



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Y METALURGIA

**PREPARACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
POLIMÉRICAS DE PLGA CARGADAS CON
AZUL DE METILENO USANDO LA TÉCNICA
DE DOBLE EMULSIÓN – EVAPORACIÓN DEL
SOLVENTE**

Tesis

Que para obtener el título de:

INGENIERA QUÍMICA

Presenta

CARMEN MARCELA RODRÍGUEZ DUARTE

Hermosillo, Sonora

Agosto 2016

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 12 de Agosto de 2016

DR. MARTÍN ANTONIO ENCINAS ROMERO

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 de Nanopartículas Poliméricas de PLGA Cargadas con Azul de Metileno Usando la Técnica de Doble Emulsión – Evaporación del Solvente**”, presentada por:

CARMEN MARCELA RODRÍGUEZ DUARTE

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:

INGENIERA QUÍMICA

_____ Fecha	_____ DR. JESÚS ARMANDO LUCERO ACUÑA
_____ Fecha	_____ DRA. PATRICIA GUERRERO GERMÁN
_____ Fecha	_____ DR. PAUL ZAVALA RIVERA
_____ Fecha	_____ DR. JOSÉ CARLOS RODRÍGUEZ FIGUEROA

Agradecimientos

Agradezco principalmente a Dios por darme las fuerzas para seguir adelante.

Al Dr. Jesús Armando Lucero Acuña por su paciencia y guía durante este tiempo, así como a todo su equipo de trabajo.

A mi familia y novio Francisco Armando por brindarme su apoyo en todo momento.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	viii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
I.1. Introducción	1
I.2. Objetivo General.....	4
I.3. Objetivos Específicos.....	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	6
II.1. Nanotecnología.....	6
II.2. Dispersiones Coloidales	7
<i>II.2.1. Emulsiones.....</i>	<i>7</i>
<i>II.2.2. Estabilidad Coloidal.....</i>	<i>15</i>
II.3. Terapia Fotodinámica	25
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
III.1. Materiales	28
III.2. Curva Patrón de Azul de Metileno	28
III.3. Preparación de las Nanopartículas Poliméricas	28
III.4. Caracterización de las Nanopartículas	29
III.5. Cinética de Liberación de Azul de Metileno	30
III.6. Carga de Azul de Metileno y Eficiencia de Encapsulación	30
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
IV.1. Curva Patrón de Azul de Metileno.....	32
IV.2. Caracterización de las Nanopartículas Poliméricas	33
IV.3. Carga de Azul de Metileno y Eficiencia de Encapsulación.....	35
IV.4. Cinética de Liberación de Azul de Metileno.....	37

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
V.1. Conclusiones	43
V.2. Recomendaciones.....	43
REFERENCIAS.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de emulsiones a) aceite en agua (O/W), b) agua en aceite (W/O), c) agua en aceite en agua (W/O/W) y d) aceite en agua en aceite (O/W/O). Adaptada de Schramm 2006 [29].	8
Figura 2. “Creaming”, agregación y coalescencia en una emulsión, espuma o suspensión. Ilustración adaptada de Schramm 2006 [29].	14
Figura 3. Energías potenciales de interacción entre dos partículas coloidales como una función de su distancia de separación, para dobles capas eléctricas debido a la carga superficial (V_{DL}), fuerzas de dispersión de Van der Waals (V_A) y la interacción total (V_T). Adaptado de Schramm, 2006 [29].	19
Figura 4. Dos curvas de energía de interacción, V_T y V'_T , resultantes de la suma de una curva de atracción (V_A) con dos diferentes curvas de energía de repulsión, V_R y V'_R . Adaptado de Schramm, 2006 [29].	20
Figura 5. La energía total de interacción V_T entre las superficies de una película líquida delgada o de espuma como una función del ancho de la película. Adaptada de Schramm, 2006 [29].	21
Figura 6. Ejemplos de posibles estructuras del agua en superficies hidrófobas e hidrofílicas. Adaptada de Schramm, 2006 [29].	24
Figura 7. Curva de calibración de AM en una solución de buffer PBS 10 mM pH=7.4, midiendo absorbancia a una longitud de onda de 665 nm ($\epsilon=0.1642 \text{ Abs}\cdot(\mu\text{g}/\text{mL})^{-1}$).	33
Figura 8. Tamaño y polidispersidad de las muestras de AM-NP correspondientes a los TDL de 4%, 8% y 16%. Datos presentados como promedios \pm DE (n = 7).	34
Figura 9. Potencial Zeta de las muestras de AM-NP correspondientes a los TDL de 4%, 8% y 16%. Datos presentados como promedios \pm DE (n = 7).	35

Figura 10. DL de las muestras de AM-NP correspondientes a los TDL de 4%, 8% y 16%. Datos presentados como promedios \pm DE (n = 3).	36
Figura 11. EE de las muestras de AM-NP correspondientes a los TDL de 4%, 8% y 16%. Datos presentados como promedios \pm DE (n = 3).	37
Figura 12. Estudio experimental de la resistencia de membrana a la difusión de AM en buffer 10 mM PBS a pH=7.4.	38
Figura 13. Curva de liberación de AM de las nanopartículas poliméricas (AM-NP) preparadas con un TDL de 4 % (●). Datos presentados como promedios \pm DE (n = 3).	39
Figura 14. Curva de liberación de AM de las nanopartículas poliméricas (AM-NP) preparadas con un TDL de 8% (■). Datos presentados como promedios \pm DE (n = 3).	40
Figura 15. Curva de liberación de AM de las nanopartículas poliméricas (AM-NP) preparadas con un TDL de 16% (▲). Datos presentados como promedios \pm DE (n = 3).	41
Figura 16. Comparación de las curvas de liberación de AM de nanopartículas poliméricas (AM-NP) preparadas con diferentes TDL: 4% (●), 8% (■) y 16% (▲). Datos presentados como promedios \pm DE (n =3).	42

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló un método efectivo para la preparación de nanopartículas poliméricas de ácido poli láctico-co-glicólico cargadas con azul de metileno (AM-NP) usando la técnica de emulsión doble – evaporación del solvente. Se evaluaron las características de AM-NP en función de la cantidad de azul de metileno (AM) usada en la preparación. Se encontró que en el rango estudiado el tamaño promedio de las nanopartículas aumenta conforme aumenta la carga teórica de fármaco (TDL). La polidispersidad encontrada en todas las preparaciones es baja, pero el promedio de esta aumenta conforme aumenta el TDL, aunque existe considerable variación experimental. El potencial zeta obtenido mostró una relativamente buena estabilidad de las partículas en todas las preparaciones, mostrando una tendencia de aumento en el valor promedio del potencial zeta con respecto al TDL. Asimismo, se observó que la cantidad final de AM encapsulado dentro de las nanopartículas incrementó al incrementar el TDL, pero la eficiencia de encapsulación mostro una ligera tendencia de disminución con respecto al TDL en el rango estudiado. La cinética de liberación de AM de AM-NP mostró resultados semejantes en los perfiles de liberación evaluados para las diferentes preparaciones, a pesar de que el DL era diferente. Los perfiles de liberación encontrados muestran una liberación rápida, liberándose el total de AM en aproximadamente 5 días. El nanosistema analizado tiene aplicaciones potenciales en tratamientos de terapia fotodinámica donde se usa AM.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

I.1. Introducción

Recientemente, los materiales nanoestructurados han adquirido gran interés a causa de sus propiedades únicas y potenciales aplicaciones, como consecuencia de esto se ha incrementado el área de investigación de nanotecnología [1–3]. Dicha área, se caracteriza por la manipulación de la forma, tamaño y propiedades de los materiales a escalas nanométricas, cuyas dimensiones son de una mil millonésima parte de un metro (1×10^{-9} m) [2,4]. La importancia de la nanotecnología radica en que a una escala nanométrica los materiales presentan propiedades diferentes a las que tienen a escala macroscópica [4]. La nanotecnología se enfoca en diversos campos de la ciencia tales como: las ciencias de la salud, farmacéutica, biología, química, electrónica, medicina, etc [1,2,5]. Con respecto a las aplicaciones de la nanotecnología en medicina (Nanomedicina), se han enfocado a aplicaciones en el diagnóstico, tratamiento, monitoreo y control de enfermedades en sistemas biológicos [3,6]. Dentro de las aplicaciones en tratamientos, se tiene a la administración de fármacos, la cual se enfoca en la liberación controlada de compuestos activos [7,8]. La liberación controlada presenta más ventajas frente a la medicina convencional, ya que en esta última el nivel del medicamento suele llegar a un máximo de concentración pero luego esta decae, siendo necesaria la aplicación de una nueva dosis que puede sobrepasar los límites de toxicidad en el organismo [9]. Por otro lado los sistemas de liberación controlada normalmente involucran nanopartículas que actúan como transportadoras de fármaco en su interior, las cuales son normalmente de material polimérico [7,9]. De acuerdo a las propiedades del material polimérico se puede mantener la liberación de forma continua [9]. Dado que los sistemas de liberación controlada utilizan nanovehículos como transportadores de fármacos para dirigirlos en la dosis específica al lugar

adecuado, los métodos de administración de fármacos varían desde oral, pulmonar, tópica, etc [7,8,10].

Para la encapsulación de fármacos se utilizan dispositivos desde nanoconjugados, polímeros lineales, liposomas, dendrímeros, miscelas, hasta nanopartículas (nanoesferas y nanocápsulas), las cuales se definen como aquellas partículas de tamaño coloidal, que poseen diámetros que oscilan entre 1 y 1000 nm, y pueden encapsular, adsorber o disolver drogas en ellas [7,11,12]. Existe una amplia variedad de nanopartículas compuestas por una gama de materiales, incluyendo lípidos, polímeros y materiales inorgánicos que se han desarrollado, los más comunes, como se mencionó anteriormente, son los materiales de polímeros, los cuales para su uso efectivo deberán cumplir con una serie de características que harán posible la administración de fármacos dirigida, tales como que el polímero sea biodegradable, biocompatible, de nula o muy baja toxicidad, etc [13–15].

Los polímeros biodegradables son naturales o de origen sintético y se degradan *in vivo*, bien enzimáticamente o no pero ambos producen biocompatibilidad, siendo toxicológicamente seguros sus subproductos pues se eliminan adicionalmente por las vías metabólicas normales [7,16]. Las drogas formuladas en dispositivos poliméricos son liberados ya sea por difusión a través de la barrera de polímero, o por la erosión del material, o por una combinación de mecanismos de difusión y erosión [17,18]. Entre las distintas clases de polímeros biodegradables están los grupos poliésteres alifáticos, donde se encuentra el copolímero ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA), el cual consiste en la unión de los monómeros PLA y PGA, y sus propiedades están dadas debido a sus proporciones o composición; además de contar con diversas propiedades biológicas, físicas y químicas muy útiles, que son necesarias comprender para saber qué tipo de dispositivo transportador se usara para la administración controlada de fármacos, debido también a que estas

determinan la liberación del fármaco desde el dispositivo del polímero [18–20]. Las propiedades físicas tales como el peso molecular y el índice de polidispersidad afectan la resistencia mecánica del polímero y su capacidad para ser formulados como un dispositivo de administración de fármacos [7,19]. También estas propiedades pueden controlar la velocidad de biodegradación del polímero así como la hidrólisis [14,16]. Además, el PLGA ha sido aprobado por la “Administración de fármacos y alimentos” (FDA, por sus siglas en inglés) así como la Agencia de Medicina Europea (EMA, por sus siglas en inglés) para la administración de fármacos [10,21,22]. Este polímero ampliamente aceptado se utiliza comúnmente en la preparación de sistemas transportadores de fármacos antitumorales como dispositivos desde microesferas, microcápsulas, nanopartículas, gránulos, implantes hasta películas [10,16]. En general, hay seis métodos clásicos para la preparación de nanocápsulas: nanoprecipitation, emulsión de difusión, doble emulsión, emulsión coacervación, de recubrimiento de polímero [20]. Sin embargo, se han utilizado otros métodos tales como emulsión-evaporación y las metodologías para la preparación liposomas de polímero [14,20].

En la actualidad existen diversas terapias que se utilizan para tratar el cáncer, y las más usadas comúnmente son la radioterapia, la quimioterapia y la cirugía [12,23]. Dichos tratamientos pueden presentar significativas limitaciones como tiempos de inicio del tratamiento, demora en la detección de la enfermedad, difícil manipulación, resolución parcial, entre otras, sin embargo la nanomedicina ha encontrado técnicas más eficaces con menos efectos secundarios como la terapia fotodinámica [24,25]. La terapia fotodinámica (PDT) está emergiendo como una prometedora técnica para el tratamiento de ciertos cánceres, infecciones localizadas y enfermedades como la degeneración macular, el acné y otras alteraciones de la piel [24,26]. Se basa en la aplicación de una fuente de energía en forma de luz con una determinada longitud de onda, sobre un tejido previamente fotosensibilizado mediante un compuesto químico (agente fotosensibilizante), en presencia de oxígeno; de modo que se

generan gran cantidad de radicales libres y derivados del oxígeno (compuestos hidroxilo) que producen necrosis del tejido tratado [23,24].

Como se ha mencionado en los párrafos anteriores, existe varias problemáticas relacionada a salud, como el cáncer, las cuales a pesar de recibir mucha atención, todavía necesitan más esfuerzos multidisciplinarios de investigación para resolverla. La síntesis de nanoestructuras con aplicaciones en medicina involucra métodos físicos, químicos, biológicos, etc., los cuales pueden ser abordados desde una perspectiva ingenieril, específicamente desde el punto de vista de la ingeniería química. En este trabajo se pretende preparar nanopartículas del polímero PLGA cargadas con azul de metileno usando la técnica de emulsificación doble – evaporación del solvente. Asimismo, las nanopartículas se caracterizarán por diferentes técnicas para determinar el tamaño, polidispersidad, potencial Z y también se realizaran estudios *in vitro* para determinar la cinética de liberación del azul de metileno de las nanopartículas. Estos estudios permitirán establecer un sistema nanoestructurado, el cual podría usarse en aplicaciones en terapia fotodinámica.

I.2. Objetivo General

Preparar y caracterizar nanopartículas poliméricas de PLGA cargadas con azul de metileno usando la técnica de emulsificación doble – evaporación del solvente.

I.3. Objetivos Específicos

- Preparar nanopartículas poliméricas de PLGA cargadas con azul de metileno por el método de emulsificación doble – evaporación del solvente.

- Caracterizar las nanopartículas poliméricas con dispersión de luz y electroforesis por láser Doppler.
- Determinar la cantidad de azul de metileno encapsulado en las nanopartículas y la eficiencia de encapsulación.
- Estudiar la cinética de liberación de azul de metileno de las nanopartículas de PLGA en condiciones fisiológicas.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

II.1. Nanotecnología

La nanotecnología se define como el estudio, creación, diseño, síntesis, manipulación y aplicación de aparatos, materiales o sistemas por medio del control de la materia de dimensiones entre 1 – 100 nanómetros (un nanómetro es la mil millonésima parte de un metro) [4]. En el campo de la nanotecnología se requiere la construcción de nanomáquinas que sean capaces de manipular o modificar moléculas simples o átomos de manera que se pueda tener un control sobre la materia [2,3].

Las potenciales aplicaciones de la nanotecnología son muy amplias (electrónica, aeroespacial, ambiental, medicina, etc), en cuanto a las aplicaciones médicas se encuentra el campo de la nanomedicina, el cual incluye actividades como la construcción de neosistemas de liberación de fármacos nanoestructurados, que funcionan como transportadores a través de la sangre, aplicación de vacunas, entre otras nuevas herramientas para combatir distintas enfermedades, además de nuevos métodos de diagnóstico y la posibilidad de generar un tratamiento adecuado para el cáncer [8,24,27]. Debido a que la nanomedicina se encarga de la aplicación de los métodos nanotecnológicos en la medicina; tiene como objetivo el desarrollo de herramientas para diagnosticar, prevenir y tratar enfermedades y lesiones traumáticas, mejorando la salud humana, con el uso de herramientas moleculares y el conocimiento del cuerpo humano. [3,27].

II.2. Dispersiones Coloidales

Una dispersión coloidal comprende un conjunto de partículas pequeñas, gotas o burbujas de una fase que tiene al menos una dimensión de entre 1 y 100 nm dispersa en una segunda fase [28,29]. Si el medio de dispersión es acuoso entonces se usan los términos hidrofóbico e hidrofílico [29,30]. Los coloides liofílicos son formados espontáneamente al contacto de las dos fases juntas porque la dispersión es termodinámicamente más estable que los estados originales por separado [28,29]. Los coloides liofóbicos no se forman espontáneamente al contacto de las fases porque ellos son termodinámicamente inestables comparados con los estados por separado [28,29]. Ejemplos de dispersiones coloidales liofóbicas son surfactantes, micelas, soluciones de proteínas y virus [29]. Estas dispersiones pueden ser formadas con ayuda de energía mecánica por medio de alguna forma de agitación tal como algún mezclador estilo hélice, molino coloidal, o un generador de ultrasonidos [28,29]. Ejemplos de dispersiones coloidales liofílicas son emulsiones, espumas y suspensiones de partículas [28,29].

II.2.1. Emulsiones

Las emulsiones son dispersiones coloidales en las cuales un líquido es dispersado en una fase líquida continua de distinta composición [29,31]. La fase dispersada es a veces referida como la fase interna (dispersa) y la fase continua como la fase externa [29]. En la mayoría de las emulsiones, uno de los líquidos es acuoso (W) mientras que el otro es un hidrocarburo (O) y es referido como aceite [29]. La Fig. 1 representa los tipos de emulsiones principales dependiendo de cuál de las formas líquidas es la fase continua. Arriba se muestran dos tipos simples de emulsiones, aceite-en-agua (O/W) y agua-en-aceite (W/O). Abajo, se muestra un nivel más complejo, agua-en-aceite-en-agua (W/O/W) y aceite-en-agua-en-aceite (O/W/O).

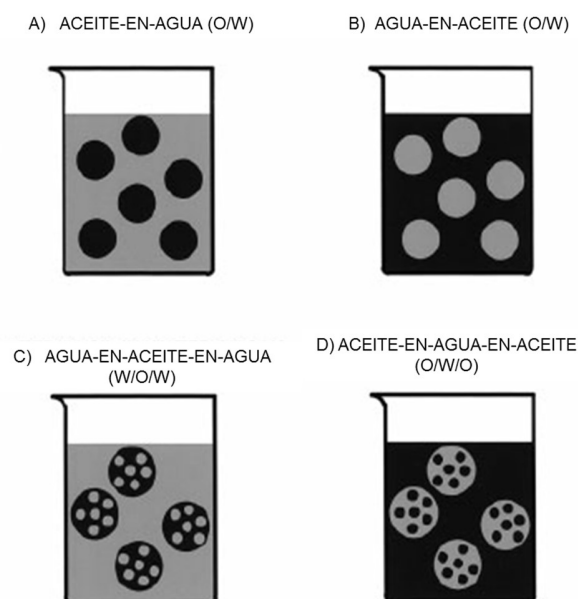


Figura 1. Tipos de emulsiones a) aceite en agua (O/W), b) agua en aceite (W/O), c) agua en aceite en agua (W/O/W) y d) aceite en agua en aceite (O/W/O). Adaptada de Schramm 2006 [29].

En la práctica no siempre son tan simples y se pueden 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) [28,29,31]. Por ejemplo, (O/W/O) denota una doble emulsión que contiene gotas de aceite dispersas en gotas acuosas que a su vez están dispersas en una fase continua de aceite [29]. Las gotas de emulsión doble pueden ser bastante grandes (decenas de μm) y contener muchas gotitas de la última fase interna [29,32].

El tipo de emulsión que se forma depende de un número de factores, como la relación de volúmenes de fase, ya que la fase que tiene el volumen más pequeño es frecuentemente la fase dispersa [28,29]. Si la relación de volumen es cercana a uno entonces son otros factores los que lo determinan [29].

La mayoría de las emulsiones no son termodinámicamente estables, pero en cuestiones prácticas pueden ocurrir emulsiones bastante estables que resistan los tratamientos de desemulsificación y pueden llegar a ser estables durante semanas, meses o años [28]. Las emulsiones meta estables contienen aceite, agua y un agente emulsificante (o estabilizador) el cual es usualmente un surfactante, una macromolécula, o sólidos finamente divididos [13,28,31]. El emulsificante es necesario para crear la forma de la emulsión más fácil, o para formar una película protectora que ayuda a mantener la emulsión sin romper [13,29,33].

II.2.1.1. Preparación de Emulsiones

La mayoría de emulsiones no son formadas espontáneamente al contacto de las fases porque son termodinámicamente inestables comparadas con sus estados por separado [29,33]. Una emulsión puede ser formada si se mezclan dos líquidos inmiscibles juntos en un contenedor y después son agitados, pero sin algún tipo de estabilizante (ó agente emulsificante) la emulsión no será muy estable [28,29,33]. Los agentes estabilizantes para emulsiones pueden contener: electrolitos inorgánicos, surfactantes, macromoléculas, o sólidos finamente divididos, (como carbono, sulfatos, hidróxidos, o revestimientos de partículas de arcilla) [28]. Los agentes emulsificantes son necesarios para reducir la tensión interfacial, haciendo más fácil la formación de gotas pequeñas o para estabilizarlas de manera que no conduzcan a la coalescencia de gotas grandes, separando las fases [28,29].

En el método clásico de preparación de emulsiones, el agente emulsificante es disuelto en la fase que es más soluble, después se añade la segunda fase y se aplica agitación a la mezcla usando una alta velocidad [31,33]. Para emulsiones O/W la agitación debe ser turbulenta para producir gotas suficientemente pequeñas [13,29]. Después del mezclado inicial, se requiere un segundo mezclado con altas

fuerzas mecánicas de corte ya sea por una hélice o mezclador de turbina, molino o generador ultrasónico [29,30]. Se necesitan velocidades de corte altas para crear gotitas pequeñas en la emulsión [29].

II.2.1.2. Apariencia y Tipos de Emulsiones

No todas las emulsiones exhiben la clásica apariencia lechosa opaca con la cual son usualmente asociadas [29,31]. Es posible un gran rango de apariencias, dependiendo de los tamaños de gotas y la diferencia en los índices de refracción entre las fases [29]. Una emulsión puede ser transparente si el índice de refracción de cada fase es la misma, o alternativamente si la fase dispersa está hecha de gotas que son lo suficientemente pequeñas comparadas con la longitud de onda de la luz que ilumina [28,29]. Por lo tanto una micro emulsión O/W o incluso un aceite crudo en agua podría ser transparente [28,29,31]. Si las gotas son de un orden de 1 μm de diámetro una dilución O/W tendrá algo de azul lechoso fundido; si las gotas son muy grandes entonces la fase de aceite se volverá bastante distinguible y aparente [29,31]. Físicamente la naturaleza de emulsiones simples puede ser determinada por métodos como: textura, mezclado, tintura, conductancia, inversión, fluorescencia y resonancia magnética [29,33].

La textura de una emulsión normalmente refleja la de la fase externa. Así que las emulsiones de O/W suelen sentirse "líquida o cremosa", mientras que las emulsiones W/O se sienten "grasosa" [34]. Esta distinción se hace menos evidente a medida que aumenta la viscosidad de emulsión, de modo que una emulsión O/W muy viscosa se puede sentir oleosa [29,32].

Una emulsión se mezcla fácilmente con un líquido que es miscible con la fase continua. Por lo tanto, la leche (O/W) se puede diluir con agua, mientras que la

mayonesa (W/O) se puede diluir con aceite [29]. Por lo general, una emulsión que conserva un aspecto uniforme y lechoso cuando es diluido en gran medida, es más estable que uno que se agrega después de la dilución [29].

Las emulsiones se distinguen fácilmente por el color de los tintes solubles en la fase continua (por ejemplo, azul de metileno para agua o aceite) [29]. En cuanto a la conductancia, las emulsiones O/W usualmente poseen una conductancia específica muy alta, como la de la fase acuosa por sí misma, mientras que las emulsiones W/O contienen una conductancia específica muy baja [29,32].

Para invertir una emulsión es necesario que se encuentre muy concentrada, siendo así, probablemente se invierta cuando se diluya en una fase interna adicional [35]. Por otro lado, si la fase aceitosa emite fluorescencia entonces se puede usar la microscopía fluorescente para determinar el tipo de emulsión siempre y cuando los tamaños de la gota sean más grandes que el límite de resolución del microscopio ($>0.5 \mu\text{m}$) [28,29].

En los casos de emulsiones dobles y múltiples de los tipos O/W/O, W/O/W, O/W/O/W, a veces es posible utilizar las técnicas anteriores para determinar la fase continua, pero no siempre. Por ejemplo, la prueba de tinte puede producir resultados engañosos cuando se aplica a una emulsión múltiple, o para una emulsión bi-continua [29,31,33]. En particular, es muy difícil de seguir la agregación y/o coalescencia de las gotitas internas en una emulsión múltiple [29,33]. Su caracterización por lo general se logra mejor mediante técnicas como la microscopía óptica y electrónica, que permitan la observación directa de las fases dispersas [28,29].

II.2.1.3. Estabilidad de Emulsiones

Para emulsiones (termodinámicamente inestables) el grado de estabilidad cinética es muy importante [29,31,32]. Una caracterización completa de la estabilidad coloidal requiere la consideración de los diferentes procesos por los cuales dispersan las especies, entre ellos: sedimentación, agregación y coalescencia [29,31,33].

La sedimentación y/o “*creaming*” es el resultado de una diferencia de densidad entre la fase continua y la dispersa y produce dos capas separadas por dispersión que tiene diferentes concentraciones de la fase dispersa [28,29]. Una de las capas contendrá una mayor concentración de la fase dispersa, y esto puede producir la agregación [29,30].

La agregación es cuando existe algún movimiento browniano, agitación o debido a que dos o más especies dispersas se aglomeran, posiblemente tocándose en varios puntos, y sin algún cambio en el área superficial [29,30]. En agregación las especies mantienen su identidad pero pierden su independencia cinética debido a que los agregados se mueven como una sola unidad. La agregación de burbujas puede conducir a la coalescencia y a la formación de grandes gotitas hasta que las fases lleguen a separarse [29,33].

En la coalescencia dos o más partículas, burbujas o gotitas se juntan para formar una gran unidad, reduciendo el área superficial [28,29]. En este caso las especies originales pierden su identidad y llegan a partir de nuevas especies [29]. Aquí la estabilidad cinética puede adquirir distintos significados, ya que un sistema puede ser cinéticamente estable con respecto a agregación pero inestable con respecto a

la sedimentación ó cinéticamente estable con respecto a la coalescencia, pero inestable con respecto a la agregación [29].

Usualmente las emulsiones preparadas mezclan dos líquidos juntos no muy estables [28,29]. Para aumentar la estabilidad, generalmente se adiciona un componente, que forma una película alrededor de las gotas dispersadas para proporcionar una barrera a la agregación y coalescencia [28,29]. Aunque hay numerosos agentes y mecanismos eficaces, el componente adicional es con frecuencia un agente tensioactivo [29]. La estabilidad a la coalescencia implica las propiedades mecánicas de la película interfacial [29]. Teniendo en cuenta la estabilidad, tanto en la agregación como en la coalescencia de gotas, los factores que favorecen la estabilidad de la emulsión se puede resumir como: Baja tensión interfacial debido a la energía libre interfacial baja, la cual hace que sea más fácil de mantener un gran área interfacial [29,31]. Así como la alta viscosidad de la superficie y/o la película interfacial mecánicamente fuerte, ya que ésta actúa como una barrera para la coalescencia y puede ser mejorada por la adsorción de los sólidos finos. La ampliación de la doble capa eléctrica y/o repulsiones estéricas que también actúan para prevenir las colisiones y la agregación, y por lo tanto, la coalescencia [29]. Las pequeñas fuerzas de dispersión atracción son otro factor que ayuda a dar estabilidad a las emulsiones dado que esto disminuye la velocidad de agregación y coalescencia [30,36]. Así como también es el pequeño volumen de fase dispersa lo que ayuda a estabilizar la emulsión puesto que reduce la frecuencia de las colisiones y la agregación [29,36]. Además de la diferencia de densidad entre las fases porque ayuda a reducir la velocidad de formación de creaming/sedimentación y, por tanto, las colisiones y la agregación [29,36]. En la Fig. 2 se presentan esquemáticamente los efectos de “creaming”, agregación y coalescencia.

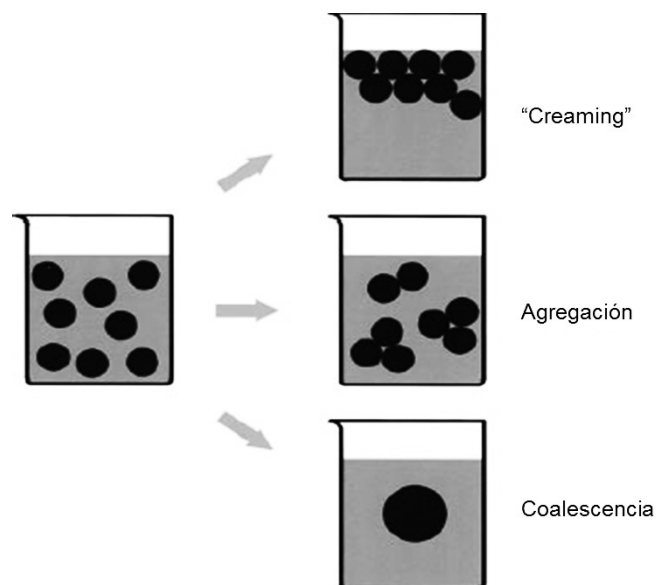


Figura 2. “Creaming”, agregación y coalescencia en una emulsión, espuma o suspensión. Ilustración adaptada de Schramm 2006 [29].

II.2.1.4. Distribución de Tamaño de Emulsiones

Debido a que la mayoría de las emulsiones son polidispersas, casi todos los sistemas se someten a alguna agregación coloidal que conduce a una distribución de tamaños de agregados [13,29]. Esta distribución es usualmente representada por un histograma de tamaños, o, si se tienen datos suficientes, una función de distribución [19,29]. En emulsiones cuya distribución de tamaño es menor, la emulsión es más estable pues los cambios en el tamaño de la curva de distribución con el tiempo, dan una medida de estabilidad [29,34]. Sin embargo, la estabilidad de una emulsión no está dada solo en función del tamaño de sus especies dispersas [29]. La viscosidad también tiene una importante influencia en el tamaño de distribución [29]. Para especies que interactúan electrostática y/o estéricamente la viscosidad de la emulsión será más alta, para una determinada masa o concentración de volumen cuando las especies sean más pequeñas [29,36]. Por ejemplo cuando hay interacción electrostática o estérica de burbujas en una

espuma, la viscosidad será más alta cuando las burbujas son más pequeñas (para una burbuja dado su volumen de gas) porque al aumentar el área superficial, incrementa el espesor de película y con esto, la resistencia al flujo [28,29]. La viscosidad de las emulsiones tenderá a ser más alta cuando los tamaños de las especies dispersas sean relativamente homogéneos, es decir, cuando la distribución de tamaño de partícula sea estrecha en lugar de amplia [29,35].

II.2.2. Estabilidad Coloidal

La estabilidad de una dispersión coloidal depende de las interacciones que ocurren entre las partículas dispersas y las partículas del solvente [30,36]. Cuando un sistema contiene solo un tipo de partícula, el tipo de interacciones que predomina diferirá de la situación donde co-existan más de un tipo de partículas en un medio [36]. Cuando las partículas están suspendidas en un medio son inevitables las colisiones aleatorias entre ellas, esto puede ser el resultado del movimiento browniano, o de la aplicación de fuerzas externas como agitación, así como flujo térmico, hidrodinámico, o bien, fuerzas gravitatorias dados los casos en que las partículas son tan grandes que promueven la sedimentación [28,36]. Como resultado de estas colisiones las partículas pueden rebotar formando agregados, y estos, a su vez, coalescencia, sedimentación o “*creaming*” hasta que las fases lleguen a separarse [29]. La estabilidad de agregación y coalescencia depende de la interacción de las especies dispersas cuando ocurre difusión con el movimiento browniano de las especies [29,30]. Sin embargo, en cuanto a la estabilidad cinética, ésta puede adquirir distintos significados. Una dispersión coloidal puede ser cinéticamente estable con respecto a la coalescencia, pero inestable con respecto a la agregación [29]. O bien, puede ser cinéticamente estable con respecto a agregación pero inestable con respecto a la sedimentación [29]. Por ello, aunque la mayoría de las dispersiones coloidales no son termodinámicamente estables, estas

especies tienen una razonable estabilidad cinética como consecuencia del tamaño pequeño y gran área superficial coloidal [29].

II.2.2.1. Fuerzas Electroestáticas y de Dispersión

La principal causa de las fuerzas de repulsión electrostática es la repulsión entre objetos con cargas iguales [29,30]. Mientras que la de las fuerzas de atracción está relacionada a las fuerzas de van der Waals existente entre las especies coloidales [30]. Estas interacciones determinan estabilidad, y cuando se estabilizan en su totalidad por las fuerzas de repulsión, dos superficies cargadas se aproximan entre sí con sus dobles capas eléctricas que se superponen creando una fuerza de repulsión de Coulomb, que actúa contra la superficie oponiéndose a cualquier intento de disminuir la distancia de separación entre ellas [29,33]. Esta fuerza de repulsión de Coulomb se puede expresar como la energía potencial de repulsión [14,29,31]. También hay otra fuerza de repulsión que causa una fuerte oposición en distancias de separación muy pequeñas donde las nubes de electrones atómicos se superponen, llamada repulsión de Born [29,30]. Además, existen fuerzas de Van der Waals o London que las moléculas ejercen una contra otra. Estas fuerzas normalmente son atractivas y resultan de la orientación de dipolos, pueden ser dipolo-dipolo (Fuerzas de dispersión de Keesom), dipolo-dipolo inducido (Fuerzas de dispersión de Debye) o dipolo inducido-dipolo inducido (Fuerzas de dispersión London). Exceptuando los materiales muy polares las fuerzas de dispersión de London son las más importantes [29].

II.2.2.2. Fuerzas Repulsivas

Las suspensiones de las partículas se podrían estabilizar completamente por fuerzas de repulsión creadas cuando dos superficies cargadas superponen sus dobles capas eléctricas una sobre la otra [37]. Si las superficies de las partículas

son cubiertas por cadenas largas de moléculas (física o químicamente unidas a la superficie) se encuentra una repulsión estérica entre las partículas [29,33].

II.2.2.3. Fuerzas de Dispersión

Las fuerzas de Van der Waals se deben a las fuerzas de atracción que ejercen moléculas neutras unas hacia otras, causadas por interacciones eléctricas entre dipolos [29,37]. La atracción es el resultado de la orientación de dipolos debido a: fuerzas entre dipolos permanentes (Keesom), fuerzas de inducción entre dipolos y dipolos inducidos (Debye) o fuerzas de dispersión entre dipolos fluctuantes y dipolos inducidos (London) [30,37]. El término fuerzas de dispersión se deben en gran medida a los electrones externos, que también son responsables de la dispersión de la luz [29].

Exceptuando materiales muy polares las fuerzas de dispersión London de Van der Waals son las más significativas de las tres [29]. Para moléculas la fuerza varía inversamente con la sexta potencia de la distancia intermolecular [29]. Para partículas dispersas las fuerzas pueden ser aproximadamente la suma de todas las atracciones entre los pares de las moléculas entre partículas [29]. De esta manera cuando se añade la fuerza de dispersión entre dos partículas esta decae lentamente como función de la distancia de separación que es el caso de las moléculas individuales [29,36].

II.2.2.4. Teoría DVLO

Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek desarrollaron una teoría cuantitativa para la estabilidad de coloides liofóbicos, conocida como la teoría del DVLO [38,39]. Usando la teoría del DVLO se puede calcular el cambio de energía que toma lugar

cuando dos partículas se aproximan entre sí mediante la estimación de las energías potenciales de atracción (dispersión de Van der Waals de London, V_A) y repulsión (electrostáticas incluyendo Born, V_R) contra la distancia entre-partículas. Todas estas fuerzas son sumadas al campo de energía de interacción total, V_T [29,36]:

$$V_T = V_R + V_A \quad (1)$$

En la Fig. 3 aparece como V_R decrece exponencialmente con la distancia de separación mientras que V_A decrece inversamente con la distancia de separación. También se muestra cómo pueden predominar las fuerzas de Van der Waals a una larga y corta distancia entre partículas [29,36]. Las fuerzas de repulsión pueden predominar a distancias cortas (Born) e intermedias (doble capa eléctrica) [29,36]. Si las especies coloidales están cargadas y tienen un potencial interfacial de alrededor de 25-50 mV, el modelo del DVLO (para interacciones de partículas binarias) predice que una barrera de energía potencial repulsiva inhibirá la cercanía entre partículas, estabilizándolas y oponiéndose a la agregación (V_{MAX}) [29,36].

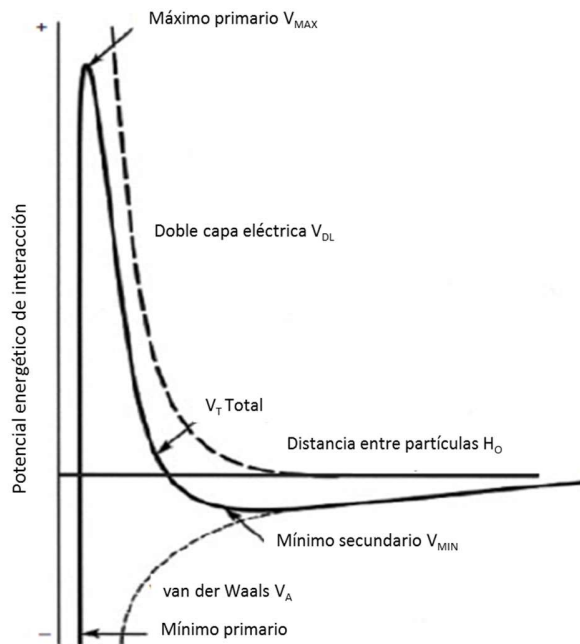


Figura 3. Energías potenciales de interacción entre dos partículas coloidales como una función de su distancia de separación, para dobles capas eléctricas debido a la carga superficial (V_{DL}), fuerzas de dispersión de Van der Waals (V_A) y la interacción total (V_T). Adaptado de Schramm, 2006 [29].

Por otro lado, se tiene que V_R decrece exponencialmente con el incremento de la distancia de separación mientras que V_A decrece inversamente con el aumento de la separación. En la Fig. 4 se muestra una sola curva de energía atractiva y dos diferentes curvas de energía repulsiva, representando dos niveles de concentración de electrolitos [29,36]. Mostrando las curvas de la interacción de energía total que resulta en cada caso se puede observar que cualquiera de las dos fuerzas ya sea las de atracción de van der Waals o las repulsivas de la doble capa eléctrica puede predominar a diferentes distancias entre partículas [29,39]. La Fig. 4 muestra que puede ocurrir una mínima energía a distancias más grandes entre partículas [29].

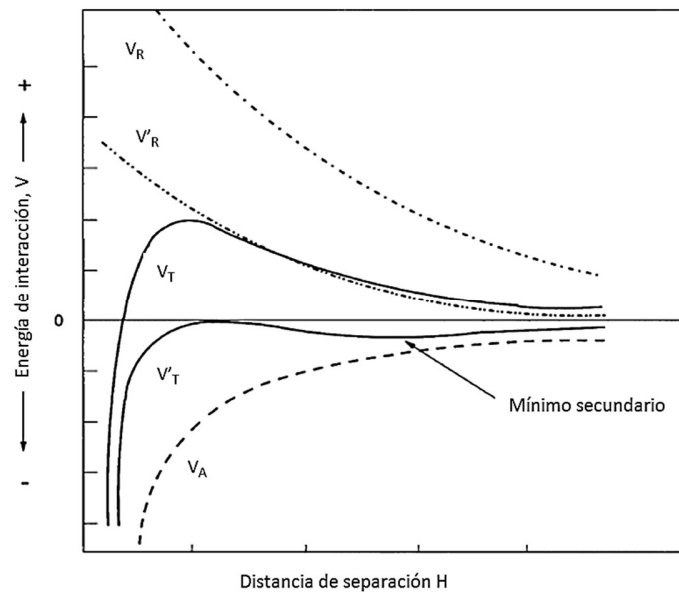


Figura 4. Dos curvas de energía de interacción, V_T y V'_T , resultantes de la suma de una curva de atracción (V_A) con dos diferentes curvas de energía de repulsión, V_R y V'_R . Adaptado de Schramm, 2006 [29].

La Fig. 5 muestra un ejemplo de la curva de energía de interacción total para una película delgada líquida estabilizada por la presencia de surfactante iónico [29]. Puede ser visto que cualquiera de las fuerzas de atracción de van der Waals o de repulsión por la doble capa eléctrica puede predominar en diferentes espesores de películas [29,33]. Como el espesor decrece la atracción incrementa pero eventualmente las fuerzas repulsivas llegan a ser significantes tanto que puede ocurrir un mínimo en la curva, esto es llamado el mínimo secundario y puede considerarse como un espesor en el cual existe un estado meta estable, que la película común [20,29,31].

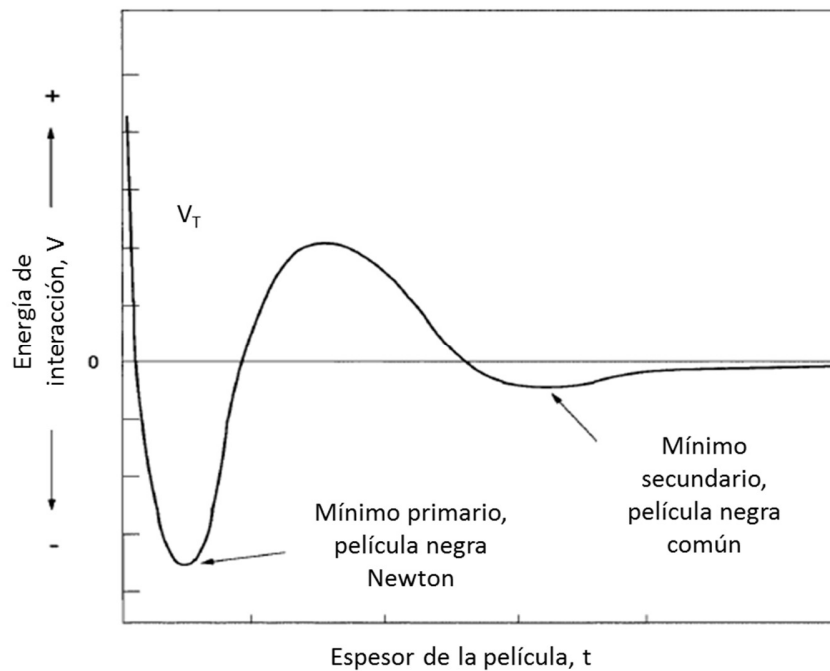


Figura 5. La energía total de interacción V_T entre las superficies de una película líquida delgada o de espuma como una función del ancho de la película. Adaptada de Schramm, 2006 [29].

Tanto como el espesor de la película decrece produce que las fuerzas repulsivas aumenten pero eventualmente las fuerzas de atracción dominan de nuevo y puede ocurrir un mínimo más pronunciado en la curva [29,30,38]. Esto es referido como el mínimo primario, la película está ahora en un estado de mayor estabilidad que antes, que la de la película [29]. En espesores de película más pequeños dominan una vez más las fuerzas repulsivas debido a las de repulsión de Born [29,34].

El papel de la repulsión electrostática en la estabilidad de suspensiones de partículas en un medio no acuoso no es tan claro; la fuerza iónica será lenta tanto como lo sea el espesor de la doble capa eléctrica, varios μm , el potencial eléctrico

variará lentamente con la distancia de separación, y también lo hará la red de potencial eléctrico a medida que las dobles capas se sobreponen [29,37].

Hay complicaciones que puede tener la teoría del DVLO, por ejemplo, habrá una cierta distorsión de las gotitas de emulsión esféricas cuando se acercan entre sí y empiezan a interactuar, causando un aplanamiento [29,40]. Muchos tipos de coloides tienden a adoptar una carga superficial negativa cuando se dispersan en soluciones acuosas, que tienen concentraciones iónicas y pH típico de las aguas naturales [29]. Para estos sistemas las partículas coloidales son bastante estables cuando el potencial zeta es de -30 mV o más negativo, y bastante inestable debido a la aglomeración cuando el potencial zeta es de entre 5 y -5 mV [29]. Estos criterios se utilizan con frecuencia para determinar las dosis óptimas de electrolitos de metales polivalentes (Tabla I), tales como alúmina, se utilizan para efecto de coagulación en el tratamiento plantas [29].

Tabla I. Criterios de estabilidad basados en el potencial zeta para partículas en suspensión. Adaptada de Schramm, 2006 [29].

Características de estabilidad	Potencial Zeta (mV)
Aglomeración y precipitación máxima	+3 a 0
Excelente aglomeración y precipitación	-1 a -4
Justa aglomeración y precipitación	-5 a -10
Aglomeración límite (aglomerados de 2-10 partículas)	-11 a -20
Estabilidad leve (pocos aglomerados)	-21 a -30
Estabilidad moderada (no aglomerados)	-31 a -40
Buena estabilidad	-41 a -50
Muy buena estabilidad	-51 a -60
Excelente estabilidad	-61 a -80
Máxima estabilidad – para sólidos	-81 a -100
– para emulsiones	-81 a -125

II.2.2.5. Hidratación y Efectos Estéricos

Más allá de la teoría DLVO, existen influencias adicionales sobre la estabilidad de la dispersión, como la hidratación de la superficie y los efectos estéricos, mismos que han recibido considerable atención en las últimas décadas [29,36]. Esta fuerza repulsiva "estructural" es debida a la perturbación del ordenamiento molecular en las superficies hidratadas y surge cuando las superficies contienen moléculas de agua adsorbidas por enlaces de hidrógeno, [29,37].

En la Fig. 6 se ilustran algunas de las posibles estructuras de agua cerca de las superficies hidrófilas e hidrófobas, donde es posible notar cómo la superposición de las moléculas de agua puede conducir a fuerzas que son atractivas (fuerzas hidrófobas) o de repulsión en la naturaleza (fuerzas de hidratación) [29]. En la Fig. 6, también se muestra el agua a granel como círculos o pentágonos parciales que indican las entidades estructurales que están en equilibrio con el agua monomérica representado por flechas. La interacción dipolo-dipolo en una superficie hidrofílica provoca el ordenamiento de las moléculas de agua, lo que conduce a una notable zona de desorden [29]. En cambio, las moléculas de agua en una superficie hidrófoba tienen con una mínima zona desordenada [29].

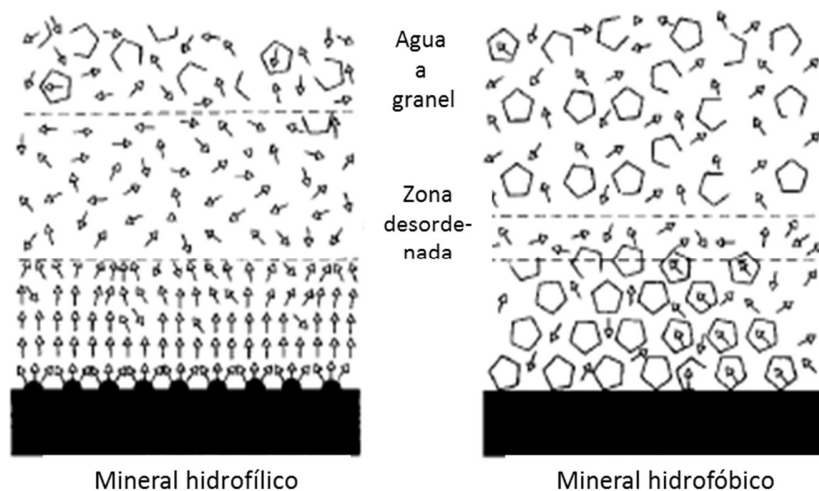


Figura 6. Ejemplos de posibles estructuras del agua en superficies hidrófobas e hidrofílicas. Adaptada de Schramm, 2006 [29].

La estabilidad de una dispersión también se puede mejorar (protección, por estabilización estérica) o reducir (sensibilización, floculación) mediante la adición de material que se absorba dentro de superficies de las partículas [29]. Los agentes protectores pueden actuar de varias maneras: aumentando la repulsión de doble

capa si tienen grupos ionizables; una película adsorbida puede requerir desorción antes de que las partículas puedan acercarse lo suficientemente cerca para que las fuerzas de van der Waals provoquen la atracción; partículas que se aproximan pueden causar que las moléculas sean adsorbidas restringiendo su libertad de movimiento (restricción de volumen) [28,29].

II.2.2.6. Estabilización Estérica

La estabilización estérica puede ser el resultado de ondulaciones de la interface (s), fluctuaciones entre dos interfaces cercanas una de la otra, sobre posicionamiento de grupos de cabezas de surfactantes absorbidos en la interface (s) y/o protuberancias a escala molecular de las cadenas de surfactante y polímero; de todos estas, la última es la más común [29,39].

En estabilización estérica las moléculas de los polímeros absorbidos deben extenderse hacia fuera de la superficie de la partícula, sin embargo, se mantienen adsorbidos suficientemente fuertes a la superficie [36,37]. Un ejemplo es un sistema de partículas que contienen cadenas de bloque de co-polímero anclados que tienen una parte hidrófoba de la molécula que está muy fuertemente adsorbido en las superficies de las partículas y una parte hidrofílica de la molécula que se extiende hacia fuera desde las superficies de las partículas [29,38]. El tamaño de la molécula adsorbida determina la extensión de las fuerzas repulsivas de largo alcance entre partículas y también hace que el mínimo primario desaparezca [29,36–39].

II.3. Terapia Fotodinámica

La terapia fotodinámica (PDT) se basa en la aplicación de una fuente de energía en forma de luz con una determinada longitud de onda, sobre un tejido previamente

fotosensibilizado mediante un compuesto químico, en presencia de oxígeno; de modo que se generan gran cantidad de radicales libres y derivados del oxígeno (compuestos hidroxilo) que producen apoptosis así como también es posible que produzcan necrosis del tejido tratado (Master et al., 2013). Requiere la presencia simultánea de tres componentes: un agente fotosensibilizador, luz y oxígeno, debido a que el oxígeno singlete es el principal agente citotóxico producido durante PDT [23].

Las etapas claves involucradas en cualquier terapia fotodinámica son primeramente la administración del fármaco (generalmente por vía intravenosa o tópica), seguido de un transcurso de tiempo de espera para la retención (preferencial) del fármaco por el tejido tumoral; después se aplica la irradiación de luz, por lo general con láser, del tumor o afección cutánea; así como la destrucción de las células cancerosas por generación de O_2 y por último un periodo de ausencia de exposición del individuo tratado a la luz solar hasta la eliminación del fármaco fotoactivo del organismo [23,25].

Las propiedades de un fotosensibilizador ideal para PDT son baja toxicidad, alto rendimiento cuántico de producción de O_2 , capacidad de absorber luz de longitudes de onda de más de 600 nm (máxima penetración en los tejidos) así como también es necesario que esté dotado de propiedades farmacocinéticas tales como una alta selectividad por tejido, solubilidad en agua y una eliminación en un tiempo razonable del organismo y rápidamente de la piel para evitar reacciones de fotosensibilidad [23]. Actualmente los fotosensibilizadores más usados en PDT *in vivo* son porfirinas, clorinas y bacterioclorinas. Sin embargo también se están utilizando otras clases de porfirinoides, como las ftalocianinas, purpurinas y texapirinas, así como el azul de metileno. Todos estos compuestos son eficaces generadores de O_2 [24].

En cuanto a las aplicaciones de la terapia fotodinámica, hay estudios clínicos que han demostrado la eficacia de la PDT para el tratamiento de varios cánceres de piel como el carcinoma de célula basal, el carcinoma espinocelular, y las lesiones premalignas como las queratosis actínicas [41]. En 1999, la FDA aprobó el uso de la PDT para múltiples tratamientos, en las que es la opción ideal ya que puede ser utilizada sobre amplias áreas de piel afectada en una sola sesión de tratamiento [24].

El uso de la terapia fotodinámica ha mostrado varias ventajas, pues es una forma más localizada de tratamiento, que afecta solo al tejido maligno y que produce resultados que son cosméticamente aceptables para el médico y el paciente [23]. Además, en estudios recientes se han evaluado las propiedades desinfectantes de la PDF mostrando efectos citotóxicos sobre gran variedad de patógenos, incluidas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, hongos, levaduras y micoplasmas [24,26].

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Materiales

El polímero PLGA con terminación en ácido (copolímero 50/50 de DL-láctico/glicólico, 0.2 dL/g) fue comprado en Purac Biomaterials, Gorinchem, The Netherlands. Diclorometano (CH_2Cl_2) fue adquirido de Fisher Scientific Inc. (Fair Lawn, NJ, USA). El alcohol polivinílico (PVA) con un peso molecular promedio de ~31,000 unidades de masa atómica y con 86.7-88.7% (mol) de hidrolisis fue obtenido de Sigma Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Azul de metileno ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{SCl}_3\text{H}_2\text{O}$) adquirido de Química Suastes S.A. de C.V. (Tlahuac, Edo. de Mx, México).

III.2. Curva Patrón de Azul de Metileno

Para caracterizar el AM se pesaron 1.3 mg de este y fueron disueltos con agitación vórtex en 1.5 mL de solución buffer 10 mM de PBS a pH 7.4 mediante el método de espectrofotometría. Brevemente se hicieron diluciones de 100 μL de la solución madre y se agregaron 1.5 mL de buffer PBS a cada tubo, repitiendo la dilución. Se leyeron las muestras a 665 nm usando el espectrofotómetro UV-Vis Genesis 10S, Thermo Scientific, (Madison, WI, USA) y por último se graficaron los resultados para obtener la curva patrón de AM.

III.3. Preparación de las Nanopartículas Poliméricas

Las nanopartículas poliméricas de PLGA cargadas con azul de metileno (AM-NP) se prepararon adaptando la técnica de emulsión doble evaporación del solvente [13,42]. Brevemente, se pesaron 50 mg de PLGA se disolvieron en 4 mL de CH_2Cl_2 .

Asimismo, se pesaron 2, 4 y 8 mg de AM, correspondientes al 4, 8 y 16% de TDL, respectivamente. La masa correspondiente de AM fue disuelta en 1 mL de agua desionizada usando agitación tipo vórtex. A continuación, se mezclaron la fase orgánica y acuosa, conteniendo el PLGA y AM, respectivamente y se sonicaron a 22% de amplitud durante 1 minuto en el equipo QSonica 500 (QSonica LLC, Newtown, Connecticut, USA), usando baño de agua fría para evitar que el solvente orgánico se evapore antes de obtener la nanoemulsión. Después de la primera emulsión se añadieron 40 mL de una solución acuosa de PVA al 5% y se volvió a sonicar a 75% de amplitud durante 1 minuto usando el mismo equipo. Después de la segunda emulsificación, el solvente orgánico (CH_2Cl_2) fue removido por evaporación durante 12 h en una campana de extracción utilizando agitación magnética a temperatura ambiente y 400 rpm. Posteriormente, se centrifugó la solución resultante tres veces para lavar las partículas del PVA remanente, así como del azul de metileno que no se encapsuló usando el equipo Sigma 3-30KS (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany). Las centrifugaciones se realizaron a 20000 rpm por 20 min, resuspendiendo el precipitado en 12 mL de agua desionizada y descartando el sobrenadante. A continuación se caracterizaron las muestras y las soluciones de nanopartículas fueron congeladas a -80°C . Finalmente, las soluciones conteniendo las nanopartículas fueron liofilizadas en el equipo freezezone 4.5 (Labconco, Kansas City, Missouri, USA).

III.4. Caracterización de las Nanopartículas

Se determinó el tamaño y el índice de polidispersidad de las nanopartículas por dispersión dinámica de luz (DLS) con ayuda del equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, United Kingdom), realizando cada estudio por triplicado. El agua desionizada fue utilizada como medio dispersante, con un índice de refracción de 1.33. Mientras que para evaluar la estabilidad de las partículas se

midió el potencial zeta utilizando el mismo equipo pero aplicando el método de electroforesis con Láser Doppler [43].

III.5. Cinética de Liberación de Azul de Metileno

La liberación de AM de las nanopartículas de PLGA se determinó mediante el método de membrana de diálisis, usando nanopartículas previamente liofilizadas. El estudio se llevó a cabo pesando una cantidad definida de nanopartículas cargadas con AM, las cuales fueron disueltas en 1 mL de solución de buffer 10 mM PBS pH 7.4. Dicha solución se colocó dentro de una membrana de diálisis estándar de celulosa de 25 mm de diámetro y de 12-14 kDa límite de corte de peso molecular (MWCO), la cual fue previamente acondicionada de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Spectra/Por, Irving, TX). La membrana se colocó dentro de un tubo falcon de 50 mL conteniendo 30 mL del mismo buffer a 37°C. Los tubos falcon se colocaron a su vez en un equipo de baño de agua modelo BR-122 de Bio-Rad (Cornelius, OR, USA) programado a una temperatura de 37°C. En ciertos intervalos de tiempo, se tomaron muestras del medio de incubación y se analizaron espectroscópicamente a 665 nm y se utilizó la curva patrón del AM para determinar la concentración liberada de este compuesto. Con los datos de concentración se realizó un balance de masa para determinar la cantidad de azul de metileno liberado de las nanopartículas a cada tiempo analizado. Cabe destacar que cada volumen extraído del tubo falcon para el respectivo análisis de AM se repuso con el mismo volumen de buffer de fosfato de sodio con el fin de mantener el volumen constante en los estudios de liberación.

III.6. Carga de Azul de Metileno y Eficiencia de Encapsulación

La cantidad de azul de metileno encapsulado en las nanopartículas (DL) y la eficiencia de encapsulación (EE) fueron determinadas a partir de los estudios de

liberación de AM. Brevemente, la masa final de AM liberada de las nanopartículas (AM-NP) se asoció con la masa inicial de nanopartículas utilizada en el estudio de liberación usando la siguiente fórmula, adaptada de literatura [44]:

$$DL \% = \frac{\textit{masa de AM en las nanoparticulas} \times 100}{\textit{masa de nanoparticulas}} \quad (2)$$

La eficiencia de encapsulación se define como una relación entre la cantidad de fármaco por cantidad de nanopartículas obtenidas en el proceso y la cantidad de fármaco y polímero inicial usado en la preparación de las nanopartículas, y se puede describir de la siguiente manera [45]:

$$EE \% = \frac{\textit{masa de AM por masa de nanoparticulas} \times 100}{\textit{masa de AM por masa de polimero y AM iniciales}} \quad (3)$$

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Curva Patrón de Azul de Metileno

Las propiedades espectroscópicas del azul de metileno se analizaron haciendo uso del equipo UV-vis (Génesis 10S, Thermo Scientific). La curva patrón de AM se evaluó usando buffer 10 mM PBS con un pH de 7.4. Se realizó un barrido de absorbancia del azul de metileno con el espectrofotómetro UV-vis, encontrando un pico de absorción a una longitud de onda a 665 nm. La curva de calibración se realizó partiendo de una solución madre a una concentración de 0.8667 mg/mL, y partir de dicha solución madre se realizaron diluciones, a las cuales se les midió absorbancia con el equipo de UV-Vis a una longitud de onda (λ) de 665 nm. Los resultados obtenidos se usaron para graficar absorbancia versus concentración y de ahí, se determinó la pendiente, la cual se relacionó al coeficiente de extinción molar por la ley de Beer-Lambert [46]. El resultado del ajuste lineal de la curva de calibración de AM mostró un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9957, lo cual valida los datos obtenidos. Los resultados que se obtuvieron se muestran en la Fig. 7, donde el coeficiente de extinción molar (ϵ) obtenido fue de $0.1642 \text{ Abs} \cdot (\mu\text{g/mL})^{-1}$. A partir del análisis realizado, se puede concluir que en el rango de concentraciones estudiado, se sigue una tendencia lineal, lo cual es deseable.

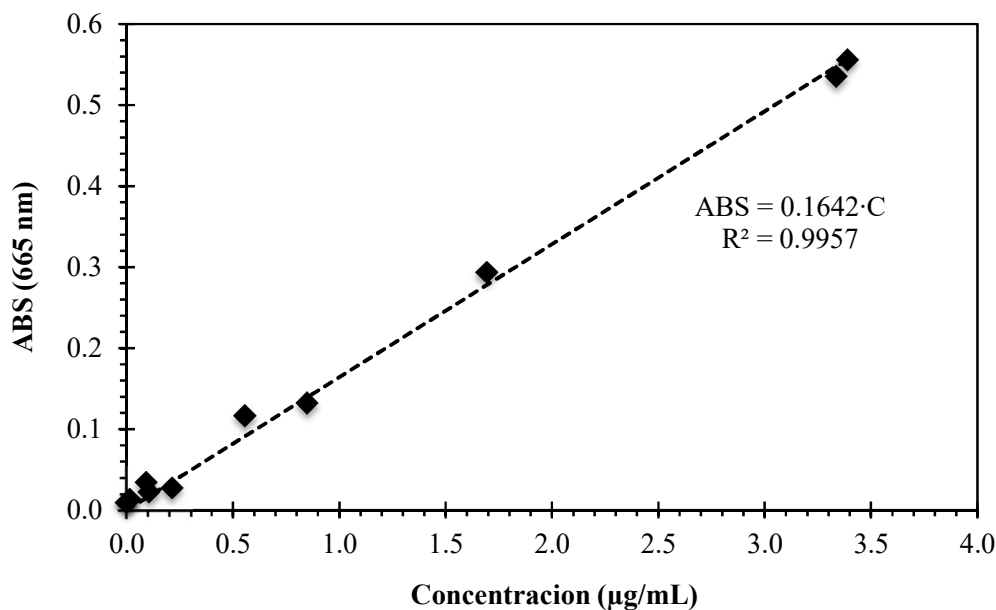


Figura 7. Curva de calibración de AM en una solución de buffer PBS 10 mM pH=7.4, midiendo absorbancia a una longitud de onda de 665 nm ($\epsilon=0.1642 \text{ Abs} \cdot (\mu\text{g/mL})^{-1}$).

IV.2. Caracterización de las Nanopartículas Poliméricas

Al caracterizar las nanopartículas poliméricas por el método de dispersión dinámica de luz, se obtuvo información del tamaño y polidispersidad. Igualmente, al caracterizar el potencial zeta se obtuvo información sobre la carga superficial de la nanopartícula y por consiguiente de la estabilidad de las nanopartículas. Se prepararon partículas con tres diferentes concentraciones iniciales de AM, usando TDL de 4%, 8% y 16%. En la Fig. 8, se muestra el tamaño de las partículas, así como su polidispersidad en función de la cantidad teórica de fármaco, observándose que al tener un TDL de 4% se cuenta con un tamaño promedio de $201.4 \pm 16.2 \text{ nm}$, y una polidispersidad media de 0.080 ± 0.061 , mientras que las partículas con TDL de 8% obtuvieron un tamaño de $209.2 \pm 22.7 \text{ nm}$, y una polidispersidad de 0.123 ± 0.072 . Por último, las partículas con una concentración del 16% reportaron un tamaño de $287.2 \pm 39.3 \text{ nm}$, presentando una polidispersidad de 0.249 ± 0.100 . Al

analizar estos resultados se observa que el tamaño promedio aumenta conforme crece el TDL, pero las partículas con TDL de 4 y 8% no muestran diferencias estadísticamente significativas, mientras que la de 16% presentan un tamaño mayor a las anteriores y mostrando diferencias estadísticamente significativas. Este último resultado es debido a que las partículas grandes corresponden a la preparación de mayor concentración de AM, lo cual pudo ocasionar aglomeraciones en la preparación de las partículas. También se puede observar que la polidispersidad promedio aumenta conforme aumenta el TDL, pero sin mostrar diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo en base a la literatura estas propiedades muestran valores muy aceptables.

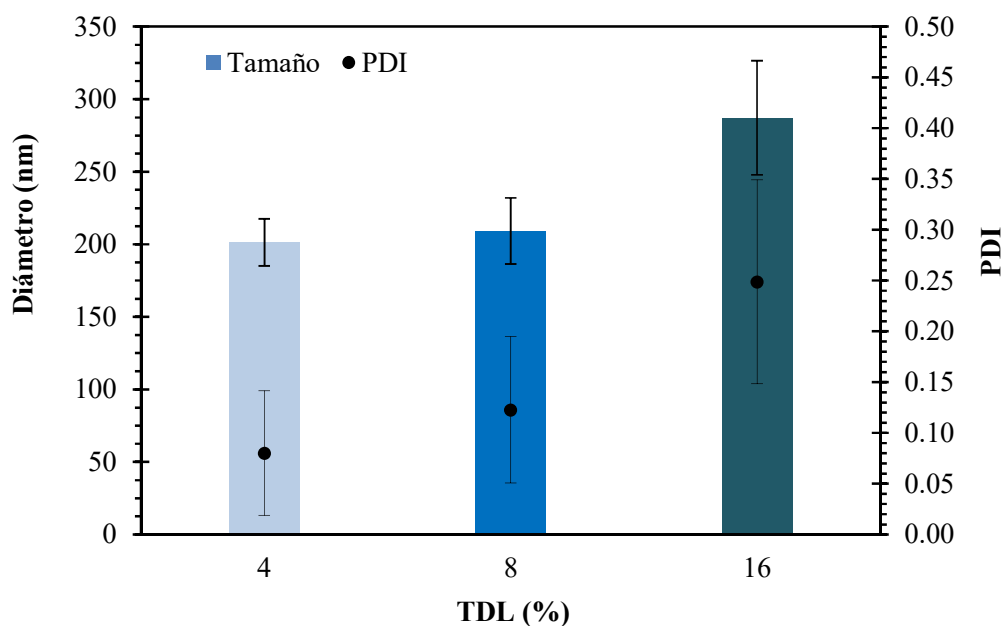


Figura 8. Tamaño y polidispersidad de las muestras de AM-NP correspondientes a los TDL de 4%, 8% y 16%. Datos presentados como promedios \pm DE ($n = 7$).

En la gráfica de la Fig. 9 se analizaron los valores de potencial zeta de las nanopartículas preparadas a distintos TDL. El valor obtenido de la medición de potencial zeta de las nanopartículas poliméricas preparadas con un TDL del 4% es

de -27.6 ± 4.2 mV, para las partículas con un TDL del 8%, el potencial zeta fue de -24.0 ± 3.4 mV, y para las partículas preparadas con un TDL del 16% fue de -21 ± 3.6 mV. Al comparar estos valores se encuentra que las nanopartículas tienen una estabilidad aceptable, ya que el potencial zeta es menor a -20 mV, lo que es favorable ya que puede existir una repulsión de cargas que evitará que las nanopartículas se precipiten o formen agregación.

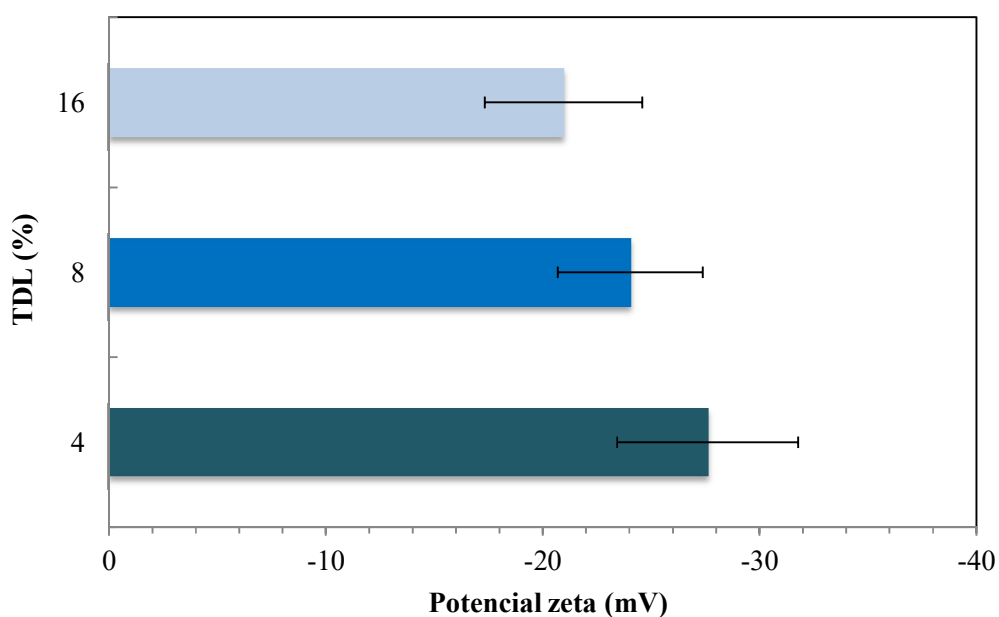


Figura 9. Potencial Zeta de las muestras de AM-NP correspondientes a los TDL de 4%, 8% y 16%. Datos presentados como promedios \pm DE (n = 7).

IV.3. Carga de Azul de Metileno y Eficiencia de Encapsulación

En base a los resultados del estudio de liberación de AM de las nanopartículas, se evaluó la cantidad de AM encapsulado para los diferentes TDL evaluados. Para cada experimento se relacionó de la masa total liberada de AM con respecto a la masa inicial de AM-NP, tomando un promedio entre los resultados correspondientes a un mismo TDL. La gráfica de la Fig. 10 muestra como incrementa el DL promedio

al aumentar el TDL. Esto se debe a que al haber mayor cantidad de fármaco disponible inicialmente, es decir en el inicio de la preparación de las nanopartículas en la primera emulsión, se puede retener una mayor parte de éste fármaco dentro de las nanopartículas. Entre los valores de DL correspondientes al TDL de 4 y 8% se encontraron diferencias estadísticamente significantes. Igualmente, se encontraron diferencias estadísticamente significantes al comparar los valores de DL correspondientes al 4 y 16% de TDL. Por otro lado, al comparar los valores de DL correspondientes al 8 y 16% de TDL no se encontraron diferencias estadísticamente significantes.

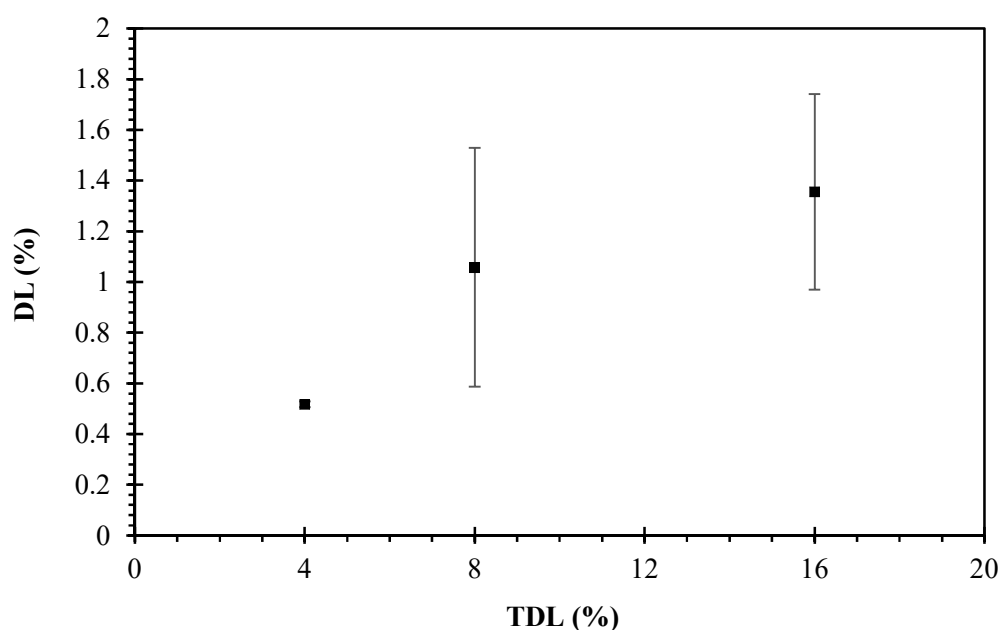


Figura 10. DL de las muestras de AM-NP correspondientes a los TDL de 4%, 8% y 16%. Datos presentados como promedios \pm DE (n = 3).

En la Fig. 11 se puede observar como los valores de EE se encuentran en un rango válido para los tres TDL estudiados. Se obtuvo una EE de $12.95 \pm 0.28\%$ para nanopartículas con un TDL de 4%, mientras que para las partículas con TDL de 8%

se tiene una $EE=13.23\pm 5.9\%$ y por ultimo resultó un valor de $EE=8.47\pm 2.41\%$ para un TDL de 16%. Al analizar los resultados se observa que solo las EE correspondientes al 4 y 16% de TDL son estadísticamente diferentes, mientras que las otras combinaciones resultan sin diferencias estadísticas.

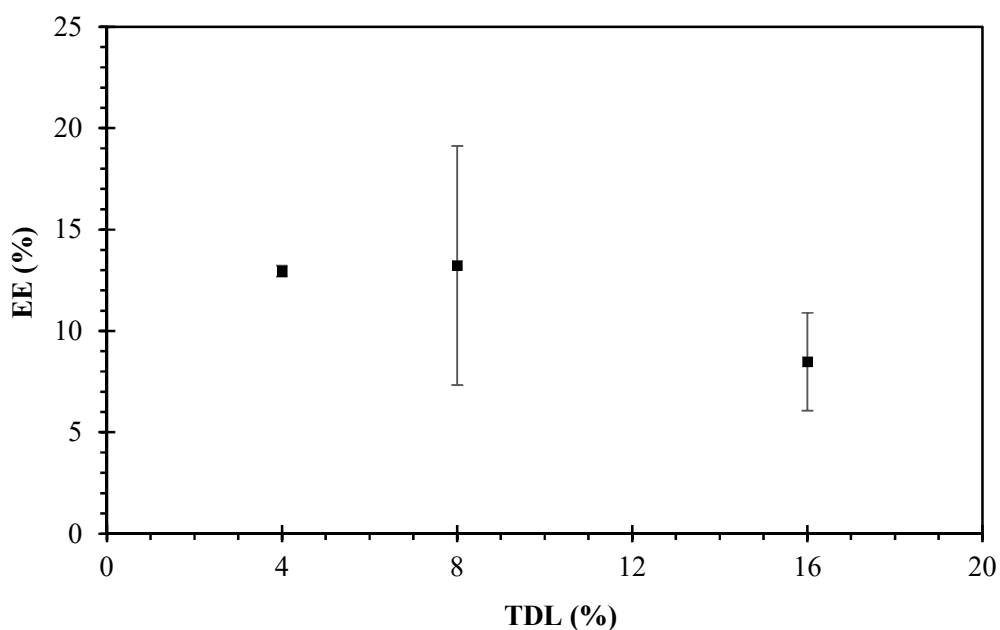


Figura 11. EE de las muestras de AM-NP correspondientes a los TDL de 4%, 8% y 16%. Datos presentados como promedios \pm DE (n = 3).

IV.4. Cinética de Liberación de Azul de Metileno

El método de liberación de AM se basa en el uso de una membrana de diálisis, colocando las partículas en solución y sellando la membrana, luego se sumerge en un determinado volumen de buffer que sirve para simular condiciones fisiológicas y se toman muestras de éste para analizar la cantidad de AM en función del tiempo. Se realizó un procedimiento para estudiar los efectos de la barrera física que el AM debe cruzar para llegar a la solución de análisis, es decir, se evaluó la resistencia

de la membrana, y el tiempo que le toma al AM difundirse a través de ella. En la Fig. 12 se reportan los resultados obtenidos del estudio.

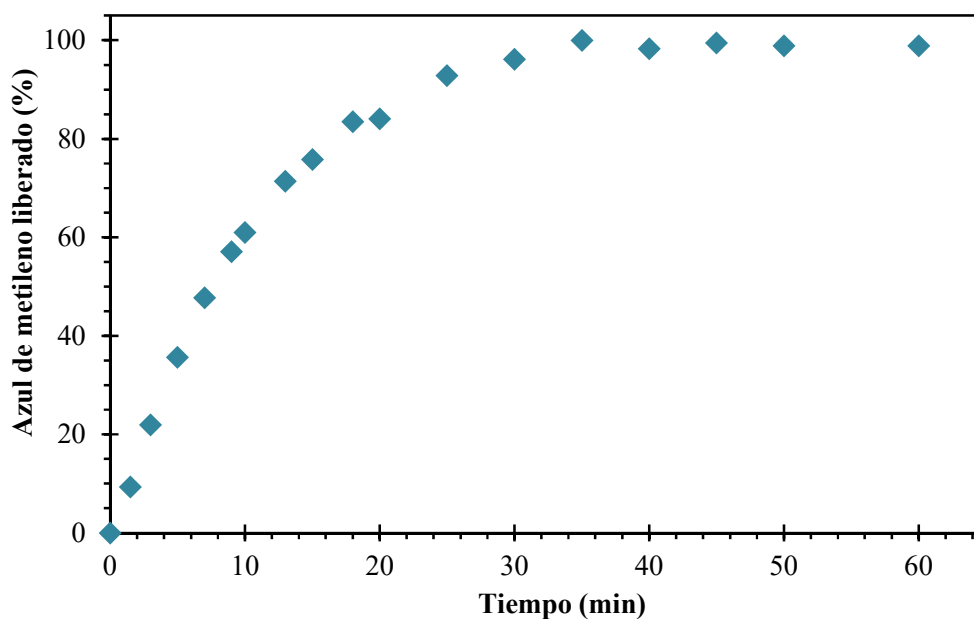


Figura 12. Estudio experimental de la resistencia de membrana a la difusión de AM en buffer 10 mM PBS a pH=7.4.

Para estudiar la cinética de liberación del AM encapsulado en AM-NP en los rangos de TDL analizados, las nanopartículas en solución se sometieron a un proceso de secado (liofilización) para extraer la humedad en ellas. Una vez secas se tomó una masa de AM-NP, las cuales se resuspendieron simulando condiciones fisiológicas, es decir, a una temperatura de 37°C en una solución buffer 10 mM PBS pH=7.4, de acuerdo a la metodología. Se tomaron alícuotas periódicamente y se analizaron espectrofotométricamente a 665 nm para determinar, con la ayuda del coeficiente de extinción obtenido de la curva patrón, la concentración de fármaco liberado. En cada tiempo evaluado, la concentración de AM se convirtió a masa considerando el

volumen total del experimento de liberación, de acuerdo a la metodología. En las Figuras 17, 18, 19 se muestran los perfiles de liberación para los TDL de 4%, 8% y 16% respectivamente. En las tres figuras se muestra una liberación rápida del AM, que concluye en aproximadamente 5 días para todos los casos. Esta liberación se adjudica al mecanismo de liberación inicial, el cual puede describir la liberación de fármacos hidrofílicos. En la Fig. 13, se comparan los gráficos de liberación de las tres preparaciones estudiadas, encontrándose mucha similitud, por lo que se observa que el DL de las partículas no afecta el perfil de liberación de AM en el rango estudiado.

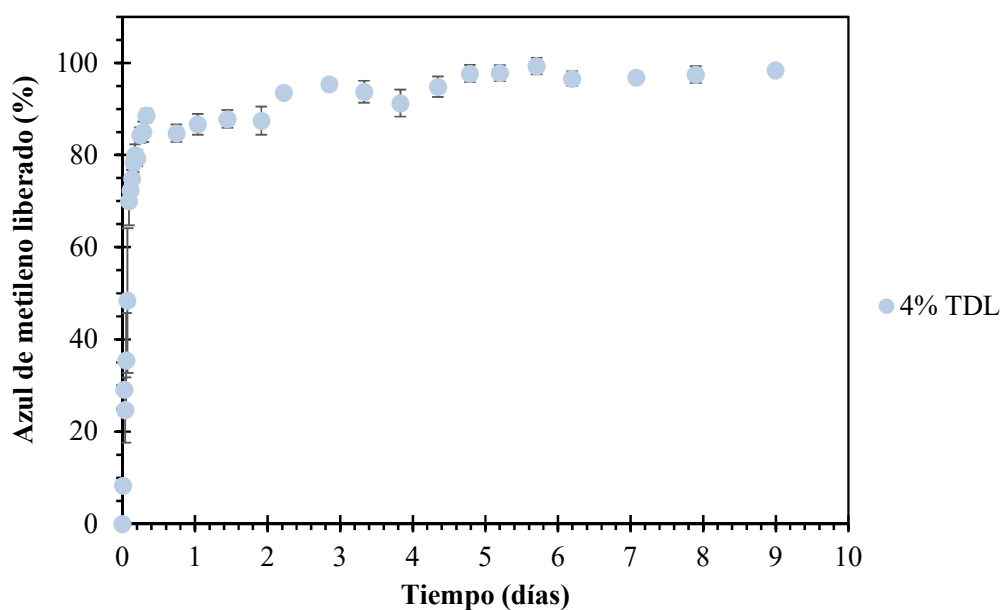


Figura 13. Curva de liberación de AM de las nanopartículas poliméricas (AM-NP) preparadas con un TDL de 4 % (●). Datos presentados como promedios \pm DE (n = 3).

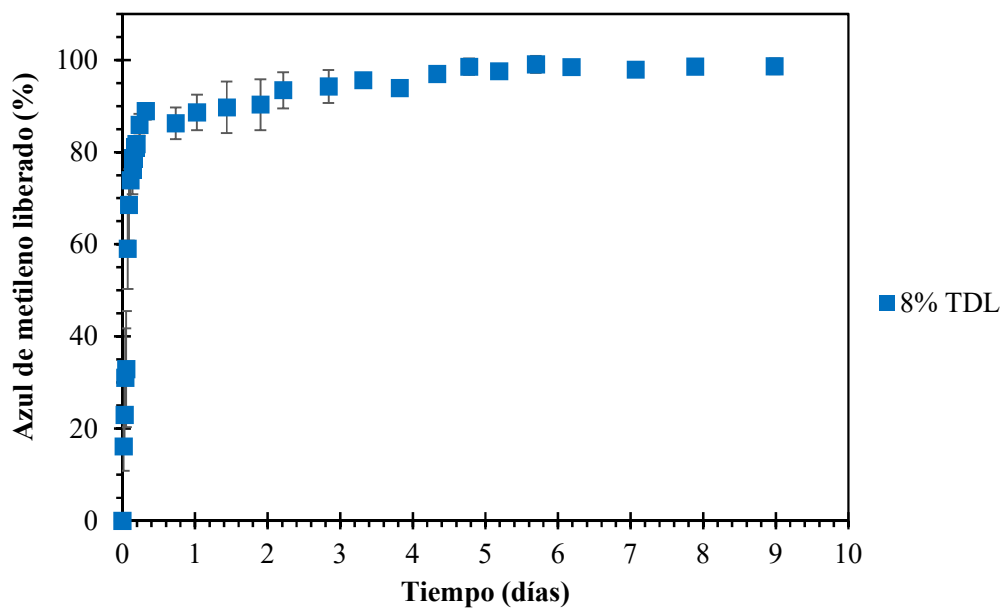


Figura 14. Curva de liberación de AM de las nanopartículas poliméricas (AM-NP) preparadas con un TDL de 8% (■). Datos presentados como promedios \pm DE (n = 3).

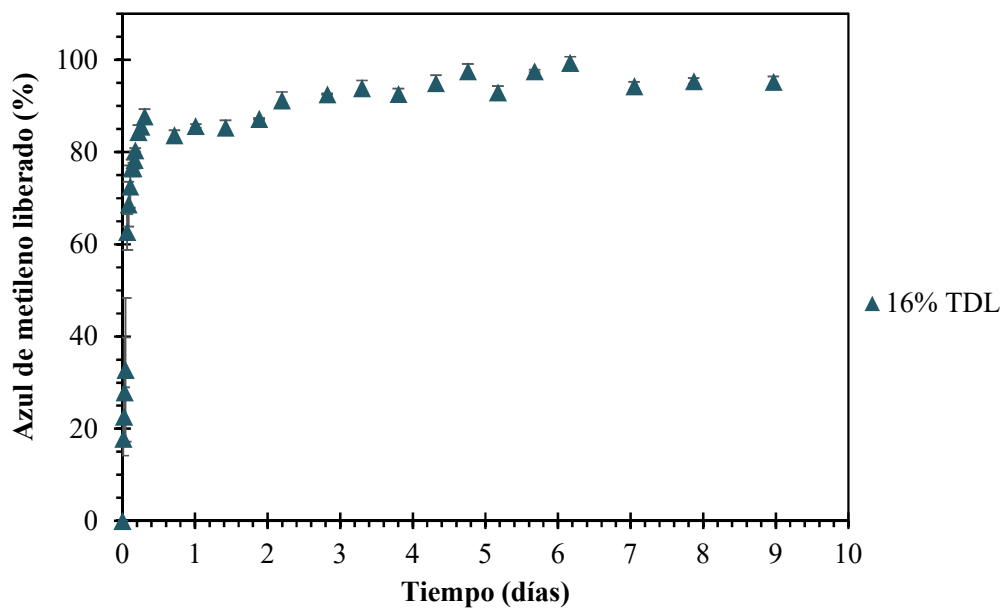


Figura 15. Curva de liberación de AM de las nanopartículas poliméricas (AM-NP) preparadas con un TDL de 16% (▲). Datos presentados como promedios \pm DE (n = 3).

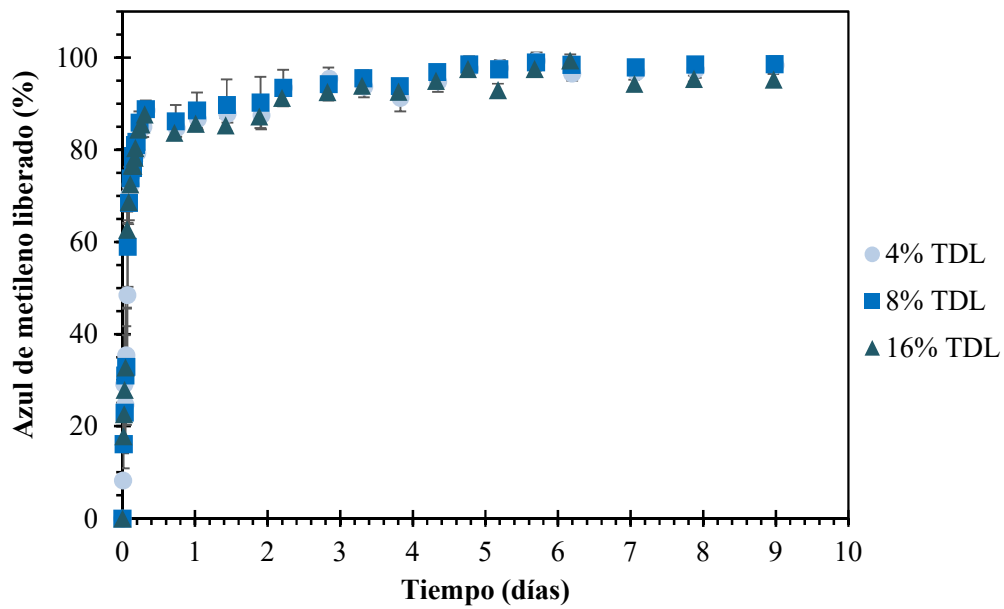


Figura 16. Comparación de las curvas de liberación de AM de nanopartículas poliméricas (AM-NP) preparadas con diferentes TDL: 4% (●), 8% (■) y 16% (▲). Datos presentados como promedios \pm DE (n =3).

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

V.1. Conclusiones

Se logró encapsular AM dentro de nanopartículas poliméricas de PLGA utilizando la técnica doble emulsión- evaporación de solvente. Se analizaron las características de las nanopartículas poliméricas en función de la cantidad de AM usada en la preparación y se encontró que el tamaño promedio de las nanopartículas aumenta conforme aumenta el TDL. Asimismo, se observó que los valores promedio de AM encapsulado dentro de las nanopartículas incrementaron al aumentar el TDL, pero la eficiencia de encapsulación promedio mostró una ligera tendencia de disminución con respecto al TDL en el rango estudiado. Se encontró que la cantidad de AM encapsulado no afecta el perfil de liberación del mismo de las nanopartículas poliméricas. Los perfiles de liberación encontrados muestran una liberación rápida, por lo que se concluye que el mecanismo de liberación que describe al sistema es el de liberación inicial. El sistema evaluado tiene potencial para administrar AM de una forma controlada en diversos tratamientos relacionados a terapia fotodinámica.

V.2. Recomendaciones

Se recomienda implementar un método para medir directamente el DL y la EE de las nanopartículas preparadas en esta investigación y hacer estudios con un láser a 665 nm usando a las AM-NP para conocer el funcionamiento del AM en las NPs así como el efecto del fármaco puro.

REFERENCIAS

- [1] M.C. Roco, Nanoparticles and nanotechnology research., *J. Nanoparticle Res.* 1 (1999) 1–6. doi:10.1023/A:1010093308079.
- [2] C. Guozhong, Nanostructures & nanomaterials., *J. Chem. Inf. Model.* 53 (2004) 66. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [3] M. Singh, S. Singh, S. Prasad, I.S. Gambhir, Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles., *Dig. J. Nanomater. Biostructure.* 3 (2008) 115 – 122.
- [4] F. Sanchez, K. Sobolev, Nanotechnology in concrete – A review., *Constr. Build. Mater.* 24 (2010) 2060–2071. doi:10.1016/j.conbuildmat.2010.03.014.
- [5] M. Ferrari, Cancer nanotechnology: opportunities and challenges., *Nat. Rev. Cancer.* 5 (2005) 161–171. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738981>.
- [6] J. Shi, A.R. Votruba, O.C. Farokhzad, R. Langer, Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications., *Nano Lett.* 10 (2010) 3223–3230. doi:10.1021/nl102184c.
- [7] L. Zhang, F. Gu, J. Chan, A. Wang, R. Langer, O. Farokhzad, Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments., *Clin. Pharmacol. Ther.* 8 (2000) 761–769. doi:10.1038/sj.clp.
- [8] R. Duncan, Polymer conjugates as anticancer nanomedicines., *Nat. Rev. Cancer.* 6 (2006) 688–701. doi:10.1038/nrc1958.
- [9] V. Sáez, E. Hernández, L. López, Liberación controlada de fármacos. Aplicaciones biomédicas., *Rev. Iberoam. Polímeros.* 4 (2003) 111–122.
- [10] J.T. Santini, Introduction to drug delivery technology, *Chem. Eng. Process.* 109 (2013) 19–23,39.
- [11] K. Letchford, H. Burt, A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65 (2007) 259–269. doi:10.1016/j.ejpb.2006.11.009.
- [12] R. Misra, S. Acharya, S.K. Sahoo, Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy., *Drug Discov. Today.* 15 (2010) 842–850. doi:10.1016/j.drudis.2010.08.006.
- [13] M.F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M.J. Alonso, et al., Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method., *J. Control. Release.* 50 (1998) 31–40. doi:10.1016/S0168-3659(97)00106-5.

- [14] M.. Hans, A.. Lowman, Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting., *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 6 (2002) 319–327. doi:10.1016/S1359-0286(02)00117-1.
- [15] J.M. Llabot, S.D. Palma, D.A. Allemandi, Nanopartículas poliméricas sólidas, *Farmacotecnia.* 53 (2008) 40–47.
- [16] R.A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices., *Biomaterials.* 21 (2000) 2475–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11055295>.
- [17] K.E. Uhrich, S.M. Cannizzaro, R.S. Langer, K.M. Shakesheff, Polymeric systems for controlled drug release., *Chem. Rev.* 99 (1999) 3181–98. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11749514>.
- [18] M. Sinha, Use of biodegradable micro and nano-particles in vaccine delivery., *Int. J. Biomed. Res.* 2 (2011) 102–109. doi:<http://dx.doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.84>.
- [19] H.K. Makadia, S.J. Siegel, Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier., *Polymers (Basel).* 3 (2011) 1377–1397. doi:10.3390/polym3031377.
- [20] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery., *Int. J. Pharm.* 385 (2010) 113–42. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018.
- [21] F. Danhier, E. Ansorena, J.M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Préat, PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications, *J. Control. Release.* 161 (2012) 505–522. doi:10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
- [22] J.-M. Lü, X. Wang, C. Marin-Muller, H. Wang, P.H. Lin, Q. Yao, et al., Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology., *Expert Rev. Mol. Diagn.* 9 (2009) 325–41. doi:10.1586/erm.09.15.
- [23] H.J. Nyst, I.B. Tan, F.A. Stewart, A.J.M. Balm, Is photodynamic therapy a good alternative to surgery and radiotherapy in the treatment of head and neck cancer?, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 6 (2009) 3–11. doi:10.1016/j.pdpdt.2009.03.002.
- [24] A. Master, M. Livingston, A. Sen Gupta, Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: Perspectives and challenges., *J. Control. Release.* 168 (2013) 88–102. doi:10.1016/j.jconrel.2013.02.020.
- [25] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, Q. Peng, J. Moan, M. Korbelik, et al., Photodynamic therapy., *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 889–905.
- [26] D. García-Fresnadillo, Desinfección mediante fotosensibilizadores : principios

básicos, *Sol. Safe Water*. (2001) 243–258.

- [27] R.A. Freitas, What is nanomedicine?, *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* 1 (2005) 2–9. doi:10.1016/j.nano.2004.11.003.
- [28] P. Sennett, J.P. Olivier, Colloidal Dispersions Electrokinetic Effects and the concept of Zeta Potential, *Ind. Eng. Chem.* 57 (1965) 32–50. doi:10.1021/ie50668a007.
- [29] L.L. Schramm, *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
- [30] W.B. Russel, D.A. Saville, W.R. Schowalter, *Colloidal Dispersions.*, (1989).
- [31] C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, M.J. Garcia-Celma, Nano-emulsions, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10 (2005) 102–110. doi:10.1016/j.cocis.2005.06.004.
- [32] O. Sonneville-Aubrun, J.T. Simonnet, F. L'Alloret, Nanoemulsions: A new vehicle for skincare products., *Adv. Colloid Interface Sci.* 108-109 (2004) 145–149. doi:10.1016/j.cis.2003.10.026.
- [33] T. Tadros, P. Izquierdo, J. Esquena, C. Solans, Formation and stability of nano-emulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 108-109 (2004) 303–318. doi:10.1016/j.cis.2003.10.023.
- [34] V. Castelvetro, C. De Vita, Nanostructured hybrid materials from aqueous polymer dispersions., *Adv. Colloid Interface Sci.* 108-109 (2004) 167–185. doi:10.1016/j.cis.2003.10.017.
- [35] N. Anton, J.P. Benoit, P. Saulnier, Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review., *J. Control. Release.* 128 (2008) 185–199. doi:10.1016/j.jconrel.2008.02.007.
- [36] A.M. Islam, B.Z. Chowdhry, M.J. Snowden, Heteroaggregation in colloidal dispersions., *Adv. Colloid Interface Sci.* 62 (1995) 109–136. doi:10.1016/0001-8686(95)00276-V.
- [37] E.J.W. Verwey, J.T.G. Overbeek, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids.*, 1948.
- [38] P.C. Hiemenz, R. Rajagopalan, *Principles of colloid and surface chemistry.*, 3rd ed., 1997.
- [39] J.N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces: Revised Third Edition.*, (2011).
- [40] A.S. Aricò, P. Bruce, B. Scrosati, J.-M. Tarascon, W. van Schalkwijk, Nanostructured materials for advanced energy conversion and storage devices., *Nat. Mater.* 4 (2005) 366–77. doi:10.1038/nmat1368.

- [41] M. Ramírez Backhaus, M. Trassierra Villa, C.D. Vera Donoso, J.F. Jiménez Cruz, Terapia fotodinámica en el cáncer de próstata localizado, *Actas Urológicas Españolas*. 31 (2007) 633–641. doi:10.1016/S0210-4806(07)73700-2.
- [42] R.C. Mundargi, V.R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel, T.M. Aminabhavi, Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives., *J. Control. Release*. 125 (2008) 193–209. doi:10.1016/j.jconrel.2007.09.013.
- [43] I.D. Morrison, R. Sydney, *Colloidal Dispersions: Suspensions, Emulsions, and Foams.*, (2002) 656 pages.
- [44] T. Lei, S. Srinivasan, Y. Tang, R. Manchanda, A. Nagesetti, A. Fernandez-Fernandez, et al., Comparing cellular uptake and cytotoxicity of targeted drug carriers in cancer cell lines with different drug resistance mechanisms, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 7 (2011) 324–332. doi:10.1016/j.nano.2010.11.004.
- [45] J. Park, P.M. Fong, J. Lu, K.S. Russell, C.J. Booth, W.M. Saltzman, et al., PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin., *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* 5 (2009) 410–8. doi:10.1016/j.nano.2009.02.002.
- [46] D. Calloway, Beer-Lambert Law, *J. Chem. Educ.* 74 (1997) 744. doi:10.1021/ed074p744.3.