



**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y
ENSAYOS DE BIODISTRIBUCIÓN DE NANOPARTÍCULAS
CON APLICACIONES EN EL TRANSPORTE DE FÁRMACOS.**

Emilia Alberdi^{1,✉}, M. Ana Huerdo¹, Andrea Enrique², Luis Bruno-Blanch² y Carolina Vericat¹

¹*Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA),
Diagonal 113 y 64, -1900- La Plata, Argentina*

²*Química Medicinal, Fac. Cs. Exactas- Universidad Nacional de La Plata
Calle 47 y 115 - 1900 - La Plata.*

Recibido el 4 de Marzo de 2013. Aceptado el 4 de Junio de 2013.

Abstract

Gold nanoparticles (AuNPs) of different sizes (approximately 15, 40 and 70 nm) have been synthesized and surface modified with the polysorbate Tween® 20 (AuNP-T) with the final purpose of using them as carriers for drugs acting on the central nervous system. The different

✉ Corresponding author: E-mail: ecalberdi@inifta.unlp.edu.ar

AuNP-T's have been preliminarily characterized by UV-visible spectroscopy and their shape and size distribution have been studied by Atomic Force Microscopy (AFM). To study their in vivo biodistribution, AuNP-T dispersions were injected into mice. Brain and other organ sections were analyzed both by optical and transmission electron microscopies (OM and TEM).

Key words: gold nanoparticles, blood-brain barrier, carriers, biodistribution.

Resumen

Se realizó la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) de 3 tamaños diferentes (aproximadamente 15, 40 y 70 nm), las cuales se postfuncionalizaron con el polisorbato Tween® 20 (AuNPs-T) con el fin de que tengan aplicación como potenciales vehículos de drogas con acción a nivel de sistema nervioso central. Las AuNPs-T se caracterizaron en forma preliminar por espectroscopía UV-visible y mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM) se analizó su morfología y la distribución de tamaños. Para estudiar su biodistribución in vivo se inyectó una dispersión de AuNPs-T a ratones y se analizaron cortes de cerebro y otros órganos por microscopías óptica y de transmisión electrónica (TEM).

Palabras clave: nanopartículas de oro, barrera hematoencefálica, vehículos, biodistribución.

INTRODUCCIÓN

Es sabido que para ejercer su acción en forma óptima las drogas deben llegar en tiempo y forma al sitio de acción. La intención de la incorporación de drogas en "carriers" o vehículos es la de posibilitar el transporte de las mismas a través de barreras biológicas y conseguir su entrega selectiva. Por ejemplo, fármacos que actúan en el sistema nervioso central (como los anticonvulsivantes) deben atravesar la barrera hematoencefálica para llegar al tejido diana. En la actualidad el transporte y la liberación controlada de fármacos empleando estrategias de Nanotecnología, entre las que se encuentra el uso de nanopartículas (NPs), es sin duda uno de los principales objetivos en Nanomedicina.

OBJETIVOS

Se propone la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) de diferentes tamaños, las cuales se podrán usar como potenciales vehículos para mejorar la administración y el transporte de fármacos por vía parenteral. Mediante el uso de recubrimientos hidrofílicos adecuados se diseñarán formas de minimizar la opsonización y posterior eliminación de las NPs a través del sistema retículo-endotelial, y también de favorecer la adsorción de ciertas proteínas plasmáticas que permiten atravesar barreras fisiológicas como la hematoencefálica. Por último, se harán ensayos de biodistribución en animales de laboratorio a fin de evaluar la efectividad de los novvehículos diseñados para atravesar la barrera hematoencefálica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se sintetizaron AuNPs por reducción química de sales de oro empleando soluciones de HAuCl₄ y citrato de sodio en diferentes proporciones, a fin de obtener AuNPs de 3 tamaños diferentes (aproximadamente de 15, 40 y 70 nm, a las que se denominó dispersiones A, B y C respectivamente) [1-3]. Cada una de estas dispersiones coloidales fue postfuncionalizada con polisorbatos (Tween® 20) para favorecer el pasaje de estos transportadores a través de la barrera hematoencefálica, obteniéndose en cada caso dispersiones de AuNPs con polisorbatos (AuNP-T) [3-5] que resultaron ser estables durante meses.

El proceso de purificación de las diferentes dispersiones, tendiente a eliminar los restos de reactivos sin reaccionar y de Tween® 20 que quedaban en la solución, se intentó por dos métodos diferentes: diálisis con membrana de celulosa de 10 kDa y centrifugación diferencial seguida por resuspensión en buffer fosfato de pH 7.4.

Como metodología de caracterización preliminar se empleó espectroscopía UV-visible para analizar el pico de resonancia de plasmones superficiales que presentan estas AuNPs en aproximadamente 520 nm. Para poder estimar el tamaño de las nanoestructuras se estudiaron las AuNPs (antes y después de la postfuncionalización) inmovilizadas sobre sustratos de grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG) mediante microscopía de fuerzas atómicas (AFM) en modo intermitente.

Por otra parte, como paso inicial para poner a punto los ensayos de biodistribución de las AuNPs-T, se inyectaron 200 μ L de AuNPs-T de la dispersión A a ratones Swiss y luego de 24 hs se sacrificaron los animales, extrayéndose hígado, riñón, bazo y cerebro (región de hipocampo y corteza cerebral), para ser observados por microscopía de transmisión electrónica (TEM). Esto se realizó en la cátedra de Farmacoquímica, Fac. de Cs. Exactas, UNLP.

RESULTADOS

El análisis por espectroscopía UV-visible de las AuNPs-T mostró que las dispersiones coloidales A, B y C fueron postfuncionalizadas con éxito (Figura 1a), Las nanopartículas pudieron ser purificadas por centrifugación, pero no fue posible eliminar el Tween® 20 mediante diálisis.

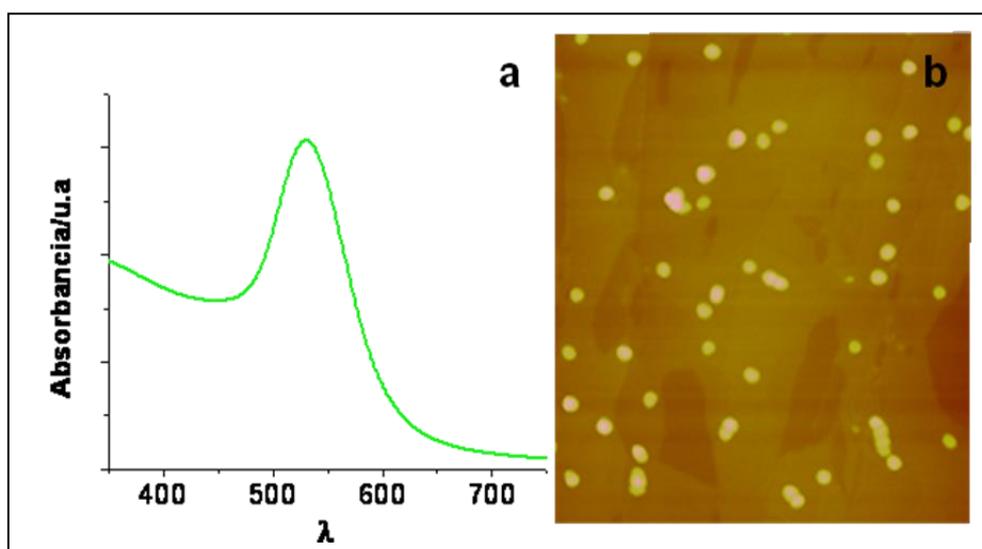


Figura 1. (a) Espectro UV-Visible de nanopartículas de Au de 35 nm recubiertas con Tween® 20 (AuNPs-T B). (b). Imagen AFM en modo contacto intermitente de las mismas nanopartículas (AuNPs-B). 1.3 μ m x 1.3 μ m.

Las imágenes tomadas por AFM mostraron que en todos los casos las AuNPs son esféricas y la distribución de tamaños no se modifica apreciablemente luego de la postfuncionalización con

polisorbato. Como ejemplo, en la Figura 1b se muestra una imagen de AFM de las AuNPs de la dispersión B, con un tamaño de partículas más frecuente entre 30-35 nm.

Como parte preliminar del estudio de biodistribución se realizó la observación por microscopía óptica de los cortes semifinos teñidos con hematoxilina-eosina de los tejidos extraídos a los ratones sacrificados. En los mismos se destacó que tanto los tejidos control como los tejidos a los que se inyectó AuNPs-T presentaban una morfología histo y citológica adecuada a las características tisulares para ratones Swiss de similar peso y edad. En las imágenes de TEM se observaron AuNPs en forma de agrupación en neuropilo y también AuNPs individuales sobre membrana plasmática de células de corteza cerebral.

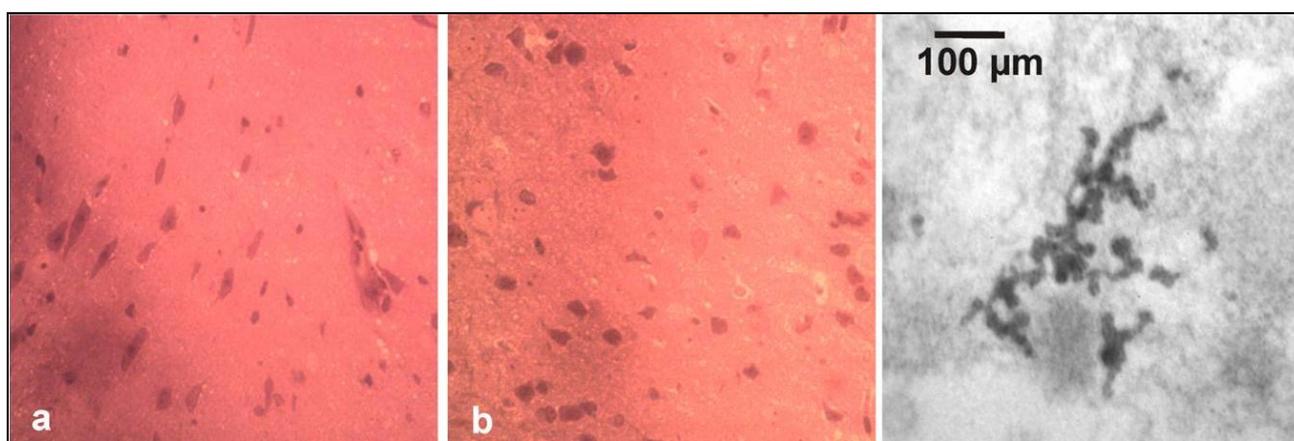


Figura 3. (a) y (b): Imágenes de microscopía óptica de cortes semifinos, teñidos con hematoxilina-eosina de cerebro de ratón control (a) y tratado (b) con nanopartículas de Au de 15 nm recubiertas con Tween® 20 (AuNPs-T A). (c). Imagen TEM de cortes ultrafinos de corteza cerebral de ratón en la que se observa una agrupación de AuNPs-T A.

CONCLUSIONES

Es posible obtener AuNPs estables de diferentes tamaños, las cuales pueden ser recubiertas con polisorbatos y purificadas. Estas resultaron ser estables en medio fisiológico. La purificación de las AuNPs-T por centrifugación diferencial mostró ser efectiva, a diferencia de la purificación por diálisis que no funcionó probablemente debido a que el tamaño de poro de la membrana utilizada es menor al tamaño de la micela formada por el polisorbato. La observación de AuNPs-T en las imágenes TEM de cortes de corteza cerebral de animales tratados permitió estudiar en forma preliminar su biodistribución y selectividad en cerebro.

REFERENCIAS

- [1] Michael J. Natan et.al., *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 735-743.
- [2] Frens G. et.al., *Nature Phys. Sci.*, **1973**, 241, 20.
- [3] A. Eychmüller et. al., *J. Phys. Chem.*, **2011**, 115, 4502-4506.
- [4] K. Aslan, et. al., *Langmuir*, **2002**, 18, 6065.
- [5] J. Kreuter et. al. *I. J. Pharm.*, **2007**, 331, 1-10.