, O., Tel, J., Cruz, L.J., de Vries, I.J.M., Srinivas, M., 2018. Customizing poly(lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomater.* <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.006>
- Verikios, G., 2020. The dynamic effects of infectious disease outbreaks: The case of pandemic influenza and human coronavirus. *Socioecon Plann Sci* 71, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.seps.2020.100898>
- Wang, S., Gao, Y., Jin, Q., Ji, J., 2020. Emerging antibacterial nanomedicine for enhanced antibiotic therapy. *Biomater Sci.* <https://doi.org/10.1039/d0bm00974a>
- Wu, L.-P., Wang, D., Li, Z., 2020. Grand challenges in nanomedicine. *Materials Science and Engineering C* 106, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110302>
- Xiang, X., Gong, Z., Deng, W., Sun, Q., Xie, J., 2021. Mycobacterial ethambutol responsive genes and implications in antibiotics resistance. *J Drug Target.* <https://doi.org/10.1080/1061186X.2020.1853733>

- Yang, L., Chaves, L., Kutscher, H.L., Karki, S., Tamblin, M., Kenney, P., Reynolds, J.L., 2023. An immunoregulator nanomedicine approach for the treatment of tuberculosis. *Front Bioeng Biotechnol* 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1095926>
- Yunus Basha, R., Sampath, S.K., Doble, M., 2019. Dual delivery of tuberculosis drugs via cyclodextrin conjugated curdlan nanoparticles to infected macrophages. *Carbohydr Polym* 218, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.056>
- Zhao, D., Zhu, T., Li, J., Cui, L., Zhang, Z., Zhuang, X., Ding, J., 2021. Poly(lactic-co-glycolic acid)-based composite bone-substitute materials. *Bioact Mater.* <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.08.016>
- Zhao, Z., Ukidve, A., Krishnan, V., Mitragotri, S., 2019. Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate of drug nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.002>
- Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A.M., Neves, A., Pires, B., Nagasamy Venkatesh, D., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A.M., Santini, A., Souto, E.B., 2020. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules.* <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>