



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

SÍNTESIS DE BIOPOLIMEROS PARA EL DESARROLLO DE NANOPLATAFORMAS DE RECONOCIMIENTO MOLECULAR

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

PRESENTA:

Ashley Patricia Rosales Ruíz

DIRECTOR: Dr. Jesús Armando Lucero Acuña

Hermosillo, Sonora

Julio, 2019

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

APROBACION DEL JURADO

de la tesis presentada por:

Ashley Patricia Rosales Ruíz

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.


9-Sep-2019
Fecha


Dr. Jesús Armando Lucero Acuña
Presidente

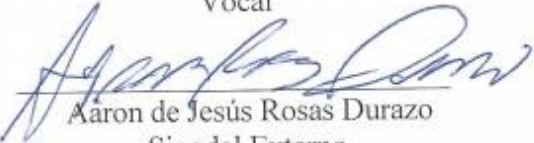
9 Sep 2019
Fecha


Dra. Patricia Guerrero German
Secretario

9 Sep 2019
Fecha


Dr. Armando Tejada Mansir
Vocal

9 Sep 2019
Fecha


Aáron de Jesús Rosas Durazo
Sinodal Externo



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

División de Ingeniería

Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química

AUTORIZACION DEL EXAMEN DE GRADO

10 Septiembre de 2019.

por la presente se hace constar que la estudiante: **Ashley Patricia Rosales Ruiz**, ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.


DR. ABRAHAM ROGELIO MARTÍN GARCÍA

COORDINADOR

POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

RESUMEN

El reconocimiento molecular es fundamental para el diseño de técnicas efectivas de diagnóstico y el desarrollo de tratamientos específicos. En este sentido, las nuevas tendencias son el uso de nanoplataformas funcionalizadas con moléculas específicas para el reconocimiento molecular. En el área de tratamientos se tiene a los sistemas de administración de fármacos usando nanopartículas poliméricas, los cuales también deben cumplir en la medida de lo posible con características de reconocimiento celular. Algunos de los polímeros biodegradables más efectivos utilizados en la actualidad para la preparación de nanopartículas son el ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA) y el polietilenglicol (PEG). El acoplamiento de estos dos polímeros con biotina, además de provocar cambios favorables en las propiedades fisicoquímicas de las partículas, nos habilitan para la posibilidad de funcionalizar los sistemas de administración de fármacos y dirigirlos específicamente a un área de interés. Además, se tiene que muchos de los anticuerpos comerciales se venden acoplados a biotina, con el fin de que estos se puedan acoplar fácilmente a la proteína avidina, por medio de la química llamada “click” (avidina-biotina). En esta investigación, se realizó la modificación del polímero PLGA con PEG y después se acopló biotina usando técnicas de conjugación basadas en carbodiimidas, resultando el biopolímero PLGA-PEG-Biotina. La síntesis de este biopolímero se corroboró usando Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR), donde se pudieron observar las bandas características del acoplamiento de los polímeros y la biotina. Después de sintetizar el biopolímero se prepararon nanopartículas utilizando 6 fracciones másicas diferentes de PLGA-PEG-Biotina:PLGA, las cuales fueron 0.0:1.0, 0.2:0.8, 0.4:0.6, 0.6:0.4, 0.8:0.2, 1.0:0.0. Las nanopartículas se caracterizaron por dispersión dinámica de luz y electroforesis por láser Doppler, donde resultaron diámetros hidrodinámicos de partícula en el rango 130 a los 170 nm, índices de polidispersidad en los rangos de 0.08 a 0.25 y potenciales Z en los rangos de los -34 a los -23 mV. Se encontró que la fracción másica de 0.6:0.4 tenía las mejores características fisicoquímicas, teniendo mayor control de preparación. Las diferentes fracciones másicas utilizadas en teoría deberían de resultar en diferente número de moléculas de biotina en la superficie de las nanopartículas, lo cual pudiera representar un factor a considerar en el acoplamiento de la proteína avidina en la superficie de las nanopartículas. El acoplamiento de avidina se llevó a cabo utilizando el mismo número de moles de esta, en función de la masa de nanopartículas (la masa de nanopartículas fue igual para todos los acoplamientos).

Antes de acoplar la avidina a las nanopartículas se estudió la actividad de esta con respecto a biotina, por medio del efecto hiperclorico. La actividad de avidina resultó en un 87.5%, es decir, se pudieron conjugar 3.5 moléculas de biotina en cada avidina, independientemente de los dos buffers usados, buffer de carbonato

de amonio 0.2 M pH 8.9 y buffer salino de fosfatos 10 mM pH 7.4 (PBS). Después se acopló avidina conjugada con fluoresceína (avidina-FITC) a las nanopartículas y cuantificó la fluorescencia, resultando en un incremento en la concentración promedio de avidina en la superficie de las nanopartículas cuando se incrementa la proporción másica del biopolímero PLGA-PEG-Biotina, lo cual indica que se puede controlar la cantidad de avidina en la superficie de las nanopartículas por medio de la fracción másica de los biopolímeros usados en la preparación de las nanopartículas. El presente trabajo puede contribuir en el área farmacéutica para el suministro específico y dirigido de fármacos y terapéuticos. Al utilizar la tecnología de la química “click” (avidina-biotina) sobre la superficie de las nanopartículas, nos posibilita el utilizar una gran diversidad de anticuerpos los cuales se encuentran actualmente disponibles en el mercado, ya unidos a biotina. El acoplamiento de anticuerpos permite que las nanopartículas tengan especificidad a células diana, reduciendo así la exposición de los agentes terapéuticos en los demás tejidos y aumentando la efectividad de estos.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	IV
LISTA DE FIGURAS	VI
DEDICATORIA.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
NOMENCLATURA	XI
CAPÍTULO 1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.....	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 Objetivo General.....	3
1.3 Objetivos Específicos	3
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Nanotecnología.....	5
2.1.2 Nanomedicina.....	5
2.1.3 Nanomateriales.....	6
2.1.4 Nanopartículas.....	6
2.1.5 Nanopartículas Poliméricas.....	8
2.1.6 Nanopartículas de PLGA.....	9
2.1.7 Nanopartículas PLGA-PEG	9
2.2 Biomateriales.....	10
2.2.1 Polímeros.....	11
2.2.2 Ácido poli (láctico-co-glicólico)	12
2.2.3 Polietilenglicol (PEG)	13
2.3 Mecanismos de Modificación de Biomateriales.....	13
2.3.1 PEGilación	13
2.3.2 Carbodiimidas	14
2.3.3 Avidina-Biotina	15
2.4 Administración de Fármacos.....	17
2.4.1 Suministro Dirigido.....	17
2.4.2 Mecanismos de Liberación de Fármacos en Nanopartículas de PLGA.....	18
2.4.3 Aplicaciones de las Tecnologías de Avidina-Biotina en los Sistemas de Administración Dirigida.....	19
2.4.4 Potencial Zeta y su Efecto en la Administración de Fármacos.....	20

2.4.4.1	Potencial Zeta y Entrega de Fármacos dirigidos	21
2.4.4.2	Efecto del Potencial Zeta en la Captación Celular	22
2.4.4.3	Efecto del Potencial Zeta en los Sistemas de Administración de Fármacos	22
2.4.4.4	Efecto del Potencial Zeta en la Captación de Macrófagos	23
2.4.5	Efecto del Tamaño	23
2.4.5	Opsonización	24
2.5	Técnicas Generales de Análisis Molecular y de Nanopartículas	24
2.5.1	Electroforesis por Láser Doppler	24
2.5.2	Dispersión Dinámica de Luz	26
2.5.3	Espectroscopia Ultravioleta-Visible	27
2.5.4	Espectroscopia de Fluorescencia	28
2.5.5	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier	30
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS		33
3.1	Materiales	33
3.2	Equipo	33
3.3	Métodos	34
3.3.1	Modificación del Polímero y Caracterización por FT-IR	34
3.3.2	Preparación y caracterización de NP a Partir de PLGA-PEG-Biotina	36
3.3.3	Determinación de la Actividad de Avidina	38
3.3.4	Acoplamiento de Avidina-FITC a Nanopartículas de PLGA-PEG-Biotina	39
3.3.5	Determinación de avidina en Nanopartículas de PLGA-PEG-Biotina	39
3.3.6	Análisis Estadístico	39
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		40
4.1	Síntesis del Biopolímero y Conjugación de Biotina	40
4.2	Preparación y Caracterización de NP a Partir del Biopolímero PLGA-PEG-Biotina	44
4.3	Determinación de la Actividad de Avidina	57
4.4	Conjugación de Avidina en Nanopartículas de PLGA-PEG-Biotina	59
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		62
5.1	Conclusiones	62
5.2	Recomendaciones	63
REFERENCIAS		64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imágenes TEM de ejemplos de NP con diferente morfología y composición. a) NP de Cu monodispersadas, b) nanorods de Fe, c) NP de núcleo-caparazón de Cu-Si, d) NP de Fe ₃ O ₄ porosas, e) cubos de Fe ₃ O ₄ decorados con NP de Ni, f) esferas de sílice porosas con NP de γ -Fe ₂ O ₃ adsorbidas en superficie, g) NP de γ -Fe ₂ O ₃ incrustadas en esferas de sílice porosas. Imágenes tomadas de (Benelmekki 2014)	7
Figura 2. Estructura del Ácido poli (láctico-co-glicólico)	12
Figura 3. Estructura del polietilenglicol (PEG)	13
Figura 4. Reacción de Diciclohexilcarbodiimida para formar Amidas.....	15
Figura 5. Diagrama del complejo Avidina-Biotina. Avidina tiene cuatro sitios activos de unión para Biotina. Imagen modificada de (Weiss et al. 2007).	16
Figura 6. Mecanismos de liberación A) Difusión a través de poros llenos de agua, B) Difusión a través del polímero, C) Bombeo osmótico, D) Erosión. Imagen tomada de (Fredenberg et al. 2011).	19
Figura 7. Representación esquemática del Potencial Zeta. Imagen tomada de (Tengku Mohd et al. 2016).	21
Figura 8. Representación esquemática de la técnica de electroforesis por láser Doppler para la medición del potencial zeta. Imagen tomada de (Alexandr Shimko, Anastasia Povolotckaia, and Aelexandra Mikhaylova 2014).	25
Figura 9. Diagrama de funcionamiento de Dispersión Dinámica de Luz. Imagen tomada del sitio web www.particletechlabs.com	26
Figura 10. Diagrama del funcionamiento de un espectrofotómetro ultravioleta-visible. Figura tomada del sitio web chem.libretexts.org	28
Figura 11. Diagrama esquemático de un espectrofluorómetro. Imagen tomada de (Lakowicz 2006b).....	29
Figura 12. Diagrama de un interferómetro de Michelson en FTIR. Figura tomada de (Leng 2008).	31
Figura 13. Representación esquemática de la reacción de acoplamiento de PEG.	34
El polímero se lavó mediante tres ciclos de precipitación utilizando 3 volúmenes de mezcla orgánica fría de metanol-éter dietílico (50/50) seguido de centrifugación, descartando el sobrenadante y resuspendiendo en DCM. Para el acoplamiento de PEG, la solución de PLGA activada se trató con PEG a una relación molar de 1:10 y se dejó reaccionar durante 12 horas en atmósfera de nitrógeno. El polímero se lavó de nuevo mediante tres ciclos de precipitación y se resuspendió en DMSO.....	35
Figura 14. Representación esquemática de la reacción de conjugación de Biotina.....	35

Figura 15. Esquema de la formulación de NP por la técnica de emulsión- evaporación del solvente. Imagen tomada de (McCall and Sirianni 2013).	37
Figura 16. Espectro de FT-IR ATR del polímero PLGA terminación ácida.	41
Figura 17. Espectro de FT-IR ATR del polímero O,O'-Bis(2-aminopropil) polipropilén glicol-bloque-polietilén glicol-bloque-polipropilén glicol (PEG). Se observan las bandas características del armónico C-C-O del PEG a 949 y 841cm ⁻¹ .	42
Figura 18. Espectro de FT-IR ATR del copolímero PLGA-PEG. Se observan las bandas características del armónico C-C-O del PEG.	42
Figura 19. Espectro de FT-IR ATR del copolímero PLGA-PEG-Biotina. se pueden ver las bandas características del enlace amida.	43
Figura 20. Características de las Nanopartículas de PLGA-PEG-Biotina preparadas por emulsión simple- evaporación del solvente. (A) Tamaño y polidispersidad de las NP con diferentes proporciones másicas. (B) Potencial zeta de las NP con diferentes proporciones másicas.	45
Figura 21. Tamaño de las nanopartículas de PLGA-PEG-Biotina con diferentes proporciones másicas y tratamientos. (♦) NP de PLGA-PEG-Biotina frescas. (■) NP de PLGA-PEG-Biotina con sucrosa antes de liofilizar. (▲) NP de PLGA-PEG-Biotina con sucrosa después de liofilizar. (●) NP de PLGA-PEG-Biotina-Avidina.	46
Figura 22. Potencial zeta de las nanopartículas de PLGA-PEG-Biotina con diferentes proporciones másicas y tratamientos. (♦) NP de PLGA-PEG-Biotina frescas. (■) NP de PLGA-PEG-Biotina frescas con sucrosa. (▲) NP de PLGA-PEG-Biotina con sucrosa después de liofilizar. (●) NP de PLGA-PEG-Biotina-Avidina.	47
Figura 23. Variación de los tamaños de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0:1. (—) NP frescas. (— —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (- · - · -) P con sucrosa después de liofilizar. (---) NP acopladas Avidina.	48
Figura 24. Variación del potencial zeta de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0:1. (—) NP frescas. (— —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (- · - · -) NP con sucrosa después de liofilizar. (---) NP acopladas Avidina.	49
Figura 25. Variación de los tamaños de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.2:0.8. (—) NP frescas. (— —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (- · - · -) NP con sucrosa después de liofilizar. (---) NP acopladas Avidina.	50
Figura 26. Variación del potencial zeta de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.2:0.8. (—) NP frescas. (— —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (- · - · -) NP con sucrosa después de liofilizar. (---) NP acopladas Avidina.	50

Figura 27. Variación de los tamaños de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.4:0.6. (—) NP frescas. (— —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (-•-•-•-) NP con sucrosa después de liofilizar. (----) NP acopladas Avidina.	51
Figura 28. Variación del potencial zeta de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.4:0.6. (—) NP frescas. (— —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (-•-•-•-) NP con sucrosa después de liofilizar. (----) NP acopladas Avidina.	52
Figura 29. Variación de los tamaños de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.6:0.4. (—) NP frescas. (— —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (-•-•-•-) NP con sucrosa después de liofilizar. (----) NP acopladas Avidina.	53
Figura 30. Variación del potencial zeta de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.6:0.4. (—) NP frescas. (— —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (-•-•-•-) NP con sucrosa después de liofilizar. (----) NP acopladas Avidina.	53
Figura 31. Variación de los tamaños de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.8:0.2. (—) NP frescas. (— —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (-•-•-•-) NP con sucrosa después de liofilizar. (----) NP acopladas Avidina.	54
Figura 32. Variación del potencial zeta de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.8:0.2. (—) NP frescas. (— —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (-•-•-•-) NP con sucrosa después de liofilizar. (----) NP acopladas Avidina.	55
Figura 33. Variación de los tamaños de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 1:0. (—) NP frescas. (— —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (-•-•-•-) NP con sucrosa después de liofilizar. (----) NP acopladas Avidina.	56
Figura 34. Variación del potencial zeta de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 1:0. (—) NP frescas. (— —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (-•-•-•-) NP con sucrosa después de liofilizar. (----) NP acopladas Avidina.	56
Figura 35. Curva de saturación de Avidina en solución de buffer de carbonato de amonio.....	58
Figura 36. Curva de saturación de Avidina-Biotina en solución de buffer de fosfatos.	58
Figura 37. Curva de calibración de Avidina-FITC en solución de buffer de fosfatos.	59
Figura 38. Concentraciones de Avidina-FITC en las nanopartículas preparadas con diferentes proporciones másicas del biopolímero PLGA-PEG-Biotina.	60

NOMENCLATURA

Nanopartículas (NP)

Ácido poli (láctico co-glicólico) (PLGA)

Polietilenglicol (PEG)

Ácido láctico (AL)

Ácido glicólico (AG)

Administración de comida y medicamento (food and drug administration (FDA))

Agencia Europea de Medicina (EMA)

sistema fagocítico mononuclear (SFM)

Temperatura de transición vítrea (Tg)

Sistema fagocítico mononuclear (SFM)

Sistema de administración de fármacos (drug delivery system (DDS))

Sistema retículo endotelial (RES)

Electroforesis por láser Doppler (LDE)

Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Espectroscopía de Correlación de Fotones (PCS)

Dispersión de Luz Cuasi-Elastica (QELS)

Ultravioleta-visible (UV-VIS)

Infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

Microscopio electrónico de transmisión (TEM)

N-Hidroxisuccinimida (NHS)

Dimetil sulfoxido (DMSO)

Diciclohexilcarbodiimida (DCC)

Diclorometano (DCM)

Alcohol polivinílico (PVA)

CAPÍTULO 1. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

La nanotecnología es la ciencia y la ingeniería involucrada en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos cuya organización funcional es tan pequeña que se encuentra en la escala nanométrica o en la mil millonésima parte de un metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) (Silva 2004). En la actualidad se considera ampliamente que la nanotecnología tienen el potencial de aportar beneficios en diversas áreas como el desarrollo de medicamentos, descontaminación del agua, tecnologías de información y comunicación, producción de materiales más fuertes y ligeros, entre otras (Benelmekki 2014). Se considera que la Nanotecnología es el primer paso hacia la Nanomedicina, la cual puede ser definida como la ciencia que monitoriza, repara, construye y controla componentes y funciones biológicas en humanos mediante el uso de sistemas a nanoescala (Bogunia-Kubik and Sugisaka 2002).

En los últimos años ha habido un creciente interés en la nanomedicina, lo cual ha propiciado la expansión en ese campo de investigación, dado lugar a nuevas perspectivas y avances tanto en la investigación biomédica como en la práctica clínica. A la fecha, más de 30 productos basados en nanotecnología han sido aprobados para uso clínico, enfocados principalmente en formulaciones liposomales, conjugados de polímeros y fármacos (Guillot et al. 2007). Una de las áreas de investigación de la nanomedicina está dirigida a la entrega de medicamento, existiendo varios vehículos de transporte los cuales varían según el método de preparación, el medicamento es ya sea atrapado físicamente o unido covalentemente a la matriz polimérica. Los compuestos resultantes pueden tener la estructura de cápsulas (nanopartículas poliméricas), estructura anfifílica núcleo/caparazón (micelas poliméricas) o macromoléculas hiperramificadas (dendrimeros) (Rawat et al. 2006).

Siguiendo con las nanopartículas poliméricas (NP), tenemos que estas son portadores prometedores de agentes biológicos debido a ciertas ventajas las cuales incluyen la biocompatibilidad, la facilidad de modificación de la superficie, la acción localizada y la reducción de la toxicidad sistémica. Así como

también mejoras en la absorción, la biodisponibilidad y el tiempo de circulación en el torrente sanguíneo. Otra de las ventajas de la encapsulación de fármacos es la protección de las moléculas de una degradación prematura, una mejora en la solubilidad, liberación controlada y dirigida de los fármacos (Khalil et al. 2013a; Menon et al. 2014)

Dentro de los polímeros biodegradables más utilizados se encuentra el ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA), el cual se ha visto que tiene un gran éxito debido a que su hidrólisis conduce a monómeros metabólicos, ácido láctico (AL) y ácido glicólico (AG). Estos dos monómeros son endógenos y fácilmente metabolizados por el cuerpo a través del ciclo de Krebs, aparte de poseer una toxicidad sistémica mínima, el uso de PLGA se asocia a la entrega de fármacos o biomaterial. PLGA está aprobado por la administración de drogas y alimento (FDA por sus siglas en inglés) de los EE.UU. y la Agencia Europea de Medicina (EMA) en diversos sistemas de administración de fármacos en seres humanos (Kumari, Yadav, and Yadav 2010). Las NP biodegradables formuladas a partir de PLGA han sido ampliamente investigadas para el suministro sostenido y dirigido o localizado de diferentes agentes que incluyen ADN, proteínas, péptidos y compuestos de bajo peso molecular (Panyam and Labhasetwar 2003) Aunque estas NP formuladas a partir de PLGA muestran numerosas ventajas, también tienen algunas desventajas, debido a su superficie hidrofóbica ya que al entrar en un organismo vivo son marcadas por proteínas llamadas opsoninas, las cuales provocan que estas partículas sean eliminadas por el sistema fagocítico mononuclear (SFM), provocando que tengan un tiempo de circulación más corto.

Modificando la superficie de estas partículas con polímeros hidrofílicos como el polietilenglicol (PEG) se estabiliza la partícula, logrando repeler las opsoninas debido a fuerzas de repulsiones estéricas y vuelve a las partículas invisibles ante el sistema fagocítico mononuclear, aumentando su tiempo de circulación plasmática y dando como resultado una mejora en la biodisponibilidad y la vida media del fármaco. Además, aumentando los tiempos de circulación plasmáticos aumenta la probabilidad de que las nanopartículas alcancen su objetivo. Las nanopartículas de PLGA-PEG han sido ampliamente estudiadas debido a su gran potencial para tener largos tiempos de circulación. así como también, la ventaja proporcionada por el carácter hidrofílico del PEG lo cual puede mejorar la biocompatibilidad de este sistema de entrega de fármacos (Khalil et al. 2013a).

Las interacciones no covalentes, incluidos los enlaces de hidrógeno, la interacción hidrófoba, la interacción de Van der Waals y la interacción iónica, también se han utilizado para nanosistemas encargados para la administración de fármacos. Una de las interacciones no covalentes más fuertes en la naturaleza es la interacción entre avidina-biotina, la cual ha evolucionado hasta convertirse en una plataforma muy versátil para una gran variedad de aplicaciones en las áreas de biotecnología y nanotecnología. Las nanopartículas fabricadas a partir de la interacción biotina-avidina tienen una distribución de tamaño uniforme y una mayor estabilidad frente a las enzimas, la temperatura, el pH y reagentes orgánicos agresivos. La estructura tetravalente de la avidina proporciona una gran ventaja en el diseño, desarrollo y suministro de nanopartículas. Proporciona cuatro sitios de unión para biotina, proporcionando una gran flexibilidad para cargar fármacos y ligandos para un suministro dirigido, a las nanopartículas (Jain and Cheng 2017).

En el presente trabajo se pretende obtener las condiciones óptimas para el desarrollo de una nanoplataforma de reconocimiento molecular. Para tal fin, primero se sintetiza el biopolímero PLGA-PEG-Biotina y después se preparan nanopartículas usando diferentes proporciones másicas de los polímeros PLGA-PEG-Biotina y PLGA. Después se lleva a cabo la bioconjugación de avidina a las nanopartículas, resultando en sistemas versátiles, los cuales quedan listos para la conjugación de un gran número de anticuerpos comerciales, los cuales se encuentran disponibles ya conjugados a biotina.

1.2 Objetivo General

Desarrollar una nanoplataforma polimérica con capacidad de reconocimiento molecular basada en interacciones biotina-avidina

1.3 Objetivos Específicos

- Sintetizar un biopolímero conjugando PLGA y PEG.
- Conjugación de Biotina al biopolímero PLGA-PEG formando: PLGA-PEG-Biotina.

- Preparar nanopartículas con diferentes proporciones másicas de PLGA-PEG-Biotina:PLGA con características fisicoquímicas apropiadas para usos biomédicos.
- Analizar la conjugación de Avidina a las Nanopartículas.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanotecnología

La nanotecnología es un campo en rápido avance que se espera tener un impacto revolucionario en muchas industrias, incluyendo medicina. Esta ciencia ha sido posible a través de la convergencia de muchos campos científicos, incluida la química, biología, física, matemáticas e ingeniería. La nanotecnología proporciona a los científicos nuevas herramientas para la investigación, manipulación y control de átomos, moléculas, y objetos submicroscópicos, generalmente en el rango de 1 a 100 nm. Esta área de la ciencia permite a los científicos aprovechar los efectos cuánticos que se producen de forma natural a nivel de nanoescala que influyen en los aspectos biológicos, físicos, químicos, mecánicos y ópticos. Estos efectos a menudo otorgan a los materiales a nanoescala propiedades químicas, físicas y biológicas deseables, las cuales no poseen los materiales en su escala macroscópica (Rawat et al. 2006; Seigneuric et al. 2010; Ventola, Bharali, and Mousa 2010).

2.1.2 Nanomedicina

La unión entre la nanotecnología y la medicina ha llevado al campo interdisciplinario de la nanomedicina. Los avances en genética, proteómica, biología molecular y celular, ciencia de materiales y bioingeniería han contribuido al desarrollo de este campo, el cual, se ocupa de los procesos fisiológicos a nivel de nanoescala. Muchos de los trabajos internos de una célula ocurren naturalmente a este nivel nanométrico, debido a que las dimensiones de muchas moléculas las cuales son indispensables para las células como lo son el agua, glucosa, anticuerpos, proteínas, enzimas, receptores y hemoglobina ya encuentran dentro del rango de tamaño. Actualmente una gran cantidad de investigadores se encuentran trabajando en tratamientos médicos, dispositivos e instrumentos que usan la nanotecnología para aumentar la eficacia, la seguridad, la sensibilidad y la personalización. Los nanoterapéuticos poseen un gran potencial de aportar beneficios los cuales incluyen biodisponibilidad mejorada, reducción de la toxicidad, una respuesta más eficiente a la dosis y una mejor solubilidad en comparación con los medicamentos convencionales (Seigneuric et al. 2010; Ventola, Bharali, and Mousa 2010).

En los últimos años el área farmacéutica ha tenido un gran interés en los nanosistemas, esto se debe en parte a las ventajas que estos sistemas pueden proporcionar al diseñar un sistema de administración de medicamentos, esto debido a que dirigir el medicamento a sitios específicos representa un gran desafío. Se ha visto que ciertos productos químicos o agentes terapéuticos que muestran éxito en el cultivo celular no producen el mismo efecto en el cuerpo humano debido a la limitación para dirigirse al área designada, como resultado, se administran altas concentraciones a los pacientes dando como resultado efectos secundarios más intensos(Rawat et al. 2006).

2.1.3 Nanomateriales

Los materiales nanoestructurados no llegaron a existir con la reciente aparición del campo de la nanotecnología. Muchos materiales existentes se encuentran estructurados en escala micro y nanométrica, y muchos de estos han sido utilizados en procesos industriales durante décadas. Los nanomateriales, son materiales que tienen componentes estructurales menores a $1\mu\text{m}$ en al menos una de sus dimensiones (Buzea, Pacheco, and Robbie 2007). Los nanomateriales tienen amplias aplicaciones para una gran variedad de áreas, entre las cuales se encuentra la química, física, electrónica, óptica, ciencia de los materiales y ciencias biomédicas. Entre las aplicaciones se encuentra el uso en dispositivos electrónicos, ópticos y mecánicos, administración de fármacos y bioencapsulación (Martin 1994).

2.1.4 Nanopartículas

Las Nanopartículas (NP) se definen como una aglomeración de átomos y moléculas en el rango de 1 a 100 nm. Pueden estar compuestas por una o más especies de átomos o moléculas y pueden exhibir una amplia gama de propiedades dependientes del tamaño. Las NP se clasifican generalmente en función de su dimensionalidad, morfología, composición, uniformidad y aglomeración (Benelmekki 2014).

Las NP son denominadas como nanomateriales de “dimensión cero”. Esta definición surge del hecho de que todas sus dimensiones se encuentran en la escala nanométrica, a diferencia de los nanomateriales unidimensionales, que tienen una dimensión que no se encuentra en nanoescala (como los nanocables y los nanotubos), y los bidimensionales, que tienen dos de sus dimensiones más grandes que la nanoescala (como las películas monocapa autoensambladas)(Murthy 2007).

Las NP tienen una variedad de formas, entre las cuales podemos encontrar esferas, discos, cilindros, conos, tubos y alambres. También podemos encontrar NP huecas, porosas o sólidas. En la figura 1 podemos ver distintas imágenes de microscopio electrónico de transmisión (TEM) de NP con diferentes formas y composiciones. Estas características pueden ser seleccionadas en función de la interactividad, la capacidad de carga y las capacidades de transporte. Por ejemplo, una NP hueca puede ser un portador atractivo para fármacos o agentes de contraste de imagen (Ventola, Bharali, and Mousa 2010).

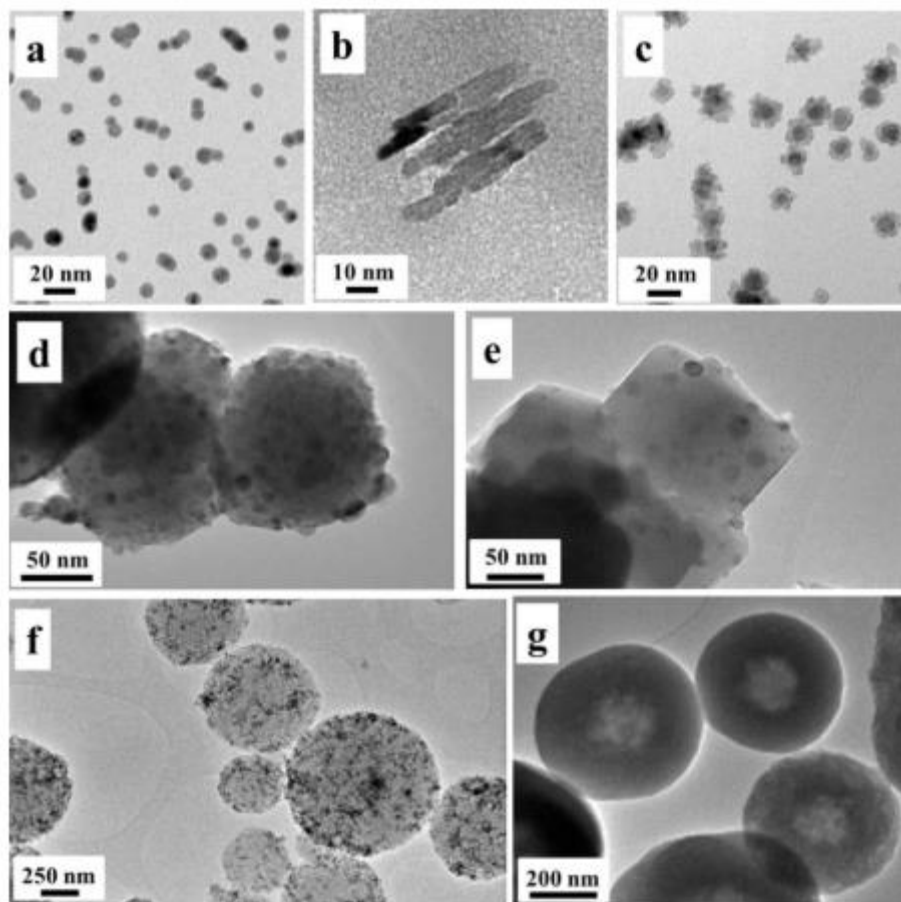


Figura 1. Imágenes TEM de ejemplos de NP con diferente morfología y composición. a) NP de Cu monodispersadas, b) nanorods de Fe, c) NP de núcleo-caparazón de Cu-Si, d) NP de Fe₃O₄ porosas, e) cubos de Fe₃O₄ decorados con NP de Ni, f) esferas de sílice porosas con NP de γ -Fe₂O₃ adsorbidas en superficie, g) NP de γ -Fe₂O₃ incrustadas en esferas de sílice porosas. Imágenes tomadas de (Benelmekki 2014)

2.1.5 Nanopartículas Poliméricas

En los últimos años las NP han ganado mucha atención, esto debido a sus diversas propiedades entre las cuales se encuentran: estabilidad prolongada, alta capacidad de carga del fármaco y su capacidad para administrar moléculas de fármaco tanto hidrófilas como hidrófobas por vía peroral, transmucosa e inhalatoria. Las NP pueden ser sintetizadas a partir de polímeros biodegradables y biocompatibles obtenidos tanto de fuentes naturales como sintéticas (Boddu and Vaishya 2012). Estas partículas son estructuras coloidales compuestas de polímeros sintéticos o semisintéticos que varían en tamaño desde 10 hasta 1000 nm. Dependiendo del método de preparación, se pueden obtener nanoesferas o nanocápsulas en las que el fármaco está disuelto, atrapado, encapsulado o unido a la matriz de NP.

Los materiales poliméricos exhiben varias propiedades deseables que incluyen biocompatibilidad, biodegradabilidad, modificación de superficie y facilidad de funcionalización de polímeros. Los sistemas poliméricos permiten un mayor control del comportamiento farmacocinético del fármaco cargado, lo que lleva a niveles más estables de fármacos (Peppas 1995). Estos atributos lo convierten en un sistema candidato para el atrapamiento eficaz o la encapsulación de fármacos biotecnológicos que suelen ser sensibles a los cambios a sus alrededores (Soppimath, Aminabhavi, and Kulkarni 2001). Además, se ha visto que el proceso de encapsulación con NP ofrece ventajas significativas sobre otras plataformas de nanovehículos, esto se debe a la gran cantidad de matrices poliméricas las cuales permiten la adaptación de las propiedades de la NP para cumplir con las necesidades específicas para cada sistema (Van Vlerken, Vyas, and Amiji 2007).

Las NP sintetizadas a partir de polímeros biodegradables son muy utilizadas para mejorar las propiedades terapéuticas de varios medicamentos y compuestos bioactivos. Como se mencionó anteriormente, el encapsular estas moléculas les brinda beneficios, algunos de ellos son que la nanoencapsulación protege las moléculas de una degradación prematura, mejora su solubilidad, y promueve una liberación controlada y dirigida. Aparte al estar sintetizadas de polímeros biodegradables presentan un bajo riesgo de toxicidad, mayor eficacia del medicamento, mayor especificidad, tolerabilidad, y el índice terapéutico va en aumento con su uso. Esto se debe a que ya específicamente hay un aumento en la absorción, biodisponibilidad, y el tiempo de circulación en el plasma aumenta debido a la reducción de la eliminación de las partículas, causando consecuentemente el aumento de la vida media del medicamento (Khalil et al. 2013b).

2.1.6 Nanopartículas de PLGA

Uno de los nanosistemas estudiados para la administración de fármacos y genes son las NP. Danhier et al., 2012 llegó a la conclusión que las NP de PLGA pueden aumentar la eficacia de los tratamientos debido a la liberación sostenida, a partir de NP estables. Pudiendo así mejorar los perfiles farmacocinéticos y farmacodinámicos.

Debido a que se ha observado que el PLGA este asociado a una toxicidad sistémica mínima, se ha estudiado ampliamente para el desarrollo de dispositivos para el suministro controlado de fármacos, moléculas pequeñas, proteínas y otras macromoléculas en uso comercial y en investigación. Se puede emplear PLGA para la liberación sostenida de fármacos a dosis deseables mediante su implantación sin procedimientos quirúrgicos. Además, es posible ajustar las propiedades físicas generales de la matriz de polímero-fármaco mediante el control de los parámetros relevantes, como el peso molecular del polímero, la relación entre ácido láctico y ácido glicólico, y la concentración del fármaco para lograr una dosis deseada y un intervalo de liberación dependiendo del tipo de fármaco (Danhier et al. 2012; Makadia and Siegel 2011).

Las NP formuladas a partir de PLGA pueden ayudar a que los fármacos tengan una mayor penetración a través de las diferentes barreras biológicas, tales como la barrera hematoencefálica, mucosa gastrointestinal, la mucosa nasal y la retina (Zhao et al. 2013). Aunque todo pareciera ser ventaja al hablar de NP sintetizadas a partir de PLGA, también nos topamos con algunas desventajas. Debido a que la superficie de estas partículas es hidrofóbica el tiempo de circulación de estas es corto, debido a que son rápidamente reconocidos por proteínas plasmáticas llamadas opsoninas, las cuales marcan a las partículas para que sean eliminadas por células del sistema fagocítico mononuclear (SFM). El proceso de opsonización es una de las más importantes barreras biológicas para los sistemas de administración de fármacos basados en NP. Recubriendo la superficie de las NP con polímeros hidrofílicos, como el PEG, sirve para estabilizar estéricamente las partículas (Khalil et al. 2013b).

2.1.7 Nanopartículas PLGA-PEG

Entre las NP actualmente bajo investigación para aplicaciones controladas de administración de fármacos y de suministro dirigido de fármacos, las que reciben la mayor atención son probablemente las NP basadas en el copolímero PLGA-PEG. Una de las propiedades que deben tener estos portadores de fármacos es la persistencia en circulación sistémica después de su administración vía intravenosa (i.v.) para así poder ser

útiles para la administración y suministro focalizado de fármacos. Después de la administración intravenosa, las NP formuladas a partir de PLGA-PEG permanecen en circulación sistémica durante horas, mientras que las NP formuladas solamente de PLGA se eliminan del torrente sanguíneo unos pocos minutos después de su administración. En general, se conoce que las células que participan predominantemente en la captura de NP por administración i.v. son los macrófagos provenientes de hígado y bazo, y los monocitos circulantes (células del SFM). La composición de las NP pegiladas afecta la efectividad de la barrera estérica que forma el PEG, así como también el tamaño y, como resultado, determina las propiedades de biodistribución de las NP (Park et al. 2009).

2.2 Biomateriales

Un biomaterial se puede definir como “un material no viable utilizado en un dispositivo médico destinado a interactuar con los sistemas biológicos. Un biomaterial es cualquier material, natural o artificial que comprende la totalidad o parte de una estructura viva o dispositivo biomédico que realiza, aumenta o reemplaza una función natural. Algunas de las primeras aplicaciones de biomateriales se encontraron en la antigua Fenicia, donde los dientes flojos se unan con alambres de oro para atar los artificiales a los dientes vecinos. Por otro lado, los mayas fabricaron dientes de nácar a partir de conchas de mar en aproximadamente 600 dC y aparentemente lograron lo que ahora llamamos integración ósea. Del mismo modo, un cadáver con fecha de 200 dC con un implante dental de hierro fue encontrado en Europa.

Los biomateriales son sustancias no viables las cuales son capaces de funcionar con éxito después de la implantación y están destinados a interactuar con los sistemas biológicos. Los rasgos característicos de estos materiales son proporcionados debido a una combinación adecuada de propiedades químicas, mecánicas, físicas y biológicas. Los biomateriales son diseñados a partir de diferentes materiales entre los cuales se encuentran: polímeros, metales, materiales naturales y cerámicos. La mayoría de los biomateriales disponibles en la actualidad se desarrollan individualmente o en combinación con los materiales de estas clases. A veces, dos clases diferentes de materiales se combinan en un material compuesto, como el caucho de silicona reforzado con sílice o el poli (ácido láctico reforzado con partículas de fibra de carbono o hidroxiapatita). Debido a que estas clases de materiales tienen diferentes disposiciones atómicas las cuales presentan propiedades estructurales, físicas, químicas y mecánicas diversificadas, por lo tanto, ofrecen diversas aplicaciones alternativas en el cuerpo.

Las características fundamentales que debe poseer un biomaterial para funcionar con éxito como implante en el sistema vivo son:

No toxicidad, un biomaterial debe cumplir su propósito en el entorno del cuerpo sin afectar órganos. Para eso, un biomaterial no debe ser tóxico. En general, la no toxicidad se refiere al material biológico no carcinogénico, no pirógeno, no alergénico, compatible con la sangre y no inflamatorio.

Biocompatibilidad, la cual generalmente se define como la capacidad de un biomaterial, prótesis o dispositivo médico para funcionar con una respuesta adecuada en el huésped durante una aplicación específica. Todos los materiales destinados para aplicación en humanos sufren respuestas tisulares al ser implantadas en tejido vivo. La “respuesta apropiada en el huésped” incluye la ausencia de coagulación sanguínea, resistencia a la colonización bacteriana y el calentamiento normal. Para que un implante de biomaterial funcione correctamente en el cuerpo, el implante debe ser biocompatible.

Bioinerte, La secuencia de reacción que se genera debido a la presencia de un cuerpo extraño en un sistema biológico se denomina “reacción de un cuerpo extraño”. Esta reacción diferirá en intensidad y duración dependiendo del sitio anatómico involucrado. Un biomaterial debe funcionar según lo previsto y no presentar ningún daño significativo para el portador (Raghavendra, Varaprasad, and Jayaramudu 2015; Ratner et al. 2012).

2.2.1 Polímeros

Muchos tipos de polímeros son ampliamente utilizados en biomedicina. Dispositivos entre los cuales se encuentran implantes ortopédicos, dentales, de tejidos blandos y cardiovasculares. Los polímeros representan la clase más grande de biomateriales. Existen dos tipos de polímeros entre los cuales se encuentran los naturales y los sintéticos. La gran variedad de polímeros naturales relevantes para el campo de los biomateriales incluye materiales vegetales como la celulosa y el alginato de sodio, materiales de origen animal como las válvulas cardíacas, glucosaminoglicanos y heparina, y otros materiales naturales. Por otro lado, los polímeros sintéticos van desde materiales hidrofóbicos, como el polietileno y polipropileno, a algunos materiales más polares como el poli(cloruro de vinilo) y PLGA, a materiales hidrofílicos como el PEG. Algunos son biodegradables y se degradan en el cuerpo, mientras que otros pueden permanecer sin cambios durante la vida del paciente. Tanto los polímeros naturales como los

sintéticos son moléculas de cadenas largas, las cuales consisten en una gran cantidad de pequeñas unidades repetitivas (Ratner et al. 2012).

2.2.2 Ácido poli (láctico-co-glicólico)

PLGA es un polímero biodegradable y biocompatible, el cual ha sido ampliamente utilizado en las últimas dos décadas. Este polímero exhibe una amplia gama de tiempos de erosión, tiene propiedades mecánicas ajustables y, lo más importante, es un polímero aprobado por la FDA esto se debe a que su hidrólisis conduce a los monómeros metabólicos ácido láctico y ácido glicólico. Algunas de las características de PLGA es que puede procesarse en casi cualquier forma y tamaño, y puede encapsular moléculas de prácticamente cualquier tamaño. Es soluble en una amplia gama de disolventes comunes entre los cuales se encuentran disolventes clorados, tetrahidofurano, acetona o acetato de etilo. En agua, este polímero se biodegrada por hidrólisis de sus enlaces éster. La presencia de grupos laterales de metilo en el ácido láctico (PAL) lo hace más hidrofóbico que el ácido glicólico (PAG), por lo tanto, los copolímeros de PLGA ricos en ácido láctico son menos hidrofílicos, por lo cual absorben menos agua y consecuentemente se degradan más lentamente. En la figura 2 se puede observar la estructura del PLGA, siendo la subunidad (x) la correspondiente al PAG y la (y) la correspondiente a PAL.

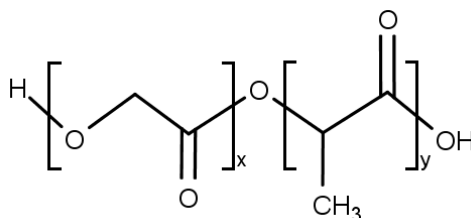


Figura 2. Estructura del Ácido poli (láctico-co-glicólico).

La resistencia mecánica del polímero se ve afectada por propiedades físicas como el peso molecular y el índice de polidispersidad. Estas propiedades también afectan la capacidad de formularse como un dispositivo de administración de medicamentos y pueden controlar la velocidad de degradación de este y su hidrólisis. La proporción 50:50 de PAL/ PAG, exhibe la degradación más rápida. Se ha visto que la temperatura de transición vítrea (T_g) de los copolímeros de PLGA está por encima de la temperatura fisiológica de 37°C y, por lo tanto, es de naturaleza vítrea, por lo que presenta una estructura de cadena

bastante rígida. Se ha informado además que la Tg de PLGA disminuye con una disminución del contenido de PAL en la composición del copolímero y con una disminución en el peso molecular (Makadia and Siegel 2011).

2.2.3 Polietilenglicol (PEG)

PEG es un polímero compuesto por varias subunidades de óxido de etileno. Cada subunidad de óxido de etileno tiene un peso molecular de 44 Da, por lo cual el peso molecular de este polímero depende de la cantidad de subunidades que contenga. En la figura 3 se puede observar la estructura de este biopolímero. PEG es un polímero inerte, no tóxico, no inmunogénico, que se encuentra actualmente aprobado por la FDA para su uso interno en humanos. Contiene dos terminaciones de grupos hidroxilo los cuales pueden ser químicamente activados (Bailon et al. 1998). Para acoplar PEG a una molécula es necesaria la activación de este, para así poder añadir un grupo funcional en uno o ambos lados extremos de la cadena del polímero. El grupo funcional que será añadido se elige según el tipo de grupo reactivo que posea la molécula que acoplará al polímero (Roberts, Bentley, and Harris 2012).

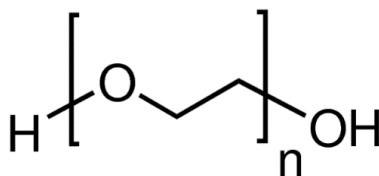


Figura 3. Estructura del polietilenglicol (PEG).

2.3 Mecanismos de Modificación de Biomateriales

2.3.1 PEGilación

La PEGilación consiste en la modificación de una molécula biológica, conjugándola mediante enlace covalente con PEG, este proceso cambia tanto las propiedades físicas como químicas, como su conformación, la interacción electrostática, hidrofobicidad, y resulta en un mejoramiento en el comportamiento farmacocinético de algunos fármacos. Así como también la PEGilación mejora la

solubilidad, aumenta el tiempo de circulación en sangre, y disminuye la inmunogenicidad debido a que provee de un escudo contra antígenos y epítomos inmunogénicos lo cual le permite evadir el sistema retículo endotelial previniendo el reconocimiento y degradación mediante enzimas proteolíticas (Roberts, Bentley, and Harris 2012; Veronese 2008)

En el caso de las NP, funciona de una manera muy similar, debido a que proporcionándoles un revestimiento en la superficie con polímeros hidrofílicos como lo es el PEG, proporciona una capa la cual sirve como estabilizante de las partículas ya que con ella se vuelven invisibles ante el SFM, incrementando su tiempo de circulación en plasma lo cual resulta en un mejoramiento en la vida media y biodisponibilidad del fármaco encapsulado en las partículas. También aumentando el tiempo de circulación en plasma aumenta la probabilidad de que las partículas lleguen al sitio en el que deben actuar (Khalil et al. 2013b). El mecanismo de protección que provee PEG se ha asociado a la gran flexibilidad que posee la cadena de este polímero, lo cual le permite la rotación libre de sus unidades proveyendo a las NP un escudo altamente hidrofílico, lo cual impide la interacción de las partículas con macromoléculas del cuerpo (Betancourt et al. 2009).

2.3.2 Carbodiimidas

Las carbodiimidas son agentes de entrecruzamiento de longitud cero utilizados para mediar la formación de un enlace amida o fosforamido entre un grupo carboxilo y una amina o un grupo fosfato y una amina, respectivamente. Se denominan reactivos de longitud cero, porque al formar estos enlaces no se introduce una estructura química adicional entre las moléculas conjugadoras. Hay varios tipos de carbodiimidas, los cuales pueden utilizarse para hacer reacciones orgánicas o acuosas, dependiendo de las características de solubilidad de los agentes a reaccionar. Los reactivos solubles en agua se utilizan principalmente para conjugaciones biológicas que involucran proteínas y otras macromoléculas. Mientras que las carbodiimidas insolubles en agua pueden utilizarse para la síntesis de péptidos u otros compuestos orgánicos (Bott 2014). El método de carbodiimidas fue introducido por Sheehan y Hess en el año de 1955. Este método fue desarrollado para la síntesis de péptidos mediante el uso de dicitohexilcarbodiimida (DCC) el propósito de este método es la formación de enlaces peptídicos. Las carbodiimidas pueden reaccionar con ácidos carboxílicos formando un intermediario llamado O-acilisourea, el cual es un agente altamente reactivo con una vida corta. El ataque de un nucleófilo de amina sobre el grupo carbonilo de este éster da como resultado la pérdida del derivado de isourea y la formación de un enlace amida (figura 4).

La primera mejora del método de acoplamiento por carbodiimidas se originó en 1966, cuando descubrieron que la adición de N-hidroxisuccinimida (NHS) a la mezcla de la reacción dio un rendimiento mucho mayor (75%) (Wünsch and Drees 1966). Investigaciones posteriores del efecto que tiene el NHS en esta reacción revelaron que las dos deficiencias más graves del método de carbodiimidas, la racemización durante la condensación de fragmentos y la formación de acilureas, puede ser suprimida casi por completo mediante la adición de 2 equivalentes a una mezcla de acoplamiento peptídico en tetrahydrofurano o dimetilformamida a -20°C (RICH and SINGH 2014; Williams and Ibrahim 1981). NHS es quizás la química de activación más común para crear agentes de acilación reactivos. Hoy en día, una gran mayoría de los reactivos de entrecruzamiento o modificación con aminas utilizan ésteres de NHS. Se puede formar un éster de NHS mediante la reacción de un carboxilo con NHS en presencia de una carbodiimida. Para preparar derivados de ésteres de NHS estables, la reacción de activación debe realizarse en condiciones no acuosas utilizando carbodiimidas insolubles en agua o agentes de condensación como DCC (Bott 2014).

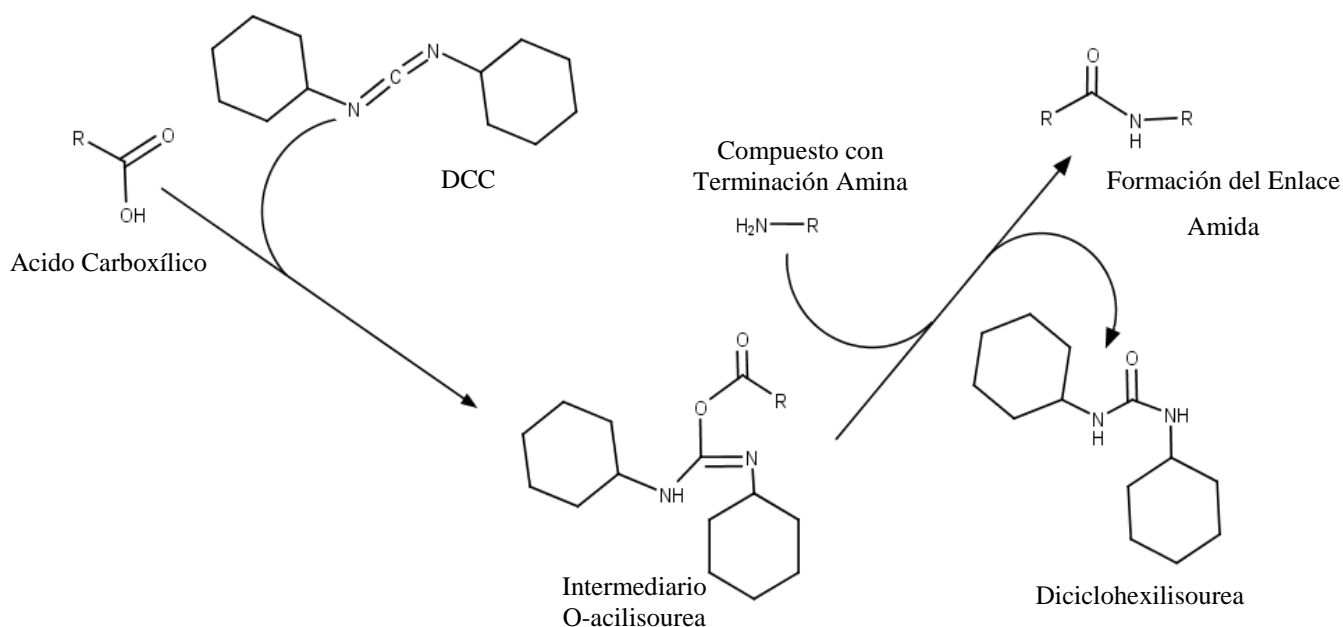


Figura 4. Reacción de Dicitlohexilcarbodiimida para formar Amidas

2.3.3 Avidina-Biotina

La biotina, es una molécula conocida como vitamina B7 o coenzima R, la cual se compone de un anillo ureido (tetrahydroimidizona) fusionado con un anillo de tetrahydrotiofeno. Esta vitamina es un promotor de crecimiento a nivel celular; funciona como una coenzima para las enzimas carboxilasas en la

preparación de ácidos grasos, isoleucina y valina; Y participa en la gluconeogénesis. También desempeña funciones esenciales en la señalización celular, la regulación de genes epigenéticos y la estructura de la cromatina (Ren et al. 2015).

Por otro lado, avidina es una glicoproteína que se encuentra en la clara de huevo aviar, reptiliana y anfibia, y se usa principalmente en el área clínica. La proteína avidina está compuesta por cuatro subunidades idénticas, cada una de 128 aminoácidos de longitud, cuya secuencia de aminoácidos se conoce desde 1971 (Hood et al. 1997).

Una de las características de la biotina es que puede unirse a la avidina o su análogo bacteriano, la estreptavidina, proveniente de la bacteria *Streptomyces*, con un alto grado de afinidad (K_d de 10^{-13} a 10^{-15} M), a través de enlaces no covalentes, tal unión provoca una respuesta inmune relativamente baja in vivo. El enlace avidina-biotina es la interacción proteína-ligando más fuerte que se conoce en la naturaleza. Otra característica distintiva de este sistema son los múltiples (cuatro) sitios de unión de la avidina para la biotina. En la figura 5, podemos observar un diagrama del complejo Avidina-Biotina. Esto nos brinda la posibilidad de un enlace cruzado entre diferentes moléculas que contienen biotina y agrega otra dimensión al uso de este sistema multifacético. La semivida de disociación de esta unión es de aproximadamente 3 meses (Pulkkinen et al. 2008; Ren et al. 2015).

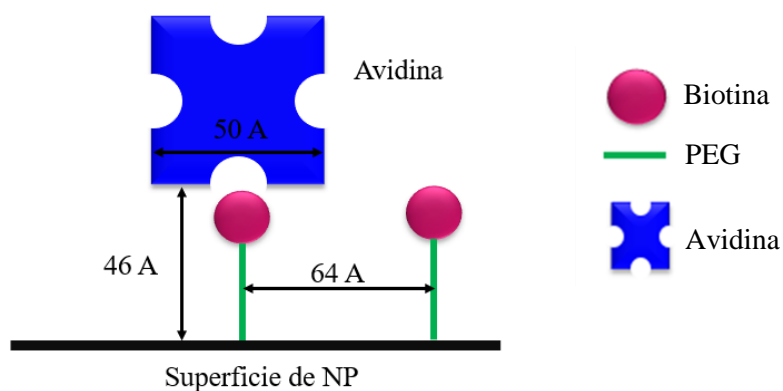


Figura 5. Diagrama del complejo Avidina-Biotina. Avidina tiene cuatro sitios activos de unión para Biotina. Imagen modificada de (Weiss et al. 2007).

NeutrAvidina es una versión desglucosilada de avidina que tiene alta afinidad y especificidad por la biotina (punto isoelectrico casi neutro a pH 6,3). Sin embargo, debido a la fuerte interacción entre la avidina y la biotina, no es posible liberar el fármaco o cualquier biomaterial en un momento específico o en un sitio

objetivo adecuado. Por lo tanto, CaptAvidina y Switchavidina se introdujeron recientemente para regular la unión a la biotina. CaptAvidina tiene una nitración selectiva de los residuos de tirosina en cuatro sitios de unión a biotina, lo que la hace particularmente útil para la separación y purificación de biomateriales conjugados con biotina. Por lo tanto, los biomateriales biotinilados se adsorben a un pH neutro y se liberan de CaptAvidina por encima de pH 9. Switchavidina es una avidina de pollo mutante con una capacidad de unión reversible a la biotina debido a su carga superficial reducida. Por lo tanto, Switchavidina puede usarse como un material típico para la inmovilización reversible de proteínas biotiniladas para purificación y etiquetado.

2.4 Administración de Fármacos

2.4.1 Suministro Dirigido.

El suministro dirigido de fármacos tiene como objetivo aumentar la especificidad de la administración y el efecto terapéutico del fármaco, de modo que el fármaco alcance la mayor cantidad posible la ubicación deseada, reduciendo así los efectos secundarios relacionados con la acumulación inespecífica en otros órganos o compartimentos celulares. Uno de los propósitos principales es evadir el sistema inmunológico, para aumentar el tiempo de circulación de la partícula y así acceder simultáneamente a los procesos de transporte y tráfico endógenos. Evitar los procesos de eliminación de partículas durante el mayor tiempo posible permite más oportunidades de circulación, lo que aumenta la posibilidad de que ocurran eventos de focalización, y posiblemente también disminuya la velocidad a la que el sistema reticuloendotelial debe tratar las partículas (Mahon et al. 2012)

Una estrategia común para lograr el suministro deseado a nivel celular es funcionalizar la superficie de las nanopartículas con biomoléculas, cuyos receptores se expresan en exceso en las células a las que se dirige. El suministro dirigido de forma pasiva se logra mediante la modificación de la superficie de las nanopartículas utilizando moléculas hidrofílicas como el PEG. Estos enlazadores evitan la captación de nanopartículas por el RES y, por lo tanto, aumentan el tiempo de circulación en la sangre.

Por otro lado, la orientación activa ayuda a entregar el medicamento al sitio de acción, mientras minimiza su exposición en otras regiones. Esta selección de nanopartículas puede aumentar potencialmente la eficacia

y reducir la toxicidad de los agentes terapéuticos. Esto se logra conjugando la superficie de las nanopartículas utilizando ligandos celulares específicos. Los ligandos dirigidos a las células pueden clasificarse en 3 tipos: moléculas pequeñas (folato, biotina, galactosa, glucosa y manosa), péptidos pequeños y proteínas (transferrina y anticuerpos) (Boddu and Vaishya 2012).

2.4.2 Mecanismos de Liberación de Fármacos en Nanopartículas de PLGA

Las características de liberación de las NP son una de las propiedades más importantes a la hora de hacer las formulaciones de polímero-fármaco, y estas varían según la administración sostenida que se desee.

El término “mecanismo de liberación” se ha definido de maneras diferentes. Se ha utilizado como una descripción de la forma en que se transportan o liberan los fármacos, y como una descripción del proceso que determina la velocidad de liberación. Existen tres formas posibles para que las moléculas de los fármacos se liberen de un sistema de administración de fármacos (DDS) basado en PLGA: 1) transporte a partir de poros llenos de agua, 2) transporte a través de la matriz polimérica, y 3) debido a la disolución del polímero de encapsulación (Figura 6).

El transporte a través de los poros llenos de agua es la forma más común de liberación, debido a que el fármaco encapsulado suele ser de origen biológico, como una proteína o un péptido, estas moléculas al ser demasiado grandes e hidrofílicas, es difícil que sean transportadas a través de la fase del polímero. La difusión es el método más común de transporte a través de poros de agua, es decir, los movimientos aleatorios de las moléculas impulsadas por el gradiente de potencial químico, que a menudo se pueden aproximar por el gradiente de concentración.

La otra forma de transporte a través de poros llenos de agua es la convección, la cual actúa impulsada por una fuerza tal como la presión osmótica. La presión osmótica se puede crear por la entrada de agua en un sistema que no se hincha. El transporte de fármacos impulsado por esta fuerza se denomina bombeo osmótico y se observa más comúnmente en los sistemas de administración de fármacos que utilizan otros polímeros, como la etil celulosa. Los dos principales mecanismos de liberación de fármacos son la difusión y la degradación/erosión. A menudo se dice que la velocidad de liberación está controlada por estos dos mecanismos durante la etapa final del periodo de degradación. No obstante muchos procesos o eventos influyen en la velocidad de difusión del fármaco y la cinética de degradación, algunos ejemplos son las

interacciones entre el polímero y el fármaco, interacciones entre fármaco y fármaco, absorción de agua, y cierre de poros (Fredenberg et al. 2011).

También existe liberación de fármaco causada por una explosión inicial, se cree que la liberación de la explosión inicial es causada debido a una ineficiente encapsulación del fármaco, o un fármaco adsorbido en el exterior de las partículas. Cuando se usan polímeros, que interactúan con un medicamento, como PLGA el cual tiene un grupo libre de COOH, la liberación de la explosión es menor y en algunos casos no se presenta, y la liberación del fármaco es prolongada (Hans and Lowman 2002)

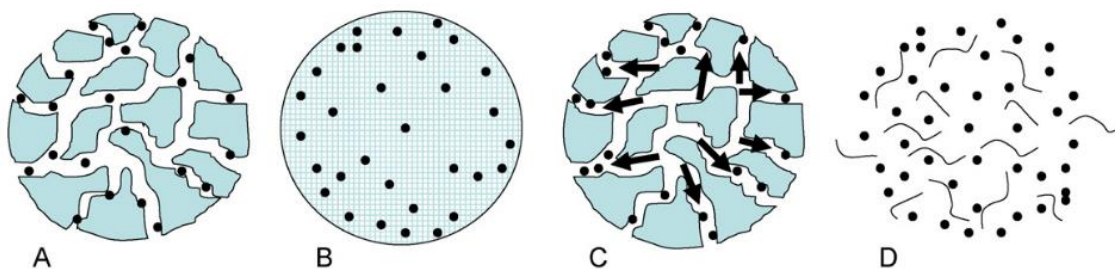


Figura 6. Mecanismos de liberación A) Difusión a través de poros llenos de agua, B) Difusión a través del polímero, C) Bombeo osmótico, D) Erosión. Imagen tomada de (Fredenberg et al. 2011).

2.4.3 Aplicaciones de las Tecnologías de Avidina-Biotina en los Sistemas de Administración Dirigida.

La interacción avidina-biotina se ha utilizado para la modificación de la superficie de las NP formuladas a partir de polímeros, para la administración y distribución de medicamentos. Una de las estrategias, la avidina está unida covalentemente a un resto lipídico como el ácido palmítico, el cual se incorpora a la fase oleosa de una emulsión para formar NP de polímeros sólidos.

Las NP formuladas a partir de PLGA y conjugados de avidina y lípidos se modificaron superficialmente con PEG para mejorar la penetración en el tejido, o con los ligandos de péptidos y anticuerpos para mejorar la captación y la liberación intracelular de la carga útil del fármaco. Se puede encapsular una variada cantidad de agentes terapéuticos dentro de NP de PLGA, incluyendo moléculas pequeñas, proteínas y oligonucleótidos. Los agentes encapsulados están protegidos contra el aclaramiento y la degradación en entornos biológicos, lo que permite que los agentes se liberen lentamente por difusión mientras que el

polímero se degrada por hidrólisis. Por lo tanto, cuando se envían directamente a un sitio en específico, las NP pueden mejorar la potencia del fármaco y limitar la exposición sistémica (Ren et al. 2015).

2.4.4 Potencial Zeta y su Efecto en la Administración de Fármacos

La superficie de las NP es algo que se debe considerar al momento de querer hacer un suministro dirigido de fármacos. Las NP convencionales (sin modificación de superficie) y las que poseen una carga negativa, pueden ser rápidamente opsonizadas o eliminadas masivamente por macrófagos del SRE en el torrente sanguíneo. La modificación de la superficie de los sistemas de administración de fármacos es la estrategia más común para controlar el proceso de opsonización y, por lo tanto, mantener los sistemas durante un período más largo en el torrente sanguíneo. Un ZP adecuado puede mejorar los perfiles de liberación de fármacos en sitios específicos, así como su estabilidad en las formas de dosificación (S Honary and Zahir 2013).

El potencial zeta (PZ) es un término científico para el potencial electrocinético en sistemas coloidales que tiene un efecto importante en las diversas propiedades de los sistemas de administración de fármacos a nano escala. Este término expresa la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido unido a la partícula dispersada. La medición del PZ es actualmente la forma más sencilla y directa de caracterizar la superficie de los coloides cargados, y las conclusiones se extraen fácilmente del análisis de sus datos sobre la concentración, la distribución, la adsorción, la ionización, la exposición o el blindaje de los restos cargados; Su unidad suele ser milivoltio. En la figura 7 se puede observar un esquema del potencial zeta de las partículas.

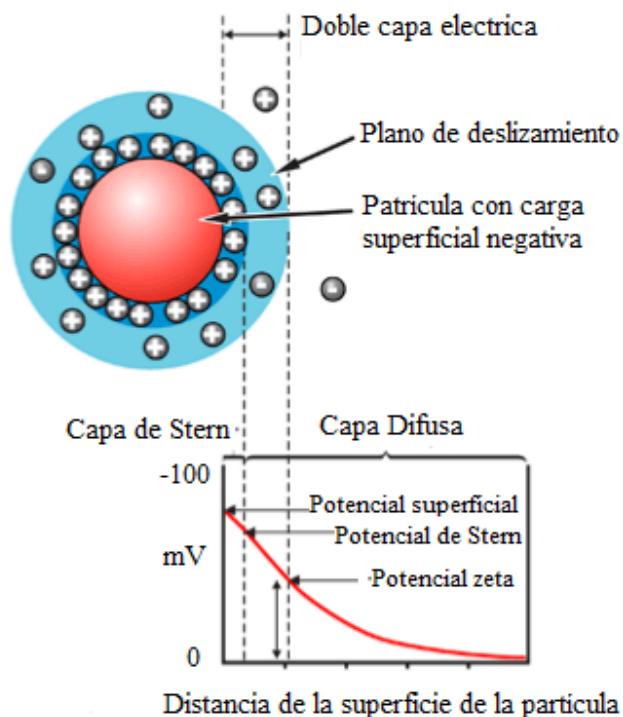


Figura 7. Representación esquemática del Potencial Zeta. Imagen tomada de (Tengku Mohd et al. 2016).

2.4.4.1 Potencial Zeta y Entrega de Fármacos dirigidos

El ZP es una característica muy importante de los nanosistemas ya que puede afectar las propiedades farmacocinéticas en el cuerpo, y la fagocitosis en el torrente sanguíneo. La superficie de las NP es una consideración muy importante en la administración de fármacos, debido a que al momento de estar en el torrente sanguíneo las NP cargadas negativamente pueden ser opsonizadas rápidamente y ser eliminadas masivamente mediante macrófagos fijos. Es bien sabido que el RES, principalmente el hígado y el bazo, es un obstáculo importante para la selección activa debido a su capacidad para reconocer estos sistemas, eliminarlos de la circulación sistémica y, en consecuencia, evitar el suministro efectivo de las NP a órganos distintos a los de la RES. La modificación de la superficie de las NP con polímeros hidrofílicos es la forma más común de controlar el proceso de opsonización y mejorar las propiedades de la superficie, especialmente la carga de la superficie, del sistema.

2.4.4.2 Efecto del Potencial Zeta en la Captación Celular

Las propiedades fisicoquímicas, tales como el tamaño de la partícula, la forma y la carga superficial, desempeñan un papel clave en la absorción celular de las NP. La captación de las NP por las células se puede describir como un proceso de dos pasos, siendo el primero la unión de la partícula a la membrana celular, mientras que el segundo paso sería la internalización a la célula. El paso que se ve más afectado por la carga superficial es la unión a la membrana celular, la variación de la carga de la superficie de las partículas podría potencialmente controlar la unión al tejido y dirigir las NP a los compartimentos celulares tanto in vivo como in vitro. En la superficie de las células predominan proteínas llamadas proteoglicanos, las cuales poseen carga negativa y desempeñan funciones fundamentales en la proliferación celular, migración y la motilidad. Por otro lado, los glicosaminoglicanos son moléculas altamente aniónicas las cuales interactúan entre los proteoglicanos y la superficie de las NP, las cuales si están cargadas positivamente tienden a ser en gran parte iónicas. Una vez dentro de la célula, se produce la degradación de los polímeros, pero también es posible dirigirse a orgánulos intracelulares específicos dependiendo de la carga superficial y los ligandos unidos. Las nanopartículas con mayor carga superficial se unen fuertemente a la membrana celular y muestran una mayor captación celular, donde las interacciones electrostáticas entre la membrana y las nanopartículas facilitan la captación (Soheyla Honary and Zahir 2013).

2.4.4.3 Efecto del Potencial Zeta en los Sistemas de Administración de Fármacos

Los efectos que más influyen en la transfección de un vector genético es el tamaño de partícula y la carga superficial o ZP. Debido a que una gran cantidad de proteínas, el ADN, y la superficie de la membrana celular son ligeramente aniónicas, las NP con un ZP positivo no solo tienen beneficios para una mayor eficiencia de carga de ADN, sino que también pueden provocar la acumulación efectiva en las células objetivo o diana. Las nanopartículas catiónicas combinan las ventajas de las NP como portadores de fármacos y la capacidad de atrapar el ácido nucleico y actuar como portadores de genes. Con las mejores propiedades de biocompatibilidad y fácil producción, estas partículas catiónicas han ganado cada vez más atención en el área de suministro de genes.

2.4.4.4 Efecto del Potencial Zeta en la Captación de Macrófagos

Existe una gran proporción en las NP en cuanto al área de superficie/ volumen lo cual propicia a la aglomeración y absorción de proteínas. Cuando se unen proteínas a estas partículas, los macrófagos pueden eliminarlas rápidamente, provocando que no puedan llegar a las células diana. Esto también puede desencadenar la agregación de los componentes en el suero y la formación de trombos, provocando una embolia en el huésped. Una alternativa para aumentar el tiempo de circulación de las NP en el torrente sanguíneo es modificar la superficie de las partículas, para así minimizar o eliminar la absorción de proteínas. El mecanismo de adsorción de proteínas se ha atribuido a la interacción electrostática. La interacción electrostática de las nanopartículas puede controlarse mediante la variación de sus cargas superficiales, que puede determinarse midiendo el potencial zeta de estas (S Honary and Zahir 2013).

2.4.5 Efecto del Tamaño

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

Varios estudios han demostrado que las NP de tamaño submicrométrico tienen una serie de ventajas sobre las micropartículas (MP) como sistema de administración de fármacos. En general, las NP tienen una absorción intracelular relativamente mayor en comparación con las micropartículas y están disponibles para una gama más amplia de objetivos biológicos debido a su pequeño tamaño y movilidad relativa. Una de las ventajas de las NP es que su tamaño puede ser ajustable. El tamaño de las NP utilizado en un sistema de administración de fármacos debe ser lo suficientemente grande como para evitar la fuga rápida en los capilares sanguíneos, pero lo suficientemente pequeña como para escapar de la captura de macrófagos fijos alojados en el RES, como el hígado y el bazo. El tamaño de la sinusoide en el bazo y la fenestra de las células de Kuffer en el hígado varía de 150 a 200nm, y el tamaño de la unión entre las células endoteliales de la vasculatura tumoral permeable puede variar de 100 a 600 nm. Por lo tanto, el tamaño de las NP debe ser mayor a 100 nm para poder alcanzar los tejidos tumorales al pasar por estas dos estructuras vasculares (Cho et al. 2008; Mohanraj and Chen 2006). Desai et al encontraron que las nanopartículas de 100 nm tenían una absorción 2.5 veces mayor que las MP de 1µm, y una absorción 6 veces mayor que las MP de 10 µm en una línea celular de Caco-2 (Desai et al. 1997).

2.4.5 Oponización

La oponización es el proceso mediante el cual un organismo o partícula extraña es cubierto por proteínas llamadas opsoninas, al ocurrir esto, los materiales o cuerpos extraños se vuelven más visibles ante las células fagocíticas. Después de este proceso puede producirse la fagocitosis, la cual es la eventual destrucción o eliminación de materiales extraños del torrente sanguíneo. La oponización junto con la fagocitosis forma el principal mecanismo de eliminación de componentes indeseables. En el caso de las NP, normalmente no pueden ser destruidas por los fagocitos, por lo tanto, suele ocurrir el secuestro por medio de los órganos del sistema SFM.

La oponización o remisión de las NP portadoras de fármacos por el cuerpo mediante el SFM, también se conoce como sistema retículo endotelial (RES), este es el mayor obstáculo con el que se encuentran las NP para lograr su objetivo. Los macrófagos del SFM tienen la habilidad de remover NP que no se encuentran protegidas del torrente sanguíneo a los pocos segundos de su administración intravenosa, volviéndolas ineficientes como sistema de entrega de fármacos. Estos macrófagos, que son normalmente células de Kupffer, o macrófagos del hígado, no pueden identificar directamente las NP, sino que reconocen proteínas opsoninas específicas unidas a la superficie de las partículas.

En términos generales, las opsoninas son cualquier componente del suero sanguíneo que ayuda en el proceso de reconocimiento fagocítico, pero las proteínas del complemento como C3, C4 y C5 y las inmunoglobulinas suelen ser las más comunes. Se han desarrollado varios métodos de camuflaje o enmascaramiento para las NP, los cuales les permiten evitar temporalmente el reconocimiento por parte del SFM y aumentar su vida media en la circulación sanguínea. Una de las maneras de proteger a las NP de su rápida eliminación del torrente sanguíneo es la PEGilación (Owens and Peppas 2006).

2.5 Técnicas Generales de Análisis Molecular y de Nanopartículas

2.5.1 Electroforesis por Láser Doppler

Electroforesis por láser Doppler (LDE) es una técnica analítica para la determinación de la movilidad electroforética de partículas en suspensión o de macromoléculas en solución. Esta técnica es una

combinación entre la electroforesis, el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, velocimetría de láser Doppler, dando como resultado a una técnica para determinar las velocidades de las partículas midiendo el desplazamiento Doppler de la luz láser que se dispersa desde ellas (Smith and Ware 1978). En la figura 8, se puede observar una representación esquemática del funcionamiento de esta técnica. PZ y la movilidad electroforética están relacionados con la ecuación de Henry, es decir:

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta F(\kappa a)}{3\eta}$$

Donde U_E es la movilidad, ζ es el PZ, η es la viscosidad del fluido, $F(\kappa a)$ es la función de Henry y κ es el inverso de la longitud de detección de Debye. Dependiendo del tamaño del coloide y de las condiciones del electrolito de soporte, se aplica el prefactor $F(\kappa a)$, ya sea 1.0 o 1.5, dependiendo del tamaño de la partícula y de las condiciones del electrolito de la solución. Bajo el análisis de fase, la dispersión de la luz del desplazamiento de frecuencia asociado con el movimiento electroforético se deriva de la transformada de Fourier de la franja transitoria de Moiré, es decir:

$$\Delta\nu = 2U_e \frac{\sin(\theta/2)}{\lambda}$$

siendo esta la base de LDE(Tucker et al. 2015).

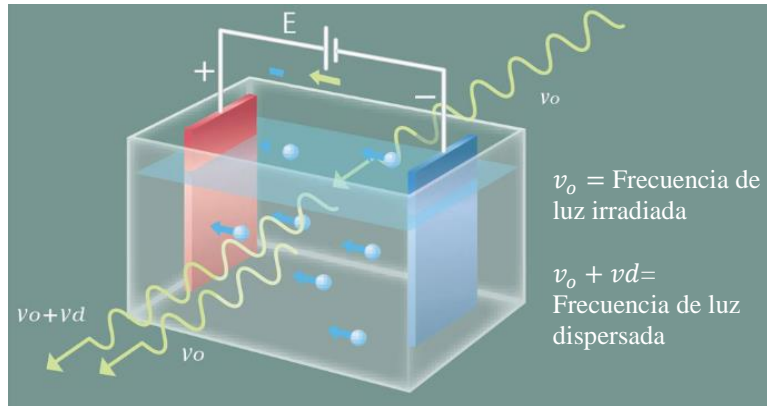


Figura 8. Representación esquemática de la técnica de electroforesis por láser Doppler para la medición del potencial zeta. Imagen tomada de (Alexandr Shimko, Anastasia Povolotckaia, and Aelexandra Mikhaylova 2014).

2.5.2 Dispersión Dinámica de Luz

La dispersión dinámica de luz (DLS) es el conjunto de técnicas más versátiles y útiles para la medición in situ de los tamaños, distribución de tamaño y en algunos casos las formas de las nanopartículas en líquido (R. Pecora 2000). DLS también es conocido como espectroscopía de correlación de fotones (PCS) y dispersión de luz cuasi-elástica (QELS). Las partículas en solución experimentan un movimiento browniano debido a colisiones aleatorias entre las moléculas del disolvente y las partículas. Como consecuencia de este movimiento de partículas, la dispersión de la luz del conjunto de partículas fluctúa con el tiempo. La autocorrelación de estas fluctuaciones temporales en la intensidad de la luz dispersada se evalúa para determinar la intensidad ponderada del coeficiente medio de difusión (m^2/s), D , de las partículas (Figura 9). El diámetro hidrodinámico promedio, d_p , puede entonces ser calculado a partir del coeficiente de difusión utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d_p = \frac{kT}{3\pi\mu D}$$

Donde k es la constante de Boltzmann (J K^{-1}), T es la temperatura absoluta y μ es la viscosidad del medio ($\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$). El diámetro hidrodinámico es el diámetro de una esfera que tiene el mismo coeficiente de difusión de las partículas. Considerando que varios grupos de tamaño de partículas están a menudo presentes en una solución, es necesaria una distribución de tamaño para describir la dispersión (Jiang, Oberdörster, and Biswas 2009).

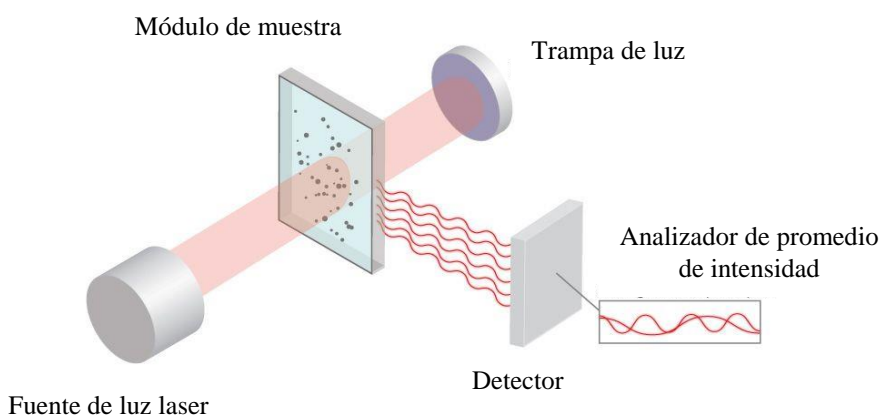


Figura 9. Diagrama de funcionamiento de Dispersión Dinámica de Luz. Imagen tomada del sitio web www.particletechlabs.com

2.5.3 Espectroscopia Ultravioleta-Visible

La espectroscopía ultravioleta-visible (UV-VIS) es uno de los métodos más antiguos en espectroscopía molecular. La formulación definitiva de la ley Bouguer-Lambert-Beer en 1852 creó la base para la evaluación cuantitativa de las mediciones de absorción en una fecha temprana. Esto condujo primero a la colorimetría, luego a la fotometría y finalmente a la espectrofotometría. En la figura 10, se puede apreciar un diagrama del funcionamiento de un espectrofotómetro UV-VIS.

La ley Bouguer-Lambert-Beer forma la base físico-matemática de las mediciones de absorción de luz en gases y soluciones en la región UV-VIS e IR

$$\lg = \left(\frac{I_0}{I}\right)_{\tilde{\nu}} = \lg\left(\frac{100}{T(\%)}\right)_{\tilde{\nu}} \equiv A_{\tilde{\nu}} = \varepsilon_{\tilde{\nu}} \cdot c \cdot d$$

Donde, $A_{\tilde{\nu}} = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right)_{\tilde{\nu}}$ es la absorbancia, $T_{\tilde{\nu}} = \frac{I}{I_0} \cdot 100$ en porcentaje es la transmitancia, $\varepsilon_{\tilde{\nu}}$ es el coeficiente de extinción decadente molar, I_0 es la intensidad de la luz monocromática que ingresa a la muestra, I es la intensidad de esta luz que emerge de la muestra; c es la concentración de la sustancia absorbente de luz y d es la longitud de la ruta de la muestra en cm.

$$\varepsilon_{\tilde{\nu}} = \frac{A_{\tilde{\nu}}}{c \cdot d}$$

Con dimensiones de $\varepsilon_{\tilde{\nu}}$ de $1 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para “c” en mol l^{-1} o $1000 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ para “c” en $\text{mol } 10^{-1}$.

El coeficiente de extinción decadente molar, $\varepsilon_{\tilde{\nu}}$, es una cantidad característica de la sustancia que también depende del número de onda $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) o de la longitud de onda λ (nm). La correlación funcional entre $\varepsilon_{\tilde{\nu}}$ y el número de onda $\tilde{\nu}$ se denomina “espectro de absorción” de un compuesto (MASAGO 2005).

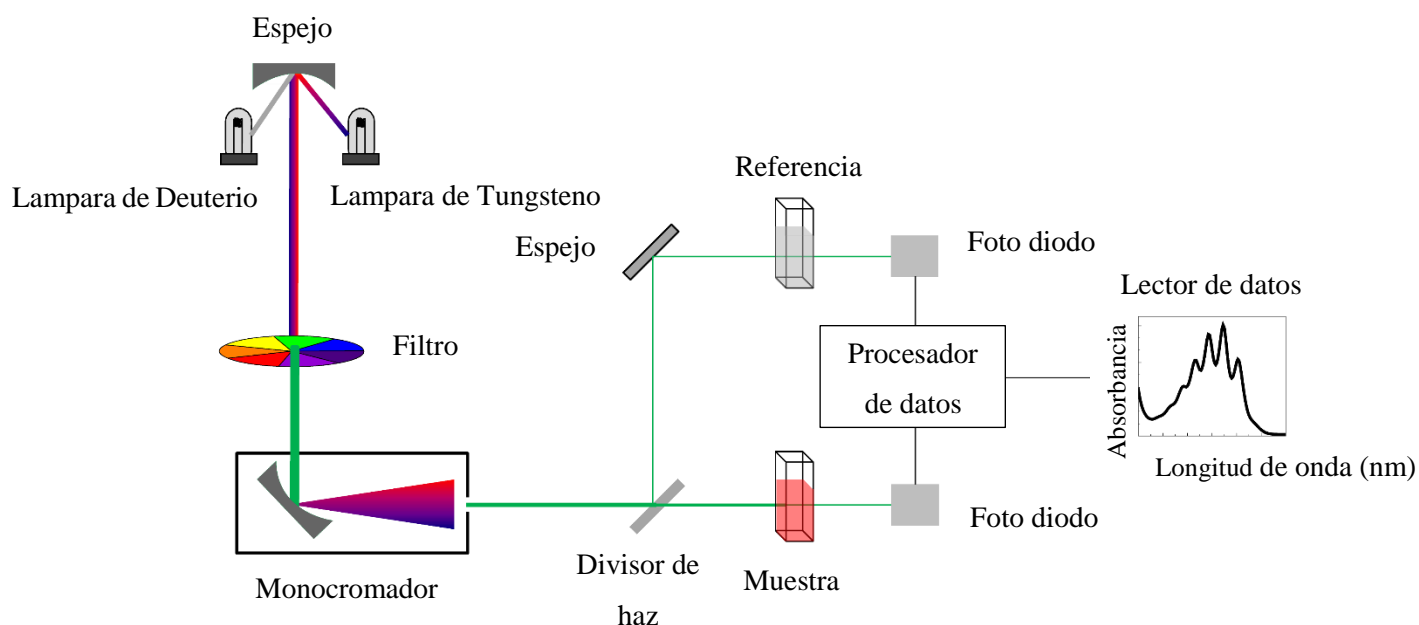


Figura 10. Diagrama del funcionamiento de un espectrofotómetro ultravioleta-visible. Figura tomada del sitio web chem.libretexts.org

2.5.4 Espectroscopia de Fluorescencia

La luminiscencia es la emisión de luz de cualquier sustancia, y ocurre desde estados excitados electrónicamente. La luminiscencia se divide formalmente en dos categorías: fluorescencia y fosforescencia, dependiendo de la naturaleza del estado excitado. En estados excitados singlete, el electrón en el orbital excitado se empareja (por rotación opuesta) con el segundo electrón en el orbital de estado fundamental. En consecuencia, el retorno al estado fundamental está permitido por rotación y ocurre rápidamente por la emisión de un fotón. Las tasas de emisión de fluorescencia son típicamente 10^8 s^{-1} , de modo que una vida útil de fluorescencia típica es cercana a 10 nano segundos ($10 \times 10^{-9} \text{ s}$).

Los espectros de fluorescencia en estado estacionario son cuando las moléculas, excitadas por una fuente constante de luz, emiten fluorescencia y los fotones emitidos, o la intensidad, se detectan en función de la longitud de onda. Un espectro de emisión de fluorescencia es cuando se fija la longitud de onda de excitación y se escanea la longitud de onda de emisión para obtener un gráfico de intensidad frente a la longitud de onda de emisión.

Un espectro de excitación de fluorescencia es cuando se fija la longitud de onda de emisión y se escanea la longitud de onda del monocromador de excitación. En la figura 11 se puede observar un diagrama esquemático de un espectrofluorómetro.

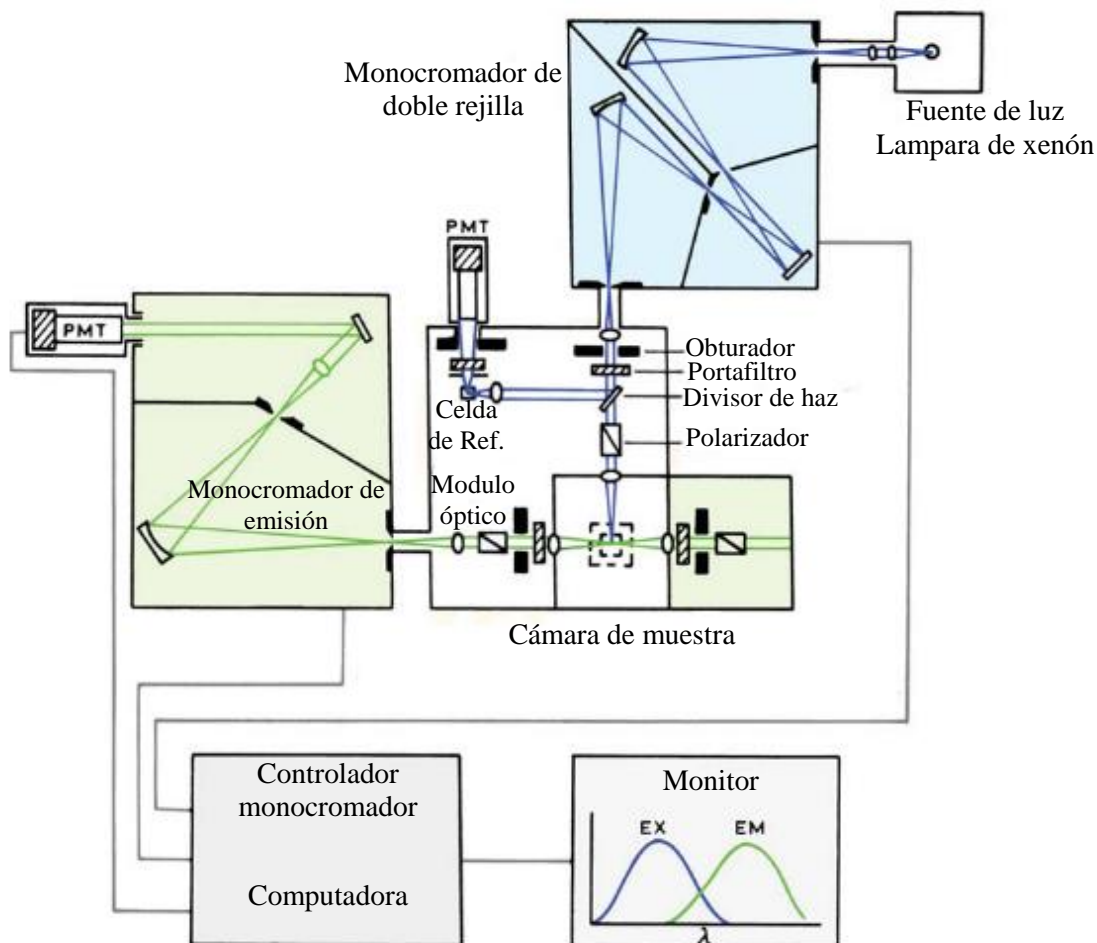


Figura 11. Diagrama esquemático de un espectrofluorómetro. Imagen tomada de (Lakowicz 2006b).

De esta manera, el espectro proporciona información sobre las longitudes de onda a las que una muestra absorberá para emitir en la longitud de onda de emisión única elegida para la observación. Es análogo al espectro de absorbancia, pero es una técnica mucho más sensible en términos de límites de detección y especificidad molecular.

Los espectros de excitación son específicos de una sola longitud de onda emisora/especie en oposición a un espectro de absorbancia, que mide todas las especies absorbentes en una solución o muestra. Los espectros de emisión y excitación para un fluoróforo dado son imágenes especulares entre sí. Típicamente, el espectro de emisión ocurre a longitudes de onda más altas (energía más baja) que el espectro de excitación o absorbancia.

Estos dos tipos espectrales (emisión y excitación) se utilizan para ver cómo está cambiando una muestra. La intensidad espectral y/o la longitud de onda máxima pueden cambiar con variantes como la temperatura, la concentración o las interacciones con otras moléculas a su alrededor. Esto incluye moléculas de desactivación y moléculas o materiales que implican transferencia de energía (Lakowicz 2006a, 2006b)

2.5.5 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier

La espectroscopía infrarroja se basa en el fenómeno de absorción infrarroja por vibraciones moleculares. Cuando una molécula es irradiada por ondas electromagnéticas dentro del rango de frecuencia infrarroja, una frecuencia particular puede coincidir con la frecuencia vibratoria de la molécula (ν_{vib}) donde ν es en número cuántico vibracional. En consecuencia, la vibración molecular será excitada por ondas con la frecuencia $\nu_{\text{ph}} = \nu_{\text{vib}}$. La excitación significa que la energía de la vibración molecular aumentará, normalmente en $\Delta\nu = +1$. Mientras tanto, las radiaciones electromagnéticas con la frecuencia específicas ν_{ph} serán absorbidas por la molécula porque la energía del fotón se transfiere para excitar las vibraciones moléculas. La transición fundamental de $\nu=0$ a $\nu=1$ dominan la absorción infrarroja, aunque pueden ser posibles otras transiciones.

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es la técnica espectroscópica vibracional más utilizada. FTIR es una espectroscopía infrarroja en la que se utiliza el método de transformada de Fourier para obtener un espectro en un rango completo de números de onda simultáneamente. Se diferencia del método dispersivo, que implica crear un espectro mediante la recopilación de señales en cada número de onda por separado. Actualmente, FTIR ha reemplazado casi por completo el método dispersivo ya que este tiene una relación señal/ruido mucho mayor que la del método dispersivo.

El componente clave en el sistema de FTIR es el interferómetro Michelson, como se ilustra esquemáticamente en la figura 12. La radiación infrarroja de una fuente ingresa al interferómetro. El interferómetro está compuesto por un divisor de haz y dos espejos. El divisor de haz transmite la mitad del

haz infrarrojo (IR) desde la fuente y refleja la otra mitad. Los dos haces divididos golpean un espejo fijo y uno móvil, respectivamente. Después de reflejarse desde los espejos, los dos haces divididos se combinan en el divisor de haces nuevamente para irradiar la muestra antes de que un detector reciba los haces.

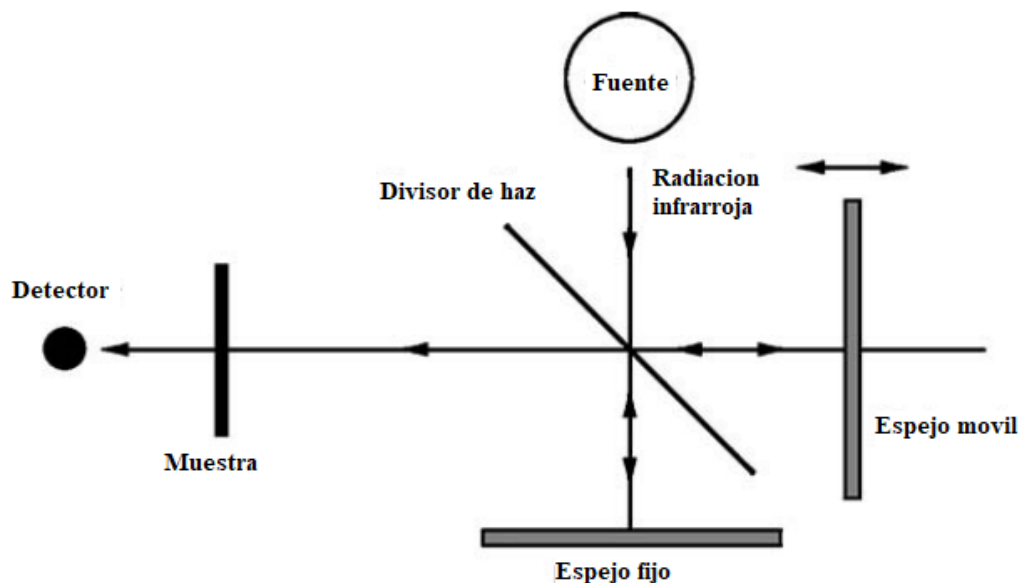


Figura 12. Diagrama de un interferómetro de Michelson en FTIR. Figura tomada de (Leng 2008).

La función del espejo móvil es cambiar las longitudes del camino óptico para generar interferencia de luz entre los dos haces divididos. Si el espejo móvil se encuentra a la misma distancia del divisor de haz que el espejo fijo, los caminos ópticos de los dos haces divididos son los mismos; por lo tanto, hay cero diferencia de ruta. Se introducirá una diferencia de trayectoria óptica (δ) al trasladar el espejo móvil lejos del divisor de haz. Los dos haces divididos mostrarán interferencia constructiva y destructiva periódicamente, con cambios continuos del valor δ . Habrá una interferencia completamente constructiva cuando $\delta = n\lambda$, pero completamente destructiva cuando $\delta = (\frac{1}{2} + n)\lambda$. Un cambio en el valor de δ es realizado al cambiar la posición del espejo móvil.

La transformada de Fourier es necesaria para convertir un interferograma en un espectro infrarrojo, que es una gráfica de la intensidad de la luz versus el número de onda. La transformada de Fourier se basa en el hecho de que cualquier función matemática puede expresarse como una suma de ondas sinusoidales. Toda la información de la intensidad de onda en función de la longitud de onda se incluye en la suma de las ondas

sinusoidales. En un instrumento de FTIR, la transformada de Fourier convierte la intensidad frente a la diferencia del camino óptico a la intensidad frente al número de onda. Se puede considerar que la diferencia del camino óptico se encuentra en el dominio del tiempo porque se obtiene multiplicando el tiempo con la velocidad de un espejo en movimiento. El número de onda puede considerarse en el dominio de la frecuencia porque es igual a la frecuencia dividida por la velocidad de la luz (Leng 2008).

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

PLGA terminación ácida (PLGA) (copolímero 50/50 DL-láctico/glicólico) con un peso molecular de 17,000 g/mol fue obtenido de Corbion Purac, Gorinchem, The Netherlands. Se obtuvo alcohol polivinílico (PVA; peso molecular promedio de ~31,000 a.m.u. y con 86.7-88.7 % mol de hidrolisis), Tabletas de buffer de fosfatos salino, Biotina, Avidina-FITC de clara de huevo, Avidina de clara de huevo y O,O'-Bis(2-aminopropil) polipropilén glicol-bloque-polietilén glicol-bloque-polipropilén glicol (PEG) de 1,900 g/mol, fueron obtenidos de Sigma Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA. Diclorometano (DCM) fue obtenido de Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, New Jersey, USA. N-Hidroxisuccinimida (NHS), dimetil sulfoxido (DMSO) y dietil éter fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, Inc., Milwaukee, Wisconsin, USA. Fluka, Buchs, Switzerland. Diciclohexilcarbodiimida (DCC) fue obtenido de Alfa Aesar, Ward Hill, Massachusetts, USA. Biotina (5-fluoresceína) fue obtenida de Sigma Aldrich, Inc. Steinheim, Alemania.

3.2 Equipo

Sonicador QSonica 500 (QSonica LLC, Newtown, Connecticut, EE. UU.). Centrífuga Beckman Coulter, Avanti J-30I (Beckman Coulter, Brea, California, EE. UU.). Liofilizador freezemobile 12 (Vitris, Gardiner, NY, EE. UU.). Espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-265 (Shimadzu, Kioto, Japon). Lector de placas multimodo Cytation 3 (Bio Tec, Winooski, VT, USA).

3.3 Métodos

3.3.1 Modificación del Polímero y Caracterización por FT-IR

La síntesis de PLGA-PEG-Biotina se realizó en dos pasos: activación de PLGA y acoplamiento de PEG seguido de conjugación de Biotina. PLGA se activó por DCC y NHS en DCM con una relación molar de PLGA: DCC: NHS = 1: 5: 5, donde la reacción se llevó a cabo durante 12 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno. En la figura 13, se puede ver el esquema de la reacción para el acoplamiento de PEG. La solución resultante se filtró (filtro Watman # 1) para eliminar la diciclohexilurea.

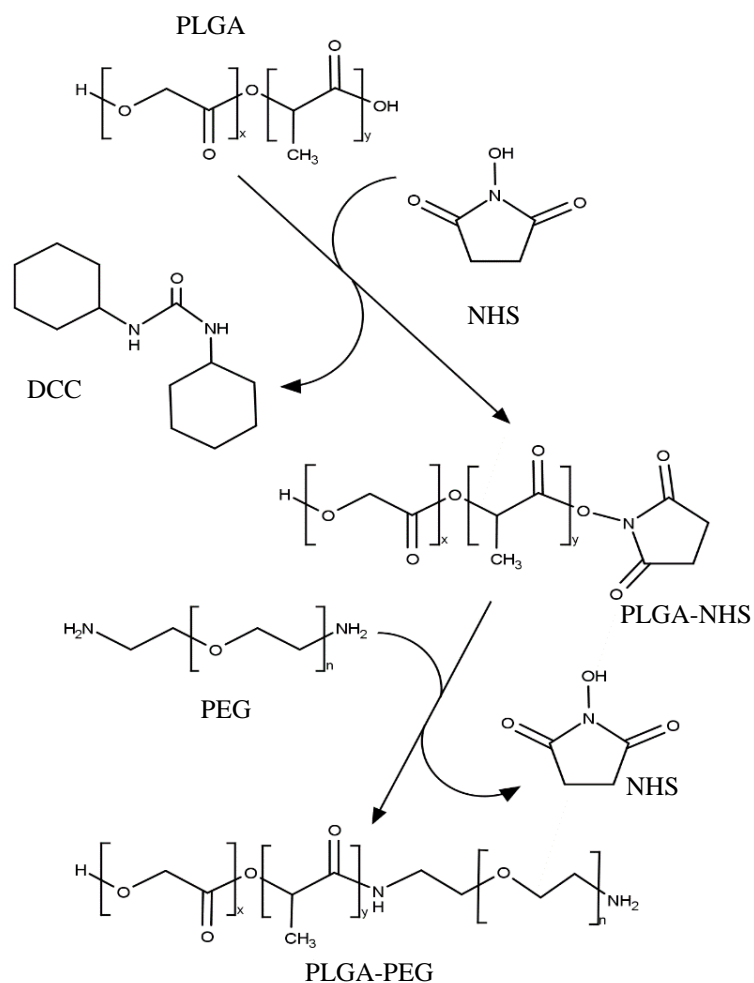


Figura 13. Representación esquemática de la reacción de acoplamiento de PEG.

El polímero se lavó mediante tres ciclos de precipitación utilizando 3 volúmenes de mezcla orgánica fría de metanol-éter dietílico (50/50) seguido de centrifugación, descartando el sobrenadante y resuspendiendo en DCM. Para el acoplamiento de PEG, la solución de PLGA activada se trató con PEG a una relación molar de 1:10 y se dejó reaccionar durante 12 horas en atmósfera de nitrógeno. El polímero se lavó de nuevo mediante tres ciclos de precipitación y se resuspendió en DMSO.

Para unir Biotina al polímero, se disolvió PLGA-PEG en DMSO y se trató con Biotina en DMSO en una proporción molar de 1:2, la reacción se dejó con agitación durante 12 horas a temperatura ambiente bajo atmósfera de nitrógeno y protegida de la luz. En la figura 14 se puede ver el esquema de la reacción de conjugación del copolímero con biotina.

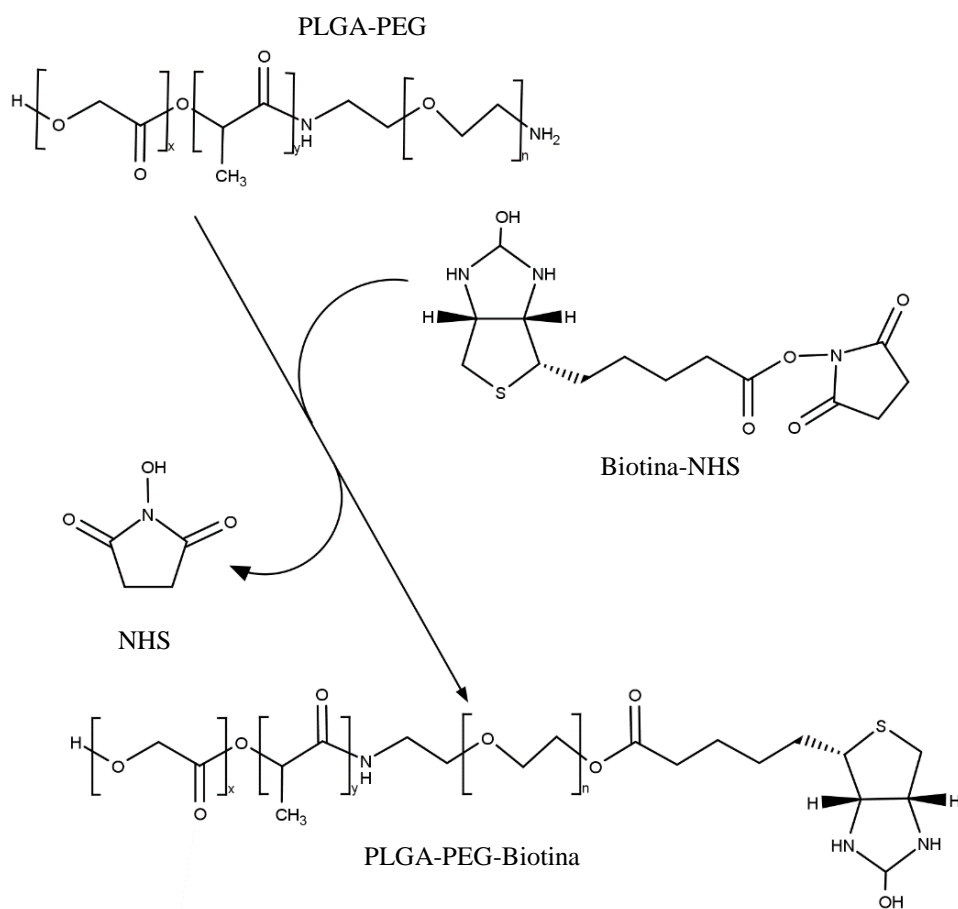


Figura 14. Representación esquemática de la reacción de conjugación de Biotina.

3.3.2 Preparación y caracterización de NP a Partir de PLGA-PEG-Biotina

Las nanopartículas formuladas a partir del polímero modificado PLGA-PEG-Biotina se prepararon utilizando la técnica de emulsión simple- evaporación del solvente. Una emulsión se define tradicionalmente como un sistema opaco y heterogéneo de dos fases líquidas inmiscibles (“aceite” y “agua”) con una de las fases dispersas en la otra como gotitas de tamaño microscópico o coloidal. Según la fase en que se forman las gotas, hay dos tipos de emulsiones simples: aceite en agua O/W y agua en aceite W/O.

La emulsión es un estado transitorio formado por la agitación vigorosa de dos líquidos puros e inmiscibles. Debido a que es muy inestable, vuelve rápidamente a separarse en “aceite” y “agua”. Para hacer una emulsión estable, debe haber material tensoactivo de superficie presente para proteger las gotitas recién formadas contra la recoalescencia inmediata. Un emulsionante es un componente químico único, o una mezcla de componentes, que tiene la capacidad de facilitar la formación de emulsiones y prevenir la recoalescencia a través de una combinación de actividad de la superficie y formación de estructura en la nueva interfaz aceite-agua. Por otro lado, un estabilizador es un componente, o mezcla de componentes, agregado a una emulsión para conferir estabilidad a largo plazo, posiblemente por un mecanismo que involucra la adsorción en la interfaz aceite-agua, pero no necesariamente así. Los surfactantes de molécula pequeña y los polímeros de alto peso molecular se usan comúnmente en ambas funciones, aunque los primeros tienden a producir mejores emulsionantes y los últimos mejores estabilizantes.

Para hacer una emulsión que contenga gotas en el rango de tamaño nanométrico, se requiere la aplicación de una gran cantidad de energía mecánica. Las dos fases en masa se pueden unir de varias maneras diferentes: agua inyectada en aceite, aceite inyectado en agua, adiciones alternativas de aceite y agua, o la adición simultánea de aceite y agua. Si se obtiene una emulsión W/O o O/W depende de las cantidades relativas de aceite y agua y de la naturaleza del emulsionante. Dependiendo de su estructura química, un emulsionante tenderá preferentemente a estabilizar una gota de agua en el aceite o una gota de aceite en el agua. La fase continua suele ser aquella en la que el emulsionante es más soluble (Wedlock 1994).

La emulsión simple- evaporación del solvente (ESE) es un proceso de dos pasos: la emulsificación de una solución de polímero que contiene la sustancia encapsulada, seguida de un endurecimiento de las partículas a través de la evaporación del solvente y la precipitación del polímero (figura 15). Durante la emulsificación, la solución de polímero se rompe en microgotas por el esfuerzo cortante producido por el homogeneizador, el sonicador o el mezclador de remolino en presencia de un agente tensoactivo. La

eliminación del disolvente acompañada de una importante contracción determina la morfología de las micropartículas y su encapsulación y comportamiento de liberación.

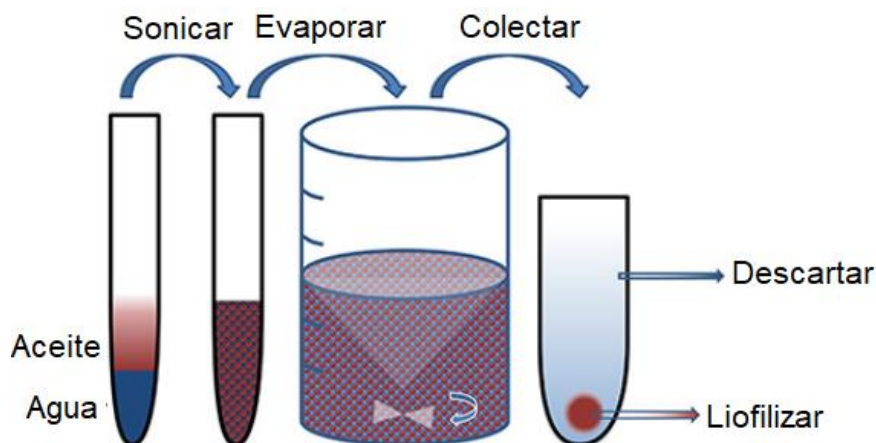


Figura 15. Esquema de la formulación de NP por la técnica de emulsión-evaporación del solvente.

Imagen tomada de (McCall and Sirianni 2013).

Durante la eliminación rápida de solvente y la contracción del polímero, la sustancia encapsulada se drena parcialmente, afectando la eficiencia de encapsulación. La microscopía electrónica de barrido y la difracción láser evidenciaron la presencia de una capa delgada de nanopartículas en la superficie de las micropartículas, con un papel importante en la liberación de la explosión inicial. Esta capa se forma durante la eliminación del solvente por la fragmentación inducida por contracción de la corteza del polímero precipitante.

La preparación de las NP se realizó con diferentes fracciones másicas de PLGA-PEG-Biotina y PLGA, esto con el fin de analizar si existen cambios en las propiedades fisicoquímicas de las NP, como cambios en el tamaño y potencial Z. Asimismo, al utilizar diferentes fracciones másicas de los polímeros se puede evaluar si existen diferencias en la capacidad de la NP para reconocer a la proteína Avidina, es decir, si se aumenta el número de avidinas por NP. Las diferentes fracciones másicas utilizadas en este estudio fueron 0.0:1.0, 0.2:0.8, 0.4:0.6, 0.6:0.4, 0.8:0.2, 1.0:0.0.

Brevemente, se disolvió la mezcla de la proporción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA correspondiente (50 mg en total) en 5 ml de DCM, se añadieron 25 mL de PVA 3% y se emulsionó utilizando un baño de hielo con un sonicador QSonica 500 (QSonica LLC, Newtown, Connecticut, EE. UU.) que funcionaba a 75 μm de amplitud durante 1 minuto. El disolvente orgánico se evaporó bajo agitación magnética a

temperatura ambiente durante 4 horas. Las NP se lavaron mediante tres ciclos de centrifugación a 20,000 rpm ($48,384\times g$) durante 30 minutos en una centrífuga Beckman Coulter Avanti J-30I (Beckman Coulter, Brea, California, EE. UU.), descartando el sobrenadante y resuspendiendo las NP del sedimento en 10 mL de agua desionizada. En el ciclo de centrifugación final, las NP se resuspendieron en 10 mL de agua desionizada y se liofilizaron en un liofilizador freezemobile 12 (Vitris, Gardiner, NY, EE. UU.).

Todos los experimentos fueron triplicados. La distribución del tamaño de las nanopartículas y los potenciales zeta se midieron utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido). Cada muestra se midió tres veces con 10 series respectivamente. Se utilizó agua desionizada como medio dispersante, la cual tiene un índice de refracción de 1.33. Para la evaluación de la estabilidad de las nanopartículas poliméricas se midió potencial zeta utilizando la técnica de electroforesis por láser Doppler, cada muestra para potencial zeta se midió por duplicado con al menos 10 ejecuciones a temperatura constante (25°C). Los promedios Z y los potenciales zeta se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes.

3.3.3 Determinación de la Actividad de Avidina

Se determinó la actividad de avidina en diferentes solventes para identificar el solvente que se usaría en el acoplamiento a las NP. Para tal efecto, se prepararon soluciones 0.1 mg/mL de avidina en los buffers de carbonato de amonio 0.2 M pH 8.9 y buffer salino de fosfatos 10 mM pH 7.4 (PBS). Después se añadió la solución con avidina (según sea el caso), tanto a la celda de estudio como a la celda de referencia y se colocaron en el espectrofotómetro Espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-265 (Shimadzu, Kioto, Japon). Las alícuotas de biotina en buffer tampón se agregaron a la celda de muestra solamente, mientras que en la celda de referencia se le agrego el mismo volumen de buffer tampón. El cambio en el espectro de absorbancia se registró al agregar cada alícuota. Se realizó una curva de la absorbancia de la solución de avidina a 233 nm en función de la cantidad de biotina agregada, llegando al punto de saturación de la avidina (cuatro biotinas por molécula de avidina para avidina completamente activa) cuando la absorbancia permanece constante. La diferencia máxima entre el espectro de una solución de avidina pura y la de la avidina unida a la biotina se produce a 233 nm. Esto es debido a que el espectro ultravioleta de la avidina en una solución tampón acuosa cambia al rojo (efecto hiperclorico) cuando la biotina se une a los sitios activos de avidina (Jain and Cheng 2017; Ren et al. 2015).

3.3.4 Acoplamiento de Avidina-FITC a Nanopartículas de PLGA-PEG-Biotina

El acoplamiento de Avidina-FITC a las NP de PLGA-PEG-Biotina, se realizó preparando una solución madre de Avidina-FITC de 1mg/mL en buffer de fosfatos salino 10 mM pH 7.4 (PBS), de la cual se agregaron 250 μ L por cada 5 mg de nanopartículas, para así llegar a una concentración de 1.51515E-6 M. La conjugación se dejó en agitación durante 2 horas. Al finalizar las 2 horas se realizaron 3 ciclos de centrifugación para eliminar los restos de Avidina que no reaccionaron. Finalmente, las NP se congelaron a -80°C y después se liofilizaron para estudios posteriores.

3.3.5. Determinación de avidina en Nanopartículas de PLGA-PEG-Biotina

Se realizaron curvas de calibración de Avidina-FITC por triplicado, partiendo de una concentración de 0.5 mg/mL en el caso de Avidina-FITC. Se prepararon 24 soluciones para cada curva las cuales se leyeron en un Lector de placas multimodo Cytation 3 (Bio Tec, Winooski, VT, USA). Se leyeron las muestras de cada fracción másica de PLGA-PEG-Biotina y PLGA (0.0:1.0, 0.2:0.8, 0.4:0.6, 0.6:0.4, 0.8:0.2, 1.0:0.0) por triplicado en una concentración de 1mg/mL, colocando 100 μ L en cada pozo. Las muestras se midieron a 490 nm de excitación y 525 de emisión.

3.3.6. Análisis Estadístico

La variabilidad de los tamaños de nanopartícula, polidispersidades, potencial Z y concentración de biomoléculas en la superficie de las NP con las diferentes proporciones másicas de PLGA-PEG-Biotina y PLGA fue analizada estadísticamente mediante un modelo de análisis de varianza o ANOVA, utilizando el software R (RStudio Desktop). Se usó un estudio R, el cual se comparó con una distribución tipo F. Se consideró que había diferencias estadísticamente significativas cuando los valores resultantes de “p” estaban por debajo de 0.05 ($p < 0.05$).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Síntesis del Biopolímero y Conjugación de Biotina

El biopolímero PLGA-PEG-Biotina fue sintetizado exitosamente en varios pasos consecutivos como se muestra en las figuras 13 y 14. Para la síntesis de este biopolímero, se partió de PLGA con terminación ácida (copolímero 50/50 DL-láctico/glicólico) con un peso molecular de 17,000 g/mol. El primer paso consistió en la activación de PLGA con DCC y NHS en una relación molar de PLGA:DCC:NHS=1:5:5. Después se llevó a cabo el acoplamiento de PEG al polímero PLGA, previamente activado, en una relación molar de PLGA:PEG=1:10. A continuación, se realizó la conjugación del polímero PLGA-PEG con biotina, en una relación molar de PLGA-PEG:Biotina=1:2.

En la figura 16 se observa el espectro de FT-IR en el módulo de ATR de PLGA, donde se puede observar la banda característica del grupo carbonilo C=O a 1757 cm^{-1} (Song et al. 2011). Así como también se observan bandas características a 1130 cm^{-1} y 1452 cm^{-1} las cuales son atribuidas al grupo C-O-C y al enlace C-H respectivamente, de un grupo metilo. Mientras que la banda de 1182 cm^{-1} corresponde al grupo éter (Pereira et al. 2016). Este conjunto de bandas caracteriza al polímero PLGA y se usarán de referencia para las modificaciones del biopolímero.

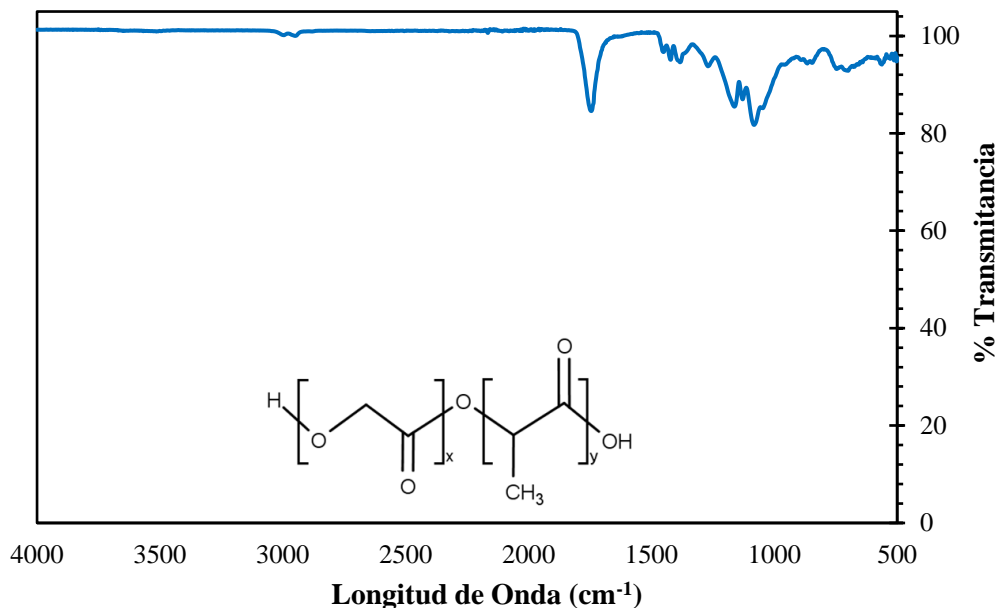


Figura 16. Espectro de FT-IR ATR del polímero PLGA terminación ácida.

Para comenzar la modificación, se activó el grupo carboxilo del PLGA con DCC y NHS, para posteriormente acoplar PEG. En la figura 18 se observa el espectro de FT-IR del copolímero PLGA-PEG, el cual fue sintetizado exitosamente. Un espectro de PEG puro tendría las siguientes señales, una banda característica a 2888 cm^{-1} atribuida a los movimientos de estiramiento de los grupos CH, CH₂ y CH₃. Bandas a 1464 y 1343 cm^{-1} asociadas al movimiento de doblamiento del enlace C-H. El movimiento de estiramiento del grupo C-C-O se observa en las señales a 1280 y 1100 cm^{-1} . El armónico C-C-O, las cuales se encuentran alrededor de 950 y 840 cm^{-1} .

Finalmente, la banda características del enlace amina a 3335 cm^{-1} . En la figura 17 se pueden observar todas estas señales. En el caso del espectro de PLGA-PEG (figura 18), el espectro es muy similar al del PLGA, lo cual puede ser explicado debido a la pequeña cantidad de PEG en el sistema. Por lo cual la presencia de PEG se puede confirmar debido a las pequeñas señales del armónico C-C-O, las cuales se encuentran alrededor de 950 y 840 cm^{-1} (Balan et al. 2012; Pereira et al. 2016)

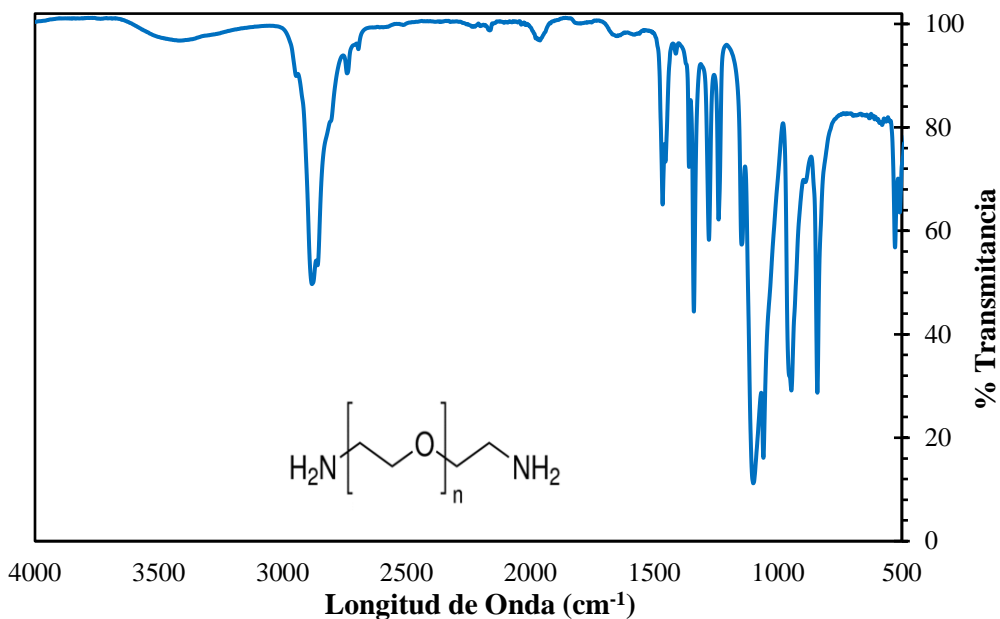


Figura 17. Espectro de FT-IR ATR del polímero O,O'-Bis(2-aminopropil) polipropilén glicol-bloque-polietilén glicol-bloque-polipropilén glicol (PEG). Se observan las bandas características del armónico C-O del PEG a 949 y 841 cm⁻¹.

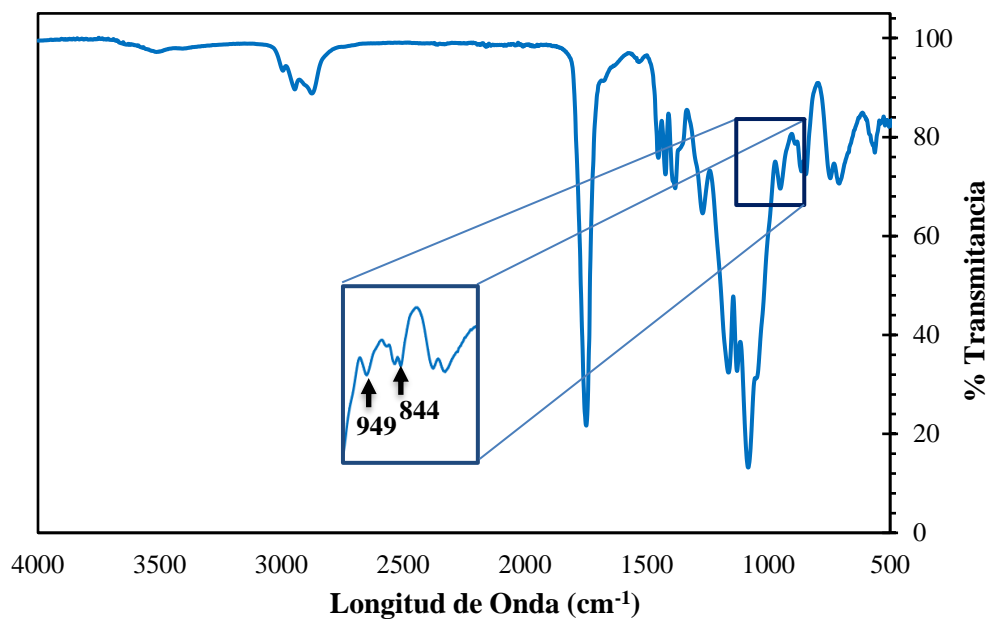


Figura 18. Espectro de FT-IR ATR del copolímero PLGA-PEG. Se observan las bandas características del armónico C-C-O del PEG.

Posterior al acoplamiento de PLGA-PEG, se proseguirá con la conjugación con Biotina-NHS el cual interactuará con el grupo amino libre del PEG. La banda de absorbancia de FT-IR más significativa para el polímero PLGA-PEG-Biotina es la correspondiente a el enlace -CONH-, el cual se puede un correcto acoplamiento de la molécula de biotina, en la figura 19 se puede ver el espectro de FTIR de este biopolímero. Las bandas características de los grupos carbonilo (C=O) y amino (N-H) que se encuentran presentes en un enlace de tipo amida, exhiben bandas a 1621 and 1568 cm^{-1} respectivamente (Boddu and Vaishya 2012; Gutiérrez-Valenzuela et al. 2016; Malý et al. 2009), lo cual nos confirma que la conjugación se llevó a cabo exitosamente. Aparte, también podemos observar vibraciones de restos de biotina C-C exhibido en la banda a 1267 cm^{-1} (Balan et al. 2012). Las señales en este espectro son muy pequeñas, lo cual se puede deber a que la biotina es la molécula que se encuentra en menor proporción en este sistema.

Aunque el polímero fue modificado exitosamente, ya que se pudieron encontrar las bandas o señales características para cada molécula, el porcentaje de biopolímero recuperado, o la masa recuperada de biopolímero fue muy baja, en comparación a la masa inicial de PLGA usada, ya que solo se pudo recuperar el 25% de la masa inicial.

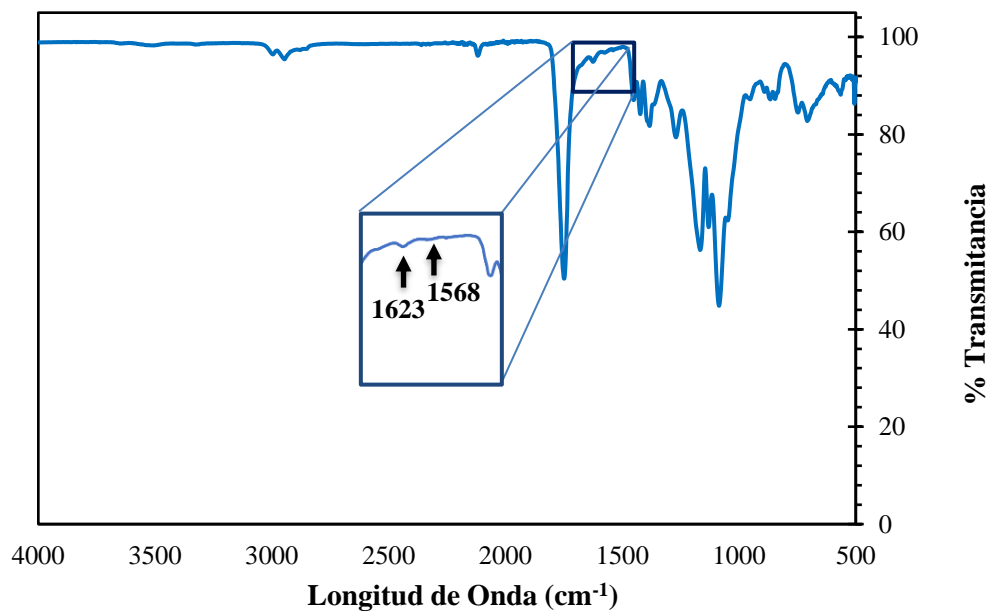


Figura 19. Espectro de FT-IR ATR del copolímero PLGA-PEG-Biotina. se pueden ver las bandas características del enlace amida.

4.2 Preparación y Caracterización de NP a Partir del Biopolímero PLGA-PEG-Biotina

Las nanopartículas del polímero modificado PLGA-PEG-Biotina fueron preparadas por el método de emulsión simple-evaporación del solvente. Se utilizaron seis proporciones másicas diferentes de PLGA-PEG-Biotina:PLGA, las cuales fueron 0.0:1.0, 0.2:0.8, 0.4:0.6, 0.6:0.4, 0.8:0.2, 1.0:0.0 respectivamente. A cada una de las NP con las diferentes proporciones másicas se les monitoreo el tamaño, índice de polidispersidad y potencial zeta. En la Figura 20A se muestran los tamaños e índice de polidispersidad de las partículas sintetizadas a partir de cada una de las proporciones másicas mencionadas anteriormente. Como se puede observar el tamaño promedio de las NP aumenta ligeramente al aumentar la proporción del biopolímero PLGA-PEG-Biotina, aunque no se observan diferencias significativas. Asimismo, el tamaño cambia drásticamente en las NP preparadas en su totalidad con polímero modificado (PLGA-PEG-Biotina), es decir, las de proporción 1.0:0.0, donde se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto a las otras fracciones másicas. Por otro lado, también se observa en la figura 20A que la polidispersidad aumenta conforme aumenta la proporción del biopolímero PLGA-PEG-Biotina, encontrando diferencias significativas en las proporciones de 0.0:1.0, 0.2:0.8, 0.4:0.6, 0.6:0.4 con respecto a la proporción 1.0:0.0. No obstante, el aumento en la polidispersidad está directamente relacionado a las diferentes poblaciones de NP, indicando que existen poblaciones más heterogéneas al aumentar la proporción del biopolímero PLGA-PEG-Biotina. Tanto los resultados de tamaño como los de polidispersidad indican que las NP preparadas en todas las proporciones tienen el potencial de utilizarse en aplicaciones biomédicas, aunque basado solamente en estas características se recomienda utilizar el biopolímero PLGA-PEG-Biotina en proporciones menores al 80%, para así disminuir el número de poblaciones de NP. También se puede observar que las partículas con menor tamaño y más monodispersas son las de la proporción másica 0.2:0.8. Por otro lado, en la Figura 20B podemos observar los potenciales zeta de todas las preparaciones de NP, en donde se observan valores de potencial Z en el rango de -23 a -34 mV. Dichos valores indican una estabilidad de NP buena. Asimismo, en dicha figura se observa un decremento en el valor del potencial Z conforme aumenta la proporción del biopolímero PLGA-PEG-Biotina, con un pico mínimo de potencial Z en la proporción de 0.4:0.6, después el potencial Z promedio aumenta al aumentar la proporción del mismo biopolímero. No obstante, los valores no tienen cambios significativos, es decir los valores de “p” estaban por arriba de 0.05 ($p > 0.05$), lo cual nos indica que no se pierde la estabilidad de las NP al aumentar la fracción másica del biopolímero.

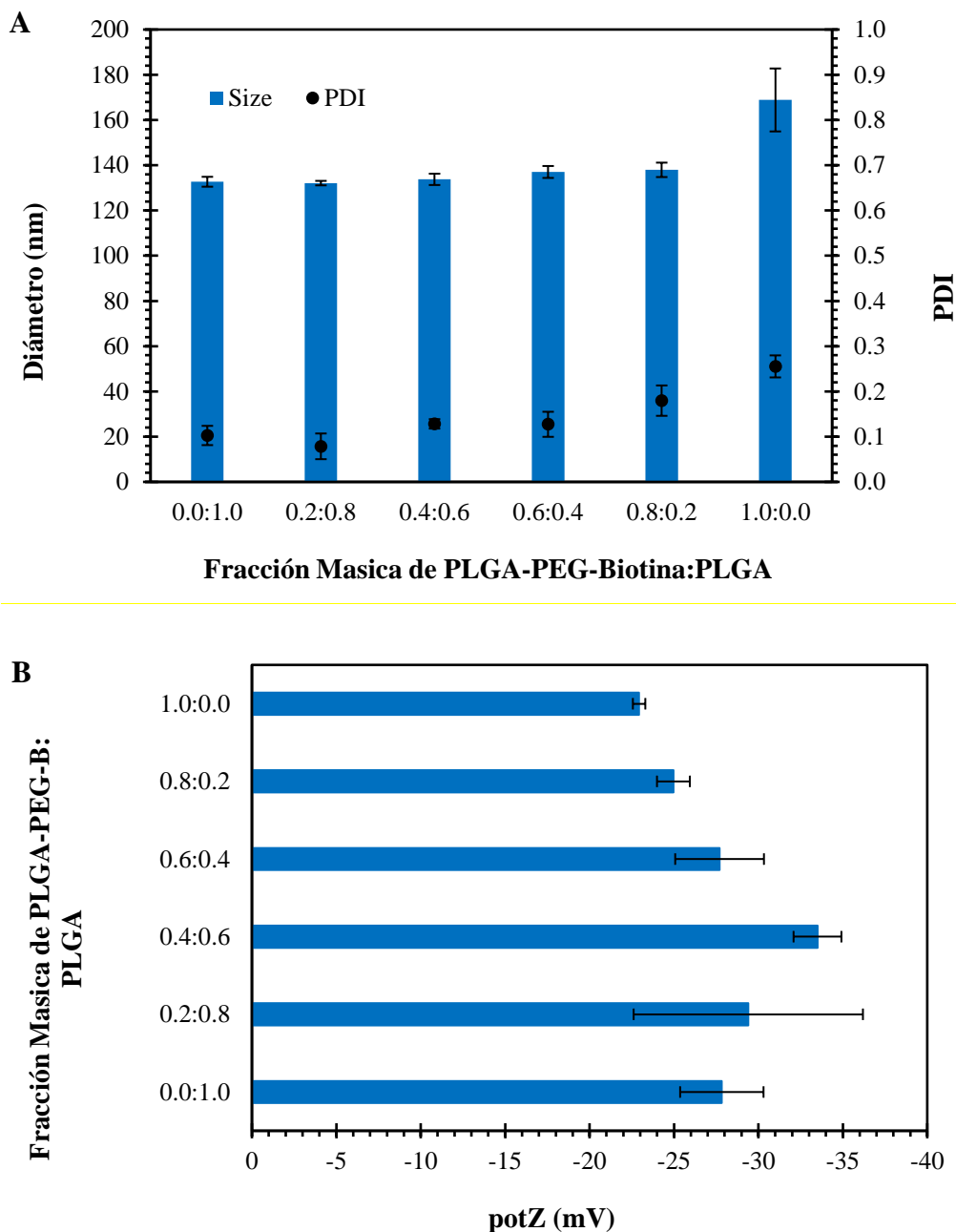


Figura 20. Características de las Nanopartículas de PLGA-PEG-Biotina preparadas por emulsión simple-evaporación del solvente. (A) Tamaño y polidispersidad de las NP con diferentes proporciones másicas. (B) Potencial zeta de las NP con diferentes proporciones másicas.

Con el fin de evaluar el tamaño, polidispersidad y potencial Z de las nanopartículas en la preparación y en las diferentes etapas de funcionalización, se hizo un análisis variando la proporción másica del biopolímero PLGA-PEG-Biotina y del PLGA. En la Figura 21 se hace una comparación de las NP sintetizadas con diferentes proporciones másicas de los polímeros durante el proceso de almacenamiento y posteriores modificaciones. La línea azul (◆) es para las NP frescas de PLGA-PEG-Biotina sin ningún aditivo. El color rojo (■) es para las NP frescas a las cuales se le adicióno sucrosa como crio protector, ya que esta protege a las NP durante el proceso de liofilización contra las tensiones de congelación y secado (Abdelwahed et al. 2006). El color amarillo (▲) corresponde a las NP de PLGA-PEG-Biotina con sucrosa después del proceso de liofilización. El color verde (●) corresponde a las nanopartículas de PLGA-PEG-Biotina después de la conjugación con Avidina-FITC. Como se puede observar en este gráfico, las NP no sufren cambios considerables en su tamaño al adicionar la sucrosa, pero después de la liofilización los tamaños aumentan, este aumento se ve más cuando se aumenta la cproporción del polímero modificado, lo cual podría deberse a la formación de capas de sucrosa sobre la superficie de las NP, favoreciendo ya sea a las más grandes, o a las que tienen mayor cantidad del polímero modificado.

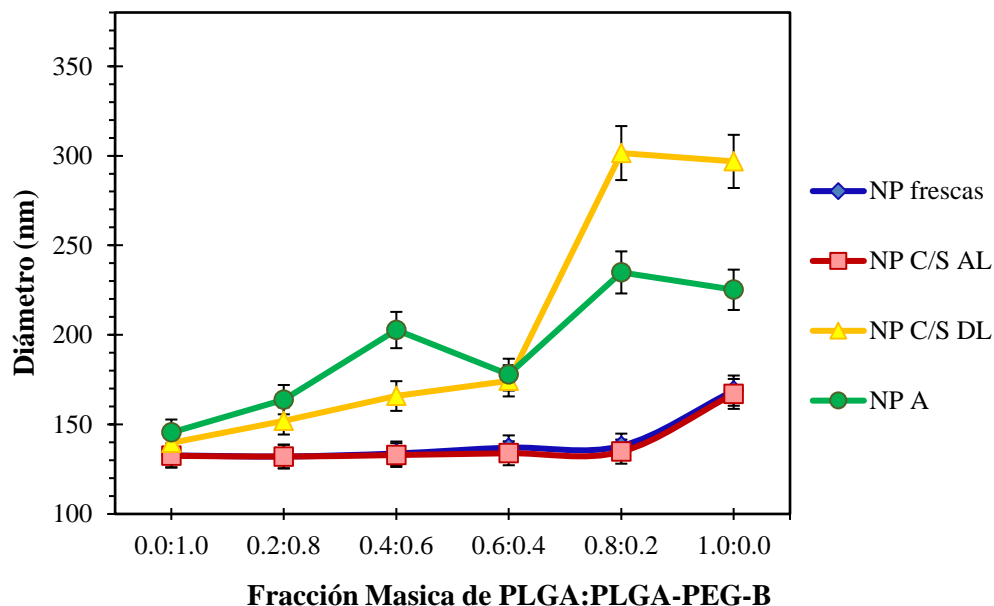


Figura 21. Tamaño de las nanopartículas de PLGA-PEG-Biotina con diferentes proporciones másicas y tratamientos. (◆) NP de PLGA-PEG-Biotina frescas. (■) NP de PLGA-PEG-Biotina con sucrosa antes de liofilizar. (▲) NP de PLGA-PEG-Biotina con sucrosa después de liofilizar. (●) NP de PLGA-PEG-Biotina-Avidina.

Revisando en literatura se encontró que la sucrosa se encuentra entre los crioprotectores más populares junto con la glucosa, manitol y trehalosa. Estos estabilizadores ayudan a la inmovilización de las NP dentro de una matriz vítrea de crioprotector, ayudando a prevenir una agregación y protegiendo a las partículas contra el estrés mecánico de los cristales de hielo. No obstante, en algunos casos, utilizar una cantidad elevada del crioprotector puede llegar a alcanzar un límite de estabilización o incluso la desestabilización de las partículas (Abdelwahed et al. 2006).

En la Figura 22 se hace la misma comparación que se hizo entre las NP en la Figura 21, solo que en este caso se comparan los potenciales Zeta. Al comparar las nanopartículas frescas con respecto a las que se les añadió sucrosa, se ve un aumento en el valor del potencial Z de las partículas, lo cual se puede deber a que se forma una pequeña capa superficial de azúcar sobre las NP, la cual puede enmascarar los ácidos carboxílicos del PLGA. También se observó que al liofilizar las NP que contienen sucrosa se obtienen potenciales zeta cercanos a cero, lo cual apoya la teoría de que se está generando una capa de sucrosa en la superficie de las partículas, la cual se va engrosando durante el proceso de liofilización.

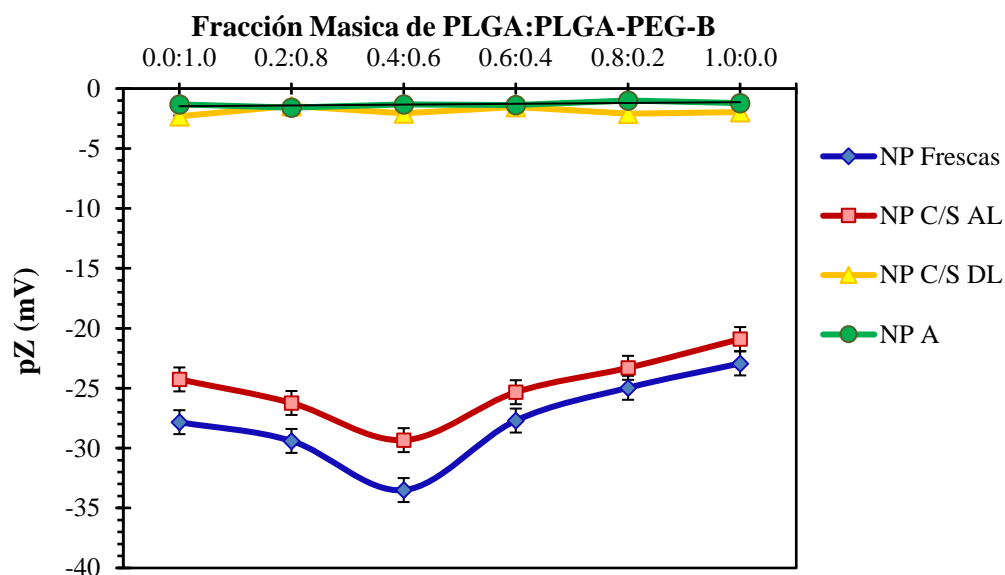


Figura 22. Potencial zeta de las nanopartículas de PLGA-PEG-Biotina con diferentes proporciones másicas y tratamientos. (♦) NP de PLGA-PEG-Biotina frescas. (■) NP de PLGA-PEG-Biotina frescas con sucrosa. (▲) NP de PLGA-PEG-Biotina con sucrosa después de liofilizar. (●) NP de PLGA-PEG-Biotina-Avidina.

También se hizo una comparación de cada fracción másica utilizada del biopolímero PLGA-PEG-Biotina y PLGA, monitoreando los tamaños y potenciales zeta de las NP a través de los diferentes pasos de modificación. La Figura 23 y 24 corresponden a las NP con la fracción másica de 0.0:1.0, es decir las NP de solo PLGA. En el caso de la figura 23, se ve la variación de intensidad con respecto al tamaño de las NP. En este gráfico se puede observar que las NP con una población más homogénea son las partículas frescas a las cuales se les adicionó sucrosa (— —). Mientras que las partículas con la población más dispersa son aquellas que se les agregó avidina y después biotina (PNP A-B), pero al ser NP de solo PLGA se cree que estas variaciones en la distribución del tamaño se pueden deber a biomoléculas de avidina adsorbidas electrostáticamente en las partículas de PLGA (Jeong et al. 2000), produciendo agregaciones al después agregar biotina. Mientras que en la Figura 24 se ve la intensidad con respecto al potencial zeta. En la imagen podemos ver como al parecer la sucrosa en las NP antes de liofilizar (— —) se adsorbe en la superficie de las NP ya que el valor de potencial zeta aumenta. Asimismo, en las NP liofilizadas (- · - · -) y acopladas a avidina (— · —) tuvieron la misma distribución en cuanto al potencial zeta, lo cual indica que la capa de azúcar en la superficie de las partículas enmascara todos los grupos que pueden presentar cargas electrostáticas en las NP.

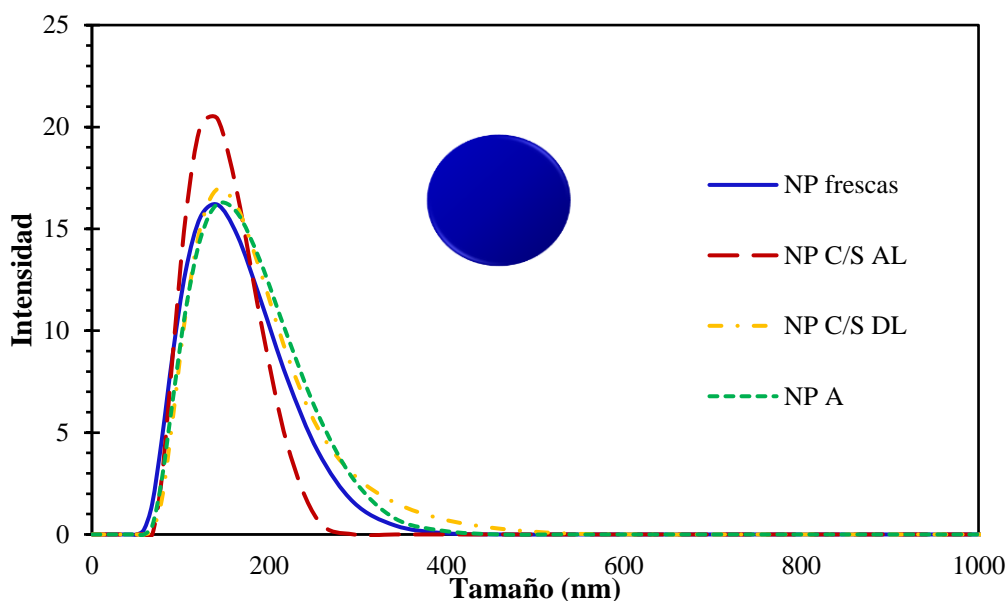


Figura 23. Variación de los tamaños de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0:1. (—) NP frescas. (— · —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (- · - · -) P con sucrosa después de liofilizar. (— · —) NP acopladas Avidina.

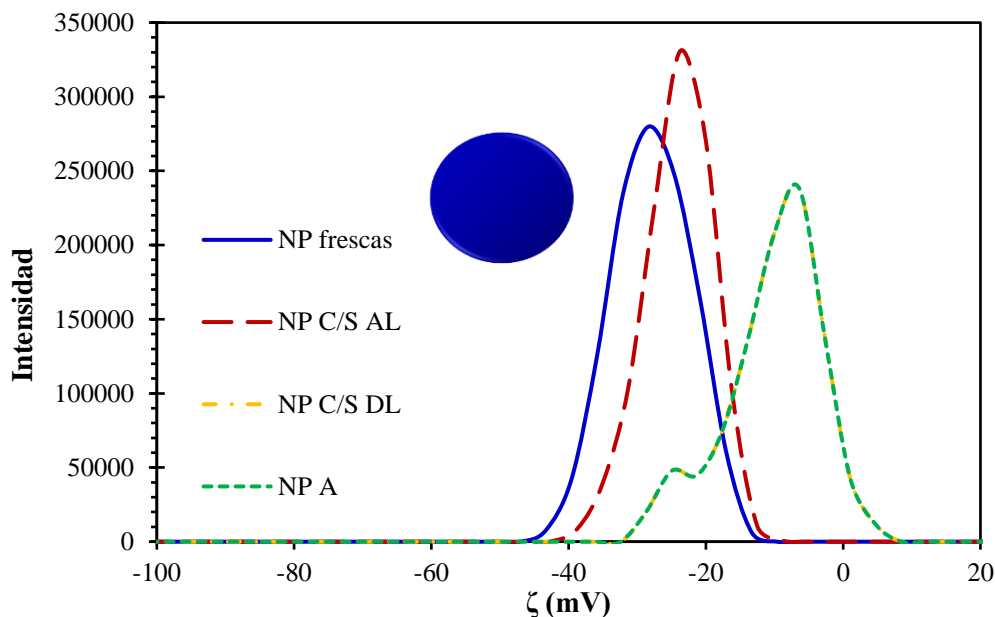


Figura 24. Variación del potencial zeta de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0:1. (—) NP frescas. (---) NP con sucrosa antes de liofilizar. (- · - · -) NP con sucrosa después de liofilizar. (---) NP acopladas Avidina.

La figura 25 y 26 corresponden a las NP sintetizadas con la proporción másica de 0.2:0.8, es decir 20% de PLGA-PEG-Biotina y 80% de PLGA. En el caso de la figura 25, se ve la variación de intensidad con respecto al tamaño de las NP. En este gráfico podemos observar que las poblaciones de las NP frescas con (---) y las frescas (—) presentan los mismos tamaños e intensidades, mientras que el tamaño de las NP después de ser liofilizadas (- · - · -) aumenta ligeramente en la mayoría de las partículas, pero se observa una población más pequeña con tamaños entre los 600 y 1000 nm. Para las NP después de conjugarse con Avidina (---) se observan poblaciones con una distribución y tamaño más homogéneas.

En la figura 26, se ve la intensidad con respecto al potencial zeta. Se puede observar que en las partículas frescas la distribución del potencial zeta se hace más pequeña al adicionar sucrosa (---). Pero en el caso de las NP después de ser liofilizadas (- · - · -) y adicionar Avidina (---), se obtuvieron los mismos potenciales zeta y distribuciones de las cargas al igual que en la fracción másica anterior.

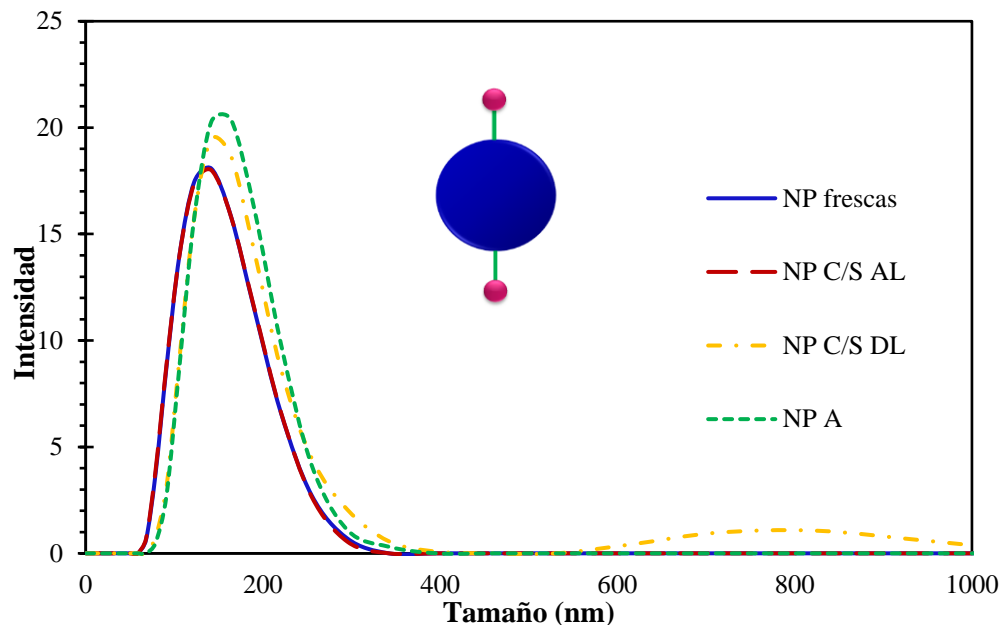


Figura 25. Variación de los tamaños de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.2:0.8. (—) NP frescas. (—) NP con sucrosa antes de liofilizar. (- - -) NP con sucrosa después de liofilizar. (---) NP acopladas Avidina.

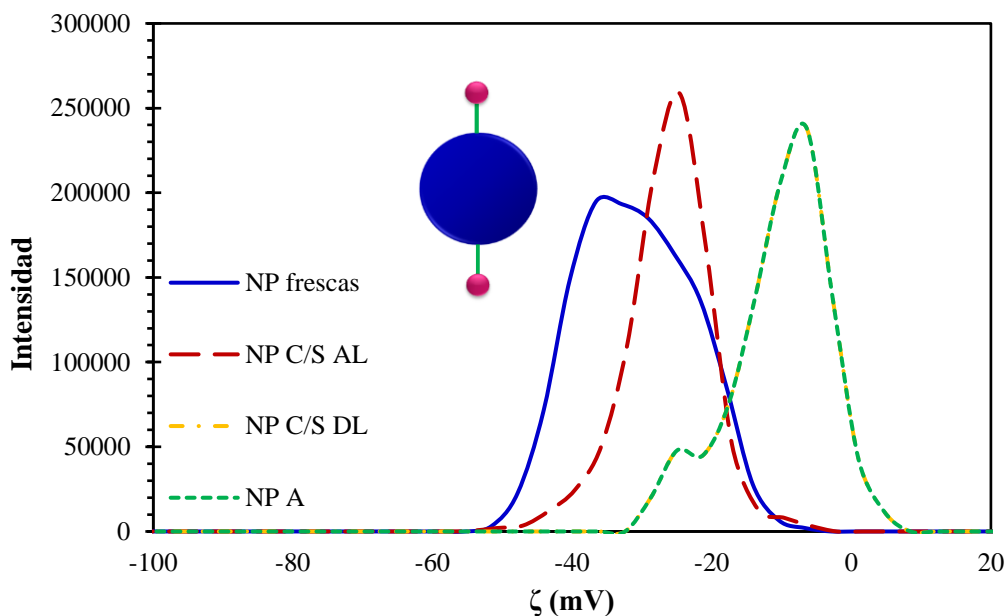


Figura 26. Variación del potencial zeta de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.2:0.8. (—) NP frescas. (—) NP con sucrosa antes de liofilizar. (- - -) NP con sucrosa después de liofilizar. (---) NP acopladas Avidina.

La figura 27 y 28 corresponden a las NP sintetizadas con la proporción másica de 0.4:0.6, es decir 40% de PLGA-PEG-Biotina 60% de PLGA. En el caso de la figura 27, podemos ver la variación de intensidad con respecto al tamaño de las NP. En este grafico podemos observar que las variaciones más evidentes son las de NP de PLGA-PEG-Biotina después de liofilizar (- · - · -) donde las poblaciones de NP se ven mas homogéneas.

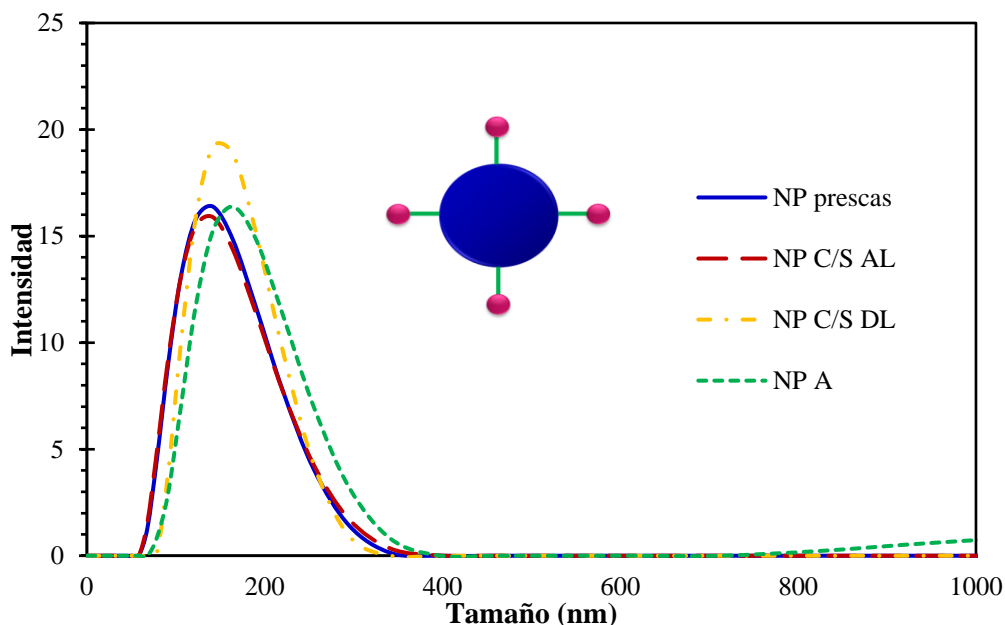


Figura 27. Variación de los tamaños de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.4:0.6. (—) NP frescas. (—) NP con sucrosa antes de liofilizar. (- · - · -) NP con sucrosa después de liofilizar. (- - -) NP acopladas Avidina.

En la figura 28, se ve la intensidad con respecto al potencial zeta. Como se puede ver en esta figura, se repiten los mismos patrones que en las anteriores, las poblaciones se vuelven más homogéneas al adicionar sucrosa en las NP frescas, pero después de ser liofilizadas el PZ disminuye drásticamente y permanece constante para las demás modificaciones. Esta proporción másica podría ser una de las fracciones más prometedoras debido a que es la que tiene el potencial Z mas bajo y buenos tamaños.

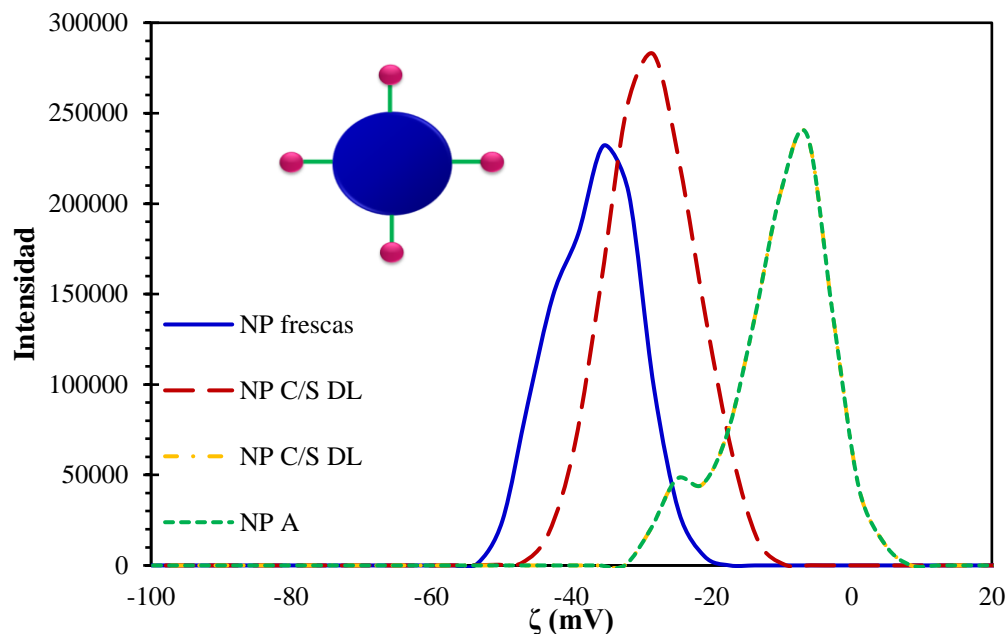


Figura 28. Variación del potencial zeta de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.4:0.6. (—) NP frescas. (— · —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (— · — · —) NP con sucrosa después de liofilizar. (— · — · —) NP acopladas Avidina.

La figura 29 y 30 corresponden a las NP sintetizadas con la proporción másica de 0.6:0.4, es decir 60% de PLGA-PEG-Biotina 40% de PLGA. En el caso de la figura 29, podemos ver la variación de intensidad con respecto al tamaño de las NP. En este gráfico se puede observar como las NP van aumentando levemente su tamaño al paso de cada tratamiento. También se puede observar que se tiene un mayor control sobre el tamaño de estas NP, ya que se observan distribuciones un poco más homogéneas en la mayoría de las partículas.

En la figura 30, se ve la intensidad con respecto al potencial zeta. Se observa una pequeña disminución del PZ en las NP frescas al adicionar sucrosa, y una disminución bastante pronunciada en la mayoría de las partículas después del proceso de liofilización.

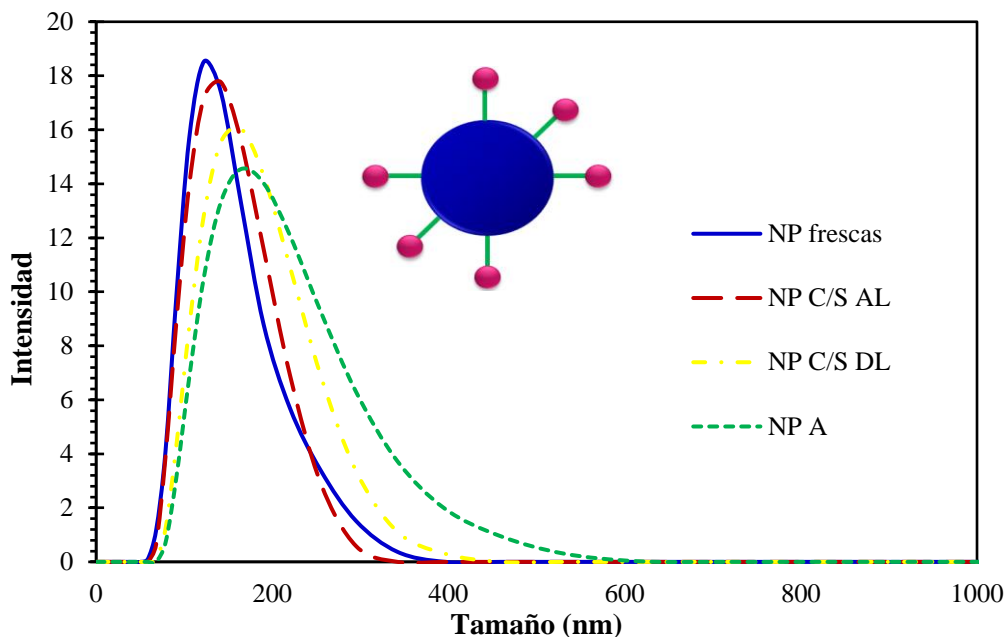


Figura 29. Variación de los tamaños de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.6:0.4. (—) NP frescas. (— · —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (— · · —) NP con sucrosa después de liofilizar. (— · —) NP acopladas Avidina.

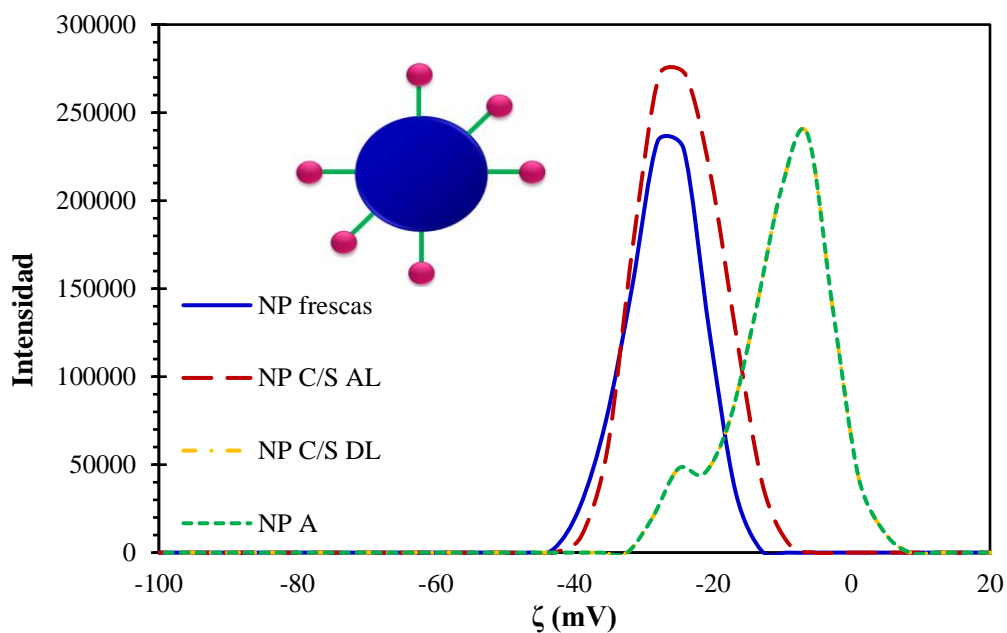


Figura 30. Variación del potencial zeta de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.6:0.4. (—) NP frescas. (— · —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (— · · —) NP con sucrosa después de liofilizar. (— · —) NP acopladas Avidina.

La figura 31 y 32 corresponden a las NP sintetizadas con la proporción másica de 0.8:0.2, es decir 80% de PLGA-PEG-Biotina 20% de PLGA. En la figura 31 se observa como en el caso de las NP después de ser liofilizadas (- · - · -) los tamaños de estas varían bastante, aunque después de acoplar avidina (- - -) al sistema se logra controlar más la distribución de los tamaños de las partículas. En la figura 32, se ve la intensidad con respecto al potencial zeta. En este caso las NP frescas con sucrosa (- - -) solo disminuyen el PZ un poco, mientras que las NP después de ser liofilizadas (- · - · -) y (- - -), tienen el mismo comportamiento, donde la mayoría de las partículas tienen un PZ cerca de cero, mientras que una pequeña población tiene entre los -30 mV y -20 mV.

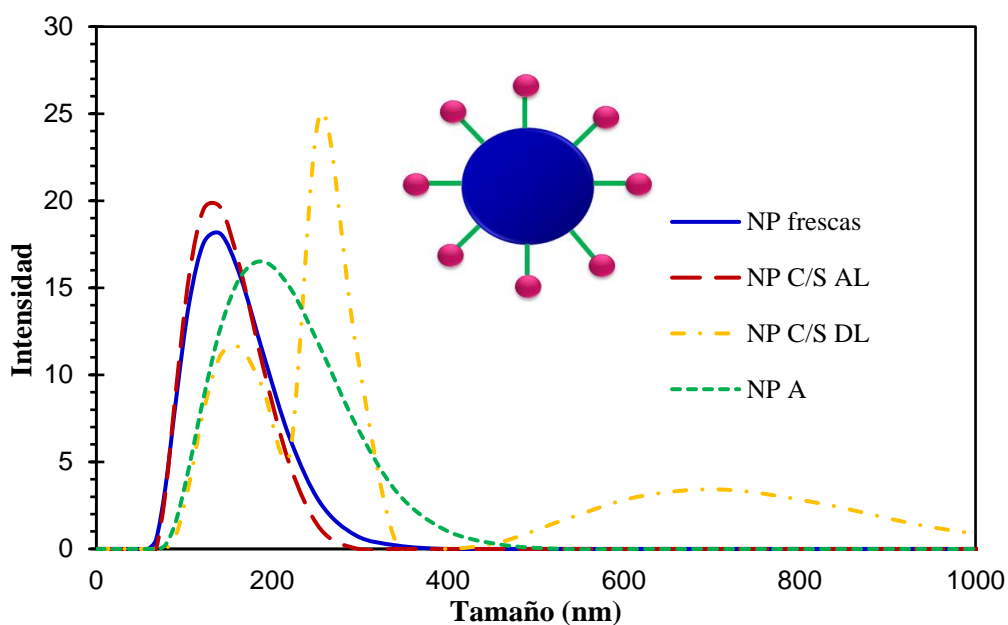


Figura 31. Variación de los tamaños de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.8:0.2. (—) NP frescas. (— · —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (- · - · -) NP con sucrosa después de liofilizar. (- - -) NP acopladas Avidina.

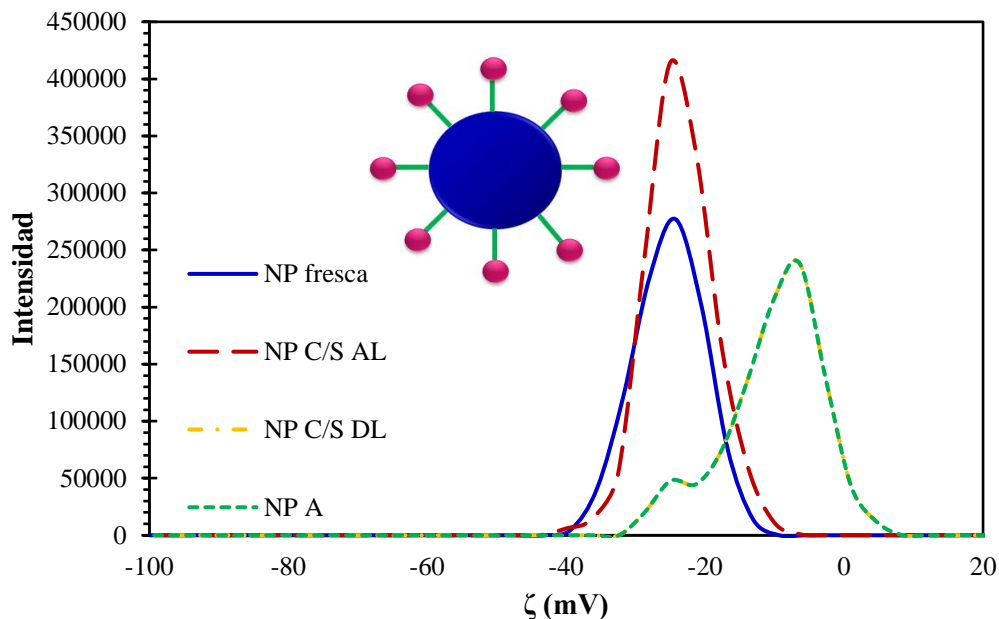


Figura 32. Variación del potencial zeta de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 0.8:0.2. (—) NP frescas. (— · —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (— · — · —) NP con sucrosa después de liofilizar. (— · — · —) NP acopladas Avidina.

La figura 33 y 34 corresponden a las NP sintetizadas con la proporción másica de 1.0:0.0, es decir 100% de PLGA-PEG-Biotina 0% de PLGA. En la figura 33, podemos ver la variación de intensidad con respecto al tamaño de las NP. En este gráfico podemos ver como se tiene menos control del tamaño de las NP después de ser liofilizadas. En el caso de las NP con sucrosa después de ser liofilizadas (— · — · —) se pueden ver cuatro poblaciones de partículas, dos de las cuales están por encima de los tamaños observados en las partículas frescas. Al hacer el acoplamiento de Avidina (— · — · —) los tamaños se logran controlar un poco, no obstante, sigue habiendo partículas muy grandes para su uso clínico. En la figura 34, se ve la intensidad con respecto al potencial zeta. En esta figura se repite el comportamiento de la carga superficial de las partículas, disminuyendo en su gran mayoría después de ser liofilizadas.

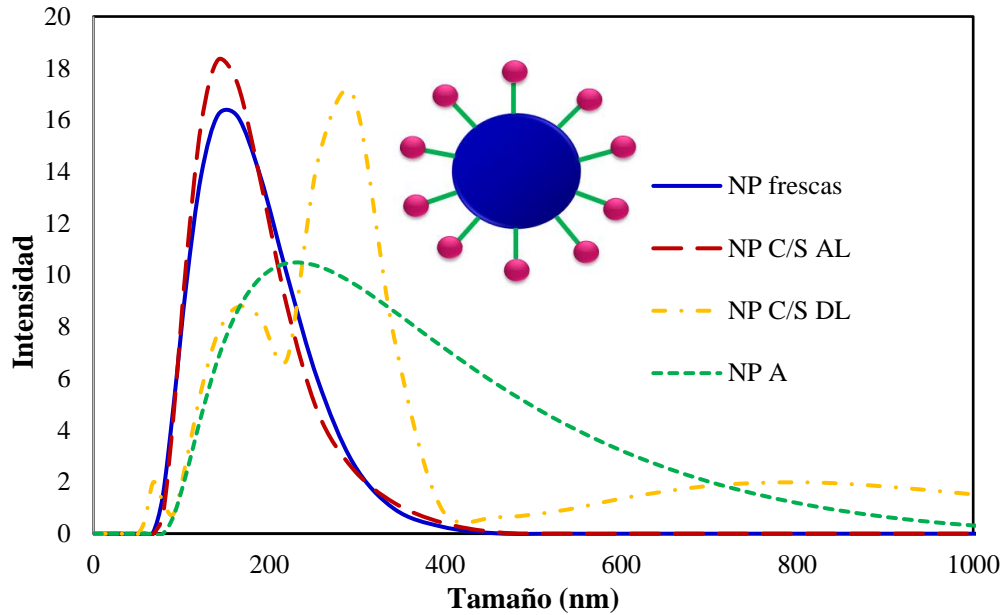


Figura 33. Variación de los tamaños de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 1:0. (—) NP frescas. (— · —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (· · · ·) NP con sucrosa después de liofilizar. (— · —) NP acopladas Avidina.

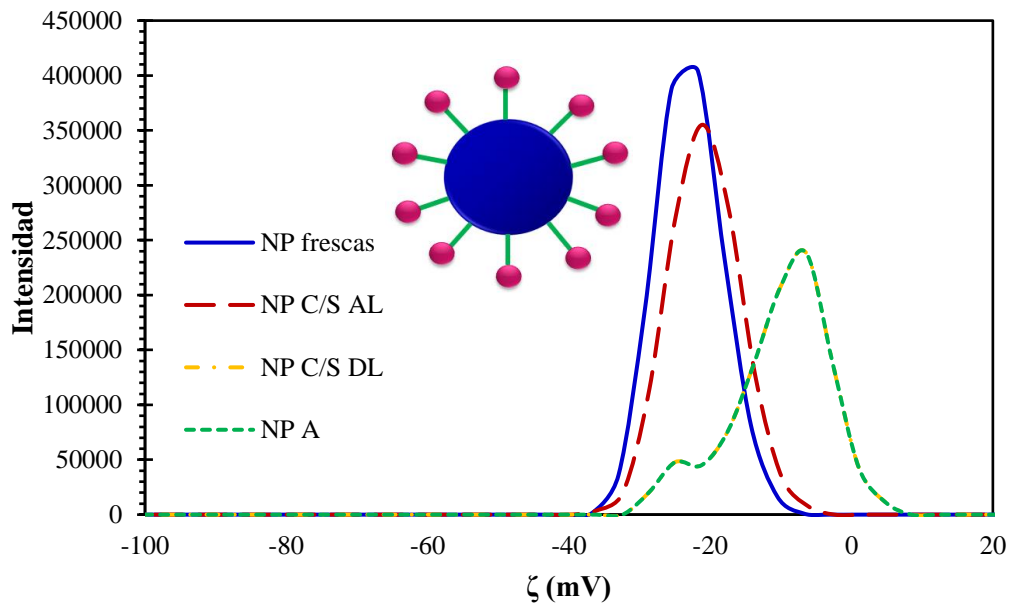


Figura 34. Variación del potencial zeta de las nanopartículas con la fracción másica de PLGA-PEG-Biotina:PLGA 1:0. (—) NP frescas. (— · —) NP con sucrosa antes de liofilizar. (· · · ·) NP con sucrosa después de liofilizar. (— · —) NP acopladas Avidina.

4.3 Determinación de la Actividad de Avidina

Se realizaron dos curvas de saturación para medir la actividad de la avidina en dos soluciones amortiguadoras diferentes para determinar si la actividad de esta proteína se ve afectada según el medio en el que se trabaje, esto con el fin de determinar las condiciones óptimas en el acoplamiento de la proteína a las NP. En el caso de la figura 35, se utilizó una solución de carbonato de amonio 0.2 M pH 8. con una solución madre de 0.1 mg/mL (1.52×10^{-6}) de Avidina y 0.01 mg/mL (4.0931×10^{-6}) de Biotina. El punto de saturación para avidina reportado en literatura en condiciones óptimas es de 4 moléculas de biotina por cada molécula de avidina (Ren et al. 2015). . En el presente análisis se llegó al punto de saturación con una concentración de 5.32×10^{-6} moles de biotina, es decir 3.5 moléculas de biotina por cada molécula de avidina. Este resultado indica que la actividad de la proteína avidina estaba en un valor de 87.5% con respecto al valor teórico. Este valor indica que al utilizar el buffer de carbonato de amonio se pierde el 12.5% de actividad de avidina. Los datos de la cinética de conjugación de Avidina–Biotina pueden ser ajustados efectivamente a un polinomio de segundo orden, con un coeficiente de determinación de 0.996.

De forma similar, se evaluó la actividad de avidina en el buffer 10mM PBS pH 7.4, mostrando los resultados en la figura 36. Al utilizar el buffer PBS se encontró un resultado similar al que se obtuvo cuando se usó el buffer de carbonato de amonio, donde la avidina se también satura con 3.5 moléculas de biotina (5.32×10^{-6} mg/mL), es decir que la actividad de avidina también es del 87.5%. Los datos de la cinética de conjugación de Avidina–Biotina se ajustaron efectivamente a un polinomio de segundo orden, con un coeficiente de determinación de 0.9888.

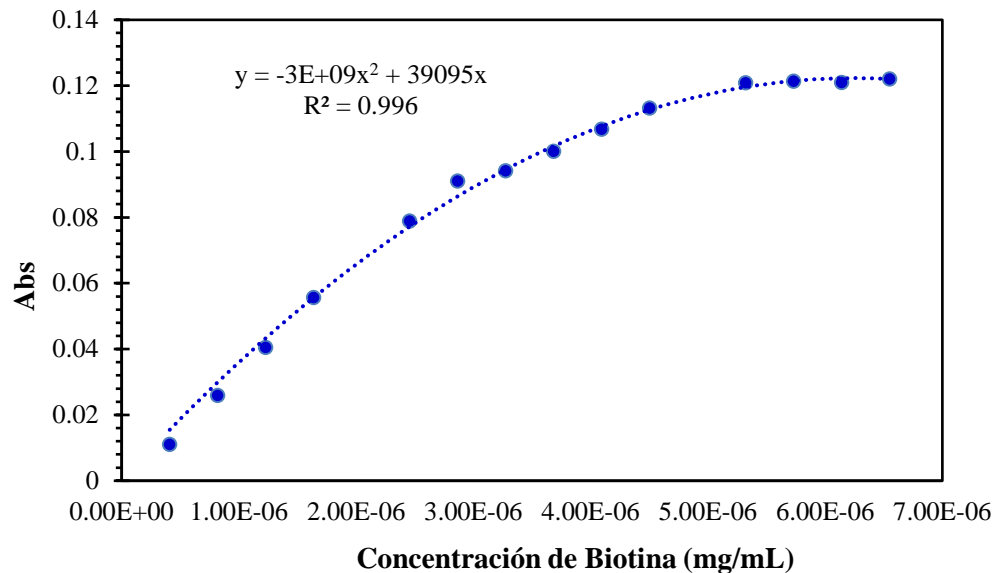


Figura 35. Curva de saturación de Avidina en solución de buffer de carbonato de amonio.

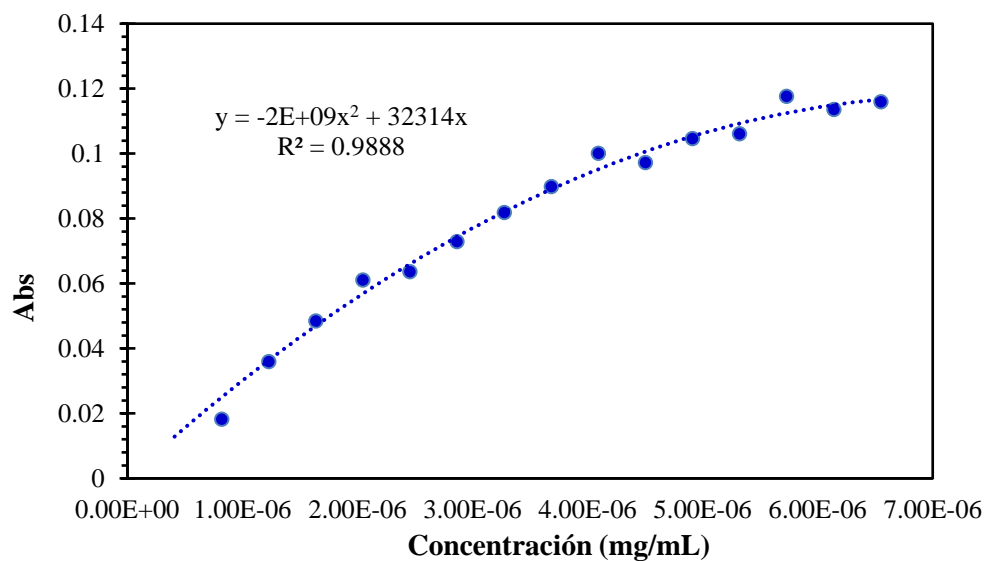


Figura 36. Curva de saturación de Avidina-Biotina en solución de buffer de fosfatos.

4.4 Conjugación de Avidina en Nanopartículas de PLGA-PEG-Biotina

Se realizaron curvas de calibración para Avidina-FITC en buffer PBS 10 mM pH 7.4, para así determinar la concentración de avidina sobre la superficie de las NP, según el cambio de proporción másica del polímero modificado PLGA-PEG-Biotina. La figura 37 corresponde a la curva de calibración de avidina-FITC, la cual se preparó partiendo de una concentración madre de $7.35294\text{E-}06$ M, y se diluyó 23 veces para obtener los puntos de la curva. En esta curva se tomaron 5 puntos y se puede observar una buena correlación entre una línea recta y los datos experimentales, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.995 y resultando un coeficiente de extinción molar de $8\text{E}+10$ A.U./M·cm.

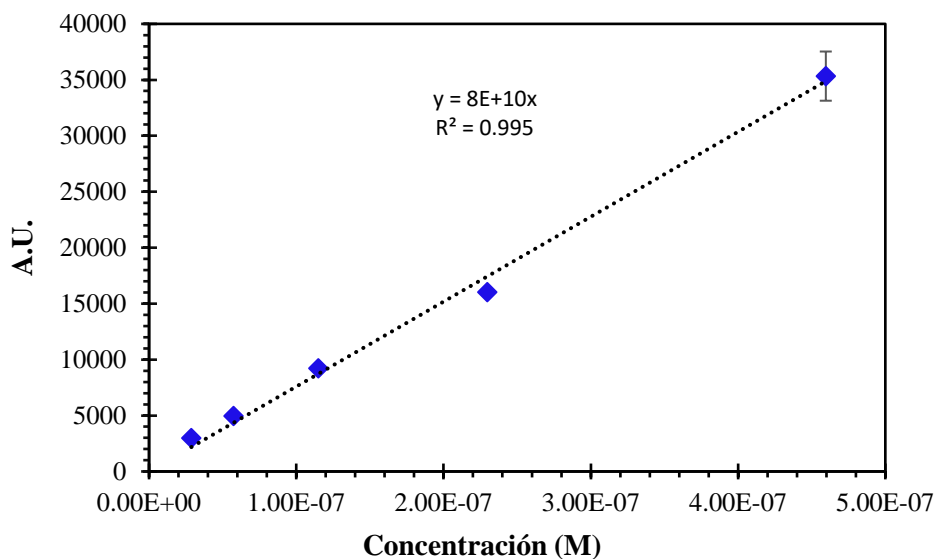


Figura 37. Curva de calibración de Avidina-FITC en solución de buffer de fosfatos.

Una vez caracterizada la Avidina-FITC en buffer PBS 10 mM pH 7.4, se procedió a hacer los experimentos de conjugación a las nanopartículas. Dicha conjugación sobre la superficie de las nanopartículas se cuantificó usando un Lector de placas multimodal Cytation 3. Se evaluaron los efectos de la conjugación de estas biomoléculas sobre las nanopartículas preparadas con diferentes concentraciones másicas de los biopolímeros, realizando los experimentos por triplicado. Los resultados del lector de placas se analizaron usando el coeficiente de extinción molar de Avidina-FITC y los resultados se presentan en la Figura 38. En dicha figura, se puede observar un incremento en la concentración promedio de avidina en la superficie de las nanopartículas cuando se incrementa la proporción másica del biopolímero PLGA-PEG-Biotina. Sin

embargo, es necesario aumentar el número de repeticiones del experimento para observar diferencias significativas. Dicha relación entre el biopolímero PLGA-PEG-Biotina y la avidina en la superficie de las NP es congruente con lo esperado, ya que al aumentar la proporción másica del biopolímero PLGA-PEG-Biotina en las nanopartículas se aumenta la concentración de biotina y por tanto el número de sitios disponibles para la bioconjugación con avidina. Asimismo, a pesar de que en las NP de PLGA no tenían biotina, también se observó presencia de avidina, lo cual se puede deber a la adsorción de esta proteína en la superficie de las nanopartículas por interacciones hidrofóbicas (Jeong et al. 2000), o bien, remanentes de proteína de los lavados. También se observa que a partir de la tercera proporción másica 0.4:0.6 PLGA-PEG-Biotina:PLGA los valores no tienen cambios significativos, es decir los valores de “p” estaban por arriba de 0.05 ($p > 0.05$). También se puede observar que las proporciones másicas de 0.4:0.6 y 0.6:0.4 PLGA-PEG-Biotina:PLGA no tienen diferencias estadísticamente significativas en comparación a la proporción másica que tuvo mayor concentración de biotina (1.0:0.0 de PLGA-PEG-Biotina:PLGA). Por lo tanto, con el número de repeticiones usado en el análisis estadístico, se puede concluir que no es necesario utilizar las fracciones másicas con las concentraciones más elevadas del biopolímero PLGA-PEG-Biotina para llegar a las mismas concentraciones de Avidina en la superficie de las nanopartículas. En la Tabla 1 se presenta un resumen de los resultados del ANOVA, donde se compara los diferentes resultados de las preparaciones, mostrando donde hay diferencias significativas.

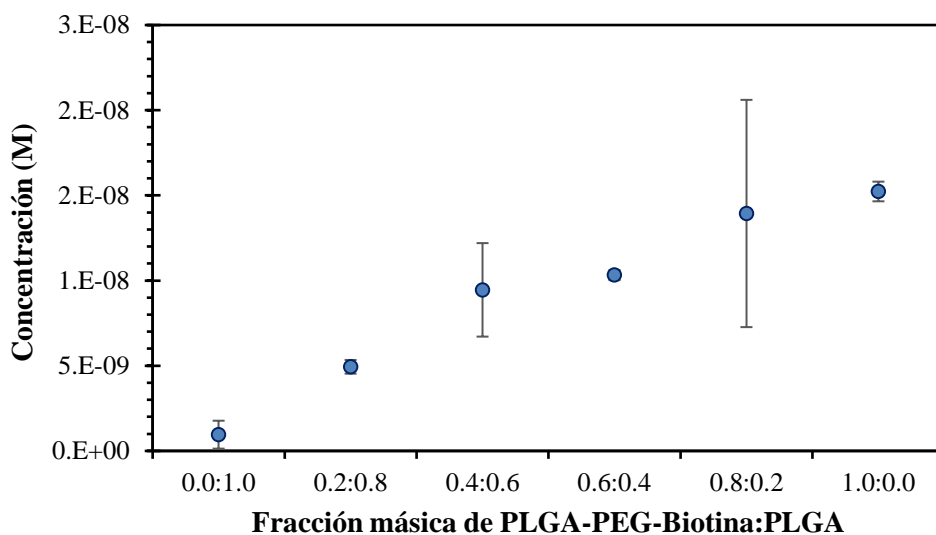


Figura 38. Concentraciones de Avidina-FITC en las nanopartículas preparadas con diferentes proporciones másicas del biopolímero PLGA-PEG-Biotina.

Tabla 1. Análisis ANOVA de las concentraciones de Avidina-FITC en las nanopartículas preparadas con diferentes proporciones másicas del biopolímero PLGA-PEG-Biotina. (n=3)

Comparación entre diferentes preparaciones de nanopartículas PLGA-PEG-Biotina:PLGA		Valor p	Diferencia Estadísticamente Significativa
0.2:0.8	0.0:1.0	0.59205	No
3	1	0.03988	Si
3	2	0.46942	No
4	1	0.02185	Si
4	2	0.29961	No
4	3	0.99903	No
5	1	0.00189	Si
5	2	0.02819	Si
5	3	0.47680	No
5	4	0.67842	No
6	1	8.32424E-4	Si
6	2	0.01151	Si
6	3	0.23896	No
6	4	0.38700	No
6	5	0.99369	No

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La modificación del biopolímero PLGA con PEG y la posterior conjugación de biotina se llevó a cabo exitosamente. La fracción másica de biopolímeros usados en la preparación de nanopartículas tiene influencia sobre las propiedades fisicoquímicas de estas. Al aumentar la fracción másica del biopolímero PLGA-PEG-Biotina, aumenta tanto el tamaño como el índice de polidispersidad de las NP. No obstante, se observó en el análisis estadístico que el aumento en la fracción másica del biopolímero no afecta en la estabilidad de las NP. También se realizó caracterizaciones de las partículas a través de los diferentes tratamientos y conjugación con la proteína Avidina. Se encontró que las fracciones másicas más estables son las de 0.4:0.6 y 0.6:0.4, ya que es en las que se tiene mayor control del tamaño e índice de polidispersidad. No obstante, se notó que los PZ se vieron muy afectados después del proceso de liofilización desestabilizando a las NP.

En el análisis de la actividad de avidina en dos buffers diferentes, se observó que la actividad de esta proteína no se vio afectada, no obstante, la velocidad de la cinética de reacción disminuyó en el buffer de carbonato de amonio. Para el análisis de la conjugación de avidina se realizó mediante fluorescencia, se concluye que el número de avidinas conjugadas en las nanopartículas está en función de la proporción másica de PLGA-PEG-Biotina usada en la preparación. Las fracciones másicas más indicadas para su uso como nanoplataforma de reconocimiento molecular son las de 0.4:0.6 y 0.6:0.4 PLGA-PEG-Biotina:PLGA, debido a que son las proporciones en las cuales se tiene un mayor control de sus propiedades fisicoquímicas, además de tener concentraciones de Avidina-FITC muy similares a las proporciones másicas con biopolímero PLGA-PEG-Biotina.

5.2 Recomendaciones

- Estandarizar el método de modificación del Biopolímero para aumentar la eficiencia de recuperación del mismo.
- Estudiar los efectos que tiene la sucrosa sobre la estabilización de las NP, para encontrar la relación másica de sucrosa-NP ideal.
- Se recomienda modelar los estudios cinéticos de la actividad de avidina con biotina a diferentes pH de solución.
- Se recomienda aumentar el número de muestras analizadas en la conjugación de avidina a las NP para mejorar el análisis estadístico.
- Se recomienda hacer estudios con Biotina unida a un fluorocromo para comprobar la actividad de la avidina posterior a su conjugación a las NP.
- Se recomienda hacer estudios de reconocimiento celular con anticuerpos comerciales unidos a biotina, así como estudios de internalización de las NP en diferentes líneas celulares.

REFERENCIAS

- Abdelwahed, Wassim, Ghania Degobert, Serge Stainmesse, and Hatem Fessi. 2006. "Freeze-Drying of Nanoparticles: Formulation, Process and Storage Considerations." *Advanced Drug Delivery Reviews* 58(15): 1688–1713.
- Alexandr Shimko, Anastasia Povolotckaia, and Aelexandra Mikhaylova. 2014. "Zeta Potential Measurement Principle (Laser Doppler Electrophoresis)." *Center for optical and laser materials research*: 1. <http://laser.spbu.ru/en/research-eng/dzeta-eng.html>.
- Bailon, Pascal, Wolfgang Berthold, Pascal Bailon, and Wolfgang Berthold. 1998. "Polyethylene Glycol-Conjugated Pharmaceutical Proteins." 1(8): 352–56.
- Balan, Vera et al. 2012. "Biotinylated Chitosan-Based SPIONs with Potential in Blood-Contacting Applications." *Journal of Nanoparticle Research* 14(2).
- Benelmekki, Maria. 2014. "An Introduction to Nanoparticles and Nanotechnology." *Designing Hybrid Nanoparticles*. <http://iopscience.iop.org/chapter/978-1-6270-5469-0/bk978-1-6270-5469-0ch1>.
- Betancourt, Tania et al. 2009. "PEGylation Strategies for Active Targeting of PLA/PLGA Nanoparticles." *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 91(1): 263–76.
- Boddu, Sai HS., and R. Vaishya. 2012. "Preparation and Characterization of Folate Conjugated Nanoparticles of Doxorubicin Using Plga-Peg-Fol Polymer." *Medicinal chemistry* 02(04): 68–75. <https://www.omicsonline.org/2161-0444/2161-0444-2-068.digital/2161-0444-2-068.html>.
- Bogunia-Kubik, Katarzyna, and Masanori Sugisaka. 2002. "From Molecular Biology to Nanotechnology and Nanomedicine." *BioSystems* 65(2–3): 123–38.
- Bott, R. 2014. *Igarss 2014 Bioconjugate Techniques 2ed.*
- Buzea, Cristina, Ivan I. Pacheco, and Kevin Robbie. 2007. "Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity." *Biointerphases* 2(4): MR17–71. <http://avs.scitation.org/doi/10.1116/1.2815690>.

- Cho, Kwangjae et al. 2008. "Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer." *Clinical Cancer Research* 14(5): 1310–16.
- Danhier, Fabienne et al. 2012. "PLGA-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications." *Journal of Controlled Release* 161(2): 505–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>.
- Desai, Manisha P et al. 1997. "The Mechanism of Uptake of Biodegradable Microparticles in Caco-2 Cells Is Size Dependent."
- Fredenberg, Susanne, Marie Wahlgren, Mats Reslow, and Anders Axelsson. 2011. "The Mechanisms of Drug Release in Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid) -Based Drug Delivery Systems — A Review." *International Journal of Pharmaceutics* 415(1–2): 34–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049>.
- Guillot, Pascale V., Wei Cui, Nicholas M. Fisk, and Dame Julia Polak. 2007. "Stem Cell Differentiation and Expansion for Clinical Applications of Tissue Engineering." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11(5): 935–44. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1582-4934.2007.00106.x>.
- Gutiérrez-Valenzuela, Cindy et al. 2016. "Folate Functionalized PLGA Nanoparticles Loaded with Plasmid PVAX1-NH36: Mathematical Analysis of Release." *Applied Sciences* 6(12): 364. <http://www.mdpi.com/2076-3417/6/12/364>.
- Hans, M L, and A M Lowman. 2002. "Biodegradable Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting." 6(September): 319–27.
- Honary, S, and F Zahir. 2013. "Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2)." *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12(2): 265–73. <http://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/view/88556>.
- Honary, Soheyla, and Foruhe Zahir. 2013. "Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1)." *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 12(April): 255–64.
- Hood, Elizabeth E. et al. 1997. "Commercial Production of Avidin from Transgenic Maize characterization of Transformant, Production, Processing, Extraction and Purification." *Molecular Breeding* 3(4): 291–306.

- Jain, Akshay, and Kun Cheng. 2017. "The Principles and Applications of Avidin-Based Nanoparticles in Drug Delivery and Diagnosis." *Journal of Controlled Release* 245: 27–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.11.016>.
- Jeong, Ji Hoon, Dong Woo Lim, Dong Keun Han, and Tae Gwan Park. 2000. "Synthesis, Characterization and Protein Adsorption Behaviors of PLGA/PEG Di-Block Co-Polymer Blend Films." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 18(3–4): 371–79.
- Jiang, Jingkun, Günter Oberdörster, and Pratim Biswas. 2009. "Characterization of Size, Surface Charge, and Agglomeration State of Nanoparticle Dispersions for Toxicological Studies." *Journal of Nanoparticle Research* 11(1): 77–89.
- Khalil, Najeh Maissar et al. 2013a. "Pharmacokinetics of Curcumin-Loaded PLGA and PLGA-PEG Blend Nanoparticles after Oral Administration in Rats." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 101: 353–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.06.024>.
- . 2013b. "Pharmacokinetics of Curcumin-Loaded PLGA and PLGA-PEG Blend Nanoparticles after Oral Administration in Rats." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 101: 353–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.06.024>.
- Kumari, Avnesh, Sudesh Kumar Yadav, and Subhash C. Yadav. 2010. "Biodegradable Polymeric Nanoparticles Based Drug Delivery Systems." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75(1): 1–18.
- Lakowicz, Joseph R. 2006a. "Chapter 1 Principles of Fluorescence." *Principles of Fluorescence Spectroscopy*: 1–26.
- Lakowicz, Joseph R. 2006b. "02. Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy BT - Principles of Fluorescence Spectroscopy." *Principles of Fluorescence Spectroscopy*: 1–35. [papers2://publication/uuid/224CF189-B48B-4B93-8D82-24DE66EB7EB7](https://publication/uuid/224CF189-B48B-4B93-8D82-24DE66EB7EB7).
- Leng, Yang. 2008. *MATERIALS CHARACTERIZATION Introduction to Microscopic*.
- Mahon, Eugene et al. 2012. "Designing the Nanoparticle – Biomolecule Interface for ' Targeting and Therapeutic Delivery .'" *Journal of Controlled Release* 161(2): 164–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.009>.

- Makadia, Hirenkumar K., and Steven J. Siegel. 2011. "Poly Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier." *Polymers* 3(3): 1377–97.
- Malý, J. et al. 2009. "The Synthesis and Characterization of Biotin-Silver-Dendrimer Nanocomposites as Novel Bioselective Labels." *Nanotechnology* 20(38): 385101.
- Martin, Charles R. 1994. "Nanomaterials : A Membrane-Based Synthetic Approach." 266(December).
- MASAGO, Hisashi. 2005. 78 Journal of the Japan Society of Colour Material *UV/Vis Spectroscopy*.
- McCall, Rebecca L., and Rachael W. Sirianni. 2013. "PLGA Nanoparticles Formed by Single- or Double-Emulsion with Vitamin E-TPGS." *Journal of Visualized Experiments* (82): 1–8. <http://www.jove.com/video/51015/plga-nanoparticles-formed-single-or-double-emulsion-with-vitamin-e>.
- Menon, Jyothi U. et al. 2014. "Polymeric Nanoparticles for Pulmonary Protein and DNA Delivery." *Acta Biomaterialia* 10(6): 2643–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.01.033>.
- Mohanraj, V J, and Y Chen. 2006. "Nanoparticles – A Review." 5(June): 561–73.
- Murthy, Shashi K. 2007. "Nanoparticles in Modern Medicine: State of the Art and Future Challenges." *International journal of nanomedicine* 2(2): 129–41. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2673971&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Owens, Donald E., and Nicholas A. Peppas. 2006. "Opsonization, Biodistribution, and Pharmacokinetics of Polymeric Nanoparticles." *International Journal of Pharmaceutics* 307(1): 93–102.
- Panyam, Jayanth, and Vinod Labhassetwar. 2003. "Biodegradable Nanoparticles for Drug and Gene Delivery to Cells and Tissue." *Advanced Drug Delivery Reviews* 55(3): 329–47.
- Park, Jason et al. 2009. "PEGylated PLGA Nanoparticles for the Improved Delivery of Doxorubicin." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 5(4): 410–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2009.02.002>.
- Peppas, L B. 1995. "Recent Advances on the Use of Biodegradable Microparticles and Nanoparticles in

- Controlled Drug-Delivery.” *International Journal of Pharmaceutics* 116(1): 1–9.
- Pereira, Emiliane Daher et al. 2016. “Influence of PLGA and PLGA-PEG on the Dissolution Profile of Oxaliplatin.” *Polímeros* 26(2): 137–43.
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282016000200137&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.br/pdf/po/v26n2/0104-1428-po-0104-14282323.pdf.
- Pulkkinen, Mika et al. 2008. “Three-Step Tumor Targeting of Paclitaxel Using Biotinylated PLA-PEG Nanoparticles and Avidin-Biotin Technology: Formulation Development and in Vitro Anticancer Activity.” *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70(1): 66–74.
- R. Pecora. 2000. “Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids.” *Journal of Nanoparticle Research* 2: 123–31.
- Raghavendra, Gownolla Malegowd, Kokkarachedu Varaprasad, and Tippabattini Jayaramudu. 2015. Nanotechnology Applications for Tissue Engineering *Chapter 2. Biomaterials_ Design, Development and Biomedical Applications*. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-32889-0.00002-9>.
- Ratner, Buddy D., Allan S. Hoffman, Frederick J. Schoen, and Jack E. Lemons. 2012. *Biomaterials Science*.
- Rawat, Manju, Deependra Singh, Swarnlata Saraf, and Swarnlata Saraf. 2006. “Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs.” *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 29(9): 1790–98.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16946487%5Cnhttp://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bpb/29.1790?from=CrossRef>.
- Ren, Wen Xiu et al. 2015. “Recent Development of Biotin Conjugation in Biological Imaging, Sensing, and Target Delivery.” *Chemical Communications* 51(52): 10403–18.
- RICH, DANIEL H., and JASBIR SINGH. 2014. 1 Major Methods of Peptide Bond Formation *The Carbodiimide Method*. ACADEMIC PRESS, INC. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-304201-9.50011-4>.
- Roberts, M. J., M. D. Bentley, and J. M. Harris. 2012. “Chemistry for Peptide and Protein PEGylation.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 64(SUPPL.): 116–27.

- Roberts, M J, M D Bentley, and J M Harris. 2002. "Chemistry for Peptide and Protein PEGylation." 54: 459–76.
- Seigneuric, R et al. 2010. "From Nanotechnology to Nanomedicine: Applications to Cancer Research." *Current molecular medicine* 10(7): 640–52.
- Silva, Gabriel A. 2004. "Introduction to Nanotechnology and Its Applications to Medicine." *Surgical Neurology* 61(3): 216–20.
- Smith, Barton A, and B R Ware. 1978. *Apparatus and Methods for Laser Doppler Electrophoresis BT - Contemporary Topics in Analytical and Clinical Chemistry: Volume 2*.
- Song, Zhimei et al. 2011. "Journal of Colloid and Interface Science Curcumin-Loaded PLGA-PEG-PLGA Triblock Copolymeric Micelles : Preparation , Pharmacokinetics and Distribution in Vivo." *Journal of Colloid And Interface Science* 354(1): 116–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2010.10.024>.
- Soppimath, Kumares S, Tejraj M Aminabhavi, and Anandrao R Kulkarni. 2001. "Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Delivery Devices." 70: 1–20.
- Tengku Mohd, Tengku Amran, Mohd Zaidi Jaafar, Azad Anugerah Ali Rasol, and Mohd Fauzi Hamid. 2016. "Measurement of Streaming Potential in Downhole Application: An Insight for Enhanced Oil Recovery Monitoring." *MATEC Web of Conferences* 87.
- Tucker, I. M. et al. 2015. "Laser Doppler Electrophoresis Applied to Colloids and Surfaces." *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 20(4): 215–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2015.07.001>.
- Ventola, C Lee, Dhruva J Bharali, and Shaker A Mousa. 2010. "The Nanomedicine Revolution: Part 1: Emerging Concepts. Pharmacy and Therapeutics." *Pharmacology & therapeutics* 128(9): 512–25. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725810001506>.
- Veronese, Francesco M. 2008. "The Impact of PEGylation on Biological Therapies." *Biodrugs* 39(2): 43–50.
- Van Vlerken, Lilian E., Tushar K. Vyas, and Mansoor M. Amiji. 2007. "Poly(Ethylene Glycol)-Modified Nanocarriers for Tumor-Targeted and Intracellular Delivery." *Pharmaceutical Research* 24(8): 1405–

14.

Wedlock, David J. 1994. "Controlled Particle , Droplet and Bubble Formation Edited By." *Butterworth-Heinemann Ltd*: 191–216. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7506-1494-8.50012-2><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780750614948500122>.

Weiss, Barbara et al. 2007. "Coupling of Biotin - (Poly (Ethylene Glycol)) Amine to Poly (D , L -Lactide-Co -Glycolide) Nanoparticles for Versatile Surface Modification."

Williams, Andrew, and Ibrahim T Ibrahim. 1981. "Carbodiimide Chemistry : Recent Advances." : 589–636.

Wünsch, Erich., and Fritiz Drees. 1966. "Darstellung Der Sequenz 22-29." *Chem. Ber.* 105: 110–20.

Zhao, Kai et al. 2013. "Preparation and Efficacy of Newcastle Disease Virus DNA Vaccine Encapsulated in PLGA Nanoparticles." *PLoS ONE* 8(12): 6–13.