



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Producción de nanopartículas de PLGA para el transporte de medicamentos específico a tejido óseo**

**Ruth Janneth Lancheros Salas**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental  
Bogotá, Colombia

2016



# **Producción de nanopartículas de PLGA para el transporte de medicamentos específico a tejido óseo**

**Ruth Janneth Lancheros Salas**

Tesis investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
Doctor en Ingeniería Química

Director:

Ph.D. Rubén Daría Godoy Silva

Codirector:

Ph.D., Carlos Arturo Guerrero Fonseca

Línea de Investigación:

Grupo de Investigación de Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá, Colombia

2016



*(Dedicatoria o lema)*

*A Dios, quien siempre está conmigo, mis padres,  
esposo, hija y amigos, quienes me han acompañado  
a lo largo de todo este camino.*



## **Agradecimientos**

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación -COLCIENCIAS- por la financiación del proyecto 1101-569-35147, con el cuál se apoyó la compra de insumos y equipos para el desarrollo de la presente investigación.

A la División de Investigación sede Bogotá –DIB-, por la financiación del proyecto 202010018338 2012, con el cuál se pagaron algunos ensayos empleados en la presente investigación.

Al Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, por el apoyo recibido al desarrollar esta investigación, tanto a nivel de consulta de conceptos básicos como con el uso de los laboratorios.

A mi director del Ingeniero Rubén Darío Godoy, de Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Nacional, por su colaboración y acertada dirección.

A mi codirector el Médico Carlos Arturo Guerrero, director del grupo de investigación en Biología Molecular de Virus por su disponibilidad, asesoría y su incondicional apoyo en la concepción y desarrollo de esta investigación. Gracias por estar ahí siempre que tenía alguna inquietud.

A la Ingeniera Natalie Camacho, miembro de grupo de investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos, por su colaboración en la ejecución de muchos de los experimentos realizados. Gracias por ser no solo una colaboradora, si no mi amiga y confidente.

Al Ingeniero Jose Angel Beleño, miembro de grupo de investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos, por su colaboración, amistad y soporte en muchos de los experimentos realizados.

A Rafael Guerrero, Médico y miembro del grupo de investigación en Biología Molecular de Virus, por su apoyo en todo el procesamiento de imágenes.

A Eliana Lozano y Fernanda Castrillón, miembros de grupo de investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos, por su apoyo en la parte administrativa del proyecto de investigación. Gracias por hacer más fáciles muchos de los trámites administrativos.

Al Ingeniero Alvaro Orjuela, miembro de grupo de investigación en Procesos Químicos y Bioquímicos, por su colaboración en la edición de documentos y su apoyo en algunas de las presentaciones realizadas

Al Ingeniero Jorge Manrique por su soporte y colaboración durante el desarrollo de mi tesis.

A el operario Ricardo Cortez, por su incondicional apoyo en la consecución de reactivos y equipos en los Laboratorios de Ingeniería Química (LIQ).

Al los Ingenieros Hugo Zea, Pedro Arias y Francisco, por la colaboración en la toma de microfotografías.

## Resumen

En el presente trabajo se desarrolló un vehículo de PLGA-ALE (copolímero de los ácidos láctico y glicólico conjugado con alendronato) para el transporte y liberación de N-acetilcisteína (NAC), direccionado hacia tejido óseo, con el fin atenuar la actividad de los osteoclastos y así ayudar a personas que sufran de enfermedades óseas como la osteoporosis.

Las partículas submicrónicas se fabricaron por el método de nanoprecipitación, obteniéndose un tamaño de 228 nm y atraparon 1,74% de NAC. Dichas partículas mostraron tener afinidad por el tejido óseo, lo que indica que puede transportar y direccionar el compuesto activo hacia dicho tejido. La NAC se libera de manera rápida las primeras 1.5 h, después baja la velocidad de liberación. El ligando con afinidad por el tejido óseo fue el alendronato; este direcciona al polímero y adicionalmente le brinda protección contra la hidrólisis. Una vez liberado podría tener acción farmacológica sobre el tejido óseo. Pasado un mes las partículas han perdido casi un 50% de su peso molecular inicial, indicando el carácter biodegradable del vehículo, hecho que lo hace un buen candidato para liberar de manera controlada medicamentos direccionados hacia el tejido óseo. Las pruebas para verificar la actividad biológica del vehículo dieron un resultado positivo, encontrándose una atenuación en la resorción ósea presentada por células similares a osteoclastos. Es necesario optimizar la capacidad de transporte de NAC con el fin de poder ampliar la cantidad que se puede transportar y realizar estudios para verificar su efectividad en un modelo *in vivo*.

**Palabras claves:** partículas submicrónicas, nanopartículas PLGA, alendronato, N-acetilcisteína, hueso, osteoporosis, nanoprecipitación.

## Abstract

In the present research a carrier of PLGA-ALE (copolymer of lactic and glycolic acid conjugated with alendronate) was developed for the transporting and releasing of N-Acetylcysteine (NAC), targeted to bone tissue, in order to decrease the activity of osteoclast and help people who suffer from bone illness.

The submicron particles were obtained using the nanoprecipitation method. They have a particle size of 228 nm and entrapped 1.74% of NAC. This particles showed to be affined to the bone tissue, which indicates they can transport and target the active compound to this tissue. NAC is released quickly released in the first 1.5hr, after this time the releasing rate decrease. The ligand with bone tissue affinity was the alendronate; this targets the polymer and additionally protects it from hydrolysis. Once is released it could have pharmacological activity over the bone tissue. After one month the particles have lost almost 50% of their initial molecular weight, indicating the biodegradable character of the vehicle, this fact makes it a good candidate for a controlled releasing of active compounds targeted to bone tissue. The essays done to verify the carrier biological activity were positive, and attenuation in the bone resorption found in similar cells to osteoclasts. It is necessary to optimize the transport capacity of NAC in order to increase the amount of substance that can be transported and make studies to verify the effectiveness in an in vivo model.

**Keywords:** submicron particles, nanoparticles, PLGA, alendronate, N-Acetylcysteine, bone, osteoporosis, nanoprecipitation.

## Contenido

<b>1. Bases teóricas para la fabricación de un vehículo que transporte N-acetilcisteína con afinidad por el tejido óseo.....</b>	<b>5</b>
1.1 Vehículos para el transporte de compuestos activos.....	6
1.2 Materiales para la fabricación de nanopartículas.....	10
1.2.1 Polímeros de origen natural.....	11
1.2.2 Polímeros de origen sintético:.....	12
1.2.3 Selección del material del vehículo.....	17
1.3 Vehículos direccionados a tejido óseo.....	18
1.3.1 Ligandos afines a tejido óseo.....	18
1.3.2 Tipos de vehículos direccionados a tejido óseo.....	23
1.4 Vehículos desarrollados para el transporte de N acetilcisteína.....	29
1.5 Métodos de fabricación de nanopartículas de PLGA.....	31
1.5.1 Método de emulsión y evaporación de solventes:.....	31
1.5.2 Método de desplazamiento de solventes o nanoprecipitación:.....	33
1.5.3 Método de precipitación.....	35
1.5.4 Aspersion.....	35
1.5.5 Electro spray.....	35
<b>2. Estandarización de las metodologías para la fabricación de partículas submicrónicas de PLGA y selección de una alternativa.....</b>	<b>37</b>
2.1 Emulsión simple con evaporación del solvente.....	37
2.1.1 Materiales y métodos.....	38
2.1.2 Resultados.....	41
2.1.3 Discusión.....	45
2.1.4 Conclusiones:.....	48
2.2 Nanoprecipitación.....	48
2.2.1 Materiales y métodos.....	48
2.2.2 Resultados y discusión.....	50
2.2.3 Conclusiones:.....	56
2.3 Comparación entre los métodos de emulsión simple, doble y nanoprecipitación.....	56
2.3.1 Materiales y Métodos.....	57
2.3.2 Resultados y discusión.....	59
Emulsión simple y evaporación.....	59
Doble emulsión.....	60
Nanoprecipitación.....	61
2.3.3 Conclusiones.....	63

<b>3. Estrategias para incrementar el atrapamiento de N-acetilcisteína en partículas de PLGA, empleando el método de nanoprecipitación .....</b>	<b>65</b>
3.1 Materiales y Métodos .....	71
<i>Materiales</i> .....	71
<i>Producción de nanopartículas o partículas submicrónicas</i> .....	72
3.2 Resultados y discusión .....	73
3.2.1 Solvente – no solvente .....	74
3.2.2 Viscosidad del no solvente .....	77
3.2.3 pH de la fase acuosa .....	77
3.2.4 Relación entre la fase orgánica y acuosa (O/A) .....	78
3.2.5 Concentración de NAC en la fase orgánica .....	80
3.2.6 Adición de NAC al solvente y al no solvente .....	82
3.2.7 Solvente o fase orgánica .....	82
3.2.8 Formación de sales de NAC con calcio .....	84
3.2.9 Concentración de PLGA .....	85
3.2.10 Peso molecular de polímero .....	86
3.3 Conclusiones .....	87
<b>4. Producción de partículas submicrónicas de PLGA conjugado a alendronato para liberar N-acetilcisteína direccionada preferencialmente a tejido óseo .....</b>	<b>89</b>
4.1 Materiales y métodos .....	89
4.2 Resultados .....	96
4.2.1 Síntesis y caracterización del conjugado PLGA-ALE .....	96
4.2.2 Producción y caracterización de las partículas submicrónicas .....	98
4.2.3 Afinidad del polímero por la hidroxiapatita .....	99
4.2.4 Velocidad de liberación de NAC .....	100
4.2.5 Velocidad de degradación .....	102
<b>5. Evaluación de la actividad biológica de la NAC atrapada en partículas submicrónicas de PLGA-ALE en un modelo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>111</b>
5.1 Materiales y métodos .....	117
5.1.1 Materiales .....	117
5.1.2 Producción y caracterización de partículas submicrónicas .....	118
5.1.3 Láminas de hueso cortical bovino .....	118
5.1.4 Cultivos celulares .....	118
5.1.5 Fusión celular .....	119
5.1.6 Siembra y cultivo .....	119
5.1.7 Inmunohistoquímica indirecta .....	120
5.1.8 Evaluación de las lagunas de resorción .....	121
5.1.9 Evaluación de la presencia de la enzima fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) .....	121
5.1.10 Evaluación de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	122
5.2 Resultados .....	123
5.2.1 Características de las partículas submicrónicas producidas .....	123
5.2.2 Determinación de la presencia de marcadores de osteoclastos .....	123
5.2.3 Evaluación de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS) .....	130
5.2.4 Evaluación de la presencia de la enzima fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) y lagunas de resorción .....	132
5.3 Conclusiones: .....	139

---

<b>6. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>141</b>
6.1 Conclusiones.....	141
6.2 Recomendaciones.....	142

## Lista de figuras

Figura 1-1 Estructura de un dendrímero. Figura adaptada de [23] .....	7
Figura 1-2 Representación esquemática de nanocápsulas (izquierda) y nanoesferas (derecha) .....	8
Figura 1-3 Tiempo de vida media para el copolímero de PLGA. (tomado de <a href="http://www.wako-chem.co.jp/specialty/plga/image/pladeg-s.gif">http://www.wako-chem.co.jp/specialty/plga/image/pladeg-s.gif</a> ) .....	14
Figura 1-4 Estructura de los ácidos aspártico y glutámico.....	19
Figura 1-5 Estructura básica de las tetraciclinas [5]. .....	19
Figura 1-6 Estructuras del pirofosfato y bifosfonato.....	20
Figura 1-7 Estructura de varios ligandos a hueso. ....	22
Figura 1-8 Componentes de un sistema ligando-polímero soluble –compuesto activo. Adaptada de la referencia [49] .....	25
Figura 1-9 Esquema del método de Emulsión y Evaporación de solventes.....	32
Figura 1-10 Esquema del método de nanoprecipitación.....	34
Figura 2-1. Efecto de la variación del porcentaje de amplitud del ultrasonido sobre el tamaño de partícula (Tp) y el índice de polidispersidad (PDI) manteniendo constante una relación O/A de 1 a 10 y tiempo de ultrasonido de 30 s. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. ....	42
Figura 2-2 Efecto de la variación del tiempo de ultrasonido sobre el tamaño de partícula (Tp) y el índice de polidispersidad (PDI) manteniendo constante una relación O/A de 1 a 10 y un porcentaje de amplitud de 40%. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.....	43
Figura 2-3 Efecto de la variación de la relación entre la fase orgánica y acuosa (O/A) sobre el tamaño de partícula (Tp) y el índice de polidispersidad (PDI) manteniendo constante un tiempo de ultrasonido de 30 s y un porcentaje de amplitud de 40%. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.....	44
Figura 2-4 Resultados reportados por el equipo Zetasizer ZS para el tamaño de partícula con las siguientes condiciones: <b>A</b> ultrasonido empleando una amplitud de 10% durante 30 segundos con una relación O/A de 1 a 10. <b>B</b> ultrasonido empleando una amplitud de 40% durante 60 segundos con una relación O/A de 1 a 10.....	46
Figura 2-5 Efecto de la variación del tiempo de agitación sobre el tamaño de partícula (Tp) índice de polidispersidad (PDI) empleando acetona como solvente, Pluronic® F127 como tensoactivo, con una relación O/A de 1/10 y un flujo de adición del solvente de 1,5 mL/min.....	51
Figura 2-6 Efecto del flujo de adición de solvente a la fase acuosa sobre el tamaño de partícula (Tp) y el índice de polidispersidad (PDI) empleando acetona como solvente,	

Pluronic® F127 como tensoactivo, con una relación O/A de 1/10, agitando durante 10 minutos.....	53
Figura 2-7 Efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula ( $T_p$ ), índice de polidispersidad (PDI) empleando acetona como solvente, Pluronic® F127 como tensoactivo, con una relación O/A de 1/10 y un flujo de adición del solvente de 1,5 mL/min agitando durante 10 minutos.....	54
Figura 3-1 Producción de nanopartículas o partículas submicrónicas de PLGA por el método de nanoprecipitación.....	66
Figura 3-2 Estrategias para incrementar la cantidad de NAC atrapada .....	67
Figura 3-3 Distribución de las diferentes formas protonadas de la N acetilcisteína, ( $NAC^{2-}$ , $NACH^-$ , y $NACH_2$ ) como función del pH [186] .....	70
Figura 3-4 Efecto del Volumen de fase acuosa. Datos obtenidos empleando acetona como solvente y 10 mg/mL de NAC. ....	79
Figura 3-5 Efecto de la concentración de NAC, empleando una relación O/A de 1 a 3... ..	81
Figura 3-6 Efecto del tipo de solvente en la formación de partículas submicrónicas. Datos empleando una relación O/A de 1 a 3 y 25 mg/mL de NAC.....	84
Figura 3-7 Efecto del peso molecular del PLGA. Datos obtenidos empleando una relación O/A de 1 a 3 y 25 mg/mL de NAC. ....	86
Figura 4-1 Reacción de conjugación y estructura de las especies involucradas .....	91
Figura 4-2 Mecanismo de reacción para la conjugación del PLGA-ALE .....	92
Figura 4-3 Espectro $^{31}P$ NMR para el PLGA-ALE .....	97
Figura 4-4 Espectro FT-IR para el PLGA-ALE y PLGA disuelto en acetona .....	97
Figura 4-5 Fotografías realizadas para las partículas de PLGA-ALE-NAC. La foto de la izquierda fue tomada empleando un microscopio SEM; la derecha se realizó con un microscopio TEM.....	99
Figura 4-6 Fotos de los huesos empleados en los ensayos de afinidad. <b>A</b> Muestra en contacto con partículas de PLGA-ALE; <b>B</b> Muestra en contacto con partículas de PLGA .....	100
Figura 4-7 Cantidad de Oil red O retenido por las partículas de PLGA-ALE vs PLGA ...	100
Figura 4-8 Velocidad y ajuste de modelos cinéticos para la liberación de NAC a partir de partículas submicrónicas de PLGA-ALE, en PBS. ....	102
Figura 4-9 Cinética de degradación de las partículas submicrónicas de PLGA-ALE y PLGA .....	105
Figura 4-10 Dispersidad ( $\mathcal{D}$ ) para los polímeros durante la cinética.....	105
Figura 4-11 Cromatograma normalizado para el inicio de la degradación .....	105
Figura 4-12 Cromatograma normalizado para el 4 día de degradación .....	106
Figura 4-13 Cambio en el pH y tamaño de partícula.....	106
Figura 5-1 Porcentaje de células con presencia de diferentes marcadores osteoclasticos (MMP, IB3, ATPC1, DC-STAMP, CAII, CK, ADAM 12 y CT-R. Células contadas sobre microfotografías de las láminas de hueso obtenidas con el equipo Cytation 3 con el objetivo 10X y procesadas con el software Gen5, para los diferentes tratamientos.....	130
Figura 5-2 Microfotografías representativas de inmunofluorescencia de anticuerpos policlonales para Cathepsina K. Tinción con 0,1 $\mu$ g/ml DAPI (color azul), fluorescencia obtenida con el filtro verde para FITC. Microfotografías de las láminas de hueso	

obtenidas con el equipo Cytation 3 con el objetivo 10X y procesadas con el software Gen5, para los diferentes tratamientos. ....	133
Figura 5-3 Porcentaje total de células que expresan marcadores osteoclasticos. ....	134
Figura 5-4 Porcentaje promedio de la expresión de todos los marcadores de actividad osteoclastica por tratamiento. ....	134
Figura 5-5 Porcentaje de células con presencia de ROS. Células contadas sobre microfotografías de las láminas de hueso obtenidas con el equipo Cytation 3 con el objetivo 10X y procesadas con el software Gen5, para los diferentes tratamientos. ....	135
Figura 5-6 Microfotografías representativas de la presencia de ROS. Tinción con 0,1 µg/ml HOESCHT (color azul), fluorescencia obtenida con el filtro rojo que cuantifica la presencia de 2-hidroxietidio. Microfotografías de las láminas de hueso obtenidas con el equipo Cytation 3 con el objetivo 10X y procesadas con el software Gen5, para los diferentes tratamientos.....	136
Figura 5-7 Microfotografías de células TRAP+ (derecha) y TRAP-(izquierda) y número de células TRAP+. Células contadas sobre láminas de hueso y obtenidas con el objetivo 10X para los diferentes tratamientos.....	137
Figura 5-8 Microfotografías y Porcentaje de resorción. Células contadas sobre láminas de hueso y obtenidas con el objetivo 10X para los diferentes tratamientos.....	138

## Lista de tablas

Tabla 1-1 Ventajas y desventajas de las nanopartículas como vehículo para el transporte de medicamentos .....	9
Tabla 1-2 Tipos de polímeros biodegradables [37] .....	10
Tabla 1-3 Tiempo de degradación para polímeros biodegradables [38] .....	13
Tabla 1-4 Principales ligandos y compuestos activos desarrollados [49] .....	26
Tabla 1-5 Vehículos desarrollados para diferentes enfermedades óseas [74] .....	27
Tabla 1-6 Vehículos desarrollados para el transporte de NAC .....	31
Tabla 2-1 Efecto del uso de Pluronic ®F127 sobre el tamaño de partícula (Tp) e índice de polidispersidad (PDI) empleando acetona como solvente, con una relación O/A de 1/10 y un flujo de adición del solvente de 1,5 mL/min agitando durante 10 minutos.....	55
Tabla 2-2 Efecto de la evaporación en el tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) empleando acetona como solvente, con una relación O/A de 1/10 y un flujo de adición del solvente de 1,5 mL/min agitando durante 10 minutos.....	56
Tabla 2-3 Método de emulsión simple y evaporación con diferentes solventes para la fase orgánica y enriqueciendo la fase acuosa con propilenglicol.....	60
Tabla 2-4 Método de doble emulsión empleando diferentes solventes.....	61
Tabla 2-5 Variación del tamaño de partícula y atrapamiento de NAC empleando el método de nanoprecipitación, usando acetona como solvente.....	62
Tabla 3-1 Efecto del tipo de solvente y no solvente sobre la formación de partículas submicrónicas por nanoprecipitación.....	75
Tabla 3-2 Efecto del incremento de la viscosidad del no solvente. Datos obtenidos con una relación O/A de 1 a 10 y acetona como solvente.....	77
Tabla 3-3 Efecto de reducir el pH de la fase acuosa. Datos obtenidos con 1 mL de acetona y 10 mL de agua con Pluronic ® F127 (1% p/v).....	78
Tabla 3-4 Efecto del Volumen de fase acuosa. Datos obtenidos empleando acetona como solvente y 10 mg/mL de NAC. ....	79
Tabla 3-5 Efecto de la concentración de NAC disuelta en acetona, empleando una relación O/A de 1 a 3.....	80
Tabla 3-6 Efecto de la concentración de NAC disuelta en DMSO, empleando una relación O/A de 1 a 3.....	81
Tabla 3-7 Efecto del incremento de la concentración de NAC en el no solvente. Datos obtenidos para una relación O/A de 1 a 3 y empleando una concentración de NAC en solvente de 15 mg/mL. ....	82
Tabla 3-8 Efecto del tipo de solvente en la formación de partículas submicrónicas. Datos empleando una relación O/A de 1 a 3 y 25 mg/mL de NAC.....	83

Tabla 3-9 Efecto de adicionar sales de calcio. Datos obtenidos con una relación O/A de 1 a 3 y 25 mg/mL of NAC.....	85
Tabla 3-10 Efecto de la concentración de PLGA. Datos obtenidos con 1 mL de acetona-DMSO (1:1 v/v) y 3 mL of agua con Pluronic ® F127, y 30 mg/mL of NAC. ....	85
Tabla 3-11 Efecto del peso molecular del PLGA. Datos obtenidos empleando una relación O/A de 1 a 3 y 25 mg/mL de NAC.....	87
Tabla 4-1 Estructura de las especies reactivas involucradas en la reacción de conjugación del PLGA al alendronato .....	91
Tabla 4-2 Características fisicoquímicas de las partículas submicrónicas.....	98
Tabla 4-3 Constantes de velocidad para distintos polímeros de PLGA .....	104
Tabla 5-1 Características fisicoquímicas de las partículas submicrónicas de PLGA-ALE .....	123

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<i>NAC</i>	N-acetilcisteína
<i>PLGA</i>	Copolímero de ácido láctico y glicólico
<i>ALE</i>	Alendronato
<i>PLGA-ALE</i>	Copolímero de ácido láctico y glicólico conjugado con alendronato
<i>T<sub>p</sub></i>	Tamaño de partícula
PDI	Índice de polidispersidad
DMSO	Dimetil sulfoxido
PVA	Acido polivinílico
PBS	Buffer de fosfatos con un pH de 7,2
NMR	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear
FT IR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
FDA	Food and Drug Administration



## Introducción

Un medicamento es una sustancia capaz de generar un cambio en alguna función fisiológica o proceso bioquímico preexistente en un organismo vivo. Los medicamentos ideales producirían su efecto terapéutico útil en todos los sistemas biológicos sin inducir ningún efecto lateral indeseado. Pero tales medicamentos ideales no existen; de hecho todo medicamento tiene siempre efectos secundarios tóxicos sobre el cuerpo humano estrechamente relacionados con la dosificación. Los medicamentos solo ejercen su efecto terapéutico en la vecindad inmediata de su sitio de acción, frecuentemente a través de un mecanismo que involucra una interacción química con un receptor. Debido a esto, es necesario considerar cuidadosamente el método de administración ya que dependiendo de la vía de ingreso al organismo, el medicamento se extiende de manera generalizada por varios órganos y tejidos que no son de interés, en donde puede metabolizarse o acumularse como el hígado o el bazo, o excretarse, por medio del riñón o la piel [1].

Recientemente se han desarrollado una serie de investigaciones que buscan generar estrategias para mejorar el grado de asimilación de los fármacos, particularmente en el órgano de interés. Para esto se han desarrollado diferentes sistemas de transporte de medicamentos con alta selectividad por un órgano en particular, de tal manera que el principio activo sea liberado en el sitio y en la cantidad adecuados. Se han desarrollado varios tipos de vehículos para el transporte como son los liposomas, eritrocitos, micro y nano partículas y polímeros solubles a los cuales se les une el principio activo. Para mejorar la selectividad de dichos vehículos se les puede adicionar algún compuesto que sea afín con el tejido u órgano al cual va dirigido.

A nivel mundial este tipo de investigaciones se han enfocado en su gran mayoría en desarrollar vehículos que transporten compuestos activos para tratamientos contra el cáncer, dado que los medicamentos empleados para dicha enfermedad son altamente tóxicos y no selectivos por el tejido a tratar. Es de particular importancia destacar la dificultad que se tiene al enviar medicamentos al tejido óseo, pues en algunos casos hay

una baja perfusión de compuestos activos de manera que la concentración que llega hasta él es muy baja y/o existe acumulación en otros tejidos [2].

Dada esta dificultad se ha iniciado el desarrollo de vehículos para transporte de medicamentos que tengan una alta afinidad por el tejido óseo, mediante los cuales se busca que el vehículo se deposite sobre el hueso e inicie la liberación del compuesto activo. En Colombia no hay, a conocimiento de la autora, antecedentes de la elaboración de vehículos nanoparticulados o submicrónicos con afinidad por tejido óseo; se han realizado varias investigaciones que buscan desarrollar nanopartículas y micropartículas como transportadores de medicamentos, pero no se les ha adicionado algún agente que le de afinidad por un tejido particular [3]. Tal vehículo tendría una potencial aplicación en el mejoramiento de los tratamientos a las enfermedades óseas tales como la osteoporosis y la osteoartritis, enfermedades que se presentan casi siempre en personas de la tercera edad, sector de la población para el cual se prevé un incremento a nivel mundial en la próxima década [4]; de ahí, la importancia de mejorar los fármacos usados en su tratamiento. Adicionalmente, el tejido óseo puede verse afectado por varios tipos de cáncer cuando estos llegan a hacer metástasis y no existe un tratamiento efectivo que lo pueda aliviar (90% de las personas que mueren por cáncer mamario y de próstata presentan también metástasis en sus huesos) [5].

Es por esto que el objetivo que se busca con esta tesis es el desarrollo de vehículos de tamaños submicrónicos de PLGA (copolímero de los ácidos láctico y glicólico) que permitan el transporte y liberación controlada de N-acetilcisteína (NAC) preferencialmente al tejido óseo. Se eligió PLGA por ser un polímero biodegradable, aprobado por la FDA para su uso en la industria farmacéutica [6]. La NAC es un compuesto activo con actividad antioxidante que podría atenuar el proceso resorptivo en los huesos que se presenta de forma acelerada en personas que padecen osteoporosis [7]. El problema radica en hacer llegar dicho compuesto en concentraciones adecuadas para que tenga el efecto terapéutico deseado, ya que la biodisponibilidad de la NAC es baja (inferior al 10%)[8].

En el desarrollo de esta tesis, primero se realiza una revisión sobre los diferentes vehículos fabricados con afinidad por el tejido óseo, los principales ligandos y métodos de fabricación para dichos vehículos. Esto con el fin de seleccionar el vehículo y ligando adecuados para el compuesto activo que se quiere atrapar. Seguidamente se desarrollan las diferentes

metodologías para obtener vehículos nanoparticulados o submicrónicos, evaluando el tamaño de partícula obtenido, ya que si el tamaño de partícula es alto (superior a 200 o 250 nm) el vehículo puede ser retenido por sistema retículo-endotelial [9]. También se evalúa y la cantidad de NAC presente, pues el vehículo debería transportar la mayor cantidad de NAC. Una vez seleccionada la metodología adecuada, se realiza la conjugación del PLGA con un ligando que lo dirija al tejido óseo. Con la metodología de fabricación definida y el polímero conjugado, se determina la velocidad de liberación del fármaco y la velocidad de degradación de los vehículos submicrónicos. Esta última se determina para verificar el carácter biodegradable del vehículo y estimar cuánto tiempo tardaría en degradarse en condiciones similares a las fisiológicas. Finalmente se realiza una prueba *in vitro* para determinar su efectividad atenuando la actividad resorptiva.

El presente trabajo se realizó con la colaboración y la experiencia del Grupo de Investigación en procesos Químicos y Bioquímicos de la Facultad de Ingeniería, donde se han realizado algunos trabajos para el desarrollo de nanopartículas [10] y el Grupo de Biología Molecular de Virus de la Facultad de Medicina, donde se ha desarrollado un modelo *in vitro* para evaluar fármacos contra la osteoporosis [11].



# 1. Bases teóricas para la fabricación de un vehículo que transporte N-acetilcisteína con afinidad por el tejido óseo

Son muchas las enfermedades que afectan a los huesos, se destacan la osteoporosis, osteomielitis, enfermedad de Paget y el cáncer en huesos; éste último se presenta con mucha frecuencia en pacientes que padecen otros tipos de cáncer y en su etapa terminal afecta los huesos, como resultado se da la metástasis; siendo ésta una de las causas principales de morbilidad [5].

Un medicamento que vaya destinado a combatir o atenuar alguna enfermedad en los huesos, debería realizar su acción terapéutica en el mismo sin afectar algún otro tejido y órgano. Los medicamentos que existen para este tipo de enfermedades no van direccionados a los mismos, si no que se distribuyen por todo el cuerpo [12].

Es por esto que se necesita el desarrollo de nuevas terapias que permitan acceder con mayor facilidad a estos tejidos, sin que se haga necesaria una intervención quirúrgica para liberar el medicamento en el tejido de interés (hueso).

La acetilcisteína (NAC), es un tiol reducido precursor de la L- cisteína, empleada como agente mucolítico y antioxidante que elimina radicales libres, comúnmente empleado en sobredosis de paracetamol [13], [14]. Recientes investigaciones han encontrado que su uso en concentraciones entre 10 y 30 mg/mL empleando modelos *in vitro* inhibe la presencia de marcadores osteoclasticos [15]. Srinivasan y colaboradores, encontraron que si se empleaba en concentraciones entre 1 y 2,5 mM atenuaba la diferenciación de las células RAW 264,7 hacia osteoclastos [16]. Bedoya evaluó la actividad resorptiva de células mononucleares de sangre periférica fusionadas con PEG al suministrar NAC 30 mM, encontrando una atenuación en la actividad resorptiva [17]. En ratones a los que se les retiraron los ovarios, y se les suministró 100 mg/kg/día de NAC dos veces al día, reducía

la pérdida de hueso [7], [18]. A pesar de estos hallazgos al ser empleada en pacientes que padecían de artritis reumatoide usando dosis altas (similares a las empleadas para tratamientos por intoxicación con paracetamol), se encontró que no existía una disminución que fuera estadísticamente significativa que permitiera concluir una mejora en los síntomas experimentados por los pacientes [19]. Resultados similares son reportados por Sanders y colaboradores, donde esta vez se suministró el medicamento a mujeres postmenopáusicas (2 g/día durante 3 meses) [20]. Una posible explicación a estos resultados es que la NAC a pesar de ser suministrada en concentraciones altas, ésta no llega con la dosis adecuada al tejido óseo, dada su baja biodisponibilidad tanto oral como intravenosa (6 y 7% respectivamente), así aunque se suministre en dosis altas, esta no llegan a tener la concentración requerida para su acción terapéutica. Por esto el objetivo de esta investigación fue el desarrollo de un vehículo para el transporte, estabilización y liberación en los huesos.

Dado que el grupo de investigación no se tiene experiencia en el desarrollo de vehículos direccionados a hueso y que transporten NAC, a continuación se revisan los principales vehículos para el transporte de compuestos activos, seguido de una revisión bibliográfica de vehículos desarrollados, tanto direccionados a hueso, como vehículos de transporte de NAC. Posteriormente se selecciona el material y ligando para el vehículo desarrollado. Finalmente se hace una pequeña revisión sobre las metodologías existentes para la fabricación del vehículo requerido.

## **1.1 Vehículos para el transporte de compuestos activos**

A continuación se hace una pequeña recopilación de los principales vehículos desarrollados para el transporte de compuestos activos para uso farmacéutico.

**Dendrimeros:** Descubiertos a inicios de 1980, los dendrimeros son macromoléculas compuestas por diversas ramificaciones unidas a un centro, como se observa en la Figura 1-1. Tienen arquitecturas globulares con muchos dendrones (dendron: polímero en forma de árbol con tronco) que están conectados a un núcleo central. Dentro de sus principales características están que se puede controlar su tamaño, múltiples valencias y se puede modificar la carga superficial de los dendrímeros ionizables en los grupos terminales, que puede variar en la generación de la ramificación [21].

Los dendrímeros son adecuados tanto para compuestos activos hidrofílicos o hidrofobos; como desventaja, pueden utilizar materiales tóxicos y la síntesis requiere mucho tiempo. No puede funcionalizarse una vez hayan sido producidas [22].

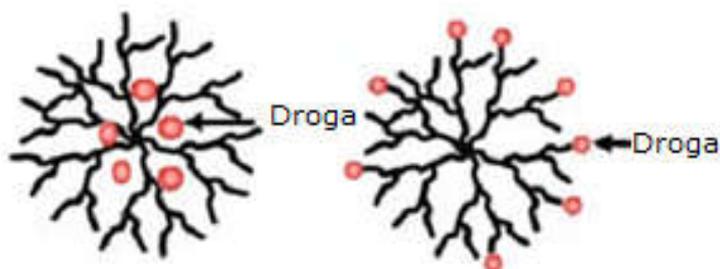


Figura 1-1 Estructura de un dendrímero. Figura adaptada de [23]

**Micelas:** El primero en hablar de micelas poliméricas fue Ringsdorf en 1984 [24]; son arreglos de bloques de copolímeros anfifílicos en un ambiente acuoso. Casi siempre las micelas poliméricas tienen una estructura de núcleo coraza bien definida con un núcleo interno hidrofóbico y una coraza hidrofílica. Las micelas pueden incorporar componentes activos insolubles en agua dentro del núcleo a través de interacciones químicas, físicas o electrostáticas [25]. Como desventaja, requieren de materiales en algunos casos tóxicos, y una vez producidas no se pueden funcionalizar [22].

**Liposomas:** son vesículas de carácter lipídico, compuestas por una membrana de dos capas (lipídicos de tipo anfifílico). Su estructura fue descrita en 1965, y propuestas como vehículo para liberar medicamentos en 1970s. Se pueden fabricar con materiales naturales y sintéticos [26]. Adicionalmente, se pueden funcionalizar con compuestos que lo direccionen a un órgano, célula o tejido en particular y se puede fabricar con materiales biodegradables, no tóxicos. Como desventaja, es difícil escalar su proceso de producción, se pueden obtener variedad de tamaños y es difícil realizar un proceso de esterilización [27].

**Nanopartículas:** son partículas microscópicas con al menos una dimensión de 100 nm, aunque hay autores que llaman nanopartículas a partículas con hasta 1000 nm; tamaños superiores a estos son consideradas micropartículas (1 – 250  $\mu\text{m}$ ). Existen gran variedad de materiales a partir de los cuales se pueden fabricar, a nivel general estos materiales pueden ser de tipo cerámico, metálico, polimérico y carbonoso. Entre los materiales más

ampliamente estudiados para la liberación de fármacos están los poliméricos, por lo tanto para la presente investigación se selecciona este grupo de materiales.

Las nanopartículas poliméricas se pueden clasificar en nanocápsulas y nanoesferas, las primeras son esferas vesiculares en las cuales el medicamento se encuentra en el interior rodeado por una membrana polimérica, mientras que en las segundas el medicamento se encuentra adsorbido o inmerso dentro de la matriz polimérica, como se puede ver en la Figura 1-2

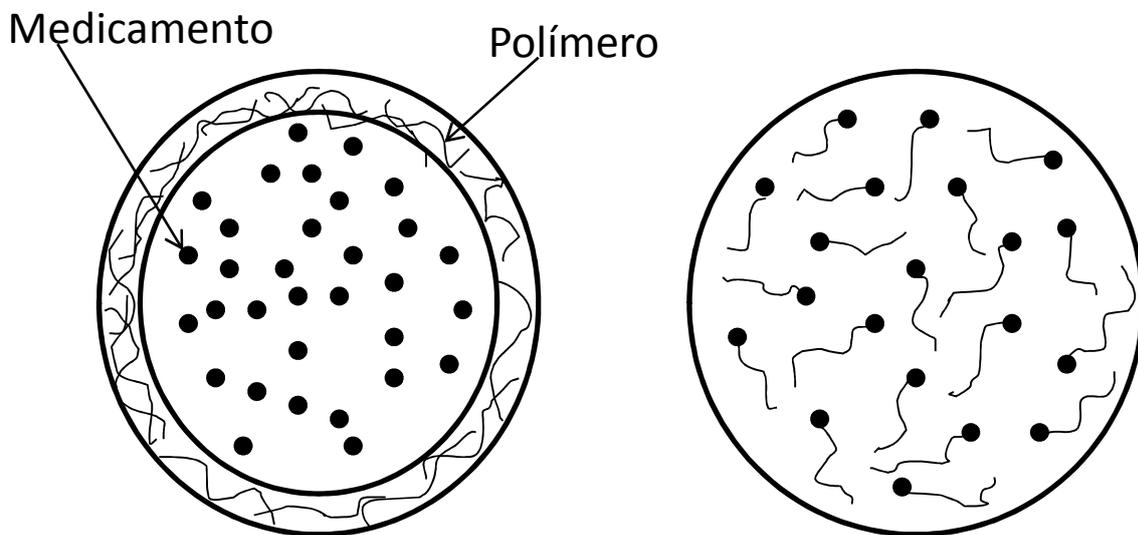


Figura 1-2 Representación esquemática de nanocápsulas (izquierda) y nanoesferas (derecha)

El uso de nanopartículas como medio de transporte para medicamentos presenta tanto ventajas como desventajas, las principales se resumen en la Tabla 1-1

Tabla 1-1 Ventajas y desventajas de las nanopartículas como vehículo para el transporte de medicamentos

	Característica	Referencia
Ventajas	Mayor estabilidad en anaquel durante almacenamiento	[28]
	Alta capacidad para el transporte de medicamentos	[28]
	Pueden transportar compuestos activos hidrofílicos o hidrofóbicos	[29]
	Pueden ser suministradas al paciente por diferentes rutas.	[30]
	Altos tiempos de circulación en el torrente sanguíneo, particularmente para nanopartículas de tamaños inferiores a 100 nm (tamaños similares al DNA, proteínas o virus) ya que a la superficie de la nanopartícula se le pueden adicionar varias moléculas para evitar el reconocimiento por parte del sistema inmune	[31]
	Capacidad para regular y mantener la velocidad de liberación del medicamento	[28]
	La superficie puede ser manipulada para realizar un direccionamiento tanto activo como pasivo al adicionar diferentes ligandos.	[32]
	Pueden ser empleadas en procedimientos para imágenes diagnósticas	[33]
	Incremento de la biodisponibilidad de compuestos activos	[29]
	Permiten dirigir el envío del medicamento en forma preciso a nivel celular o nuclear.	[34]
	Desarrollo de nuevos medicamentos mucho más seguros.	[35]
	Al ser empleado en tratamientos contra el cáncer, previene que los agentes de quimioterapia actúen en tejidos sanos.	[29]
Desventajas	Involucran el uso de tecnologías más costosas, que a su vez pueden incrementar el costo de la formulación	[28]
	Exige el uso de solventes tóxicos en el proceso de preparación	[36]
	Puede generar la aparición de respuestas inmunes y reacciones alérgicas	[36]

De acuerdo a lo visto anteriormente, aunque es factible emplear cualquiera de los vehículos nombrados, se eligen las nanopartículas, ya que estas proporcionan estabilidad (la NAC es un compuesto activo altamente inestable) y alta capacidad para el transporte de compuestos activos. Adicionalmente se pueden fabricar en materiales que sean biodegradables

## 1.2 Materiales para la fabricación de nanopartículas

Aunque existen gran cantidad de materiales empleados, en el campo médico, en los últimos años se han introducido los polímeros biodegradables, distinguiéndose dos tipos de materiales: los de origen natural y los sintéticos. La Tabla 1-2 resume dichos tipos junto con el método de purificación o síntesis y su solubilidad.

Tabla 1-2 Tipos de polímeros biodegradables [37]

Polímero	Origen	Método de purificación o síntesis	Solubilidad
Alginato de sodio	Natural (algas y bacterias)	Extracción con álcalis	Agua (pH>3) insoluble en solventes orgánicos
Quitosan	Natural (caparazón de crustáceos, algunos insectos y hongos)	Deacetilación de la quitina	Soluble en soluciones acuosas (bajo pH) e insoluble en solventes orgánicos
Gelatina	Natural (colágeno)	Hidrólisis	Soluble en agua caliente (>34°C) y ácido acético e insoluble en agua fría y solventes orgánicos
Polisacáridos	Natural	Reacciones enzimáticas	Pululano y dextrano ambos solubles en agua e insolubles en solventes orgánicos
Albúmina	Natural (plantas o animales)	Técnicas de separación (cromatografía)	Soluble en agua
Gliadina	Natural (trigo)	Extracción con alcohol	Insoluble en agua y soluble en alcohol
Poli-láctico (PLA) y Poli-láctico-glicólico (PLGA)	Sintético	Polimerización por apertura de anillo	Insoluble en agua y soluble en alcohol
Poli-caprolactona	Sintético	Polimerización aniónica, catiónica, por radicales libres o por apertura de anillo	Soluble en algunos solventes como diclorometano o cloroformo
Poli anhídridos	Sintético	Condensación por fusión o polimerización por apertura de anillo	La gran mayoría son solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua
Poli alquil cianoacrilatos	Sintético	Polimerización por emulsión o interfacial	Solubles en solventes orgánicos
Poli fosfoesteres	Sintético	Poliadición o polimerización por apertura de anillo	Disponibles tipos solubles en agua como insolubles en ella.

### 1.2.1 Polímeros de origen natural

El uso de polímeros de origen natural sigue siendo muy grande a pesar del gran desarrollo realizado para los polímeros biodegradables de origen sintético. La ventaja de los polímeros de origen natural es que tienden a ser más biocompatibles, se obtienen fácilmente y no son tan costosos. La mayor parte de éstos se pueden elaborar en forma de discos, esferas, películas y micro y nanocápsulas; adicionalmente se pueden unir covalentemente a medicamentos [37]. Los polímeros de origen natural pueden variar en su pureza y características dependiendo de la fuente de procedencia (microbiana, vegetal o animal); por ejemplo, existen por lo menos 200 tipos diferentes de alginato de sodio que provienen de diferentes fuentes y cuyo peso molecular y relación entre monómeros puede cambiar. A continuación se presenta una breve descripción de los diferentes polímeros naturales empleados[37].

*Alginato de sodio:* es un polisacárido obtenido principalmente a partir de algas y algunas bacterias, de estructura lineal, compuesto principalmente por ácido manurónico y ácido glucurónico unido por enlaces  $\beta$  y  $\alpha$ -(1-4). Es un polímero de tipo aniónico e hidrofílico, se prepara en medio acuoso y puede encapsular compuestos activos que sean inestables en solventes orgánicos (proteínas y péptidos). Forma geles reversibles que pueden ser inestables en la presencia de iones monovalentes presentes en el suero fisiológico.

*Quitosan:* es un polímero no tóxico, biodegradable y biocompatible que proviene de la hidrólisis de la quitina, la cual a su vez es un polisacárido natural presente en el exoesqueleto de algunos crustáceos, en algunos insectos y en la pared celular de algunos hongos. Debido a su buena solubilidad (soluciones acuosas a pH bajo) se le puede dar diferentes tipos de formas como fibras, películas, cápsulas, etc. Se utiliza mucho en tratamiento de aguas residuales y en formulaciones para liberación de fármacos. Tiene la propiedad de adherirse a las superficies cargadas negativamente, tales como membranas mucosas.

*Gelatina:* se obtiene por hidrólisis ácida o básica del colágeno, proteína de triple hélice con un alto contenido de glicina, prolina e hidroxiprolina. Sus propiedades cambian de acuerdo con el método para extracción y purificación. Se puede entrecruzar con glutaraldehído para incrementar su estabilidad, pero se ha encontrado que disminuye la velocidad de liberación del fármaco y genera respuesta inmune.

*Pululano*: es un polímero no inmunogénico, no tóxico, soluble en agua, de tipo lineal y no iónico. Es un polisacárido secretado por hongos. Se ha empleado más para la liberación de vacunas que en proteínas y péptidos, dado su carácter hidrófobo. Cuando se prepara por conjugación con sulfamidas es estable a pH fisiológicos pero sufre agregación a pH bajo. Cuando se emplea para recubrir nanopartículas magnéticas, puede generar endocitosis.

*Albumina*: es una proteína presente en el suero de la sangre y sintetizada por el hígado, con carga eléctrica negativa. Se ha empleado para la elaboración de micro y nanopartículas incluidas en productos comerciales como el Abraxano® para el tratamiento contra el cáncer de seno. También se ha empleado para recubrir nanopartículas de PLA ya que dicho recubrimiento incrementa la velocidad de degradación en el intestino. Es importante mencionar que las nanopartículas de albúmina son procesadas por macrófagos.

*Gliadina*: es una glucoproteína presente en el trigo y otros cereales. Como material se comporta muy bien para encapsular compuestos hidrofóbicos. Se adhiere con gran facilidad a la mucosa estomacal y no se ha reportado su internalización dentro de las células.

### **1.2.2 Polímeros de origen sintético:**

La gran mayoría de los polímeros sintéticos de aplicación médica son fabricados con monómeros de origen natural, para facilitar su biodegradabilidad. Su ventaja, frente a los naturales, radica en que se puede controlar de mejor manera su síntesis y, con ésta, sus propiedades y pesos moleculares, hecho que hace que sean muy empleados en nuevos desarrollos.

A continuación se realiza una breve descripción de los polímeros sintéticos más empleados y en la Tabla 1-3 se especifica el tiempo de degradación de los polímeros más empleados. Este tiempo es de particular importancia, ya que la nanopartícula debe descomponerse dentro del cuerpo humano.

Tabla 1-3 Tiempo de degradación para polímeros biodegradables [38]

Polímero	Tiempo de eliminación (meses)
Poliácido D-Láctico	12-16
Poliácido L-Láctico	18-24
Copolímero de ácido glicólico y láctico	6-12
Policaprolactona	18-24
Poliglicol	2-4
Polihidroxibutirato	18-24
Poliésteres de fosfato	12-24
Poliortoésteres	12-24
Poli anhídridos de alcanos	0.2-4
Poli anhídridos aromáticos	6-12
Gelatina	0.2-1
Celulosa oxidada	0.2-1
Colágeno	0.2-1
Pseudopoliaminoácidos	2-24
Poliiminocarbonatos	4-12
Polifosfacenos	6-18
Polipropilénfumarato	12-24

*Acido Poliláctico (PLA)*: es un polímero termoplástico, amorfo y semicristalino, ampliamente estudiado en sistemas de liberación de fármacos, para la fabricación de suturas biodegradables y en ingeniería de tejido como soporte reabsorbible. Es un polímero aprobado por la FDA para uso humano.

Su biodegradación es ideal desde el punto de vista toxicológico, ya que lo hace por hidrólisis que puede ser acelerada *in vivo* por un grupo de enzimas, que lo transforman en

ácido láctico el cual es incorporado en el metabolismo a través de procesos fisiológicos a nivel celular.

*Poli (ácido glicólico) (PGA)*: es un poliéster lineal y alifático, degradable por hidrólisis y empleado para suturas absorbibles y como material de fijación ósea (clavos óseos). Se degrada dentro del organismo en sustancias no tóxicas asimilables siguiendo la ruta de los ácidos tricarbónicos. Se degrada de manera más rápida *in vivo* que *in vitro*, gracias a la actividad de ciertas enzimas (esterasas).

*Copolímero del ácido láctico y glicólico (PLGA)*: es un material ampliamente empleado en sistemas de liberación de medicamentos ya que se descompone en menos tiempo que el PLA, y dichos tiempos varían dependiendo de la proporción entre el ácido láctico y glicólico, como se puede ver en la Figura 1-3. Adicionalmente la FDA aprobó su uso en humanos.

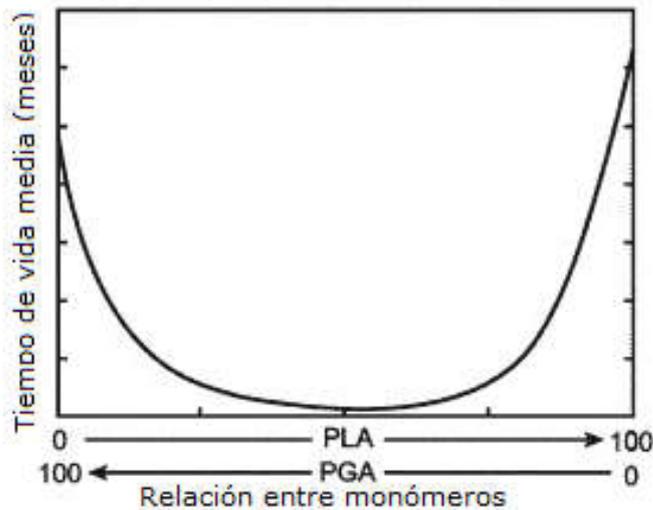


Figura 1-3 Tiempo de vida media para el copolímero de PLGA. (tomado de <http://www.wako-chem.co.jp/specialty/plga/image/pladeg-s.gif>)

Se ha empleado en la liberación de esteroides, anticancerígenos, proteínas, péptidos, antibióticos, anestésicos y vacunas. Se degrada fisiológicamente por medio de sus enlaces ester en sus respectivos monómeros. La velocidad de degradación puede cambiar de

acuerdo con el tipo y composición del polímero, si se le ha adicionado algún grupo, el peso molecular del polímero y la geometría del sistema de liberación.

El PLGA se ha funcionalizado con diferentes compuestos para direccionar su acción hacia un tejido específico empleándose ligandos como transferrina, HIV-TAT, aptameros, heparina, bisfosfonatos y lecitina. Cuando se adiciona polietilenglicol (PEG), se obtienen tiempos prolongados en la sangre.

*Policaprolactona (PCL)*: es un polímero semicristalino que se encuentra disponible en varios pesos moleculares. Se produce por polimerización por apertura de anillo de la  $\epsilon$ -caprolactona. Es un material biocompatible y se emplea como sutura biodegradable. Se degrada por hidrólisis a una velocidad que depende del tamaño, forma y aditivos empleados. La degradación se da por una ruptura de cadenas, de manera que se reduce el peso molecular y posteriormente las cadenas son transportadas fuera del sitio de implantación por parte de los fluidos fisiológicos o por fagocitosis. La presencia de enzimas como la lipasa pancreática, proteasas y amilasas acelera el proceso de degradación [39].

*Polianhídridos*: son polímeros compuestos por esqueletos hidrofóbicos con uniones anhídridas hidrofílicas altamente hidrolizables. Su composición química varía ampliamente incluyendo compuestos alifáticos, aromáticos y polianhídridos basados en ácidos grasos. La velocidad de degradación depende de la composición del polímero aunque en general los alifáticos se descomponen más fácilmente que los aromáticos; por esto se pueden encontrar copolímeros con mezclas de los dos para aplicaciones específicas. Presentan una alta compatibilidad con el organismo aunque sus propiedades mecánicas son muy pobres, por eso se emplean más para la liberación de medicamentos. Actualmente se está evaluando su uso en la liberación controlada de medicamentos como la insulina, enzimas, proteínas y la bis-cloroetilnitrosourea (BCNU), un fármaco empleado para el tratamiento de tumores cerebrales, donde el tratamiento vía venosa es tóxico y altamente letal [40].

*Polialquil-cianoacrilatos* : son un tipo especial de biopolímero donde los enlaces carbono-carbono son hidrolizables gracias a la carga que inducen los hidrógenos en los grupos metilo. Tienen propiedades que los hacen ser candidatos para emplearlos en la liberación de medicamentos, como adherentes tisulares y sellante hemostático. Tienen tiempos de degradación de horas o días dependiendo de la composición final del polímero, particularmente de la longitud de la cadena alquil. Por ejemplo, el más pequeño es el

poli(metil cianoacrilato) que se degrada en poco tiempo, pero se ha encontrado que forma compuestos tóxicos como formaldehído y ácido cianoacético. Actualmente se investiga el uso de polímeros con cadenas más grandes para evitar estos efectos, particularmente el butil, octil e isobutil cianoacrilato que están siendo investigados para la liberación de péptidos y agentes anticancerígenos. El 2-octil cianoacrilato fue aprobado por la FDA como un adhesivo tisular para ser empleado en la piel [41].

Polietilenglicol (PEG): aunque este material por sí solo no es empleado para la fabricación de nanopartículas, si se emplea de manera combinada, es decir acompañando a cualquiera de los otros materiales, particularmente de los polímeros de PLA y PLGA. Es un poliéter ampliamente empleado en la industria. Su nombre generalmente aparece asociado a un número que hace referencia al peso molecular del polímero; por ejemplo, un PEG con  $n=80$  poseerá un peso molecular promedio de unos 3500 Da, por lo que se llamará PEG 3500. Su estructura química puede representarse como  $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$ . También es conocido como óxido de polietileno (PEO) o polioxietileno (POE). El PEG es soluble en agua, biodegradable, biocompatible y no tóxico, propiedades que lo hacen ser muy empleado en la industria biotecnológica. De acuerdo a esto se han desarrollado varias aplicaciones, entre estas las principales son [42].

- Empleado en procesos de purificación de proteínas y ácidos nucleicos
- Unido al dextrano junto con una buffer, es empleado para purificación de material biológico.
- Interactúa con la membrana celular y permite procesos de fusión celular.
- Cuando se une covalentemente a proteínas disminuye la probabilidad de una respuesta inmune.
- Al unirse de manera covalente a algunos polímeros, no permite que se adsorban proteínas, lo que hace que puedan llegar a evitar la respuesta inmune cuando se emplean dentro del cuerpo. Adicionalmente aumenta el carácter hidrofílico del material.

### 1.2.3 Selección del material del vehículo

Lockman y colaboradores presentan algunas de las características ideales de los materiales para ser empleados como vehículos en la liberación de medicamentos [43]

- Propiedades físicas y mecánicas adecuadas
- Bajo costo
- Biocompatibles/biodegradables
- No trombogénicos
- No inmunogénicos
- No deben generar agregación de plaquetas
- No deben generar respuesta por parte del sistema retículo endotelial
- No deben generar respuesta inflamatoria crónica
- Elevados tiempos de circulación en la sangre

De acuerdo con los criterios anteriores, y una vez estudiados los diferentes materiales, se seleccionó el PLGA por varias razones: es uno de los materiales más empleado para fabricación de nanopartículas para liberación de medicamentos hecho que hace que se encuentren gran cantidad de investigaciones que lo emplean y protocolos desarrollados que podrían ser empleados en el desarrollo de la presente investigación. El tiempo de degradación y carácter hidrófobo se puede manejar con la proporción entre los monómeros, y dado que se espera que se degrade dentro del cuerpo, se empleará un polímero de PLGA 50:50, pues es la relación que se descompone más rápido [44]. Se encuentran comercialmente con diferentes pesos moleculares. Adicionalmente está aprobado por la FDA, para su uso en la industria farmacéutica [45]–[47] y adicionalmente existe disponibilidad para encontrarlo modificado con PEG lo que lo hace muy atractivo, ya que existen referencias que afirman que la presencia de PEG en la superficie de la nanopartícula, disminuye la probabilidad de ser reterido por el sistema retículo-endotelial, garantizando un tiempo de circulación elevado y no presenta citotoxicidad cuando se encuentra ligado a algunos bifosfonatos [9], [48].

## 1.3 Vehículos direccionados a tejido óseo

Los vehículos con afinidad por el tejido óseo, se componen por varias partes: un ligando que le da dirección al tejido de interés y un material que enlace el ligando con el compuesto activo. A continuación se hace un breve resumen sobre los diferentes ligandos y vehículos desarrollados.

### 1.3.1 Ligandos afines a tejido óseo

Se han desarrollado diversos ligandos, casi siempre con afinidad por la hidroxiapatita, ya que este compuesto se encuentra casi de manera exclusiva en los huesos y no en otros tejidos. Idealmente un ligando con afinidad por el tejido óseo debería tener las siguientes propiedades: poseer una alta afinidad por la hidroxiapatita, debe ser químicamente modificable para permitir su unión con otros materiales, que al descomponerse dentro del cuerpo no lo hagan en productos tóxicos, y finalmente que los efectos secundarios dentro del cuerpo sean los mínimos o al menos no interfieran con la acción farmacológica del medicamento [49]. A continuación se realizará una breve descripción de dichos ligandos.

**Oligopéptidos ácidos:** estudios recientes sobre proteínas presentes en la matriz ósea diferentes al colágeno, han demostrado que poseen unidades repetitivas compuestas con aminoácidos ácidos (ácido L-aspártico o ácido L-glutámico) que les da la capacidad de unirse a la hidroxiapatita. La osteopontina y las sialoproteínas del hueso, dos de las proteínas no colagenosas, tienen secuencias repetitivas de L-Asp y L-Glu que al ser adicionadas a cultivos de osteoblastos, se adhieren rápidamente a la hidroxiapatita [50]–[52]. Kasugai y colaboradores, indican que el número mínimo de aminoácidos en la secuencia debe ser 6 para obtener una alta afinidad y no existe ninguna diferencia de acuerdo a la naturaleza del aminoácido o su forma de isómero óptico (L o D) [51]. La afinidad que tiene estos péptidos por la hidroxiapatita se debe a las interacciones iónicas de los grupos cargados de manera negativa en los grupos ácidos de los péptidos, con los iones calcio presentes en el mineral del hueso a pH fisiológico. Kopecek y colaboradores reportan que tiene especial afinidad por la hidroxiapatita con alta cristalinidad, como la que se encuentra en tejidos con alta presencia de osteoclastos, sin embargo al comparar la fuerza de unión del ligando al hueso es mayor la del alendronato (bifosfonato) que la del Asp8. La Figura 1-4 muestra la estructura de los ácido aspártico y glutámico.

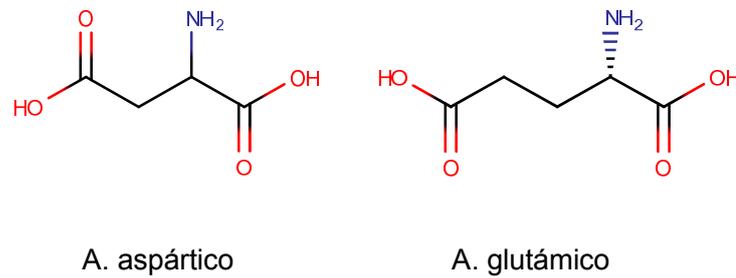


Figura 1-4 Estructura de los ácidos aspártico y glutámico.

Se ha reportado su uso exitoso al ser empleado para transportar estradiol, según lo reporta Yokogawa y colaboradores, cuando al unir  $\beta$ -estradiol con un hexapéptido de L-Asp y ser empleado en ratas, mostró una alta afinidad por el tejido óseo siendo eliminado lentamente del cuerpo del animal [53]. También se ha empleado como ligando para el transporte de Prostaglandina con el fin de promover la formación de hueso [54]

**Tetraciclinas:** son compuestos bien reconocidos por su capacidad para unirse a huesos y dientes. Son compuestos cristalinos, amarillos anfotéricos obtenidos a partir del metabolismo del actinomicete *Streptomyces rimosus* ampliamente conocido por sus usos como antibiótico. Su estructura se puede ver en la Figura 1.5

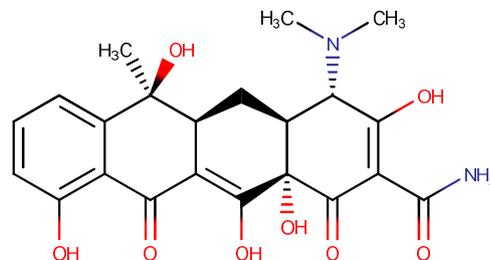


Figura 1-5 Estructura básica de las tetraciclinas [5].

Las tetraciclinas una vez ingresan en el cuerpo, se depositan sobre el tejido óseo recién formado, esto gracias al efecto quelante que tiene al combinarse con los iones de calcio, presentes en la hidroxiapatita [49].

Las tetraciclinas han sido empleadas al unirse a algunos medicamentos para lograr direccionarlos al hueso y también con algunos polímeros como el polietilenglicol (PEG) y el N-2-hidroxipropilmetacrilamida (HPMA) y ser empleados para transportar medicamentos [55]. Frost y colaboradores las han empleado como marcador para determinar la velocidad

de formación de osteoblastos. Sin embargo su estructura compleja, la baja estabilidad química y el hecho que se adhiera y de cierta coloración a los dientes ha hecho que su uso actualmente como ligando de afinidad a hueso sea bajo [56].

**Bifosfonatos (BPs):** son compuestos sintéticos e inorgánicos análogos al pirofosfato (PPi). Este último, se une a la superficie del hueso y evita la disolución del fosfato de calcio *in vitro*. También se ha demostrado que previene la calcificación ectópica *in vivo* y se encuentra presente en orina y plasma y se ha sugerido que es un regulador del proceso de calcificación y descalcificación ya que la fosfatasa alcalina lo hidroliza de manera rápida. Debido a esto se buscó la síntesis de compuestos que fueran más estables; así se desarrollaron los bifosfonatos [57].

Los bifosfonatos están formados por dos grupos fosfato unidos por un enlace fosfoester a un átomo de carbono (Figura 1-6). El enlace P – C es resistente a muchos agentes químicos e inertes a la degradación enzimática. El átomo de carbono central presenta muchas oportunidades ya que se puede enlazar con diferentes elementos lo que incrementa el amplio rango de posibles estructuras químicas que puedan presentar [58].

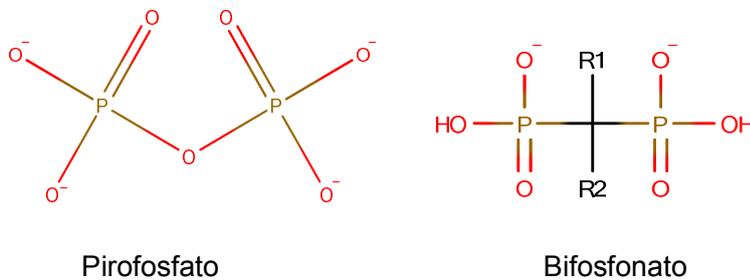


Figura 1-6 Estructuras del pirofosfato y bifosfonato.

La estructura P – C – P, le confiere la habilidad al bifosfonato de unirse a iones divalentes como el  $\text{Ca}^{+2}$  es por esto que una vez suministrado desaparece rápidamente del torrente sanguíneo y se localiza en la superficie de los huesos en los sitios donde se realiza el proceso de remodelamiento celular, particularmente en zonas donde se encuentran los osteoclastos [59]. Sin embargo Wang y colaboradores, reportan que un bifosfonato como el alendronato se une de igual manera a los sitios de formación (osteoblastos) como a los de resorción (osteoclastos) [60]

Los bifosfonatos se clasifican en dos grandes grupos: los que tienen nitrógeno presente en el radical  $R_1$  y los que no. Los bifosfonatos que no tienen nitrógeno, pueden incorporarse al AMP creando un ATP modificado que no puede ser hidrolizado, lo que genera apoptosis en los osteoclastos y reduce la resorción ósea. Los que contienen nitrógeno son mucho más potentes, ya que actúan inhibiendo la actividad de la farnesil pirofosfato sintasa interrumpiendo la ruta del ácido mevalónico, lo que genera mal funcionamiento en el osteoclasto.[52]

Los bifosfonatos han sido empleados para el tratamiento de enfermedades con resorción ósea, como la osteoporosis y el cáncer con metástasis ósea. También se prescriben en la enfermedad de Paget y en otras alteraciones que provocan fragilidad ósea, como la enfermedad renal crónica tratada con diálisis. Aunque son muy eficaces, en los últimos años se ha constatado un aumento en el número de casos clínicos en los que el uso de los bifosfonatos se relaciona con la osteonecrosis de los maxilares; por ello, se recomienda consultar con un odontólogo para estar muy alerta sobre las posibles complicaciones en los pacientes que los toman para prevenir una posible osteonecrosis y evitar tratamientos periodontales invasivos e implantes [61]. En osteoporosis confirmadas, este compuesto activo pertenece a la primera línea de tratamiento en mujeres.

Estudios farmacocinéticos de los bifosfonatos indican que existe una baja asimilación de éstos cuando se suministran de forma oral (0.76% para el alendronato [62]) y una vez es biodisponible un alto porcentaje se deposita sobre el tejido óseo. Esta es una de las principales razones por la cual se han empleado ampliamente como ligando a fármacos direccionados a hueso, ya que proporciona varias ventajas: se direcciona al hueso, son muy estables, su composición permite que se puedan unir a otro tipo de compuestos y finalmente aunque el cuerpo descomponga el complejo que forme con el fármaco, ambos tendrían acción farmacológica sobre el hueso (tanto el bifosfonato que se encontraría en una concentración más baja, como el fármaco que está transportando) [63].

Existen investigaciones que los han empleado de manera exitosa, como ligando para el transporte de estradiol, prostaglandina E2, diclofenalco, fluoroquinolona, cisplantina, melfalán, metotrexato y radiofarmacéuticos [31], [64], [65].

Recientemente el alendronato fue empleado de manera exitosa cuando se usó de manera conjugada con un sistema polimérico para liberar medicamentos [55]. En este caso se

emplearon dos polímeros como el PEG y el HPMA; los experimentos *in vitro* indicaron que al modificar ambos polímeros con alendronato mostraban alta afinidad por la hidroxiapatita (72% para el PEG y 68 % para el HPMA) al compararlos con los mismos polímeros sin modificar. Estos resultados también se corroboraron cuando se emplearon ambos sistemas poliméricos en ratones [66]. Resultados similares se encontraron con PLGA-PEG [31].

**Otros:** adicional a los arriba mencionados, existen algunas otras moléculas que también tienen afinidad por el tejido óseo, entre estas están el ácido polimalónico, ácido sialico, ácido N-metacrilamida salicílico, ácido N-acriloil aspartico, oxido de polifenileno fosfonilado y polímeros no iónicos como el glucan [5]. Las estructuras de algunos de éstos compuestos se pueden ver en la Figura 1-7

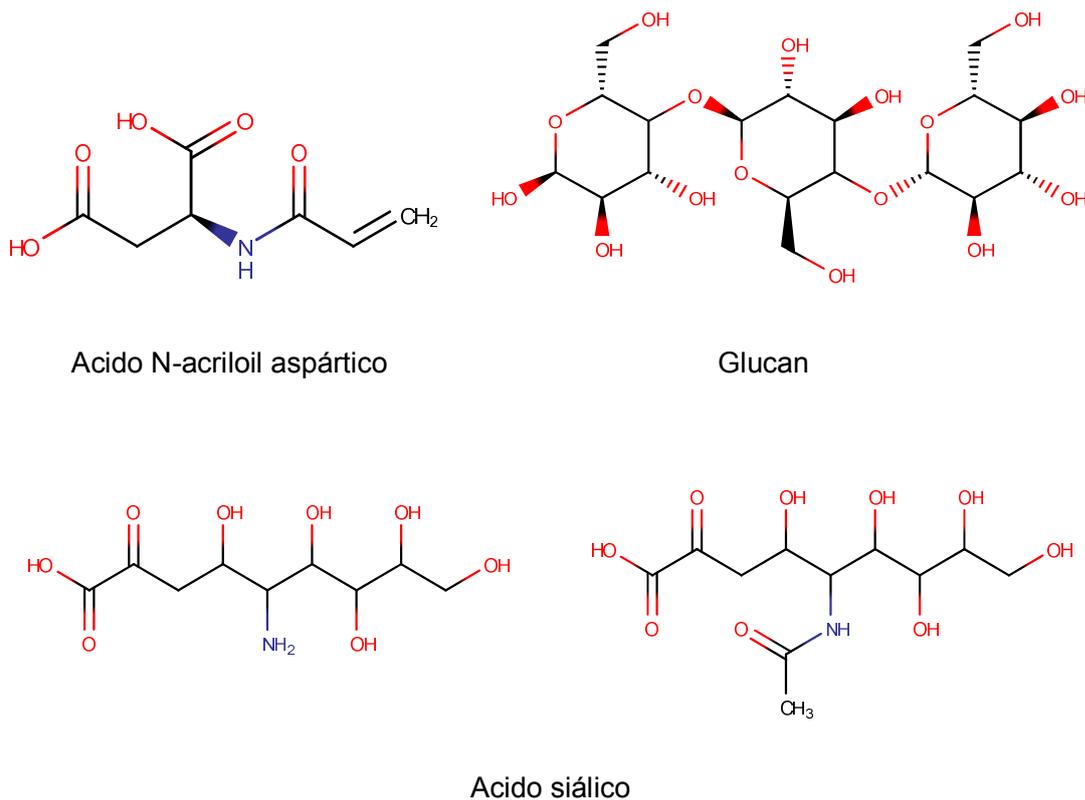


Figura 1-7 Estructura de varios ligandos a hueso.

El ácido polimalónico fue uno de los primeros ligandos empleados, tiene una fuerte afinidad por el tejido óseo y ha sido empleado para la síntesis de agentes terapéuticos para enfermedades como osteoporosis, enfermedad de Paget e hipercalcemia maligna [49]. También se reportan estudios en los que se unió al estradiol, sin embargo no se encuentran reportes de estudios *in vivo* desde la publicación de la patente [67].

El ácido N-metacrilamida salicílico y ácido N-acrilóil aspartico tienen afinidad por la hidroxiapatita, aunque al compararla con los oligopéptidos o los bifosfonatos aquella es mucho más baja [49].

El óxido de polifenileno fosfonilado, fue estudiado por Rawls y Cabasso quienes encontraron que se adhería fuertemente a la hidroxiapatita, ya que el hecho de ser mitad ácido y mitad ester formaba un polímero que se adsorbía rápidamente en la hidroxiapatita acompañado de la liberación de un fosfato. Este estudio concluye que el proceso de conjugación a un medicamento puede ser algo problemático [68].

Dado que se desea fabricar un vehículo con afinidad por el tejido óseo, se debe elegir un ligando que lo dirija. Después de analizar las diferentes opciones, se elige un bifosfonato como el alendronato, pues tienen alta afinidad por el tejido óseo, efecto terapéutico para enfermedades como la osteoporosis, en su estructura posee una amina que hace que se pueda unir químicamente al grupo ácido del PLGA y así obtener un conjugado, y es fácil de adquirir.

### **1.3.2 Tipos de vehículos direccionados a tejido óseo**

El direccionamiento de compuestos activos a diferentes partes del cuerpo no es un concepto actual [69], dada la importancia de desarrollar nuevas maneras de llegar a tejidos de difícil acceso. Se han desarrollado principalmente tres estrategias para mejorar el acceso de principios activos a los huesos:

1. Unir químicamente un ligando al compuesto activo
2. Adicionar una macromolécula entre el ligando y compuesto activo
3. Elaboración de un vehículo con un polímero que sea susceptible de modificar químicamente con un ligando que le de afinidad por el hueso y así transporte el compuesto activo.

Las primeras aproximaciones de direccionamiento de compuestos activos a los huesos, fueron realizadas bajo el mecanismo de unión de un ligando al compuesto activo, con el fin de ser suministrados vía parental. Aunque esta estrategia efectivamente los direcciona, se debe unir químicamente el compuesto activo al ligando de tal manera que dicha unión aunque sea estable también sea susceptible de ruptura cuando se encuentre dentro del cuerpo. Esto hace que no siempre sea posible y en algunos casos el compuesto activo se puede deteriorar y perder su actividad biológica [70][71][64][72][73]. La Tabla 1-4 resume algunas de las investigaciones realizadas con diversos compuestos activos y ligandos.

El segundo desarrollo de compuestos direccionados a hueso, se realizó a partir de la unión del compuesto activo, ligando y polímero soluble en agua, (Figura 1-8) este último se adiciona para mejorar la solubilidad en agua de compuestos hidrófobos, prolongar los tiempos de circulación por el torrente sanguíneo, minimizar el metabolismo del compuesto activo que se transporta [49], [55]. Wang y colaboradores, sintetizaron dos polímeros basados en PEG (dos conjugados) y Poli(N-(2-hidroxipropilmetacrilamida) (PHPMA, dos conjugados) que se unieron a ligandos como alendronato y un péptido de ácido aspártico (asp8). Ensayos *in vivo* mostraron acumulación de dichos compuestos en el tejido óseo [55]. Posteriormente se realizaron pruebas con el complejo PGE1-HPMA-Asp8, (PGE1: prostaglandina E1 que es un potente generador de hueso), (HPMA: N-(2-Hidroxipropilmetacrilamida)) usando como unión un péptido susceptible a un ataque proteolítico, vía Catepsina K. Ensayos *in vivo* empleando ratones a los que se les retiraron los ovarios, mostraron generación de tejido óseo [54].

El tercer desarrollo de compuestos direccionados a hueso ha empleado como estrategia la elaboración de vehículos que puedan transportar una mayor cantidad de compuesto activo, mediante el uso de nanopartículas, liposomas y dendrímeros, que unidos a un ligando, los direccionen al hueso de tal manera que se realice una liberación controlada del principio activo. Todos los vehículos desarrollados deben ser de tamaños pequeños (inferior a 200 o 250 nm) para evitar que el sistema retículo-endotelial los retenga [9]. La Tabla 1-5 muestra los diferentes vehículos desarrollados, materiales empleados, el efecto terapéutico esperado.

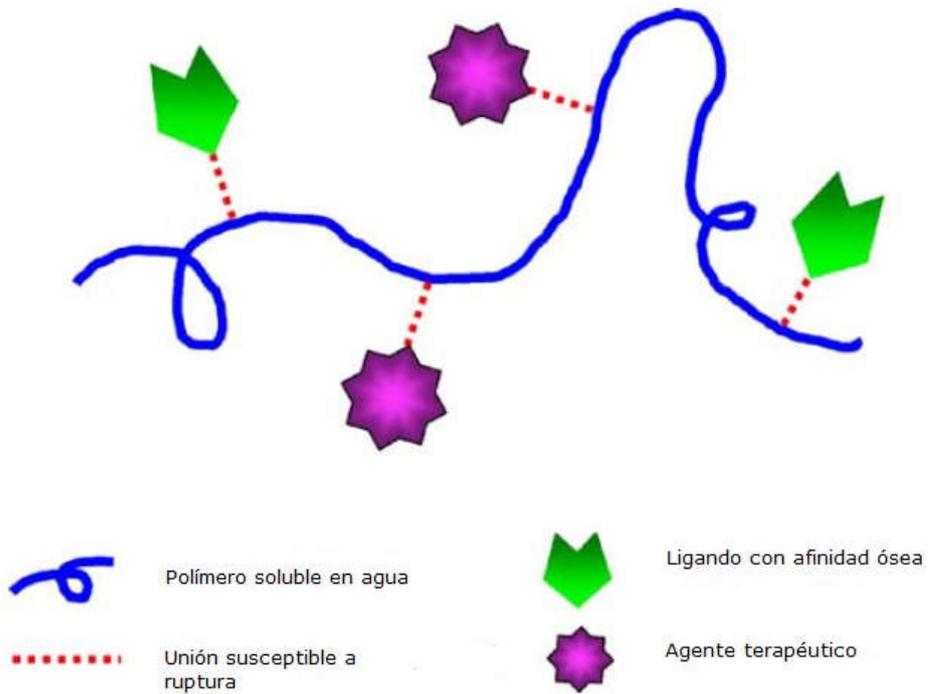


Figura 1-8 Componentes de un sistema ligando-polímero soluble –compuesto activo. Adaptada de la referencia [49]

Tabla 1-4 Principales ligandos y compuestos activos desarrollados [49]

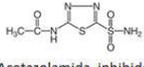
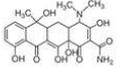
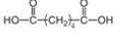
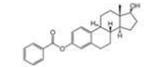
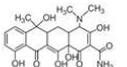
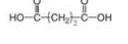
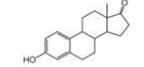
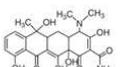
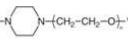
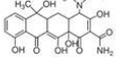
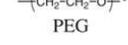
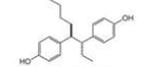
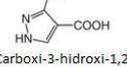
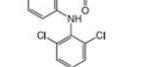
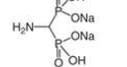
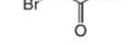
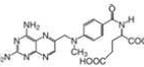
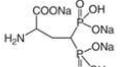
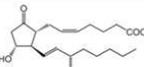
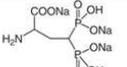
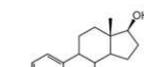
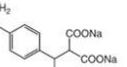
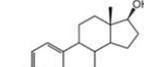
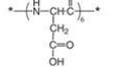
Droga	Fracción de orientación ósea (BTM)	Vínculo entre la droga y el BTM	Mecanismo de liberación de la droga	Razones	Ref.	Comentarios
 Acetazolamida, inhibidor de anhidrasa carbónica	 Tetraciclina	 Acido hexanoico	Hidrólisis no específica	Distribución ubicua de la anhidrasa carbónica <i>in vivo</i>	18	Primer intento de suministro de fármacos dirigidos al hueso. No hay detalles de purificación y caracterización
 β-estradiol-3-benzoato	 Tetraciclina	 Acido succínico	Hidrólisis no específica	Distribución ubicua de los receptores de estrógeno. Los efectos secundarios son citados en las Ref. 15,16	19	La estructura del compuesto esta bien caracterizada. No hay datos de estudio en animales
 3-Estrona	 Tetraciclina	 Derivados de Piperazina	No	Distribución ubicua de los receptores de estrógeno <i>in vivo</i>	20	Piperazina se adjunta a la amida de tetraciclina con formaldehído. Algunos datos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .
TFG-β Factor de crecimiento de hueso	 Tetraciclina	 PEG	No	Distribución ubicua de los receptores de TFG-β <i>in vivo</i>	21	PEG epoxy disfuncional se utilizó en la conjugación. Sitios de modificación no están claros
 Hexestrol Análogo	 4-Carboxi-3-hidroxi-1,2-pirazol	No	No	Distribución Ubicua de los receptores de estrógenos	22, 23	Muestra una fuerte unión hidroxiapatítica y una débil actividad estrogenica
 Diclofenaco sódico NSAID	 Metilamino fosfonato	 Acido Bromo acético	Hidrólisis no específica	Evitar efectos secundarios del NSAID	24	Otros trabajos de este grupo de investigación en ODDS son revisados en la Ref. 25
 Metotrexato	 Bifosfonato	Formación de enlace amida con γ-COOH del glutamato en Metotrexato	No	Incrementa la actividad en contra del tumor metastásico y reduce los efectos secundarios	26	La actividad anti-tumoral no fue clara. El conjugado puede ser visualizado con
 Prostaglandina E2	 Bifosfonato	entre 15-OH del y -SH del Bifosfonato	Hidrólisis no específica	Efectos secundarios del , el agente anabólico óseo más potente	27	Hermosa química, efecto marginal <i>in vivo</i>
Proteínas terapéuticas	Bifosfonatos	Enlace amida	No	Distribución Ubicua de los receptores de estrógenos	28	Este tema fue revisado en la Ref. 29
 Estradiol	 Acido polimalónico	Enlace úrico entre 17α-OH del estradiol y la amida primaria del acido polimalónico	No	Distribución Ubicua de los receptores de estrógenos	30	No son mostrados los efectos biológicos
 Estradiol	 Hexapeptido del L-acido Aspártico	Succinato entre 17β-OH y la amina del péptido	No es claro, la peptidasa es mediada por hidrólisis	Distribución Ubicua de los receptores de estrógenos	31	Algunos efectos anti-osteoporosis y los efectos secundarios del estradiol reducido <i>in vivo</i> con ratones ovariectomizados

Tabla 1-5 Vehículos desarrollados para diferentes enfermedades óseas [74]

Enfermedad ósea	Vehículo	Compuesto activo liberado	Eficiencia del compuesto activo	Ref.
Cancer en los huesos	PLL-CD	BPs (RIS)	Incrementa	[75]
	PLGA-ZOL	Docetaxel	Incrementa	[76]
	PLGA-ALE	Curcumina y bortezomib	Incrementa	[77]
	PLGA	Doxorubicina	Incrementa	[78]
	PLGA	Alendronato	No detectado	[79]
	Polifosfato	Placitaxel	Incrementa	[80]
	PTX-PEG-ALN	Aminobisfosfonato	Incrementa	[81]
Osteosarcoma	MSN	siRNA	Unicamente modelo celular	[8]
	Polimero	Camptotecina	Incrementa	[8]
	LDH	Methotrexate	Unicamente modelo celular	[82]
	Quitosan NP	Enzima DNA	Incrementa	[83]
	Quitosan NP	Plasmido DNA	Incrementa	[84]
	Liposoma polimérico	Doxorubicina	Incrementa	[85]
	Liposoma-BP	Doxorubicina	Incrementa	[86]
	Trióxido de arsenico con propiedades magnéticas NP	Trióxido de arsénico	Incrementa	[87]
	Fosfato de calcio NP	Cisplatino	Incrementa	[88]
	Dextrano-lípido NP	Doxorubicina	Incrementa	[89]
	Dextrano-PEI NP	Doxorubicina	Incrementa	[90]
	PLGA-AP-NP	Salomicina	Incrementa	[91]
	Osteoartritis	Hidrogel polimérico	Dextran	Incrementa
Quitosano NP		Plasmido DNA	Incrementa	[93]
Infecciones e inflamaciones	Implantes de PLGA	Doxycycline	Incrementa	[94]
Terapia génica	Hidrogel mPEG-PLGA	Teicoplanin	Incrementa	[95]
	PLGA-fosfato de calcio	Tigecycline	Incrementa	[96]
	HA-quitosano	Plasmido DNA	Unicamente modelo	[97]
	Quitosano	IL-1 Ra DNA	Incrementa	[93]
	Dendrímeros	Gen LacZ	Estudio en modelo	[98]
	PAMAM	siRNA para sarcoma de Ewing		
	Diamantes NP	Ewing	Incrementa	[99]
Regeneración ósea	Albúmina-BP NP	BMP 2	Incrementa	[100]
	PLGA-MP	Simvastatin	Incrementa	[101]

Abreviaturas: BMP: proteínas morfogénicas óseas; MP: micropartículas; AP aptamero; NP: nanopartículas; PLL-CD, poli-L-lisina unida covalentemente a beta-ciclodextrina; RIS, risendronato; PLGA, copolímero del ácido láctico y glicólico; ZOL, ácido zoledrónico; PTX-PEG-ALN: paclitaxol y alendronato soportado sobre polietilenglicol; MSN: nanopartículas de sílica mesoporosa; siRNA, RNA silenciador; LDH, doble capa de hidróxidos; DNA, ácido desoxirribonucleico; mPEG, polietilenglicol monometil eter; HA, ácido hialurónico; PAMAM, poliamidoamina; PEI, polietilenimina.

Como se puede observar en la Tabla 1-5, se han desarrollado diferentes vehículos como nano y micropartículas, liposomas y dendrímeros. Los vehículos desarrollados presentan forma esférica, con tamaños que varían entre los 240 y 50 nm; con la excepción de las micropartículas. Como materiales de fabricación se emplea con mayor frecuencia polímeros de tipo biodegradable como quitosano, PEG, PLGA, albúmina, entre otros. Como estrategia de direccionamiento hacia tejido óseo, la mayoría de los materiales se han funcionalizado con un bifosfonato para darle afinidad por ese tejido.

Se ha evaluado la afinidad de los distintos vehículos por el tejido óseo empleando ensayos *in vitro*, verificando la afinidad por la hidroxiapatita, aunque esta aumenta con la cantidad de ligando presente [31], [76], [79], [100], [102]–[105]. También se han realizado pruebas *in vivo* para verificar no solo la afinidad, si no en algunos casos la biodistribución de los vehículos; como resultado se encontró que éstos se depositan principalmente sobre los huesos, hígado y bazo [76], [100], [102], [106]. Ramanlal y colaboradores [76] realizaron estudios comparando nanopartículas de PLGA sin y con ligando (zolendronato) encontrando mayor cantidad de nanopartículas con ligando (5 veces) en el tejido óseo. Estos estudios fueron realizados en tejidos de tipo tumoral o con enfermedades óseas. Sin embargo, Wang y colaboradores [100] realizaron el ensayo empleando nanopartículas de albúmina (BSA) empleando un bifosfonato como ligando, utilizando ratones sanos y no encuentra direccionamiento a hueso si comparan las nanopartículas con ligando con las desnudas. Esto podría indicar un mejor direccionamiento de los bifosfonatos cuando se aplican a tejido tumoral o con enfermedades óseas.

Para verificar si existe algún efecto adverso del vehículo a nivel celular o una posible reacción adversa cuando este ingrese al torrente sanguíneo, se practican pruebas de citocompatibilidad. Los resultados indican que dichos vehículos no presentan efectos adversos. Wang y colaboradores [100] realizan un ensayo para comparar el efecto citotóxico tanto de las nanopartículas de albúmina-bifosfonato sin ligando y con este, y encuentran que no existe mayor efecto citotóxico particularmente en células C2C12. De otro lado Chaudhari [76] y Hengst [105] realizaron pruebas de citotoxicidad para comparar el compuesto activo libre y atrapado, encontrando que atrapado tiene mayor efecto citotóxico ya que lo atrapado es taxol, componente tóxico. Pignatello *et al*, [79] Anada *et al* [86] y Wang *et al* [100] hacen pruebas solo sobre el vehículo, encontrando que no había efecto citotóxico.

Se verificó la acción farmacológica de los compuestos atrapados. Thamake [77] compara el efecto de dos anticancerígenos libres, atrapado y atrapado con ligando y comprueban que existe una disminución en la velocidad de crecimiento del tumor que se marca aún más con las nanopartículas con ligando. Pignatello *et al* [79] atraparon doxorubicina empleando nanopartículas de PLGA con alendronato como ligando y ensayaron el efecto del compuesto activo en ratones con metástasis ósea. Como resultados, observaron menor porcentaje de metástasis ósea en los ensayos que emplearon las nanopartículas con ligando, cuando se comparó con las que no lo tienen, ya que la doxorubicina inhibió el crecimiento celular.

## **1.4 Vehículos desarrollados para el transporte de N acetilcisteína**

La N-acetilcisteína (NAC), es un tiol reducido precursor de la L- cisteína, empleada como agente mucolítico y antioxidante que elimina radicales libres [13], [14]. Aunque es un compuesto activo con muchas aplicaciones terapéuticas, su biodisponibilidad oral es baja (6 a 10%); una vez ingresa al torrente sanguíneo se une a las proteínas plasmáticas por medio de puentes disulfuro, lo que la hace altamente inestable [107], [108]. Adicionalmente su carácter hidrófilo hace que se elimine fácilmente en la orina y concentraciones altas en la sangre, pueden incrementar la presión sanguínea, generar náuseas y en algunos casos irritaciones en la piel [109], [110]. Es por ello que se ve la necesidad de explorar el desarrollo de vehículos que transporten el compuesto y lo estabilicen dentro del organismo.

Se han desarrollado varias estrategias para incrementar la biodisponibilidad de la NAC. Una de ellas fue adicionar una cadena de 6 a 8 unidades de polietilenglicol (PEG) que se unía a la NAC (5 a 7 moléculas), obteniendo tamaños de partícula entre 21 y 43 nm. Este estudio buscaba obtener conjugados para ser empleados en el tratamiento de neuroinflamaciones a nivel fetal, los resultados obtenidos mostraron que el conjugado obtenido tenía mayor capacidad antioxidante (más del doble) que el compuesto activo libre [109]. Aunque el complejo formado tenía un tamaño pequeño, la cantidad de NAC que se puede incorporar en el complejo también es baja, ya que se transportan entre 5 y 7 moléculas por unidad de complejo. También se han desarrollado dendrímeros conjugados con NAC (16 a 18 unidades por dendrímero) para tratamiento en neuroinflamaciones, reportando resultados positivos para ensayos realizados en modelos *in vitro* como *in vivo*

[107], [111], [112], [113], [114]. Otro vehículo empleado han sido los liposomas; Mitsopoulos y colaboradores reportan la fabricación y uso de liposomas de 200 nm contra las lesiones pulmonares agudas, encontrando mayor actividad de la NAC cuando se encuentra dentro del vehículo, ya que le brinda estabilidad [115]. Ourique y colaboradores fabrican también liposomas (tamaño de partícula de 89 a 147 nm) para administración contra enfermedades pulmonares, lo formulan secándolo por aspersión reportando una carga de NAC de  $8.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  [116]. Odziomek y colaboradores desarrollaron micropartículas con mezclas de dextrano, manitol y NAC e identificaron que tenían potencial para ser empleadas como vehículos para transporte de medicamentos hacia los pulmones [117]. Ondricek, reporta nanopartículas (210 nm) de PLGA para ser usadas en neuropatías en la retina, hacen pruebas *in vivo* donde identifican que tienen efecto terapéutico. La eficiencia de atrapamiento de NAC es baja. De otro lado, Akbar y colaboradores, elaboraron también nanopartículas de PLGA empleando el método de electrospray [118], encontrando nanopartículas de 122 nm con alta eficiencia de atrapamientos (54%). Finalmente Desai y colaboradores, desarrollaron cilindros de PLGA para implante cuyo objetivo fue colocarlo de manera local sobre el cuello del paciente con el fin de liberar NAC, ya que el efecto terapéutico buscado era ayudar a las personas que padecen cáncer en la cabeza o cuello, no se reportan resultados de su uso *in vitro* o *in vivo* [119]. La Tabla 1-6 resume los principales vehículos desarrollado para el transporte de NAC; allí se especifica el material de fabricación, tipo de vehículo, tamaño de partícula, la enfermedad y el efecto del uso del vehículo que se pretende atender.

Tabla 1-6 Vehículos desarrollados para el transporte de NAC

Vehículo	Material	Tp	Enfermedad	Efecto	Ref
Dendrimeros	PAMAM	21 -43 nm	Neuroinflamaciones a nivel fetal	+	[107], [111], [112], [114]
Liposomas	DPPC	200 nm	Lesiones pulmonares agudas	+	[115], [120]
Liposomas	Fosfolípido y colesterol	147 a 89 nm	Enfermedades pulmonares	+	[116]
Micropartículas	Dextrano- manitol	1,65 - 3,32 $\mu$ m	Enfermedades pulmonares	+	[117]
Nanocompositos	Oxido de Zinc y ciclodextrinas		Cancer de mama	+	[121]
Nanopartículas	PLGA	122 nm		N.D	[118]
Nanopartículas	PLGA	210 nm	Neuropatías ópticas	+	[122]

PAMAM: Poliamidoamina; DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina; N.D: No hay datos; +: el desempeño del compuesto activo mejora cuando se encuentra en el vehículo, comparado con el compuesto libre

## 1.5 Métodos de fabricación de nanopartículas de PLGA

Anteriormente se había seleccionado que el vehículo que se fabricaría serían nanopartículas de PLGA conjugadas con alendronato. A continuación se explican las diferentes metodologías para la fabricación de nanopartículas de PLGA.

### 1.5.1 Método de emulsión y evaporación de solventes:

Este método tiene dos alternativas, que pueden variar dependiendo del carácter hidrófilo o hidrófobo del compuesto activo a encapsular. La primera es una emulsión simple (w/o) y la segunda es una doble emulsión (w/o/w). La figura 1-9 muestra el esquema de esta metodología.

**Emulsión simple (w/o)** es empleada principalmente para atrapar compuestos activos hidrofóbicos. El polímero y el compuesto activo se disuelven en un solvente orgánico volátil inmiscible en agua, como el diclorometano o el etil acetato. La fase orgánica es emulsificada en agua, mediante una agitación intensa, que se puede realizar por medio de un homogeneizador, por microfluidización o por ultrasonido, en algunas ocasiones se emplea la presencia de un agente surfactante (colato de sodio o alcohol polivinílico –PVA–) para estabilizar la emulsión. El solvente orgánico se evapora (algunas veces a presiones reducidas, dependiendo de lo lábil del compuesto activo que se esté atrapando) causando que el polímero insoluble en agua forme nanopartículas con el medicamento incluido y éstas se recuperen por centrifugación, resuspenden en agua y finalmente se liofilizan para

su almacenamiento [123]. Aunque este método ha sido empleado para compuestos activos hidrofobicos, se han realizado algunas modificaciones a esta metodología para adaptarla a compuestos hidrófilos; la ventaja de la emulsión sencilla es que en algunos casos puede atrapar mayor cantidad de compuesto activo dentro de la partícula comparada con el procedimiento por doble emulsión [123]. Song y colaboradores describen la fabricación de nanopartículas cargadas con dos compuestos hidrófilos de bajo peso molecular, por medio de una emulsión simple (w/o), donde el polímero y el compuesto activo se disuelven en una mezcla de acetona y diclorometano. La fase acuosa, que contiene PVA, forma una emulsión con la fase orgánica por medio de ultrasonido. Los resultados reportados para esta variación son nanopartículas de tamaños de 111.4 +/- 2.35 nm y una eficiencia de atrapamiento de 55.35% y 69.47% para los dos compuestos empleados [124].

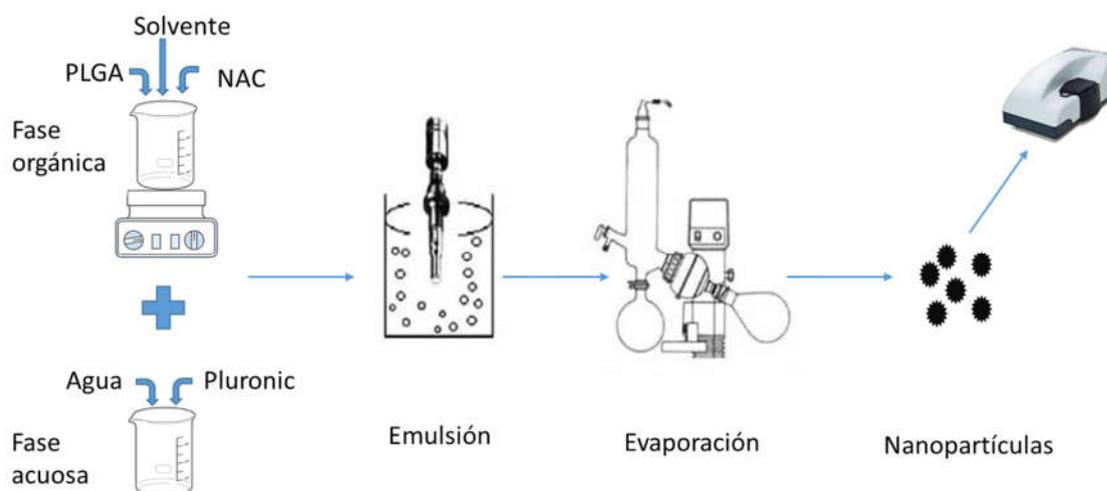


Figura 1-9 Esquema del método de Emulsión y Evaporación de solventes.

Los sistemas de doble emulsión, han sido ampliamente empleados para atrapar compuestos activos hidrófilos y proteínas. Dicho compuesto se disuelve en una pequeña cantidad de solución acuosa que es emulsificada en la fase orgánica que contiene el polímero disuelto. La emulsión w/o se dispersa en una solución acuosa que se encuentra en una alta proporción, formando la doble emulsión w/o/w. Los siguientes pasos son los mismos que para una emulsión sencilla [123], [125].

Cuando se fabrican nanopartículas por el método de emulsión y evaporación de solvente, las variables que tienen mayor influencia sobre el tamaño de partícula son el tipo y concentración de polímero y de agente surfactante. Se ha encontrado que dicho tamaño varía proporcionalmente con la concentración del polímero en la fase orgánica e inversamente con la concentración del estabilizador (colato de sodio o PVA) [126]. Cuando se emplea colato de sodio como estabilizante, se ha reportado que solamente un porcentaje bajo de este (inferior a 6%) queda asociado a las nanopartículas. Mientras que cuando se emplea PVA, éste puede quedar asociado en una proporción elevada. Esto puede llegar a generar problemas en algunas ocasiones cuando queda en el interior de las nanopartículas.

Peracchia y colaboradores, reportan que no encontraron variación apreciable en el tamaño de nanoesferas de PLGA-PEG cargadas con lidocaína al variar el peso molecular del PEG y la cantidad de compuesto activo cargado [127]. Estos resultados fueron también corroborados [128].

La principal desventaja de los métodos por emulsión, radica en que algunos de los solventes empleados son relativamente tóxicos y que los altos esfuerzos cortantes a los que se ven sometidas las nanopartículas, por los efectos de la agitación, pueden llegar a degradar el compuesto activo, esto es particularmente crítico cuando ésta es una proteína.

### **1.5.2 Método de desplazamiento de solventes o nanoprecipitación:**

Este método fue primero descrito y patentado por Fessi y colaboradores [129]. Como se observa en la Figura 1-10, el polímero y el compuesto activo se disuelven en un solvente orgánico soluble en agua (acetona). La fase orgánica se transfiere de manera lenta a la fase acuosa que contiene un surfactante (PVA o poloxamer 188 por ejemplo), allí se forma una emulsión o/w con la ayuda de una agitación suave, de manera que la acetona migra hacia la fase acuosa y la nanopartícula se forma por precipitación del polímero y el compuesto activo. El solvente orgánico se retira por evaporación, la solución acuosa se concentra a presión reducida, las nanopartículas son centrifugadas o dializadas para remover el exceso de surfactante y compuesto activo que no haya sido encapsulado. Posteriormente son liofilizadas. No es necesario adicionar siempre el surfactante, pero éste

es importante para evitar la agregación de las partículas. Este método también es conocido como difusión de solventes [130].

La fabricación de nanopartículas modificadas con polietilenglicol (PEG) no requiere de la presencia de surfactantes ya que el PEG en la superficie estabiliza la dispersión. Las variables más importantes al fabricar nanopartículas por este método son la concentración del polímero en la fase orgánica y la relación entre la fase orgánica y acuosa [30]. Se ha comprobado que a mayor peso molecular de polímero en la fase orgánica, mayor será el tamaño de partícula [131].

Entre las ventajas de este método está su simplicidad y la ausencia de grandes esfuerzos cortantes; como desventaja, este método no es recomendable para encapsular compuestos activos que sean hidrosolubles, aunque Takeuchi y otros [132] propuso realizar algunas modificaciones para mejorar esto, como en lugar de usar agua como medio acuoso se usa un triglicérido (caprilato y triglicérido de caprato) y adicionar un surfactante (Span 80) a la fase orgánica que contiene el polímero. Otra opción es que a la acetona se le adicione otro solvente como diclorometano [133]. Bilati y colaboradores realizó cambios en el no solvente [134] y Dalpiaz y colaboradores emplearon aceite de semilla de algodón en lugar de agua como no solvente [135], [136].

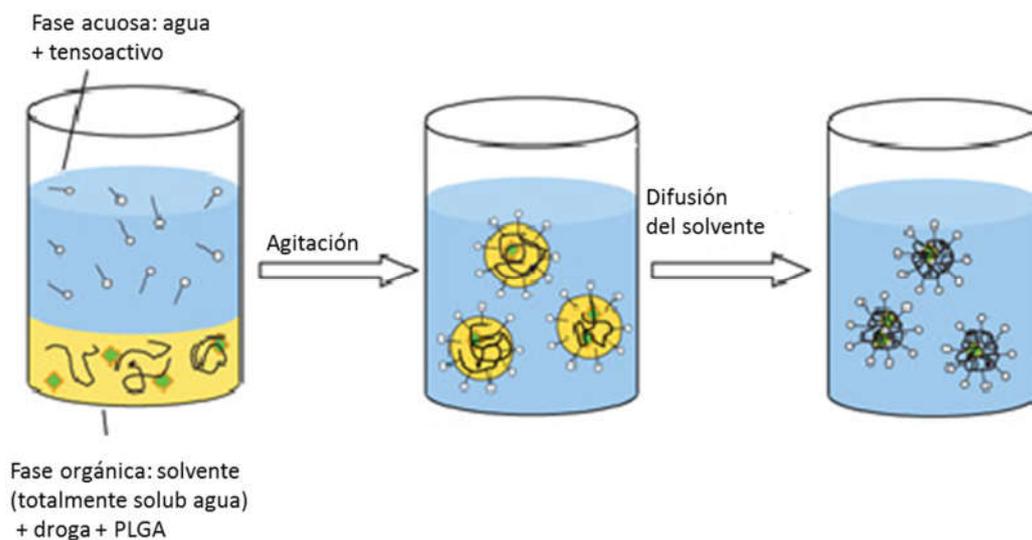


Figura 1-10 Esquema del método de nanoprecipitación.

### **1.5.3 Método de precipitación**

En este método el polímero y el compuesto activo son disueltos en un solvente que sea soluble en agua (acetona o tetrahidrofurano). Posteriormente se forma una emulsión con un gel acuoso que contenga un agente que provoque la precipitación del polímero y un estabilizante de coloides (PVA, PVP o hidroxietilcelulosa) esto se agita mecánicamente y la emulsión o/w se diluye en suficiente agua para permitir la migración de la acetona a la fase acuosa, induciéndose la formación de nanopartículas del polímero, estas se purifican posteriormente por filtración. Este proceso es empleado solamente para compuestos activos hidrofóbicos [123].

### **1.5.4 Aspersión**

Es una técnica sencilla, en la que las partículas son formadas por atomización de una emulsión y puesta en contacto con una corriente de aire caliente. Esta técnica no emplea condiciones extremas, y es fácilmente escalable. Empleado con mayor frecuencia para la fabricación de micropartículas, ya que se requiere una aspersión muy fina para lograr nanopartículas [46], [137].

### **1.5.5 Electrospray**

El principio de funcionamiento de esta técnica es el paso de corriente a una solución polimérica, forzándola a salir en forma de nanopartículas. El equipo está compuesto por una bomba conectada a una fuente de alto voltaje. Un colector de metal colocado en el extremo opuesto que hace las funciones de polo a tierra. El flujo y el voltaje aplicado se optimizan de acuerdo a la solución que se vaya a trabajar. Esta técnica ofrece como ventajas que puede producir nanopartículas monodispersas, es reproducible, se ha reportado alta capacidad de atrapamiento, las condiciones de operación son fácilmente controlables. Como desventajas, el proceso emplea una fuente eléctrica con alto voltaje, se opera con flujos bajos, lo que genera rendimientos bajos y en algunos casos cuando los compuestos activos son muy lábiles, pueden ser desnaturalizados [101], [138].

De las metodologías expuestas se seleccionan los métodos de:

- Emulsión – evaporación ya que esta es una metodología sencilla que se ha empleado para el atrapamiento de compuestos hidrófilos y se cuenta con los equipos requeridos.
- Nanoprecipitación esta es otra técnica muy sencilla, fácilmente escalable, económica, con bajos esfuerzos cortantes de fácil implementación. Adicionalmente se cuenta con los equipos requeridos.

Aunque podrían funcionar muy bien los métodos de aspersion y electrospray no se cuenta con los equipos requeridos.

A continuación, se estandarizan las metodologías a emplear, se selecciona una y se buscan las condiciones para maximizar la cantidad de NAC cargada al interior de las nanopartículas o partículas submicrónicas. Posteriormente, se estudia la velocidad de liberación de NAC y degradación de las partículas poliméricas submicrónicas en condiciones similares a las fisiológicas. Finalmente se verifica su acción terapéutica empleando un cultivo *in vitro* de células similares a osteoclastos.

## **2. Estandarización de las metodologías para la fabricación de partículas submicrónicas de PLGA y selección de una alternativa**

Dado que no se tenía implementada ninguna metodología para la fabricación nanopartículas de PLGA que atraparan NAC, se buscó encontrar las variables que tuvieran mayor influencia en el tamaño de partícula, de tal manera que fuese posible obtener nanopartículas de tamaños inferiores a 250 nm, ya que tamaños superiores son retenidos fácilmente por el sistema retículoendotelial [9], [139], [140]. Se seleccionaron los métodos de emulsión simple y nanoprecipitación como alternativas que podrían llegar a funcionar para la fabricación del vehículo deseado. Una vez seleccionada una metodología, se buscaría incrementar el atrapamiento de NAC. A continuación, se encuentran los resultados del proceso de estandarización de cada una de las metodologías propuestas.

### **2.1 Emulsión simple con evaporación del solvente**

En este método, se forma una solución del polímero y del compuesto activo en un solvente orgánico volátil inmiscible o parcialmente miscible en agua, como el diclorometano o el acetato de etilo; posteriormente, la fase orgánica es emulsificada en agua mediante una agitación intensa, que se puede realizar por medio de un homogenizador, por microfluidización o por ultrasonido; en algunas ocasiones se emplea la presencia de un tensoactivo para estabilizar la emulsión, ya que se puede presentar agregación en el polímero. Finalmente, el solvente orgánico se evapora (algunas veces a presiones reducidas, de acuerdo a la estabilidad del principio activo que se esté atrapando), lo que causa que el polímero insoluble en agua, precipite, formando nanopartículas con el compuesto activo incluido. Estas se recuperan por centrifugación o filtración y se resuspenden en agua para una posterior liofilización con el objetivo de almacenarlas [123], [141], [142]. En esta metodología la cantidad de compuesto activo que se puede atrapar

se ve limitada tanto por la cantidad que se puede solubilizar en el solvente a emplear, como por la afinidad del compuesto activo por el agua, ya que los compuestos que son altamente hidrófilos pueden migrar hacia el agua durante el proceso de emulsificación; disminuyendo la cantidad que se atrapa dentro de las nanopartículas [143]. Para el presente estudio se eligió este método con el fin de determinar las condiciones para obtener nanopartículas o partículas submicrónicas de PLGA de tamaños inferior a 250 nm, que pudieran atrapar NAC, teniendo en cuenta que ésta última es soluble en el acetato de etilo a concentraciones inferiores a 25 mg/mL a temperatura ambiente ( $\approx 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (anexo A).

### **2.1.1 Materiales y métodos**

2.1.1.1. *Materiales*: PLGA 50/50 Resomer RG 502 (peso molecular 7 – 17 kDa), N-acetilcisteína marca Sigma Aldrich, Pluronic F127 marca Bioreagent, agua destilada y desionizada, acetato de etilo grado analítico marca Panreac.

*Manejo y cuantificación de N-Acetil-cisteína*: 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{ H}_2\text{O}$  marca (Merck ) y marca Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA), Diclorometano R.A. marca (Merck). Buffer acetato, HCl (J Beacker).

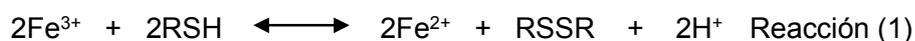
2.1.1.2. *Producción de nanopartículas o partículas submicrónicas*: la formación de nanopartículas o partículas submicrónicas se realizó empleando el método de emulsión y evaporación: la fase orgánica estaba compuesta por acetato de etilo como solvente, PLGA (10 mg/mL) y NAC (1mg/mL). Se dejó un tiempo de disolución de mínimo 2 horas a temperatura ambiente. La fase acuosa se formó con agua y Pluronic® F127 1% p/v como tensoactivo. A continuación se formó la emulsión adicionando lentamente la fase orgánica a la acuosa mientras se realizaba ultrasonido (Branson digital sonifier 450). Finalizado el tiempo del ultrasonido, se evaporó el solvente a presión reducida (74,5 kPa) y se realizó la determinación del tamaño de partícula e índice de polidispersidad.

Se empleó un diseño experimental al azar univariante mutinivel, donde se establecieron como factores la relación entre las fases orgánica y acuosa (relación O/A), el tiempo de duración del ultrasonido y el porcentaje de amplitud del mismo. Los niveles que se emplearon tanto para la relación O/A (1 a 2, 1 a 5 , 1 a 10 y 1 a 20) como para el tiempo de ultrasonido (15, 30, 60, 180 y 300 s) se escogieron con base en información de

protocolos desarrollados por otros autores [47], [144]–[147]. Los valores de los porcentajes de amplitud se establecieron de acuerdo con la disponibilidad que tenía el ultrasonido (permite trabajar porcentajes de amplitud hasta el 70 %). Como variables respuesta se establecieron el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad.

Una vez se establecieron los niveles de las variables observadas que permitieron obtener nanopartículas o partículas submicrónicas de menor tamaño, se realizó un ensayo final al cual se le determinó el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad, la eficiencia de encapsulación (%) de NAC, la carga específica que se define como la relación entre la cantidad de NAC atrapada con respecto a la cantidad de polímero adicionada (% NAC/PLGA p/p) y el potencial zeta. Estos ensayos se realizaron solo en la parte final, ya que el objetivo de esta etapa del trabajo fue determinar un protocolo para obtener nanopartículas o partículas submicrónicas de PLGA de tamaños inferiores a 250 nm y que puedan atrapar NAC. Posteriormente se compara la cantidad de NAC atrapada por el método de emulsión y evaporación empleando acetato de etilo como solvente con otras metodologías como nanoprecipitación o emulsión doble. Las pruebas fueron realizadas por duplicado.

2.1.1.3. *Determinación de NAC*: Se realizó por espectrofotometría empleando una adaptación del método de Kukoc y Radic (2011) [148], [149]. El método se basa en la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  por parte de la NAC como se ve en la reacción 1. El  $\text{Fe}^{2+}$  reacciona con la TPTZ para formar el complejo  $\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{2+}$  de coloración azul profundo (reacción 2).



Se tomó 1 mL de la suspensión acuosa de nanopartículas o partículas submicrónicas y se centrifugó a 20000 g por 20 minutos, descartando el sobrenadante. Posteriormente se realizaron tres lavados con 0,7 mL de agua tipo II, descartando el sobrenadante. Para disolver el *pellet* se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de diclorometano y se agitó con un vórtex. La solución se dejó en reposo durante 1 h para asegurar que el polímero fuera completamente disuelto y posteriormente se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de agua, se agitó con un vórtex y luego se centrifugó a 20000 g por tres minutos. La determinación de NAC se hizo en la fase

superior (acuosa), por espectrofotometría. Para esto se tomaron 60  $\mu\text{L}$  de la fase acuosa y se le adicionaron 1,2 mL de *buffer* acetato (0,5 M) pH 3,6, 75  $\mu\text{L}$  de solución acuosa de Fe III (10 mM), 75  $\mu\text{L}$  de solución acuosa de tripiridiltriazina TPTZ (10mM) y 90  $\mu\text{L}$  de agua. La mezcla se agitó y se esperó 60 minutos a temperatura ambiente hasta que se desarrolló el color (morado) para finalmente determinar el valor de la absorbancia a 593 nm. Se usó como blanco el mismo tratamiento con agua tipo II. La concentración se determinó mediante una curva de calibración cuyos límites de detección fueron entre 5 y 140  $\mu\text{g/mL}$ . Las pruebas se realizaron por triplicado.

La eficiencia de encapsulación de NAC (% NAC) se determinó dividiendo el peso de NAC atrapada en las nanopartículas o partículas submicrónicas sobre el peso adicionado originalmente en la solución del solvente y se multiplicó por 100. La carga específica (% p/p NAC/PLGA) se determinó dividiendo el peso de NAC atrapada en las partículas entre el peso de polímero adicionado en la solución del solvente y se multiplicó por 100.

2.1.1.4. *Determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta:* la distribución del tamaño de partícula fue determinada por dispersión dinámica de luz (DLS) empleando un equipo Malvern Zetasizer ZS. Los parámetros de medida empleados fueron los siguientes: se empleó un laser con una longitud de onda de 633 nm (He-Ne), un ángulo de dispersión de 173°. Los ensayos se realizaron a 25 °C, en un cuarto cerrado y con un tiempo para estabilizar la temperatura de 2 minutos. La viscosidad del medio empleado fue de 0.8872 mPa.s y el índice de refracción del medio fue de 1.33, valores que corresponden al agua y fueron obtenidos del software (Zetasizer v6.34). Se realizaron al menos 3 medidas por muestra y se reportó el promedio aritmético de las tres. Se reportó el tamaño de partícula teniendo en cuenta el valor reportado por el análisis acumulativo siempre y cuando el índice de polidispersidad fuese inferior a 0,2 y el valor del intercepto superior a 0,85 este último de acuerdo a las recomendaciones realizadas por el fabricante [150]. En los casos que índice de polidispersidad es superior a 0.2 se reporta el valor que haya presentado mayor intensidad, de acuerdo al análisis diferencial, siempre y cuando el valor del intercepto hubiese sido superior a 0,85. Cuando se obtuvo una medida que no cumpliera con estas especificaciones, se reportó como muestra polidispersa y no se reporta valor para el tamaño de partícula pues el resultado no sería confiable. La concentración de partículas para realizar el ensayo debía ser inferior a 1 mg/mL, ya que

.concentraciones superiores no permiten obtener resultados reproducibles, tal como se analiza en el anexo B.

El potencial zeta se determinó con el mismo equipo usando electroforesis Doopler con láser, empleando un mililitro de muestra.

Análisis estadístico: Las pruebas se realizaron al menos por duplicado. Los datos fueron analizados empleando análisis de varianza en una vía y la comparación entre medias fue evaluada por medio de la prueba de diferencia media significativa (DLS) con un nivel de significancia de 0,05. Se verificó que los datos tuvieran distribución normal, empleando la prueba de Shapiro Will ( $\alpha = 0,05$ ) y homogeneidad de varianzas empleando la prueba de Levene ( $\alpha = 0,05$ )

### **2.1.2 Resultados**

*Efecto de la amplitud de onda del ultrasonido:* en este estudio, se buscó observar si existía alguna influencia sobre el tamaño de partícula e índice de polidispersidad al cambiar el porcentaje de la amplitud entregado por el ultrasonido a la emulsión. El análisis estadístico (ANOVA  $p < 0.05$ ) mostró que el tamaño de partícula varía con el porcentaje de amplitud. Los resultados encontrados para tamaño de partícula al realizar la comparación de medias (comparación de medias usando LSD  $p < 0,05$ ) reportaron que no existía diferencia significativa entre las amplitudes de 20 y 60 y entre 40 y 60%, tal como se puede ver en la Figura 2-1. En cuanto al índice de polidispersidad este se ve influenciado por la amplitud, ya que al emplear valores bajos se obtuvieron muestras con una polidispersidad superior a 0,4, mientras que a mayor amplitud se obtuvieron polidispersidades inferiores a 0,2.

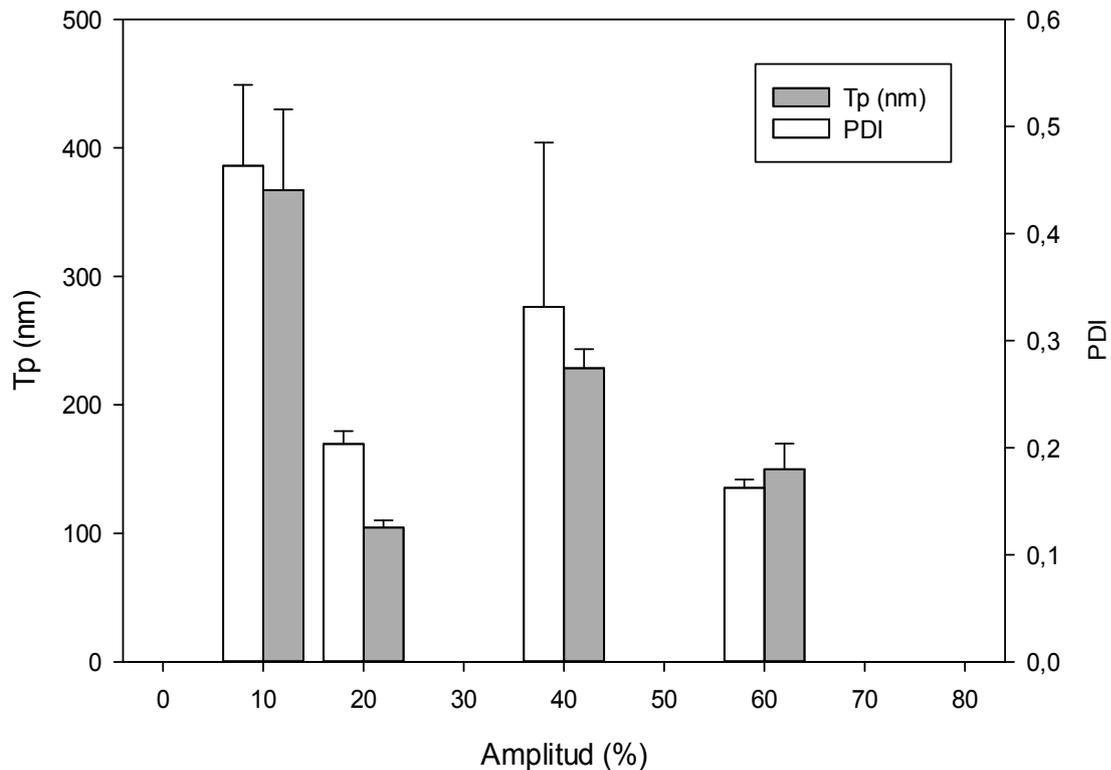


Figura 2-1. Efecto de la variación del porcentaje de amplitud del ultrasonido sobre el tamaño de partícula (Tp) y el índice de polidispersidad (PDI) manteniendo constante una relación O/A de 1 a 10 y tiempo de ultrasonido de 30 s. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

*Tiempo de ultrasonido:* se realizaron ensayos variando el tiempo de ultrasonido, y se emplearon valores entre 15 y 300 s. De acuerdo a la Figura 2-2, se encontró que este factor tenía efecto sobre el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad, aunque los valores más bajos de éste último se obtuvieron para 60 y 180 s. En cuanto al tamaño de partícula, se encontraron tamaños inferiores a 200 nm a partir de los 60 s (105,16 nm) y no parece existir diferencia para el tamaño de partícula empleando tiempos superiores a los 60 s. Al tiempo de 300 s aunque el tamaño de partícula sigue siendo bajo (104,7 nm) el índice de polidispersidad se incrementó con respecto a los valores obtenidos a 60 y 180 s.

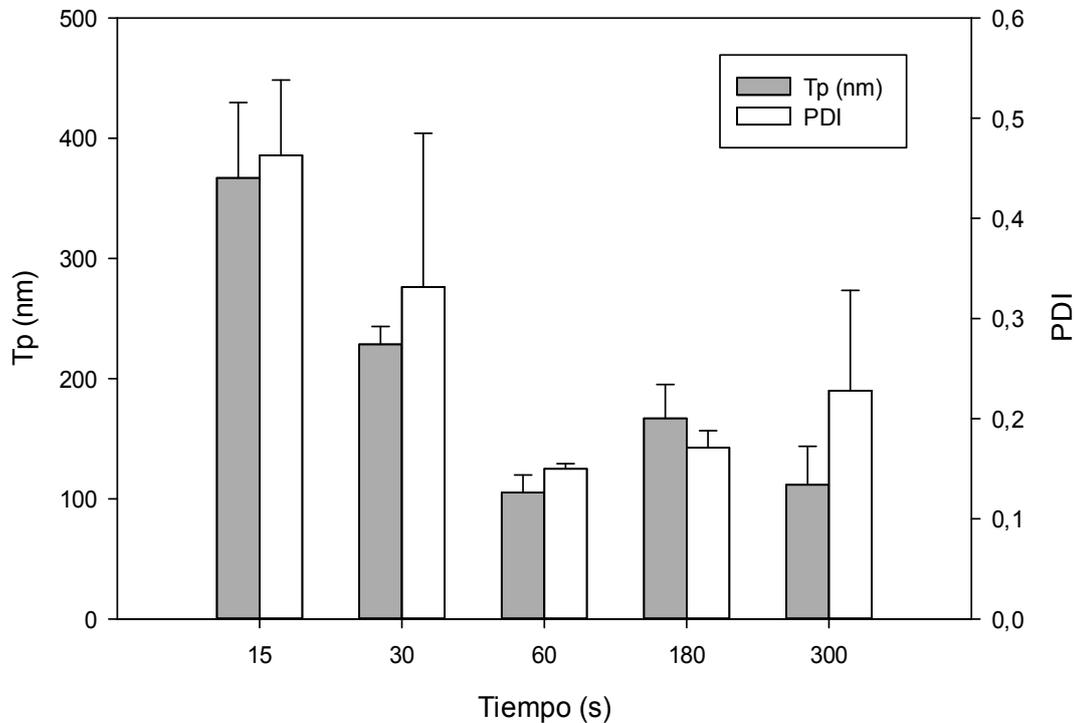


Figura 2-2 Efecto de la variación del tiempo de ultrasonido sobre el tamaño de partícula ( $T_p$ ) y el índice de polidispersidad (PDI) manteniendo constante una relación O/A de 1 a 10 y un porcentaje de amplitud de 40%. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

*Relación entre la fase orgánica y la acuosa (O/A):* los resultados de la Figura 2-3, y el análisis estadístico (ANOVA  $p < 0,05$ ) mostraron que el tamaño de partícula cambia con la relación O/A, pero el índice de polidispersidad no. El menor tamaño de partícula e índice de polidispersidad se encuentra con la relación 1 a 5. Esto se corrobora con la comparación de medias realizada para el tamaño de partícula (comparación de medias usando LSD  $p < 0,05$ ), donde se encontró diferencia entre los valores para una relación O/A de 1 a 5 con los niveles de 1 a 10 y de 1 a 20. Cuando se incrementó la fase acuosa (valores O/A superiores a 1/10) también lo hace el tamaño de partícula, obteniéndose el máximo valor (337 nm) con una relación de 1/20.

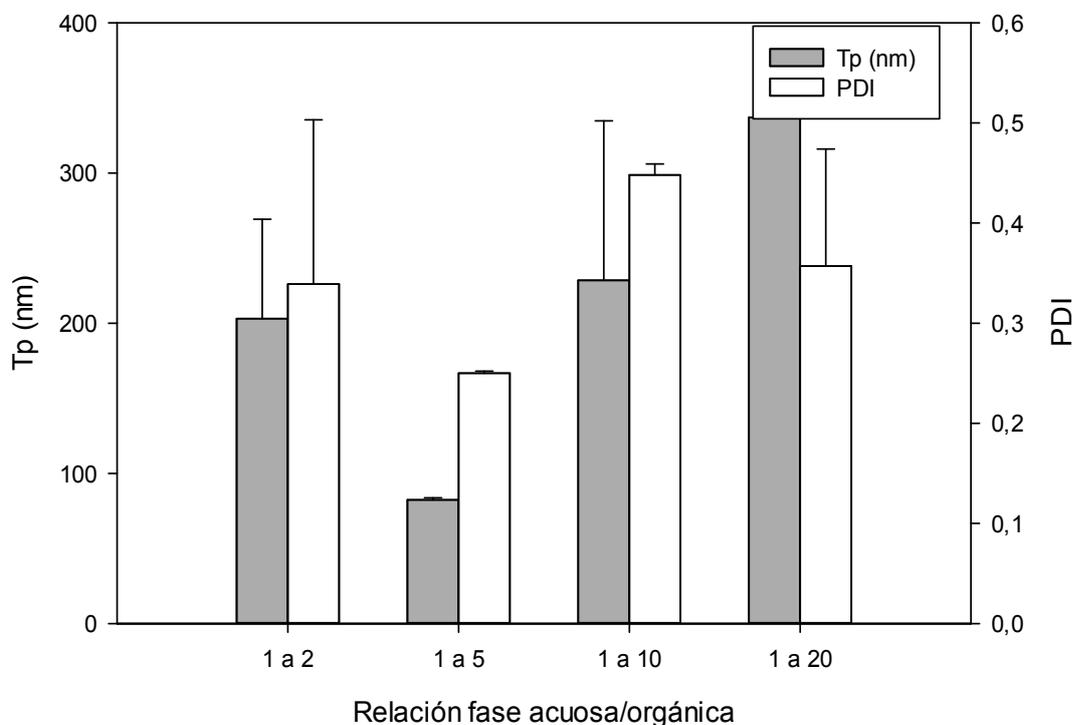


Figura 2-3 Efecto de la variación de la relación entre la fase orgánica y acuosa (O/A) sobre el tamaño de partícula (Tp) y el índice de polidispersidad (PDI) manteniendo constante un tiempo de ultrasonido de 30 s y un porcentaje de amplitud de 40%. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

*Resultados de ensayos empleando los mejores valores de las variables analizadas:* con el fin de corroborar los resultados encontrados se realizó un ensayo final con los mejores valores de cada una de las variables observadas. Para esto, se realizó un ensayo con un tiempo de sonicación de 60 segundos, ya que como estableció el análisis estadístico, tiempos superiores no disminuían considerablemente el tamaño de partícula y si representan mayores tiempos de agitación, lo que incrementaría los costos energéticos asociados a este proceso. Se eligió una relación entre la fase orgánica y acuosa (O/A) de 1 a 5 y se realizaron pruebas con porcentajes de amplitud de 20 y 60% ya que habían reportado menores tamaños de partículas y de acuerdo con el análisis estadístico no existía diferencia significativa entre las dos amplitudes. Para una amplitud del 20% se

obtuvieron partículas de tamaños de 99,3 +/- 5,1 con un índice de polidispersidad de 0,28 +/- 0,04; y para un porcentaje de amplitud del 60% se hallaron partículas de 114,8 +/- 20,5 con un índice de polidispersidad de 0,2 +/- 0,004. Ya que el índice de polidispersidad fue menor para una amplitud del 60% y los tamaños de partícula siguen siendo bajos (por debajo de 150 nm) y si se tiene en cuenta la desviación estándar son similares, se elige la amplitud del 60 % como el valor que representa la mejor condición para la amplitud entregada por el ultrasonido.

Finalmente se determinó la eficiencia de encapsulado, el potencial zeta y la carga específica a las partículas obtenidas con una relación O/A de 1 a 5, 60 s como tiempo de ultrasonido y un porcentaje de amplitud del 60%. Como resultados se obtuvieron nanopartículas de 82,25 nm con un índice de polidispersidad de 0,2 que encapsularon NAC en un porcentaje de 0,04% y una carga específica de 0,06% y un potencial zeta de -6,07 mV.

### 2.1.3 Discusión

Con una significancia del 5%, las tres variables observadas, afectan el tamaño de partícula; mientras que el índice de polidispersidad solo se ve afectado por el porcentaje de amplitud del ultrasonido. Lo que sugiere que esta última influye en la generación de partículas monodispersas.

Los resultados para el porcentaje de amplitud que se muestran en la Figura 2-1, se observa que para una amplitud del 10% se obtienen los mayores valores tanto para tamaño de partícula como índice de polidispersidad. Aunque para una amplitud de 40% se incrementaron un poco comparados con los valores encontrados para porcentajes del 20 y 60 %; este incremento se puede explicar si se tiene en cuenta que el valor del índice de polidispersidad es alto, lo que indica que existen partículas de tamaños diversos y por esto el equipo muestra los picos en los valores donde se encuentra la mayor cantidad, tal como se observa en la Figura 2-4 A, donde se observan dos picos de intensidad diferente, uno para partículas de 430 nm y el otro para 4315 nm. Vale la pena aclarar que el valor que se tuvo en cuenta para realizar el presente análisis fue el que reportó mayor porcentaje de intensidad, ya que para los ensayos con porcentajes de 10 y 40% se encontraron presencia de micropartículas en porcentajes inferiores al 7%. Teniendo en cuenta que el punto

obtenido para una amplitud del 40% puede tener implícito algún error, y al observar los restantes se puede afirmar que a medida que se incrementa el porcentaje de amplitud se obtienen tamaños de partícula e índices de polidispersidad bajos. Una posible explicación surge al analizar la manera como el ultrasonido forma la emulsión. Ya que al ser sumergido la punta del sonicador dentro del líquido éste empieza a vibrar y esto genera cavitación, provocando burbujas que colapsan de manera violenta y liberan gran cantidad de energía que hace que la fase orgánica se disgregue en gotas microscópicas que al hacer contacto con el líquido permiten que parte del solvente migre al agua y genere la formación del coloide que posteriormente al ser evaporado el resto del solvente da lugar a las partículas. Si la amplitud se incrementa, también lo hace la energía que se libera al líquido, de tal manera que se generan microgotas de tamaños menores.

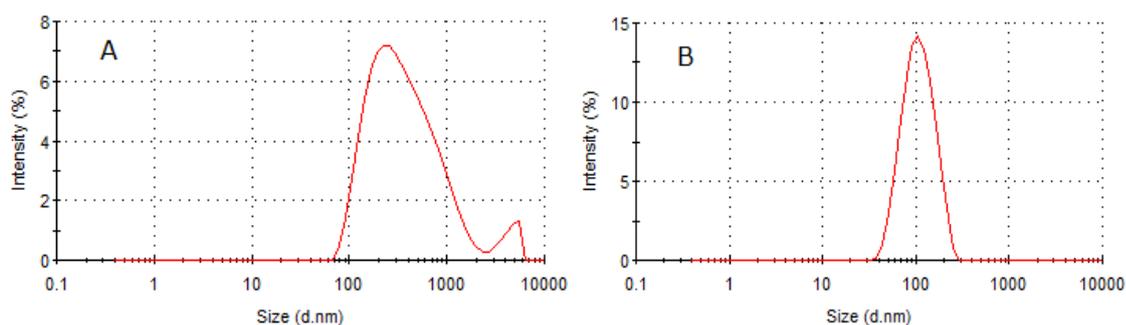


Figura 2-4 Resultados reportados por el equipo Zetasizer ZS para el tamaño de partícula con las siguientes condiciones: **A** ultrasonido empleando una amplitud de 10% durante 30 segundos con una relación O/A de 1 a 10. **B** ultrasonido empleando una amplitud de 40% durante 60 segundos con una relación O/A de 1 a 10.

El tiempo de ultrasonido afecta al tamaño de partícula, como se puede ver en la Figura 2-2, ya que al incrementarse el tiempo de sonicación, el tamaño de partícula disminuye, aunque a partir de los 60 s, la variación es mucho menor. Es probable que cuando el tiempo de sonicación es superior a un minuto la cantidad de energía que se libera al sistema, no puede disgregar de la misma forma en la fase orgánica, generando que no exista una diferencia apreciable en los tamaños de partícula e índice de polidispersidad. Estos resultados contrastan con los de Song y colaboradores quienes realizaron ensayos con tiempos más cortos, y encuentran que a partir de 30 s no hay disminución en el tamaño de

partícula, aunque ellos emplean como solvente una mezcla de acetona - diclorometano y esto podría explicar que el tiempo puede variar con el tipo de solvente empleado [124], [147], [151].

En cuanto a la relación entre las fases orgánica y acuosa, de acuerdo con la Figura 2-3, el valor que más favorece un tamaño de partícula bajo es la relación O/A de 1 a 5, ya que aunque la polidispersidad es de 0,25 es importante anotar que el tiempo de ultrasonido que se empleó para realizar estos experimentos fue de 30 s; de acuerdo con los resultados obtenidos, este tiempo es insuficiente para obtener partículas monodispersas y de tamaños pequeños. Song y colaboradores, encontraron que también en esta relación O/A de 1 a 5, correspondía al menor tamaño de partícula en sus ensayos [124], [151]. Relaciones mayores (1 a 10) muestran tamaños de partículas superiores con una polidispersidad alta, resultados similares fueron reportados por Budhian y colaboradores [152]. Esto se podría explicar si se tiene en cuenta que la viscosidad del sistema cambia de acuerdo a la relación entre la fase orgánica y acuosa. La viscosidad del acetato de etilo es de 0,41 cp (25 °C) y la del agua es de 1 cp (25 °C). Al encontrarse en mayor proporción el agua, la viscosidad tendería a subir y como la energía entregada por parte del ultrasonido es la misma, da como resultado que exista una disgregación de manera no uniforme, que se ve reflejada en partículas de diversidad de tamaños, incrementando el valor del índice de polidispersidad y obteniéndose partículas de tamaños superiores.

Adicionalmente, los resultados de las pruebas empleando los mejores valores de las variables estudiadas (amplitud del 60%, relación O/A de 1 a 5 y tiempo de ultrasonido de 60 s), mostraron que las partículas podían atrapar NAC. Aunque la eficiencia de encapsulado y la carga específica son muy bajas (0,03% y 0,04% respectivamente) valores similares han sido reportados para el atrapamiento de compuestos activos de carácter hidrófilo [130], [153], [154]; principalmente debido a que la NAC tiende a migrar hacia el agua, lo que hace que la eficiencia sea baja. En estudios posteriores se podrían examinar estrategias como cambiar el pH o saturar la fase acuosa con el fin de incrementar dicha eficiencia. Finalmente, el valor del potencial zeta mostró que las partículas poseen carga negativa, aunque su valor es bajo no se presentó agregación.

### **2.1.4 Conclusiones:**

La relación entre la fase orgánica y acuosa (relación O/A) de 1 a 5 fue la que generó partículas de menor tamaño y polidispersidad. En cuanto al porcentaje de amplitud empleado, se encontró que a mayor valor menor tamaño de partícula y polidispersidad. El tiempo mínimo para obtener partículas de tamaños pequeños fue de 1 minuto. Para las mejores condiciones se obtuvieron partículas de PLGA de tamaños menores a 300 nm lo que valida el método de emulsión y evaporación para la obtención de nanopartículas o partículas submicrónicas de PLGA.

En cuanto a las características de las nanopartículas obtenidas, se encontró que pueden atrapar NAC con una eficiencia y carga específica de 0,03%, y 0,04 respectivamente; con un potencial zeta de -6,07 mV.

## **2.2 Nanoprecipitación**

Este método consiste en disolver el compuesto activo (NAC) y polímero (PLGA) en un mismo solvente; dicha solución se pone en contacto con otro solvente (denominado no solvente) en el cual el polímero sea insoluble, pero que sea completamente miscible con el solvente, de tal manera que el solvente migre hacia el no solvente, provocando la precipitación del polímero en forma de nanopartículas en las cuales queda atrapado parte del compuesto activo [123]. Al igual que en el método de emulsión simple, la cantidad de compuesto activo que se puede atrapar se ve limitada tanto por la cantidad que se puede solubilizar en el solvente a emplear, como por la afinidad del compuesto activo por el no solvente, pues si ésta es alta, el compuesto activo puede migrar hacia el no solvente, disminuyendo la cantidad que se atrapa dentro de las nanopartículas [143]. Aunque esta metodología se emplea principalmente para compuestos activos liposolubles, también se encuentran casos exitosos, para atrapar compuestos hidrófilos [135].

### **2.2.1 Materiales y métodos**

*Materiales:* PLGA 50/50 Resomer RG 502 (peso molecular 7 – 17 kDa), N-acetilcisteína marca Sigma Aldrich, Pluronic F127 marca Bioreagent, agua destilada y desionizada, acetona grado analítico marca Merck.

*Producción de nanopartículas o partículas submicrónicas:* la fase orgánica estaba compuesta por acetona como solvente, PLGA (10 mg/mL) y NAC (1mg/mL). Se dejó un tiempo de disolución de mínimo 2 horas a temperatura ambiente. El no solvente se formó con agua y Pluronic® F127 1% p/v como tensoactivo. A continuación, se formó la suspensión de partículas adicionando lentamente la fase orgánica a la acuosa mientras se realizaba agitación con un magneto durante 10 minutos.

Para realizar una exploración rápida de la técnica y de algunas variables importantes en la misma, se empleó un diseño experimental al azar univariante mutinivel, donde se establecieron como factores:

- Tiempo de duración de la agitación: 10, 30 y 60 minutos. Dichos tiempos se establecieron de acuerdo a metodologías encontradas en la literatura. [155]–[159].
- Flujo de adición del solvente a la fase acuosa: se han reportado valores entre 0,15 y 10,6 mL/min, aunque algunos autores reportan que la adición se hace gota a gota [160]–[167] se emplearon valores dentro de este rango como 0,8, 1,2 y 6 mL/min.
- Velocidad de agitación del magneto: este dato no siempre es reportado en la literatura, algunas veces solo se dice que la agitación es suave [134], [163], [168]. Sin embargo también hay autores que reportan valores de agitación entre 375 hasta 1800 rpm [160], [161], [164], [169]. Por lo tanto se trabajaran valores dentro de este intervalo: 430, 870 y 1300 rpm.
- Uso de surfactantes: se evaluó si era necesario el uso de un tensoactivo como el Pluronic® F127, haciendo pruebas con y sin este. Se eligió este surfactante por ser ampliamente recomendado para sistemas de liberación [170].
- Separación del solvente por evaporación o no: la acetona es un solvente altamente volátil, se encontraron reportes donde la retiran una vez realizada la nanoprecipitación [156], [162], pero también existen reportes donde no se retira el solvente [144], [171]. Por esto se decidió estudiar la relevancia de este paso. Para ver el efecto de la evaporación sobre el tamaño de partícula se realizó un ensayo en el cual después de haber formado las nanopartículas o partículas submicrónicas se evapora la acetona sometiendo la muestra a presión reducida (13,7 kPa) durante 30 minutos a temperatura ambiente ( $\approx 22^{\circ}\text{C}$ ). Como control se realizó el mismo procedimiento omitiendo la evaporación.

Como variable respuesta se estableció el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad. Una vez establecidos los niveles de las variables observadas que permitieron obtener partículas de menor tamaño, se realizó un ensayo final al cual se le determinó el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad, la eficiencia de encapsulación (%) de NAC, la carga específica y el potencial zeta. Estos ensayos se realizaron solo en la parte final, ya que el objetivo de este trabajo fue determinar un protocolo para obtener partículas de PLGA de tamaños inferiores a 250 nm y que puedan atrapar NAC.

*Determinación de NAC:* Se realizó de acuerdo con la metodología del numeral 2.1.1.3.

*Determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta:* Se realizó de acuerdo con la metodología del numeral 2.1.1.4.

*Análisis estadístico:* Las pruebas fueron realizadas por duplicado. La desviación estándar aparece en medio de las barras en las figuras. Los datos fueron analizados empleando análisis de varianza en una vía y la comparación entre medias fue evaluada por medio de la prueba de diferencia media significativa (DLS) con un nivel de significancia de 0,05.

## **2.2.2 Resultados y discusión**

*Tiempo de agitación:* Como se puede ver en la Figura 2-5 existe una pequeña variación tanto en el tamaño de partícula, como en el índice de polidispersidad cuando se incrementa el tiempo de agitación, de tal manera que se obtuvo un valor inferior a 200 nm para un tiempo de agitación de 60 minutos. Sin embargo, el análisis estadístico de los datos ( $p < 0,05$ ) muestra que ninguna de las dos variables se ve afectada por el tiempo de agitación. Ya que las diferencias entre los valores obtenidos son muy bajas. Estos resultados son corroborados por otras investigaciones [161]. Esto sugiere que el mecanismo de formación de las partículas es muy rápido de tal manera que cuando entran en contacto el solvente con el no solvente se da la difusión de manera casi instantánea, dando lugar a la formación de las partículas. Por lo tanto se decide establecer como tiempo de agitación el valor de 10 minutos. Ya que tiempos menores reducirían los tiempos de producción de las partículas, minimizando costos y reduciendo el tiempo de contacto de la NAC con el agua.

Los valores ensayados para el tiempo de agitación se establecieron de acuerdo a protocolos reportados en la literatura para la fabricación de nanopartículas de PLGA. Los resultados muestran que no hay influencia del tiempo de agitación sobre el tamaño de partícula, lo que significa que una vez se pone en contacto el solvente con el no solvente o fase acuosa, se da la migración del solvente a la misma de una manera espontánea formando las partículas de manera casi instantánea y por esto no es posible ver una variación en el tamaño de la misma cuando se deja agitando por más de 10 minutos. Este tiempo ha sido reportado por varios autores [156], [158], [159]. Aunque también hay referencia que indican tiempos superiores[144], [155], [172].

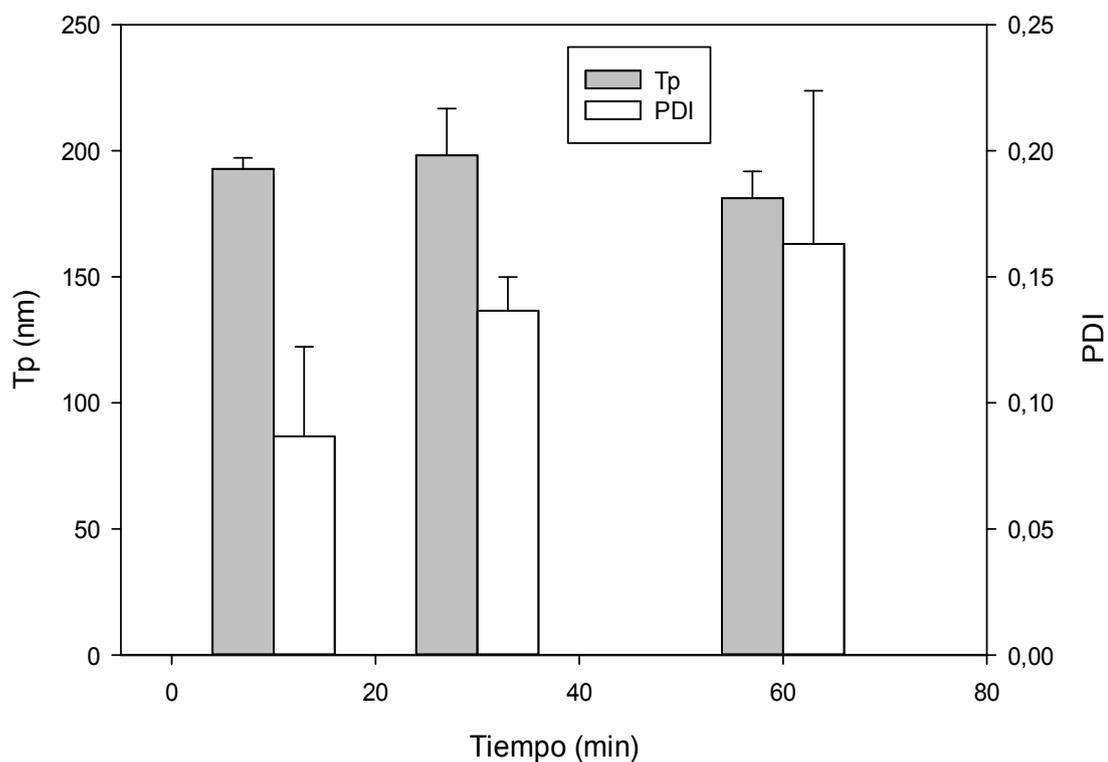


Figura 2-5 Efecto de la variación del tiempo de agitación sobre el tamaño de partícula (Tp) índice de polidispersidad (PDI) empleando acetona como solvente, Pluronic® F127 como tensoactivo, con una relación O/A de 1/10 y un flujo de adición del solvente de 1,5 mL/min.

*Flujo de adición del solvente a la fase acuosa:* La Figura 2-6 muestra que la adición del solvente a la fase acuosa no tiene efecto sobre el tamaño de partícula mientras que se observa un ligero incremento en el índice de polidispersidad. Aunque al realizar un análisis estadístico a los datos se encontró que ninguna de las dos variables tiene efecto significativo ( $p < 0,05$ ). Esto indicaría que sin importar la velocidad a la que se adicione el solvente, esto no altera el mecanismo de formación de las mismas, ya que se daría por la migración del solvente hacia el no solvente de una manera casi instantánea, formando las partículas. El efecto de la velocidad de adición del solvente al no solvente no es importante en las condiciones empleadas (empleando acetona como solvente y agua con Pluronic® F127 como no solvente). Como se busca estandarizar la técnica se usará un flujo de 1,5 mL/min que corresponde a un goteo moderado, empleando una jeringa para impulsar el fluido.

Al contrastar los resultados obtenidos con valores reportados en la literatura, se encontró que Mora y colaboradores llegan a resultados similares [161]. Otros investigadores no siempre reportan dicha variables en muchos de los protocolos revisados; casi siempre se dice que la fase orgánica se adiciona goteando [160]–[167]; solo algunas referencias reportan valores como: 0,5 mL/min [169], 2 mL/min [162], [173], 10 mL/min [160].

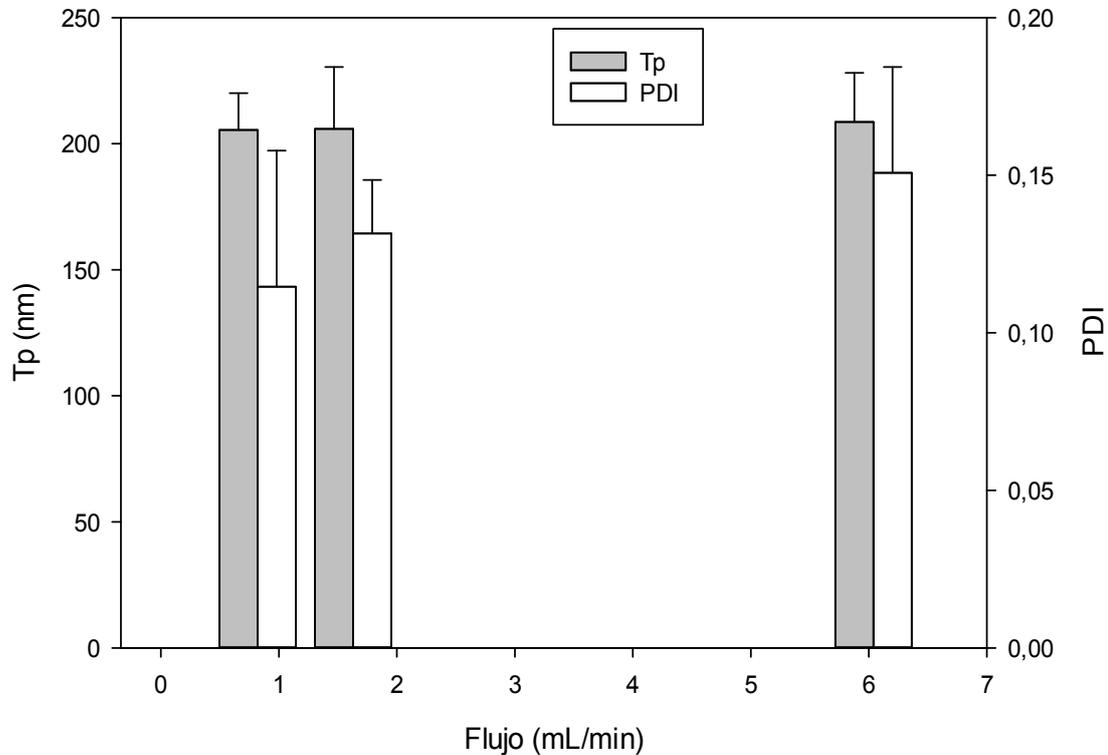


Figura 2-6 Efecto del flujo de adición de solvente a la fase acuosa sobre el tamaño de partícula ( $T_p$ ) y el índice de polidispersidad (PDI) empleando acetona como solvente, Pluronic® F127 como tensoactivo, con una relación O/A de 1/10, agitando durante 10 minutos.

*Velocidad de agitación:* como se observa en la Figura 2-7 el tamaño de partícula no se ve alterado por la velocidad a la cual se realice la agitación entre los valores empleados, aunque el índice de polidispersidad disminuye ligeramente al emplear la mayor agitación. Por lo tanto se establecerá una agitación baja (430 rpm), ya que esta consumiría menos energía, minimizando costos y daño a los reactivos al ser sometidos a altos esfuerzos.

Mora y colaboradores, realizan ensayos empleando dos velocidades de agitación (375 y 500 rpm) y para la relación O/A que se empleó en el presente trabajo encuentran que el tamaño de partícula disminuye ligeramente ( $\approx 10\%$ ) con 500 rpm. Nuestros resultados muestran una variación de casi 6%. Otros autores reportan velocidades de agitación de 400 rpm [162] 500 rpm [160], [174], 800 rpm [164] y 1800 rpm [169].

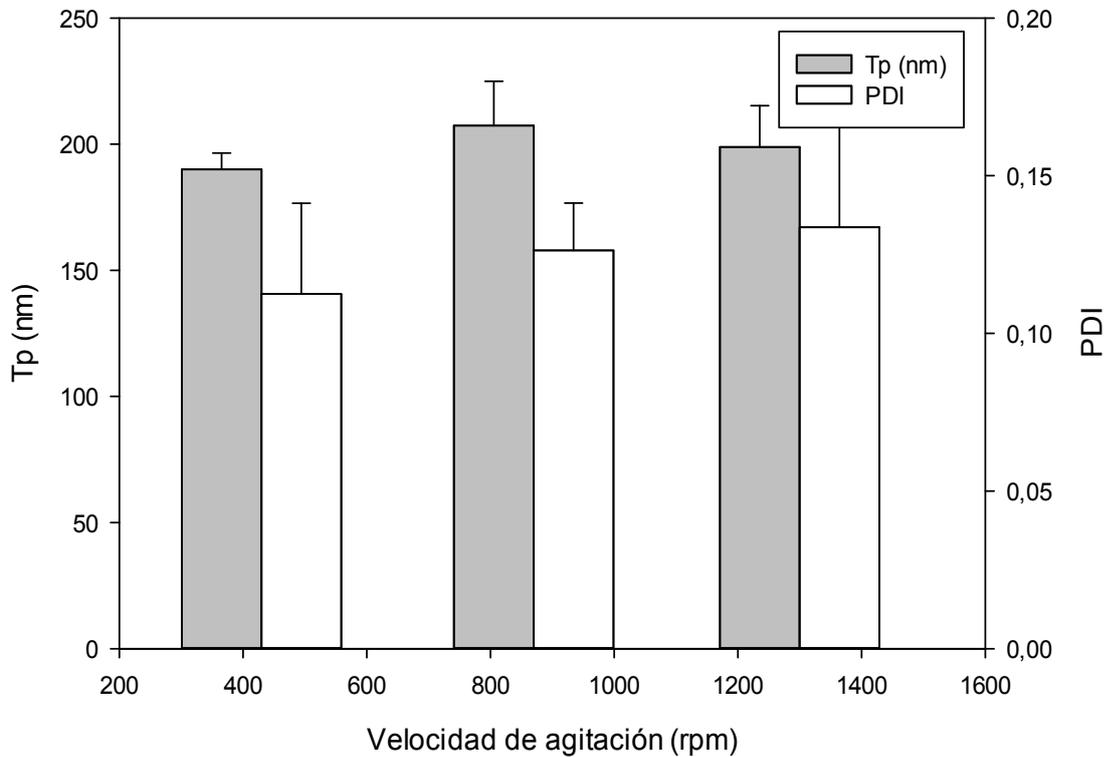


Figura 2-7 Efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula (Tp), índice de polidispersidad (PDI) empleando acetona como solvente, Pluronic® F127 como tensoactivo, con una relación O/A de 1/10 y un flujo de adición del solvente de 1,5 mL/min agitando durante 10 minutos.

*Surfactantes en la fase acuosa.* Los surfactantes son requeridos para estabilizar a las partículas y evitar que estas se agreguen. Estos le dan carga a la superficie del material para evitar que se agreguen y precipiten. Aunque existen gran cantidad de surfactantes, se seleccionó el Pluronic® F127, ya que es un material citocompatible, que no daña las células y puede llegar a incrementar el tiempo de circulación de partículas en el torrente sanguíneo [137], [170], [175]–[177]. Se realizaron pruebas evaluando el cambio en el tamaño de partícula con la presencia del surfactante y sin este. Los resultados se observan en la Tabla 2-1, donde estadísticamente no hay variación en el tamaño de partícula, pero sí se encontró presencia de micropartículas en las muestras que no tenían tensoactivo.

Por lo tanto se decide emplear Pluronic ®F127 al 1% (P/V); la concentración que se va a emplear está por encima de la concentración micelar crítica (0.26 %P/V) [175]

Tabla 2-1 Efecto del uso de Pluronic ®F127 sobre el tamaño de partícula (Tp) e índice de polidispersidad (PDI) empleando acetona como solvente, con una relación O/A de 1/10 y un flujo de adición del solvente de 1,5 mL/min agitando durante 10 minutos.

	Tp (nm)	PDI
Pluronic ® F127	208,5 +/- 13,3	0,12 +/- 0,02
Sin	201,4 +/- 30,8*	0,18 +/- 0,04

\*Presencia de micropartículas de 5000 nm

*Evaporación del solvente.* Los resultados muestran que no existe una diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ) en el tamaño de partícula al comparar la muestra evaporada con la que no. Esto probablemente porque la relación entre el volumen de agua y acetona era de 10 a 1, lo que permitía a la acetona difundirse completamente en el agua y abandonar el interior del polímero. Por lo tanto para próximos ensayos no se realizará el retiro del solvente por evaporación. Una vez formadas las partículas estas fueron separadas por centrifugación.

Tabla 2-2 Efecto de la evaporación en el tamaño de partícula e índice de polidispersidad (PDI) empleando acetona como solvente, con una relación O/A de 1/10 y un flujo de adición del solvente de 1,5 mL/min agitando durante 10 minutos.

	Tp (nm)	PDI
Evaporación	189.5 +/- 22.5	0.162 +/- 0.084
Sin evaporar	202.8 +/- 17.7	0.133 +/- 0.1

Una vez determinadas las mejores condiciones para obtener partículas de tamaños inferiores a 250 nm, se procedió a realizar el ensayo con las mejores condiciones encontradas: flujo lento (1,5 mL/min), 10 minutos de agitación lenta (430 rpm) y adición de Pluronic® F127 como tensoactivo. No se evaporó el solvente. Los resultados muestran un tamaño de partícula de 210 +/- 9 nm y una eficiencia de atrapamiento de  $0,97 \pm 0,2\%$  y la carga específica de  $0,15 \pm 0,05\%$ . Aunque el tamaño de partícula se encuentra dentro del tamaño que se desea (inferior a 250 nm) la cantidad de NAC que se atrapa es baja, por lo tanto se requiere mejorar este último.

### 2.2.3 Conclusiones:

Se estudiaron variables como el tiempo y velocidad de agitación, el flujo de adición de la fase orgánica a la acuosa, la presencia de tensoactivos y la separación por evaporación del solvente; como resultado se obtuvo que a excepción de la presencia tensoactivos, las otras no afectaban significativamente el tamaño de partícula. Lo que sugiere que el mecanismo de formación de las partículas por nanoprecipitación no se ve afectado significativamente por las variables antes mencionadas.

## 2.3 Comparación entre los métodos de emulsión simple, doble y nanoprecipitación

Una vez estandarizadas las condiciones de operación para las metodologías de emulsión simple y nanoprecipitación, se procedió a realizar modificaciones a algunos de los

materiales empleados en las mismas con el fin de incrementar la cantidad de NAC atrapada por las partículas. Dado que el método de doble emulsión ha sido empleado para el atrapamiento de moléculas hidrófilas, se implementó un protocolo reportado en la literatura [178] y se cambió el tipo de solvente con el fin de comparar el atrapamiento de NAC y con base en los resultados obtenido seleccionar una metodología para aplicar diferentes estrategias con el fin de aumentar el atrapamiento de NAC en las partículas obtenidas.

### 2.3.1 Materiales y Métodos

#### *Materiales*

PLGA 50/50 Resomer RG 502 (masa molar 7 – 17 kDa) terminado en éster, Pluronic F-127® Bioreagent, 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) y N-acetil-cisteína, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, Acetato de etilo R.A. marca Panreac; Acetona R.A., Acetato de metilo, y Diclorometano (DCM) marca Merck, FeCl<sub>3</sub>·6 H<sub>2</sub>O marca (Panreac) y HCl.

#### *Producción de nanopartículas o partículas submicrónicas*

Emulsión simple y evaporación: Se usó la metodología con las mejores condiciones encontradas en el numeral 2.2. A continuación se explica brevemente: la fase orgánica estaba compuesta por 0,5 mL de acetato de etilo o metilo como solvente, PLGA (10 mg/mL) y NAC (2 mg/mL). Se dejó un tiempo de disolución de mínimo 2 horas a temperatura ambiente y con agitación manual esporádica. El no solvente o fase acuosa se formó con 2,5 mL de agua y Pluronic® F127 1% p/v como tensoactivo. A continuación se formó la emulsión adicionando lentamente la fase orgánica a la acuosa mientras se realizaba ultrasonido durante 1 min 60% amplitud (Branson digital sonifier 450). Finalizado el tiempo del ultrasonido, se evaporó el solvente a presión reducida (13,7 kPa). Se realizaron ensayos cambiando el solvente (acetato de etilo y metilo) y enriqueciendo el no solvente con propilenglicol (1:1); es decir el no solvente se conformó por una mezcla de 1,25 mL de agua y 1,25 mL de propilenglicol. Se eligieron los acetatos de etilo y metilo como solventes ya que ambos pueden disolver a la NAC (anexo A), son clase 3 de acuerdo a la clasificación de la ICH (International Conference on Harmonisation) [179], es decir son solventes con

una baja toxicidad. Adicionalmente tienen temperaturas de ebullición de 77 °C (acetato de etilo) y 56,9 °C (acetato de metilo), que están por debajo de los valores del agua, de manera que se pueden separar por evaporación. Se eligió el propilenglicol para que al combinarse con el agua se incrementara la viscosidad del no solvente y así disminuir la difusión de la NAC hacia el no solvente.

Doble emulsión: se empleó la metodología desarrollada por Tewes y colaboradores [178]. Se formó la primera emulsión mezclando 200 µL de una solución de agua y NAC (80 mg/mL) con 2 mL de una solución de PLGA (10 mg/mL) disuelto en diclorometano o acetato de etilo empleando ultrasonido durante 1 min 60% amplitud (Branson digital sonifier 450). El producto de la primera emulsión se mezcló con 4 mL de agua con Pluronic® F127 (1% p/v) por medio de ultrasonido en las mismas condiciones de la primera emulsión. A continuación el solvente se retira por evaporación a presión reducida (74,5 kPa) en el caso del acetato de etilo y con un rotavaporador para el caso del diclorometano. Este último se emplea ya que tiene una temperatura de ebullición baja (40°C) lo que hace que se pueda separar fácilmente por evaporación.

Nanoprecipitación: se disolvieron 10 mg de PLGA y 2 mg de NAC en 1 mL de acetona. Se dejó un tiempo de disolución de mínimo 2 horas a temperatura ambiente (~22°C). A continuación dicha solución se adicionó gota a gota (1,5 mL/min) a 10 mL de una solución acuosa de Pluronic® F-127 (1% p/v) agitada magnéticamente (430 rpm); la suspensión resultante se mantuvo en agitación durante 10 minutos. Se realizaron ensayos enriqueciendo el agua con propilenglicol (50/50 v/v).

Todas las pruebas se realizaron al menos por duplicado. Una vez se producen las partículas se evalúa el tamaño de partícula y la cantidad de NAC atrapada.

*Determinación de NAC:* Se realizó de acuerdo con la metodología del numeral 2.1.1.3.

*Determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta:* Se realizó de acuerdo con la metodología del numeral 2.1.1.4.

## 2.3.2 Resultados y discusión

### Emulsión simple y evaporación

Los resultados (Tabla 2-3) muestran que cuando se emplea agua como no-solvente, los tamaños de partícula son más pequeños que cuando se usa agua + propilenglicol, aunque existe una diferencia marcada entre los dos solventes empleados; ésta se atribuye a la miscibilidad parcial del agua en los solventes; que permite que en el momento de formar la emulsión una cierta cantidad de moléculas de agua se difundan hacia el interior de las pequeñas gotas de solución de acetato y PLGA. En el momento de evaporar el solvente, algunas de estas moléculas de agua permanecen al interior de la partícula, causando un incremento del tamaño de la misma debido a la repulsión entre el agua y el polímero hidrofóbico. Como el agua es más soluble en el acetato de metilo (8,8% p/p) que en el de etilo (3,3 % p/p), es de esperar que más agua esté presente en las partículas y por ello el tamaño de partícula es mayor en el acetato de metilo. El mismo efecto se observa cuando se enriquece el agua con propilenglicol (817 vs 745 nm), aunque el tamaño de partícula para este no-solvente es muchísimo mayor que para agua como no-sovente. Este último efecto se atribuye al incremento en la viscosidad de la fase continua por la presencia del propilenglicol ( $\mu= 48,6$  cp), lo que generaría mayor resistencia para que la fase orgánica sea dispersada en la acuosa, incrementado tanto el tamaño promedio de las gotas como la polidispersidad de las mismas. Resulta interesante notar que la polidispersidad del tamaño de partícula para el acetato de metilo es en cada caso mayor que para el acetato de etilo; tal polidispersidad es el resultado de la presencia de un pequeño grupo de partículas con diámetros superiores al promedio, probablemente causadas por una agregación de partículas de menor diámetro. La mayor agregación con acetato de metilo puede deberse a algún efecto de la tensión interfacial entre el acetato de metilo, el agua, el PLGA y el tensoactivo (Pluronic F127) que no fue investigado con mayor profundidad, pero que se ve exacerbado por la presencia del propilenglicol.

La eficiencia de atrapamiento de NAC es 13 veces mayor en acetato de metilo que en acetato de etilo cuando la fase acuosa es agua. Cuando se agrega el propilenglicol, la tendencia se invierte, atrapándose más NAC en las partículas fabricadas con acetato de etilo. La razón de este comportamiento no es clara. Si, como se propuso anteriormente,

hay más agua al interior de la partícula con acetato de metilo, podría verse favorecida la migración de la NAC (soluble en agua) hacia el medio externo durante el proceso de fabricación de la emulsión, de la evaporación y de la centrifugación; sin embargo, el mecanismo debe ser mucho más complejo puesto que la difusión de NAC hacia el no solvente es más rápida en partículas pequeñas. El mismo comportamiento se observa para la carga específica de NAC.

Tabla 2-3 Método de emulsión simple y evaporación con diferentes solventes para la fase orgánica y enriqueciendo la fase acuosa con propilenglicol.

Fase acuosa	Solvente (Fase orgánica)	Tp (nm)	PDI	Eficiencia (%P/P)	Carga específica (%P/P)
Agua ( $\mu= 1,13$ cP)	A. etilo	72,3 $\pm$ 3,1	0,13 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,02
	A. metilo	180,5 $\pm$ 2,2	0,18 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,27	0,4 $\pm$ 0,1
Agua+Propilenglicol ( $\mu= 6,12$ cP)	A. etilo	744,6 $\pm$ 144,2	0,16 $\pm$ 0,05	3,5 $\pm$ 1,8	0,82 $\pm$ 0,42
	A. metilo	817,9 $\pm$ 118,9	0,29 $\pm$ 0,4	1,37 $\pm$ 0,19	0,31 $\pm$ 0,04

En cualquiera de los casos, la cantidad de NAC atrapada (carga específica) por el método de emulsión es extremadamente pequeña, lo que motivó la búsqueda de métodos alternativos para aumentar dicho atrapamiento.

## Doble emulsión

Se realizaron dos ensayos cambiando la naturaleza del solvente; se empleó acetato de etilo, solvente parcialmente miscible con el agua, y diclorometano (DCM) que es prácticamente insoluble en el agua (1,6 % p/p). Los resultados (Tabla 2-4) muestran que al emplear acetato de etilo se obtienen partículas de menor tamaño, con muy pequeña dispersión y que atrapan NAC en mayor proporción (~ 10 veces) que cuando se usa la misma fase acuosa y el mismo solvente en el método de emulsión simple. Los resultados encontrados con el diclorometano muestran partículas cuyo tamaño promedio estaría por

encima del tamaño deseado y con una elevada polidispersión. Para disminuir tanto el tamaño como la polidispersidad, se podría trabajar en modificar la relación volumétrica entre la primera y segunda emulsión (probablemente aumentando la cantidad de agua adicionada en la segunda emulsión) y en evaluar el efecto de la adición de un surfactante a la primera emulsión con el fin de mejorar su estabilidad y, como consecuencia, incrementar el la eficiencia de retención de NAC.

El atrapamiento de NAC cuando se emplea DCM es muy bajo comparado con los valores encontrados para el acetato de etilo, a pesar de que se obtuvieron partículas de mayor tamaño. Este podría ser un indicio de que las partículas submicrónicas formadas podrían ser altamente porosas y por lo tanto la NAC migraría fácilmente hacia la fase acuosa cuando se realiza la segunda emulsión.

Tabla 2-4 Método de doble emulsión empleando diferentes solventes

Solvente	Tp (nm)	PDI	Eficiencia (%P/P)	Carga específica (%P/P)
A. Etilo	77,2 +/- 2,2	0,13 +/- 0,01	0,4 +/- 0,1	0,31 +/- 0,10
DCM	275,7 +/- 19,2	0,36 +/-0,08	0,09 +/- 0,02	0,07 +/- 0,01

## Nanoprecipitación

Aunque este método tradicionalmente se ha empleado para atrapar moléculas hidrófobas [180]–[183], se decidió implementarlo ya que la acetona puede solubilizar a la NAC. Se realizaron pruebas variando la fase acuosa comparando los tratamientos cuando se adiciona agua y una solución de agua y propilenglicol (1:1), tal como se realizó con el método de emulsión simple y evaporación. Los resultados, presentados en la Tabla 2-5, muestran que al enriquecer la fase acuosa con propilenglicol la polidispersidad disminuye ligeramente, mientras que el tamaño de partícula se incrementa levemente (10%). Sin embargo, análisis estadísticos ( $p < 0,05$ ) muestran que el índice de polidispersidad no cambia. Esto es probablemente debido a que el mecanismo de formación de las nanopartículas se da por migración del solvente de la fase orgánica hacia la acuosa (en la cual es soluble), lo que ocasiona que el polímero se torne insoluble; al enriquecer el agua

con propilenglicol, que también es un solvente polar y completamente miscible con la acetona, el mecanismo de formación no se ve alterado, presentándose resultados similares. De hecho, la solubilidad de la NAC en agua y en agua con propilenglicol no cambia apreciablemente (anexo 1). En cuanto a la cantidad de NAC retenida, se observa un incremento importante con la adición de propilenglicol; se propone que al aumentarse la viscosidad del medio, la difusión de la NAC desde la solución de acetona y polímero hacia el medio acuoso se ve reducida, por lo que la migración de NAC desde la solución de polímero y solvente es menor y por ello el atrapamiento se incrementa.

Tabla 2-5 Variación del tamaño de partícula y atrapamiento de NAC empleando el método de nanoprecipitación, usando acetona como solvente.

Fase acuosa	Tp (nm)	PDI	Eficiencia (%P/P)	Carga específica (%P/P)
Agua ( $\mu= 1,13$ cP)	210 +/- 9	0,2 $\pm$ 0,04	0,97 $\pm$ 0,2	0,15 $\pm$ 0,05
Agua - propilenglicol	233,3 $\pm$ 1,2	0,16 $\pm$ 0,01	4,01 $\pm$ 0,3	0,46 $\pm$ 0,03

Aunque el cambio de la fase acuosa permitió un incremento importante del atrapamiento, los valores obtenidos siguen siendo pequeños para considerarlos como parte de un tratamiento médico contra la osteoporosis. A manera de ilustración y con el fin de determinar la cantidad de partículas necesarias para tener efecto terapéutico en un posible caso de osteoporosis, si la dosis empleada por Sander y colaboradores en mujeres posmenopáusicas que no tuvo efectividad fue de 2 g/día [20], y la biodisponibilidad de la NAC es del 6%, eso quiere decir que en el torrente sanguíneo quedarían 120 mg, si se sube la dosis para que tenga efecto a por ejemplo, 150 mg y se usa una carga específica de 0,46 (valor más alto que se encuentra dentro del tamaño deseado) se requerirían 36,6 g de partículas de PLGA, cantidad que si se quiere suministrar por vía intravenosa es muy grande y los costos de la misma serían altos. Adicionalmente se tendrían que descomponer dentro del cuerpo.

En cuanto a las metodologías examinadas, la tabla 2-5 muestra que el porcentaje de atrapamiento y la carga específica de NAC para el método de nanoprecipitación son similares a los del método de emulsión simple (Tabla 2-3); sin embargo, desde el punto de vista operativo y energético, la fabricación de partículas por el método de nanoprecipitación es mucho mejor; ya que el uso de ultrasonido genera altos esfuerzos cortantes que pueden llegar a dañar al polímero o al compuesto activo y adicionalmente puede llegar a tener altos costos energéticos no solo asociados a la agitación si no a la evaporación del solvente. Por lo tanto, se elige el método de nanoprecipitación para explorar otras estrategias para reducir las pérdidas de NAC mediante una interpretación juiciosa de los fenómenos de transporte que suceden durante la formación de las partículas.

### 2.3.3 Conclusiones

En esta investigación se exploraron tres diferentes metodologías para formar nanopartículas o partículas submicrónicas de PLGA: emulsión simple, doble y nanoprecipitación; con las tres metodologías se encontraron partículas que atrapaban NAC en mayor o menor proporción. El acetato de etilo, por emulsión simple, mostró ser el solvente que permitió obtener nanopartículas de menor tamaño (72 nm) pero con atrapamiento bajo (eficiencia de 0,03% y carga específica de 0,04%). Al variar la fase acuosa con polietilenglicol se logró un atrapamiento del 3,5% de la NAC agregada y carga específica de 0,8% p/p pero el tamaño de las partículas se incrementó por fuera del intervalo deseado. El método de nanoprecipitación empleando acetona como solvente y adicionando propilenglicol a la fase acuosa permite obtener partículas submicrónicas con los tamaños deseados (~250 nm) y atrapamiento y carga específica comparables a los de emulsión simple, con la ventaja de que el consumo energético es mínimo y con mayor facilidad operativa. El método de doble emulsión, a pesar de ser recomendado para moléculas hidrófilas, mostró pobres resultados en términos de atrapamiento de NAC y carga específica..



### **3. Estrategias para incrementar el atrapamiento de N-acetilcisteína en partículas de PLGA, empleando el método de nanoprecipitación**

En el capítulo anterior se compararon los métodos de emulsión simple, doble y nanoprecipitación y se seleccionó el método de nanoprecipitación, por ser más sencillo, económico, fácilmente escalable y proporcionar nanopartículas por debajo de los 250 nm, con índice de polidispersidad bajos. A continuación, se presenta un estudio en el que con base en fundamentos teóricos se buscó modificar la técnica de nanoprecipitación para mejorar la eficiencia de atrapamiento y carga específica.

El método de nanoprecipitación fue descrito en el numeral 1.5.2 y la Figura 3-1 se muestra un breve esquema que lo explica. Como ya se mencionó anteriormente, la desventaja de este método es que para compuestos hidrófilos se pueden presentar un bajo atrapamiento ya que el compuesto activo puede migrar junto con el solvente hacia el agua [143]. Varios investigadores han planteado una serie de modificaciones para incrementar el atrapamiento de compuestos hidrófilos. La primera de las estrategias planteada ha sido cambiar el no solvente que normalmente es agua por otro no solvente en el cual sea menos soluble el compuesto activo; entre los no solventes reportados están: caprilato y triglicérido de caprilato [132], aceite de semilla de algodón [135], [136], metanol, etanol e isopropanol [134]. Otra estrategia ha sido modificar el compuesto activo para hacerlo más hidrófobo; Tewes y colaboradores usan un pH alcalino para hacer a la doxorubicina más hidrófoba [178], Govender y colaboradores reportan algo similar para procaina clorhidrato [130], Peltonen y colaboradores acidifican el pH del cromoglicato de sodio e incrementan la eficiencia de atrapamiento hasta un 70 % [154]. Song y colaboradores no solo prueban con el cambio del pH si no que ensayan polímeros de diferentes pesos moleculares, varían la

relación entre la fase orgánica y la acuosa, la concentración de polímero, surfactante y compuesto activo[124], [151].

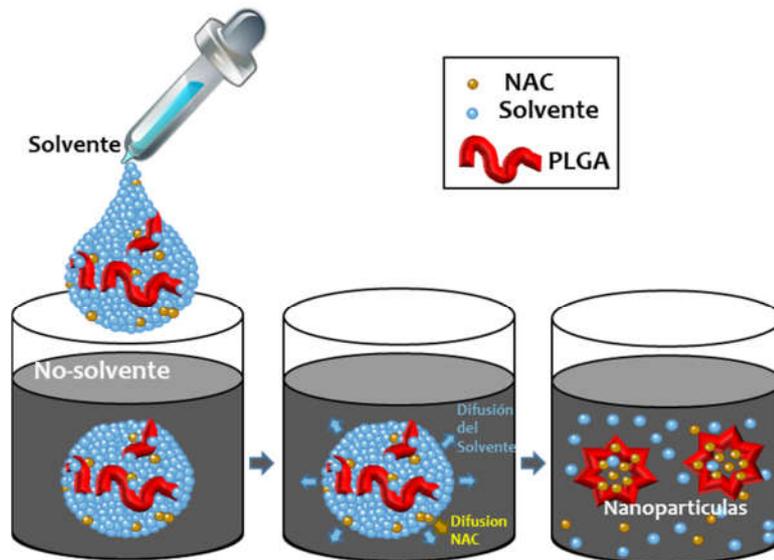


Figura 3-1 Producción de nanopartículas o partículas submicrónicas de PLGA por el método de nanoprecipitación

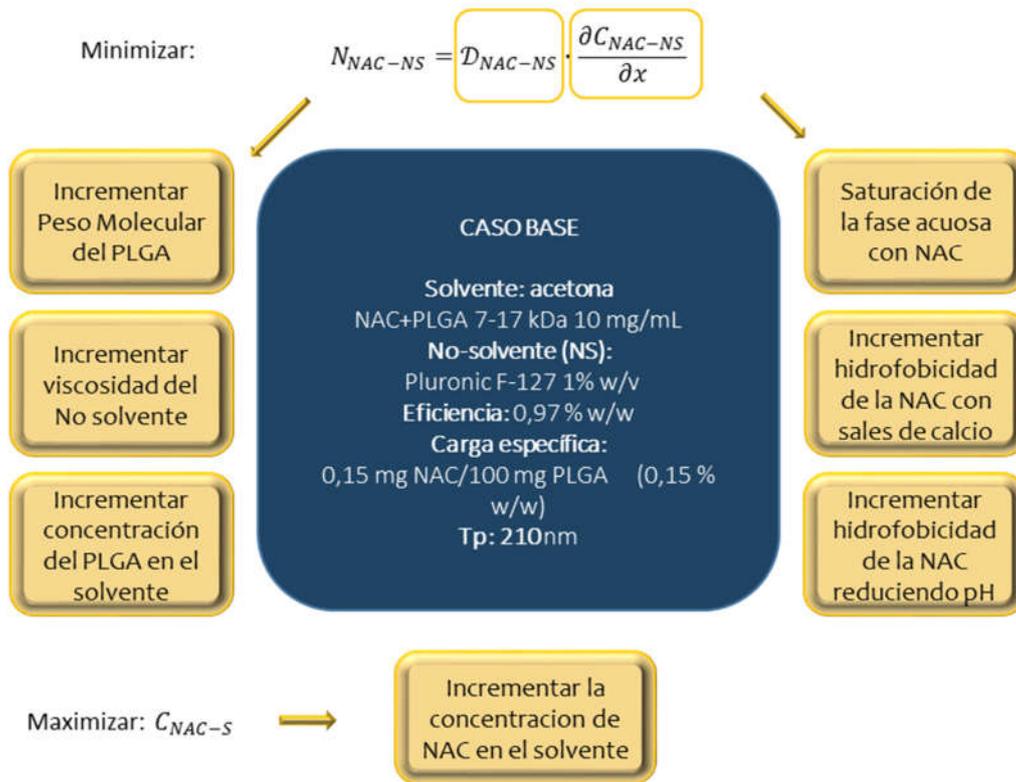


Figura 3-2 Estrategias para incrementar la cantidad de NAC atrapada

En la Figura 3-2 se muestran las estrategias que se implementaron para incrementar el atrapamiento de NAC. Como se puede ver se parte de la ley de Fick para el transporte del compuesto activo entre las partículas formadas y el no solvente. Dicha ley dice que el flujo de transporte difusivo de un compuesto que atraviesa una superficie ( $N_{NAC-NS}$ ) es directamente proporcional al gradiente de concentración, que para este caso, es la diferencia de concentración entre el interior de la partícula y el no solvente ( $\frac{\partial C_{NAC-NS}}{\partial x}$ ). El coeficiente de proporcionalidad es la difusividad  $D_{NAC-NS}$ . Aunque no es objeto de la presente investigación el cálculo de la difusividad, si es importante conocer las variables implicadas en la determinación de la misma. Existen varios modelos para estimarla, la ecuación 1 es el modelo desarrollado por Stokes y Einstein:

$$D_{NAC-NS} = \frac{K T}{6 \pi \mu r} \quad \text{Ecuación 1}$$

K: es la constante de Boltzmann

T: es la temperatura.

$\mu$ : es la viscosidad del no solvente

$r$ : es el radio de la NAC (asumiendo que tiene el tamaño de una esfera)

Como se puede ver la difusividad varía con la temperatura, que para este caso permaneció constante, ya que todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente y es inversamente proporcional a la viscosidad del no solvente.

Todas las estrategias que se plantearon se pueden agrupar en dos grandes grupos uno que busque bajar el valor de la difusividad del compuesto activo hacia el no solvente y el segundo que disminuya el gradiente de concentración de NAC entre las partículas formadas y el no solvente. A continuación, se explican:

- Solvente – no solvente: Con esta estrategia se busca disminuir las pérdidas de NAC por migración hacia el agua que es el no solvente más comúnmente empleado. Se tuvo en cuenta que la NAC fuera prácticamente insoluble en los no solventes seleccionados (anexo A). Para esto se realizaron ensayos con diferentes parejas (solvente – no solvente) teniendo en cuenta, la miscibilidad entre los dos y que el valor de las constantes dieléctricas no varíe mucho, ya que si la diferencia es alta, puede existir agregación en el sistema [134].
- Viscosidad del no solvente: la difusividad se ve afectada por la viscosidad del no solvente, se incrementó la viscosidad de este para disminuir la difusividad de la NAC hacia el no solvente. Para esto se formó una solución de propilenglicol – agua (1:1 v/v). El propilenglicol es un solvente en el que no es soluble la NAC y tiene una viscosidad alta (48,6 cP). Con esta mezcla de solventes se buscó no solo incrementar la viscosidad del no solvente, también alterar la solubilidad del compuesto activo en el no solvente.
- Concentración de PLGA: diferentes investigaciones han reportado que el incremento de la concentración del polímero en el solvente, aumenta la cantidad de compuesto activo atrapado y el tamaño de partícula [152], [161], [184]. Aunque no es claro el mecanismo, se podría suponer que al existir mayor cantidad de polímero, se incrementa la viscosidad de la solución de polímero - solvente, por lo tanto puede existir mayor dificultad para que el solvente migre hacia el no solvente, incrementándose el tamaño de partícula, la densidad de la misma y generándose poros más pequeños de manera que el transporte desde el interior hacia el exterior

sería más complejo, lo que traería como consecuencia una disminución en la difusividad del compuesto activo y un incremento en la cantidad atrapada.

- **Peso molecular de polímero:** se ha encontrado que esta variable puede afectar tanto la eficiencia de atrapamiento del compuesto activo como la velocidad de liberación del mismo [137], [152]. Mittal y colaboradores reportan que la velocidad de liberación del compuesto activo disminuye a medida que se incrementa el peso molecular del polímero [182]. Las razones por las que se da pueden ser similares a las explicadas para el incremento de la concentración, ya que cuando se incrementa el peso molecular, también lo hace la viscosidad.
- **pH de la fase acuosa:** Existen antecedentes [124], [130], [151], [154], [178], [185] que muestran que al cambiar el pH de algunos principios activos, éstos se pueden volver más hidrófobos. La NAC se protona, dependiendo del pH en el cual se encuentre (Figura 3-3); se ha reportado que la forma más hidrófoba se encuentra a pH inferiores a 3,3 [186]. De acuerdo con esto se realizaron pruebas variando el pH de la fase acuosa empleando los valores de 2,4 y 7,2. De acuerdo con esto, se espera que a pH de 2,4 se atrape mayor cantidad que a pH 7,2. No se realizan pruebas a pH alcalino, ya que el compuesto es inestable a dichos valores [187].

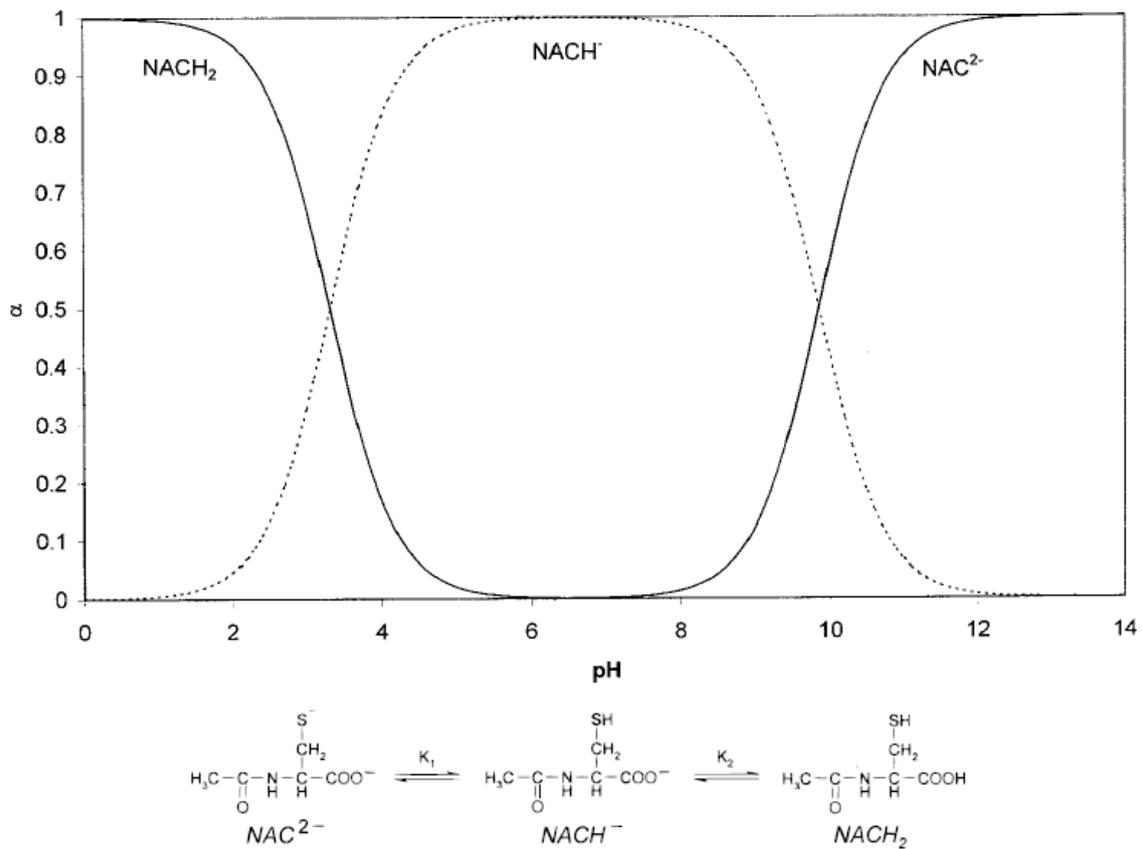


Figura 3-3 Distribución de las diferentes formas protonadas de la N acetilcisteína, (NAC<sup>2-</sup>, NACH<sup>-</sup>, y NACH<sub>2</sub>) como función del pH [186]

- Formación de sales de NAC con calcio: Se ha reportado que la neutralización de la NAC con hidróxido de calcio, hace la molécula más hidrófoba [119]. De esta manera se disminuye la afinidad del compuesto por el agua.
- Relación entre la fase orgánica y acuosa (O/A): el no solvente más usado es el agua. Se quiere investigar si la cantidad de agua presente en la fase acuosa puede influenciar tanto el tamaño de partícula como el atrapamiento, pues si la relación es alta (1/10) el gradiente de concentración de NAC entre el interior de las partículas y el exterior (no solvente) se hace mayor y por lo tanto se incrementa la migración de NAC.
- Solvente o fase orgánica: el método de nanoprecipitación requiere que la NAC sea soluble en el mismo solvente que el polímero. La cantidad disponible de NAC para

el atrapamiento en las partículas, se ve limitada por su solubilidad en solvente. Por ello, se decidió realizar pruebas con dos solventes y una mezcla (1:1 v/v) de los dos: acetona y DMSO ya que este último puede solubilizar a la NAC en proporciones aún mayores que el agua (100 mg/mL).

- Concentración de NAC en la fase orgánica: se emplearon diferentes concentraciones de NAC de acuerdo con la capacidad del solvente para solubilizarla. Se emplearon como solventes acetona y DMSO.
- Adición de NAC al solvente y al no solvente: ya que parte de la NAC puede migrar a la fase acuosa, se propone enriquecer la fase acuosa con NAC con el fin de disminuir el gradiente de concentración y así incrementar la cantidad de NAC que se atrapa al interior de las partículas.

## 3.1 Materiales y Métodos

### *Materiales*

*Fabricación de partículas:* PLGA 50/50 Resomer RG 502 (masa molar 7 – 17 kDa) RG 504 (masa molar 38-54 kDa) y RG 505 (masa molar 54-69 kDa) terminados en éster marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

*Tensoactivos:* Stepan-Mild L3 ®, Bio-Soft N1-7® y Makon NF-5 ® fueron adquiridos de Stepan (Stepan Company, Northfield, Illinois, USA) y Pluronic F-127® Bioreagent fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

*Solventes:* Dimetilsulfóxido R.A. (DMSO) y Acetato de etilo R.A. marca Panreac (Panreac Applichem, Barcelona, España); Acetona y Acetato de metilo R.A. marca Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

*No-solventes:* Agua tipo II, n-butanol, 2-butanol, n-heptano, acetato de amilo, propilenglicol USP (Dow), Neobee® 1053 de Stepan (Stepan Company, Northfield, Illinois, USA).

*Manejo y cuantificación de N-Acetil-cisteína:* 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), FeCl<sub>3</sub>·6 H<sub>2</sub>O marca (Merck ) y marca Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA), Diclorometano R.A. marca (Merck). Buffer acetato, HCl (J Beacker)

*Producción de nanopartículas o partículas submicrónicas*

La formación de partículas se realizó empleando el método de nanoprecipitación usando acetona como solvente y agua como no solvente. Se disolvió 10 mg de PLGA y 2 mg de NAC en 1 mL de acetona en un vial de vidrio, el cual se cerró inmediatamente después de agregar los reactivos. El vial se dejó un tiempo de disolución de mínimo 2 horas a temperatura ambiente ( $\sim 22^{\circ}\text{C}$ ) con agitación esporádica por inversión manual del mismo. A continuación, dicha solución se adicionó gota a gota (1,5 mL/min) a 10 mL de una solución acuosa de Pluronic® F-127 1% (p/v), agitada magnéticamente; la suspensión resultante se mantuvo en agitación durante 10 minutos, tiempo suficiente para que el solvente migrase hacia el agua, formando las partículas. A las condiciones anteriores se le llama caso base, ya que a partir de dichas condiciones se realizaron una serie de modificaciones con el fin de incrementar la cantidad de NAC atrapada por las partículas.

La Figura 3-2 ilustra la estrategia empleada. Allí se puede ver que se busca minimizar la tanto difusión del compuesto hacia el no solvente, como el gradiente de concentración de NAC entre el solvente y no solvente. Así las variables que se investigaron fueron:

- Solvente – no solvente: La Tabla 3-1 muestra las diferentes parejas exploradas y el surfactante empleado. Se eligieron surfactantes no iónicos de tipo farmacéutico para evitar que pudieran reaccionar con la NAC. Todos los solventes y no solventes empleados son de baja toxicidad.
- Viscosidad del no solvente: se adicionó propilenglicol (solvente en el que no es soluble la NAC) al agua (1:1) con el fin de incrementar la viscosidad.
- pH de la fase acuosa: se realizaron pruebas variando el pH de la fase acuosa empleando los valores de 2,4 y 7,2.
- Relación entre la fase orgánica y acuosa (O/A): se emplearon los valores de 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 y 1/10. Dichos valores fueron empleados por diferentes investigadores [144], [151], [188].
- Concentración de NAC en la fase orgánica: se emplearon diferentes concentraciones de NAC de acuerdo a la capacidad del solvente para solubilizarla. Para acetona 5, 10 y 27 mg/mL y para DMSO 2, 25, 50 80 y 100 mg/mL.
- Adición de NAC al solvente y al no solvente: se realizó empleando acetona y DMSO (1:1 v/v) como solventes y se adicionó NAC (80 mg/mL) a la fase acuosa.

- Solvente o fase orgánica: se empleó acetona, DMSO y una solución (1:1 v/v) de los dos.
- Formación de sales de NAC con calcio: Esto se evaluó con dos métodos: adicionando la sal cálcica de N acetilcisteína (NAC-Ca) al solvente o agregando cloruro de calcio (1 mol de  $\text{CaCl}_2$  por 2 de NAC) al no solvente (agua). Las sales de calcio se prepararon llevando a pH 6 una solución de NAC en agua (90 mg/mL), neutralizando con hidróxido de calcio (0,165 % p/v) y se liofilizó (Temperatura de -47 °C y presión de 0,1 mBar durante 32 h). La muestra liofilizada se adicionó al solvente (acetona-DMSO 1:1 v/v) junto con el PLGA para realizar la nanoprecipitación. Fue necesario emplear esta mezcla de solventes, ya que la acetona no podía solubilizar a la sal cálcica de N acetilcisteína.
- Concentración de PLGA: aunque se han reportado valores desde 5 hasta 100 mg/mL [134], [144], [152], [153], [157], [173], [189], [190], se emplearon concentraciones de 10 y 20 mg/mL, ya que valores superiores pueden incrementar el tamaño de partícula.
- Peso molecular de polímero: Se emplearon polímeros de PLGA (50:50) con pesos moleculares de 7 -17 kDa, 38-54 kDa y 54-69 kDa.

Una vez se establecieron los niveles de las variables manipuladas que permitieron obtener partículas de menor tamaño, se realizó un ensayo final al cual se le determinó el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad, la eficiencia de encapsulación, la carga específica y el potencial zeta

*Análisis estadístico:* Todas las pruebas se realizaron al menos por duplicado. Los datos fueron analizados empleando análisis de varianza en una vía con un nivel de significancia de 0,05.

*Determinación de NAC:* Se realizó de acuerdo a la metodología del numeral 2.1.1.3.

*Determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta:* Se realizó de acuerdo con la metodología del numeral 2.1.1.4.

## 3.2 Resultados y discusión

Se realizó un primer ensayo con las condiciones especificadas en la metodología para el caso base. Se obtuvieron partículas submicrónicas con un diámetro promedio de 210 +/- 9

---

nm nm con un PDI de  $0,2 \pm 0,04$ . La eficiencia de atrapamiento de NAC fue de  $0,97 \pm 0,2\%$  y la carga específica de  $0,15 \pm 0,05\%$ . Aunque el tamaño de partícula está dentro de los valores requeridos, la eficiencia y carga específica son muy bajas, es por esto que se realizaron variaciones al procedimiento con el fin de incrementar la cantidad de NAC atrapada.

### 3.2.1 Solvente – no solvente

La NAC es un compuesto con una solubilidad alta en el agua (100 mg/mL [187]); como estrategia para incrementar el atrapamiento se buscó reemplazar el agua (no solvente) por otro no solvente, que fuera completamente miscible con el solvente de la fase orgánica, pero que no solubilizara a la NAC. Se ensayaron diferentes parejas de solvente y no solvente (Tabla 3-1). Los resultados muestran que cuando se emplearon parejas (solvente y no solvente) con constantes dieléctricas bajas se observó agregación. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Dalpiaz y colaboradores (2009 y 2015) donde se observa que al emplear acetona (solvente) y aceite de semilla de algodón (no solvente) se obtienen partículas con valores alrededor de 200 nm con una polidispersidad relativamente alta (0.3 a 0.4) [135], [136]. Por el contrario, los resultados encontrados para la pareja DMSO y propilenglicol sin surfactante muestran partículas de tamaño de 696,8 nm con una polidispersidad baja (0,13). Aunque no se obtuvieron partículas con los tamaños deseados (inferior a 250 nm), se obtuvieron partículas de tamaños superiores monodispersas (PDI < 0,25), que podrían ser empleadas en otras aplicaciones. Se resaltan las partículas encontradas de 193 nm para propilenglicol con DMSO en presencia de Bio soft N-7, que aunque de tamaño pequeño, el valor del índice de polidispersidad encontrado fue de 0,58, lo que indica que hay partículas de tamaños variados, solo se reportó el que presentó mayor intensidad. Se destaca que la pareja DMSO-propilenglicol presenta partículas monodispersas sin la presencia de surfactantes. Aunque se obtuvieron partículas no se realizaron las pruebas de eficiencia de atrapamiento, ya que los valores de tamaño de partícula se encuentran lejanos del rango de trabajo deseado (250 nm).

Tabla 3-1 Efecto del tipo de solvente y no solvente sobre la formación de partículas submicrónicas por nanoprecipitación

Constante dielectrica ( $\epsilon$ )	No solvente	Tamaño de partícula (nm)/PDI											
		Acetato de etilo ( $\epsilon=6,0$ )			Acetato de metilo ( $\epsilon=6,7$ )			Acetona ( $\epsilon=20,7$ )			DMSO ( $\epsilon=48,9$ )		
		No	AE	EL	No	AE	EL	No	AE	EL	No	AE	EL
2,0	Heptano	A	PS	PS	A	PS	PS	A	PS	PS	NM	NM	NM
3,0	Neobee® 1053	A	A	PS	A	AS	PS	A	A	PS	NM	NM	NM
5,0	Acetato de amilo	A	A	A	A	A	A	A	A	A	NM	NM	NM
17,1	Butanol	A	A	A	A	456.3/0,15	A	A	287.7/0,03	A	536,4/0,22*	524/0.15	A
32,0	Propilenglicol	A	A	A	A	A	A	A	A	A	696.8/0,13*	2772/0,67*	630,4/0,34*

PS: Parcialmente soluble el surfactante en el no solvente; NM: no miscible; A: Agregacion; PVP: Polyvinylpyrrolidona; PLU: Pluronic ® F127; EL: Stepan mild L3®; AE: Bio Soft N1-7®; LL: Makon NF5®; \* Presencia de Microparticulas, se tomó en cuenta el valor que presenta mayor intensidad.



### 3.2.2 Viscosidad del no solvente

Los resultados, presentados en la Tabla 3-2, muestran que al enriquecer la fase acuosa con propilenglicol la polidispersidad disminuye ligeramente, mientras que el tamaño de partícula se incrementa levemente (10%). Sin embargo análisis estadísticos ( $p < 0,05$ ) muestran que el índice de polidispersidad no cambia. Esto probablemente se debe a que el mecanismo de formación de las partículas se da por migración del solvente de la fase orgánica hacia la acuosa (en la cual es soluble), lo que ocasiona que el polímero se torne insoluble; al enriquecer el agua con propilenglicol, que también es un solvente polar y completamente miscible con la acetona, el mecanismo de formación no se ve alterado, presentándose resultados similares. De hecho, la solubilidad de la NAC en agua y en agua con propilenglicol no cambia apreciablemente (anexo 1). En cuanto a la cantidad de NAC retenida, se observa un incremento importante con la adición de propilenglicol; se propone que al aumentarse la viscosidad del medio, la difusión de la NAC desde la solución de acetona y polímero hacia el medio acuoso se ve reducida, por lo que la migración de NAC desde la solución de polímero y solvente es menor y por ello el atrapamiento se incrementa.

Tabla 3-2 Efecto del incremento de la viscosidad del no solvente. Datos obtenidos con una relación O/A de 1 a 10 y acetona como solvente

Fase acuosa	Tp (nm)	PDI	Eficiencia (%P/P)	Carga específica (%P/P)
Agua ( $\mu=1.13$ cP a 25 °C)	210 $\pm$ 9	0,2 $\pm$ 0,04	0,97 $\pm$ 0,2	0,15 $\pm$ 0,05
Agua – propilenglicol ( $\mu=6.12$ cP a 25 °C)	233,3 $\pm$ 1,2	0,16 $\pm$ 0,01	4,01 $\pm$ 0,3	0,46 $\pm$ 0,03

### 3.2.3 pH de la fase acuosa

Se obtuvieron partículas de tamaños inferiores a 250 nm, monodispersas que atrapan NAC en un porcentaje bajo (Tabla 3-3). Aunque se observó un mayor tamaño y atrapamiento de NAC a pH de 2.4 comparado con el mismo ensayo realizado a pH neutro, al realizar el análisis de varianza (ANOVA  $p < 0.05$ ), no se encontró diferencia estadística significativa ni en el tamaño de partícula ni el atrapamiento (eficiencia y carga específica). Esto indica

que aunque el pH ácido favorece que la molécula se encuentre más hidrófoba, esta diferencia no es apreciable. El compuesto activo a pesar de cambiar el pH de la fase acuosa, sigue migrando hacia el agua. Estos resultados contrastan con los reportados por Song y colaboradores [151], donde varían el pH de la fase acuosa cuando se atrapa vincristina y encuentran que a pH superior a 7 el atrapamiento se incrementa en un 10 % (aproximadamente), aunque también encuentran que el tamaño de partícula permanece estable.

Tabla 3-3 Efecto de reducir el pH de la fase acuosa. Datos obtenidos con 1 mL de acetona y 10 mL de agua con Pluronic ® F127 (1% p/v).

pH	Tp (nm)	PDI	Eficiencia (%P/P)	Carga específica (%P/P)
2,4	248 +/- 25,03	0,17+/-0,06	2,43 +/- 0,03	0,49 +/- 0,01
7,2	233,3 +/- 3,25	0,10+/-0,01	2,02 +/- 0,8	0,4 +/- 0,17

### 3.2.4 Relación entre la fase orgánica y acuosa (O/A)

En los resultados se observan en la Figura 3-4 y en la tabla 3-4 se observa que esta variable tiene influencia en todas las variables respuesta observadas (%NAC, carga específica y tamaño de partícula) de acuerdo al análisis estadístico realizado (ANOVA  $p < 0,05$ ). El tamaño de partícula se ve incrementado cuando se adiciona el menor volumen (relación O/A 1 a 2). Esto se debe a que parte del solvente aún no abandona completamente la matriz polimérica, aumentando por esto su tamaño. A medida que se adiciona mayor volumen de fase acuosa, el tamaño de partícula baja y permanece casi constante a partir de la relación 1 a 3 (ANOVA  $p < 0,05$ ). En cuanto a la eficiencia de atrapamiento y la carga específica, estas disminuyen a medida que se incrementa el volumen de la fase acuosa, ya que aumentan las pérdidas por migración de NAC hacia dicha fase, debido al incremento en el gradiente de concentración entre la fase orgánica y acuosa. Resultados similares fueron reportados por otros autores [144], [151], [152]. Ya que se buscan partículas de tamaños pequeños y eficiencias de atrapamiento elevadas, se concluye que la mejor relación O/A será de 1 a 3. Por lo tanto para los siguientes ensayos realizados, se empleó esta relación.

Tabla 3-4 Efecto del Volumen de fase acuosa. Datos obtenidos empleando acetona como solvente y 10 mg/mL de NAC.

Rel O/A	Tp (nm)	PDI	Eficiencia (%P/P)	Carga específica (%P/P)
1 a 2	271,5 +/- 16,68	0,23 +/- 0,01	0,32 +/- 0,06	0,32 +/- 0,07
1 a 3	223,25 +/- 31,32	0,13 +/- 0,06	0,19 +/- 0,04	0,20 +/- 0,04
1 a 4	212,5 +/- 9,03	0,14 +/- 0,01	0,09 +/- 0,01	0,09 +/- 0,01
1 a 5	236,35 +/- 11,38	0,18 +/- 0,01	0,06 +/- 0,02	0,06 +/- 0,02
1 a 10	190,75 +/- 6,85	0,08 +/- 0,01	0,08 +/- 0,01	0,04 +/- 0,01

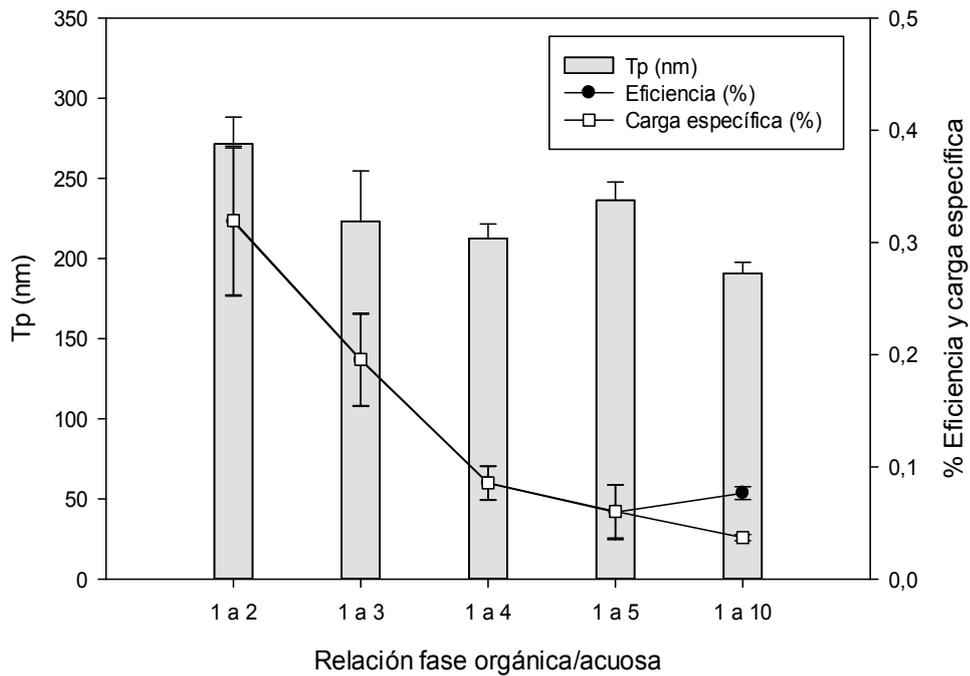


Figura 3-4 Efecto del Volumen de fase acuosa. Datos obtenidos empleando acetona como solvente y 10 mg/mL de NAC.

### 3.2.5 Concentración de NAC en la fase orgánica

La cantidad de NAC disponible para atrapar varía con el solvente, ya que se ve limitada por la solubilidad del compuesto en el mismo. Para el caso de la acetona, la concentración que se adicionó no pudo ser superior a 30 mg/mL (a temperatura ambiente  $\approx 22$  °C), porque a mayores concentraciones no fue posible solubilizar el compuesto; mientras que al emplear DMSO las concentraciones que se pudieron emplear fueron mayores (100 mg/mL).

En la Figura 3-5 y tablas 3-5 y 3-6 se puede observar que el tamaño de partícula no varía significativamente (ANOVA  $p < 0,05$ ) para ninguno de los solventes empleados y tampoco se afecta por la cantidad de NAC adicionada. De lo anterior se puede afirmar que el compuesto activo no interfiere en la formación de las partículas ya que su tamaño permanece estable, aun empleando concentraciones altas (100 mg/mL). Los valores de eficiencia son bajos y no presencian diferencia estadística significativa (ANOVA  $p < 0,05$ ). Sin embargo no sucede lo mismo con carga específica, ya que esta se incrementa con la cantidad de NAC adicionada, puesto que hay mayor cantidad de moléculas para ser retenidas dentro de la matriz polimérica. El incremento de la carga específica se nota más para el DMSO que para la acetona, ya que el primero puede disolver mayor cantidad de NAC. Estos resultados indicarían que la matriz polimérica podría retener mayor cantidad de moléculas a su interior a medida que se incrementa la cantidad disponible de las mismas. Otros investigadores reportan resultados similares empleando otros solventes [191], [192].

Tabla 3-5 Efecto de la concentración de NAC disuelta en acetona, empleando una relación O/A de 1 a 3

NAC (mg/mL)	Tp (nm)	PDI	Eficiencia (%P/P)	Carga específica (%P/P)
5	210,3 +/- 17,8	0,12 +/- 0,03	0,032 +/- 0,021	0,016 +/- 0,01
10	222,5 +/- 18,8	0,14 +/- 0,04	0,06 +/- 0,02	0,06 +/- 0,02
27,5	184,4 +/- 28,3	0,10 +/- 0,03	0,16 +/- 0,04	0,38 +/- 0,10

Tabla 3-6 Efecto de la concentración de NAC disuelta en DMSO, empleando una relación O/A de 1 a 3

NAC (mg/mL)	Tp (nm)	PDI	Eficiencia (%P/P)	Carga específica (%P/P)
2	236,1 +/- 16,1	0,15 +/- 0,05	0,06 +/- 0,07	0,013 +/- 0,016
25	227,3 +/- 00,5	0,12 +/- 0,01	0,07 +/- 0,03	0,165 +/- 0,091
50	213,3 +/- 12,0	0,11 +/- ,01	0,08 +/- 0,002	0,49 +/- 0,01
80	221,4 +/- 1,1	0,14 +/- 0,04	0,09 +/- 0,01	0,897 +/- 0,129
100	194,2 +/- 15,2	0,15 +/- 0,02	0,09 +/- 0,004	1,06 +/- 0,05

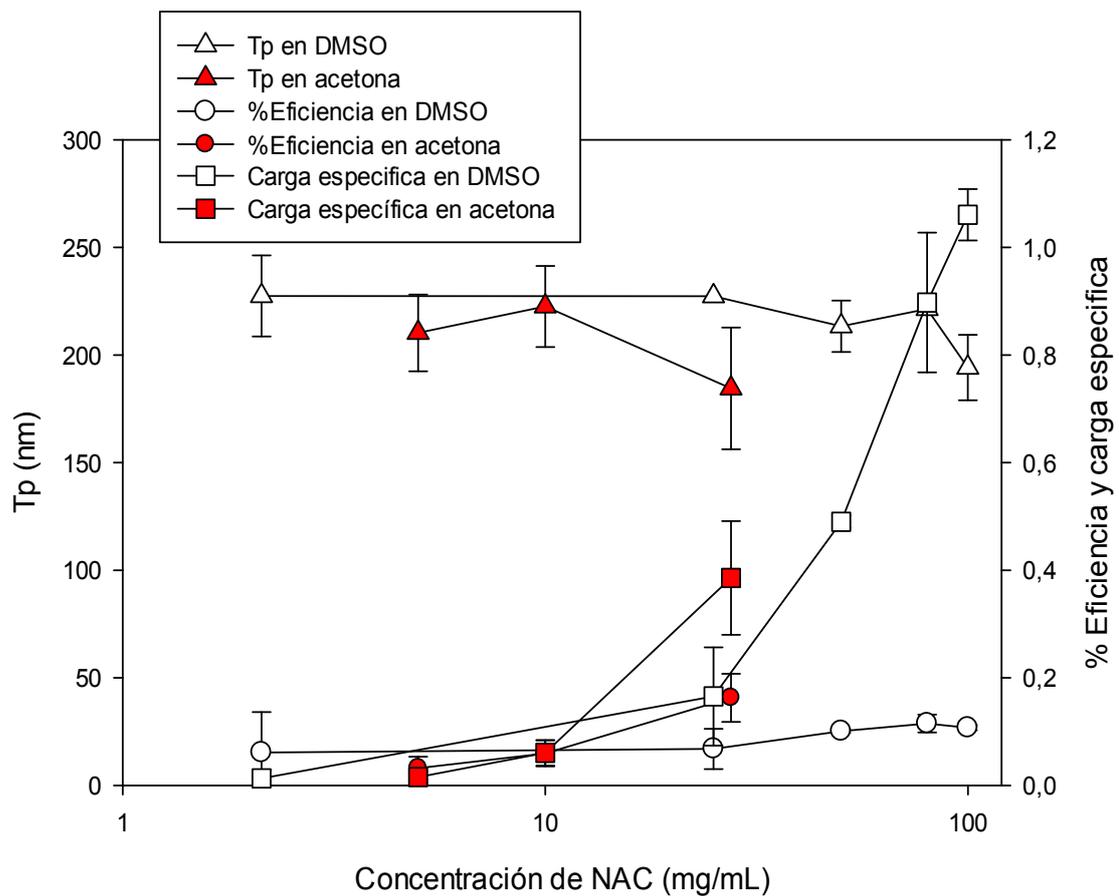


Figura 3-5 Efecto de la concentración de NAC, empleando una relación O/A de 1 a 3.

### 3.2.6 Adición de NAC al solvente y al no solvente

Las pruebas se realizaron con acetona y DMSO como solventes. El análisis estadístico muestra que el tamaño de partícula no se ve influenciado significativamente (ANOVA  $p < 0,05$ ) por la presencia de NAC en la fase acuosa, probablemente por el bajo atrapamiento que existe. En cuanto al atrapamiento de NAC, se observa un incremento superior al doble comparado con el obtenido sin la adición de NAC, empleando ambos solventes (Tabla 3-7). Adicionalmente, la presencia de NAC en la fase acuosa disminuye el gradiente de concentración y como consecuencia aumenta el atrapamiento. Otros autores reportan la saturación de la fase acuosa como estrategia para incrementar el atrapamiento [193], [194]. Avgoustakis y colaboradores, reportan valores similares para el atrapamiento de cisplatino, que pasa de 0.1% a 0.66% al saturar la fase acuosa.

Como el atrapamiento de NAC se incrementó más del doble, con el fin de observar la importancia de las otras variables estudiadas, no se implementará la saturación con NAC hasta el ensayo final.

Tabla 3-7 Efecto del incremento de la concentración de NAC en el no solvente. Datos obtenidos para una relación O/A de 1 a 3 y empleando una concentración de NAC en solvente de 15 mg/mL.

Solvente	Tp (nm)	PDI	Eficiencia (%w/w)	Carga específica (% w/w)
Acetona	253.1 +/- 28	0,18 +/- 0,07	0.24 +/- 0.03	0.36 +/-0.05
Acetona*	222.9 +/- 21.2	0,12 +/- 0,05	0.61 +/-0.4	0.92 +/- 0.56
DMSO	220.3 +/- 19.2	0,17 +/- 0,05	0.38 +/- 0.1	0.56 +/- 0.15
DMSO*	236.1 +/- 11.1	0,17 +/- 0,03	0.95 +/- 0.2	1.43 +/- 0.32

\*Datos obtenidos adicionando NAC (80 mg/mL) al no solvente o fase acuosa.

### 3.2.7 Solvente o fase orgánica

Se realizaron pruebas empleando DMSO, acetona y una mezcla (1:1 v/v) de los mismos. Se seleccionaron estos solventes ya que pueden solubilizar a la NAC, y tienen un bajo grado de toxicidad (clase 3 en la clasificación ICH [179]). Las pruebas con la mezcla de

solventes se realizaron para incrementar la capacidad de la acetona de solubilizar la NAC, ya que dicha mezcla mostró solubilizar a la NAC en concentraciones hasta 100 mg/mL (anexo 1); adicionalmente, las partículas producidas empleando DMSO presentaron mayor tendencia a la aglomeración cuando eran resuspendidas después de ser centrifugadas, mientras que las producidas por la acetona no. Esto se verifica al comparar el potencial zeta (-33.4 mV para acetona y -9.8 mV para DMSO).

La Figura 3-6 y tabla 3-8 muestra que el cambio de solvente no afecta el tamaño de partícula (ANOVA  $p < 0,05$ ), encontrándose valores entre 200 y 250 nm. Resultados similares han sido reportados por Song y colaboradores, quienes empleando diferentes solventes encontraron que al adicionar tensoactivos el tamaño de partícula permanece casi constante [192]. Caso contrario a lo que reporta Cheng y colaboradores (2007), donde el tamaño de partícula si cambia con el solvente, aunque en este caso no se adicionó tensoactivo [144].

En cuanto a la eficiencia y carga específica se observa que hay una disminución cuando se usa DMSO como solvente sin embargo, son similares para la acetona y la mezcla de solventes. Esto permite concluir que el uso de la mezcla de solventes sería la mejor opción ya que permitiría incrementar la cantidad de NAC que se puede adicionar en la fase orgánica y su proceso de separación por centrifugación, sería menos susceptibles a la aglomeración.

Tabla 3-8 Efecto del tipo de solvente en la formación de partículas submicrónicas. Datos empleando una relación O/A de 1 a 3 y 25 mg/mL de NAC.

Solvente	Tp (nm)	PDI	Eficiencia (%P/P)	Carga específica (%P/P)
Acetona	232,6 +/- 7,0	0,17 +/- 0,02	0,16 +/- 0,01	0,37 +/- 0,03
DMSO	222,6 +/- 14,2	0,15 +/- 0,04	0,12 +/- 0,06	0,17 +/- 0,09
Acetona-DMSO (1:1 v/v)	197,9 +/- 26,1	0,17 +/- 0,07	0,14 +/- 0,04	0,34 +/- 0,11

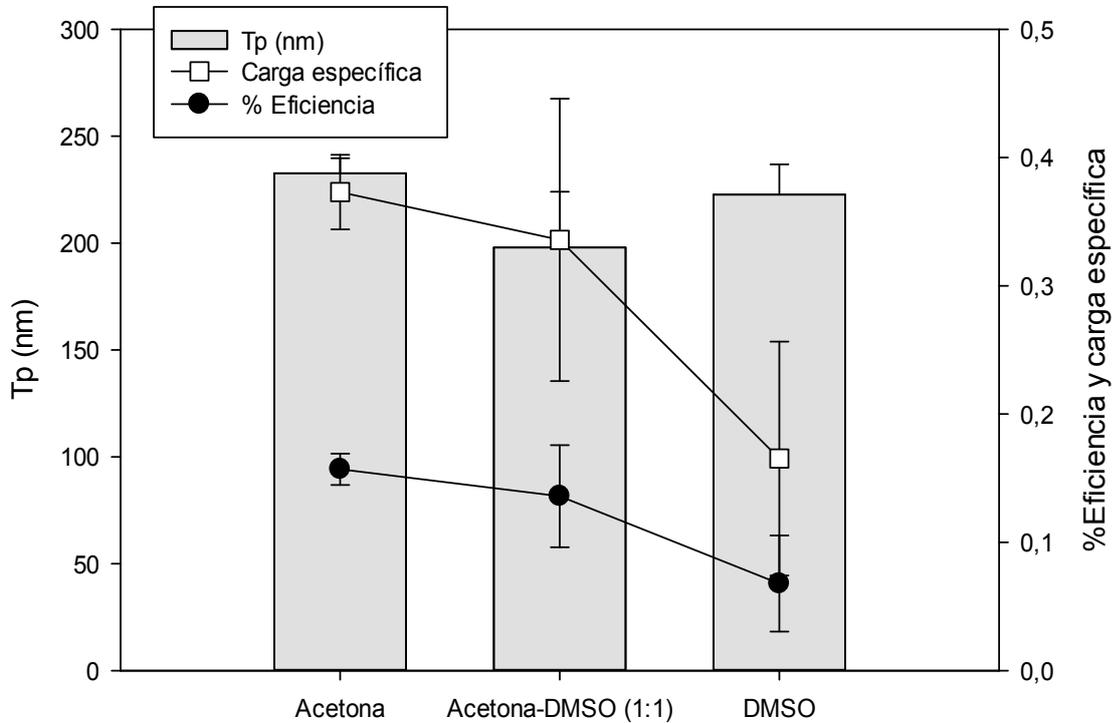


Figura 3-6 Efecto del tipo de solvente en la formación de partículas submicrónicas. Datos empleando una relación O/A de 1 a 3 y 25 mg/mL de NAC.

### 3.2.8 Formación de sales de NAC con calcio

Los resultados de la Tabla 3-9 muestran el efecto de adicionar calcio a la NAC con el fin de volverla más hidrófoba. Cuando se emplea la sal de NAC, se observa que el tamaño de partícula disminuye casi un 25%, pero la variación en la eficiencia y carga específica no es significativa ( $p < 0,05$ ) si se compara con el atrapamiento cuando se emplea NAC. Estos resultados contrastan con los reportados por Desai y colaboradores [119], donde mejoran el atrapamiento de NAC en milicilindros de PLGA, aunque la metodología de atrapamiento del compuesto activo es diferente.

Tabla 3-9 Efecto de adicionar sales de calcio. Datos obtenidos con una relación O/A de 1 a 3 y 25 mg/mL of NAC

Fase orgánica	Fase acuosa	Tp (nm)	PDI	Eficiencia (%p/p)	Carga específica (%p/p)
Acetona-DMSO (1:1 v/v) + NAC	Agua + Plu + CaCl <sub>2</sub>	208 +/- 1	0,18 +/- 0,04	0,19 +/- 0,11	0,49 +/- 0,28
Acetona-DMSO (1:1 v/v) + NAC-Ca	Agua + Plu	157,2 +/- 3,4	0,12 +/- 0,03	0,27 +/- 0,09	0,79 +/- 0,24
Acetona-DMSO (1:1 v/v) + NAC	Agua + Plu	202,4 +/- 110,6	0,17 +/- 0,07	0,38 +/- 0,15	0,95 +/- 0,38

Plu: Pluronic ®F127; NAC-Ca: Sales de NAC con calcio

### 3.2.9 Concentración de PLGA

Los resultados de la Tabla 3-10 muestran que el incremento de la concentración del polímero afecta, aunque de manera leve (17%) al tamaño de partícula, ya que entre 10 y 20 mg/mL se incrementó un 17% mientras que la eficiencia se creció casi dos veces, pero la carga específica permanece sin variación. Esto se debe a que la cantidad de polímero adicionado se incrementa por esto aunque la eficiencia aumenta, la carga específica no. Resultados similares han sido reportados por otros investigadores [151], [152]; Mora y colaboradores reportan tamaños de partícula para concentraciones superiores a las empleadas en este trabajo y encuentran también un incremento en el tamaño de partícula [161]. Es por esto que se decidió trabajar con la concentración más baja, ya que a esta concentración se encontraron los valores de tamaño de partícula más bajos y la carga específica es la misma.

Tabla 3-10 Efecto de la concentración de PLGA. Datos obtenidos con 1 mL de acetona-DMSO (1:1 v/v) y 3 mL of agua con Pluronic ® F127, y 30 mg/mL of NAC.

PLGA (mg/mL)	Tp (nm)	PDI	Eficiencia (%P/P)	Carga específica (%P/P)
20	223 ± 9	0,18 ± 0,07	0.2 ± 0.05	0.291 ± 0.08
10	190 ± 21	0,17 ± 0,08	0.1 ± 0.03	0.292 ± 0.11

### 3.2.10 Peso molecular de polímero

En la Figura 3-7 y tabla 3-11 se observa que el tamaño de partícula cambia con el peso molecular (ANOVA  $p < 0,05$ ) aunque para los valores más bajos el cambio es mucho más ligero (18% comparado con el valor obtenido para 7-17 kDa), mientras que para el peso molecular superior (54-69 kDa) se incrementa en casi un 70%. En cuanto al atrapamiento, este se ve levemente incrementado con el aumento en el peso molecular, particularmente para el mayor valor (incremento alrededor del 50% tanto de la eficiencia de atrapamiento como de la carga específica, con respecto al valor obtenido para 7-17 kDa), aunque estadísticamente no se encontró diferencia al comparar los resultados. Otros investigadores han reportado también un incremento en la eficiencia y en el tamaño de partícula [137], [151], [182]. Esto indicaría que el aumento en el tamaño de partícula se da como consecuencia de un incremento en la longitud de la cadena polimérica. Una consecuencia del incremento del tamaño de partícula sería el leve aumento en el atrapamiento, ya que existiría mayor volumen para atrapar el compuesto activo.

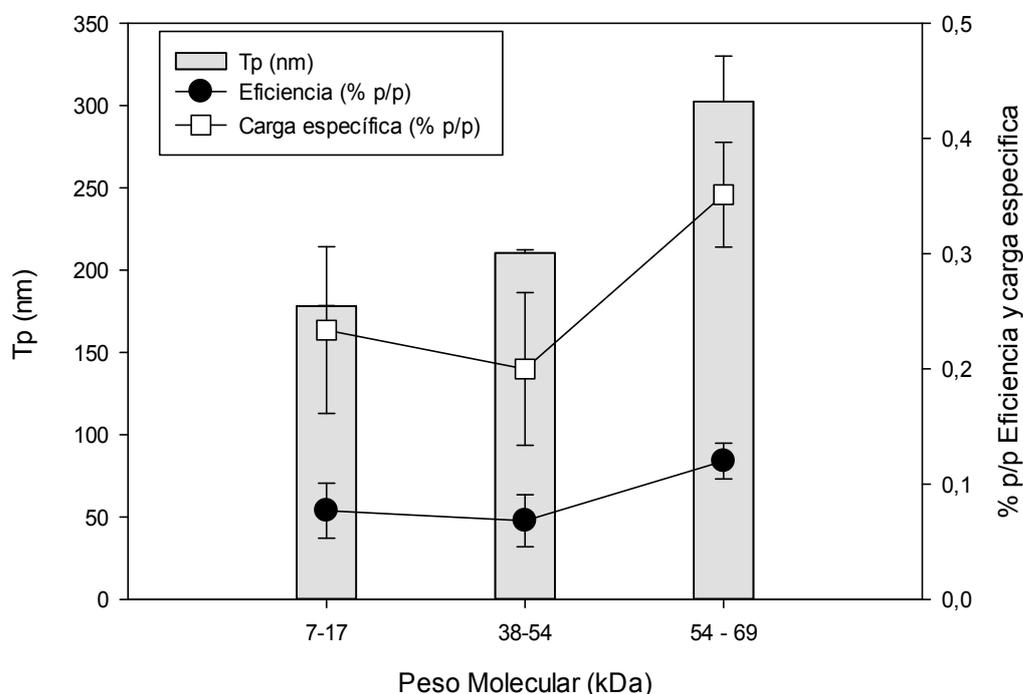


Figura 3-7 Efecto del peso molecular del PLGA. Datos obtenidos empleando una relación O/A de 1 a 3 y 25 mg/mL de NAC.

Tabla 3-11 Efecto del peso molecular del PLGA. Datos obtenidos empleando una relación O/A de 1 a 3 y 25 mg/mL de NAC.

Peso Molecular (kDa)	Tp (nm)	PDI	Eficiencia (%P/P)	Carga específica (%P/P)
7 -17	178,2 +/- 0,2	0,12 +/- 0,01	0,08 +/- 0,02	0,23 +/- 0,07
38-54	209,7 +/- 1,8	0,11 +/- 0,01	0,07 +/- 0,02	0,20 +/- 0,06
54-69	302,4 +/- 27,5	0,29 +/- 0,01	0,12 +/- 0,01	0,35 +/- 0,04

### Ensayo final

De acuerdo con los resultados obtenidos con cada una de las variables estudiadas, se planteó un ensayo final empleando las mejores condiciones encontradas: como no solvente se empleó agua con propilenglicol (1:1) y Pluronic® F127 (tensoactivo al 1% p/v). El no solvente se enriqueció con NAC (80 mg/mL). Como fase orgánica se empleó una mezcla de solventes de acetona y DMSO (1:1 v/v) con una concentración de NAC de 80 mg/mL y 10 mg/mL de PLGA de 38-54 kDa. Como resultados se obtuvieron partículas submicrónicas de 235,5 +/- 11,4 nm con una eficiencia de atrapamiento de 0,4 +/- 0,04% y una carga específica de 3,14 +/- 0,33%, esta última se incrementó casi 20 veces el valor obtenido para el caso base. Aunque se logró incrementar la cantidad atrapada, Karimi Zarchi *et al* reportan atrapamientos mayores usando electrospray [118]. Es necesario seguir optimizando el proceso con el fin de obtener atrapamientos mayores.

## 3.3 Conclusiones

En este capítulo se evaluaron diferentes alternativas para incrementar el atrapamiento de un compuesto hidrófilo de bajo peso molecular como la NAC dentro de partículas submicrónicas de PLGA. Se encontró que el incremento de la viscosidad del no solvente, la concentración del polímero, el tipo de solvente, y el incremento de la concentración de la NAC tanto en la fase orgánica como en la acuosa no tienen influencia sobre el tamaño de partícula, mientras que la relación entre la fase orgánica y acuosa (O/A), el peso molecular del polímero, el uso de sales de calcio y el empleo de diferentes parejas de solvente y no solvente influyen el tamaño de partícula. Se encontró que la mayoría de parejas solvente y no solvente ensayadas presentaron aglomeración excepto aquellas formadas por acetona y DMSO (solventes) con propilenglicol (no solvente), los cuales tienen constantes dieléctricas altas.

La carga específica y la eficiencia de atrapamiento se vieron favorecidas por el incremento en la viscosidad del no solvente, la concentración de NAC en la fase orgánica y el enriquecimiento del no solvente con NAC. Sin embargo, disminuye con el aumento del volumen de la fase acuosa (relación O/A).

Se encontró una metodología que permite incrementar la cantidad de NAC atrapada dentro de partículas submicrónicas de PLGA, manteniendo un tamaño inferior a los 250 nm y una carga específica de 3,1%. Se espera funcionalizar el PLGA con un ligando afín por el tejido óseo, con el fin de direccionar las partículas hacia este tejido con el fin de poder ser usadas para el tratamiento de la osteoporosis.

## **4. Producción de partículas submicrónicas de PLGA conjugado a alendronato para liberar N-acetilcisteína direccionada preferencialmente a tejido óseo**

Después de analizar varios métodos de fabricación, seleccionar el de nanoprecipitación y establecer las condiciones para incrementar tanto la eficiencia como la carga específica, se procedió a conjugar el polímero con un ligando (alendronato) con el fin de darle a las partículas afinidad preferencial por el tejido óseo. A continuación, se describe el procedimiento realizado para la síntesis del conjugado, las pruebas para determinar su afinidad por el tejido óseo, así como las velocidades de liberación y de degradación de las partículas submicrónicas.

### **4.1 Materiales y métodos**

#### *Materiales:*

Síntesis del polímero: PLGA RG 503 H terminado en ácido (Molecular weigh 24 -38 kDa), Alendronato de sodio, Diciclohexilcarbodiimida (DCC), N-Hidroxisuccinimida (NHS) todos adquiridos de Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dimetilsulfóxido R.A. (DMSO) marca Panreac (Panreac Applichem, Barcelona, España), Acetona, Dietil éter y DMSO-D6 R.A. marca Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Fabricación de partículas: PLGA Resomer RG 502 terminado en ester, PLGA-ALE, N-acetilcisteína, Pluronic F127 marca Bioreagent, Oil red O, todos adquiridos de Sigma-Aldrich Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dimetilsulfóxido R.A. (DMSO) marca Panreac (Panreac Applichem, Barcelona, España), Acetona R.A. marca Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Manejo y cuantificación de N-Acetil-cisteína: 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  marca (Merck ) y marca Sigma- Aldrich (St. Louis, MO, USA), Diclorometano R.A. marca (Merck). Buffer acetato, HCl (J Beacker).

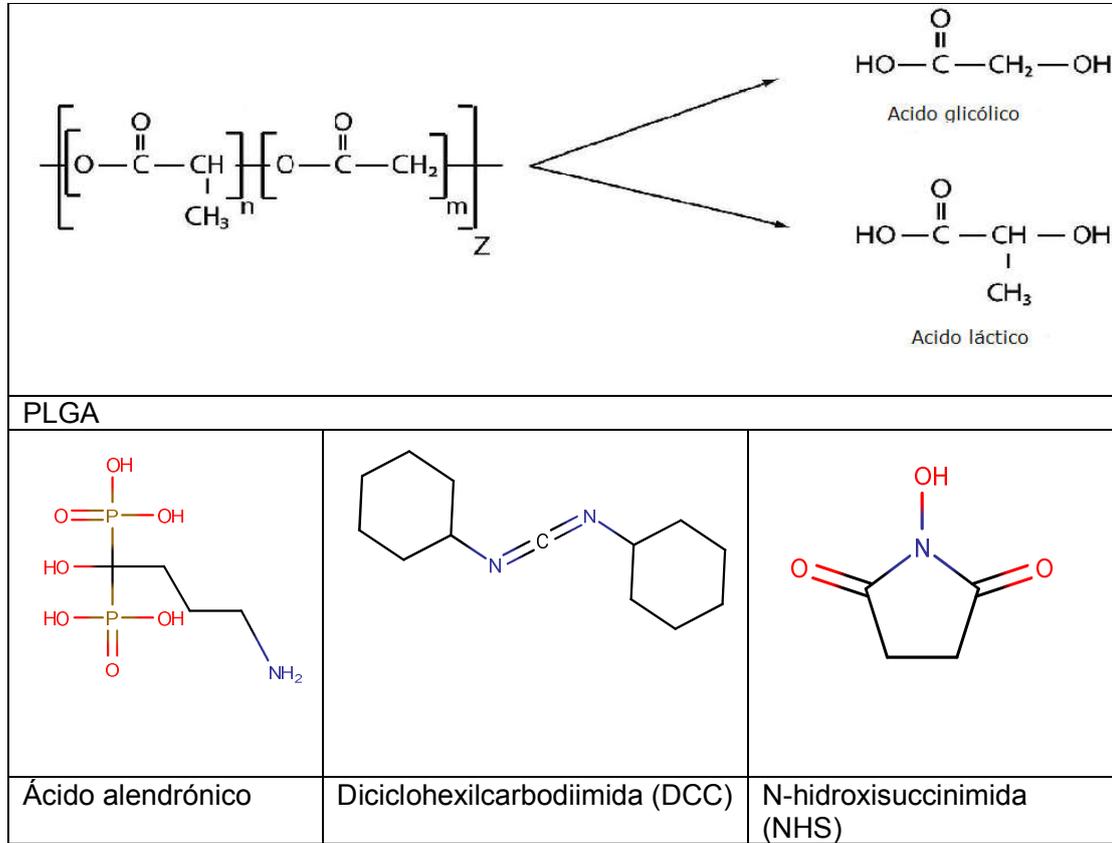
#### *Síntesis del conjugado de PLGA-ALE*

Se realiza para funcionalizar el polímero de PLGA con un bifosfonato como el alendronato, y direccionar las partículas obtenidas al tejido óseo.

La reacción de general y el mecanismo de reacción se observan en las Figuras 4-1 y 4-2. La tabla 4-1 muestra las estructuras de las especies reactivas involucradas.

La reacción se lleva a cabo cuando un agente de acople como la dicitclohexilcarbodiimida (DCC) (2) reacciona con el extremo carboxilo del PLGA (1), formando un intermediario inestable (3), razón por la cual se adiciona la N-hidroxisuccinimida (NHS) (4), para formar el compuesto NHS-PLGA (5) que es mucho más estable y reacciona fácilmente con las aminas. Junto con el compuesto 5 se forma la dicitclohexilúrea (6), que es un subproducto que precipita y se retira fácilmente por filtración o centrifugación. El polímero activado (5) reacciona con el extremo amino del alendronato (7) para formar el polímero conjugado (8).

Tabla 4-1 Estructura de las especies reactivas involucradas en la reacción de conjugación del PLGA al alendronato



Reacción general:

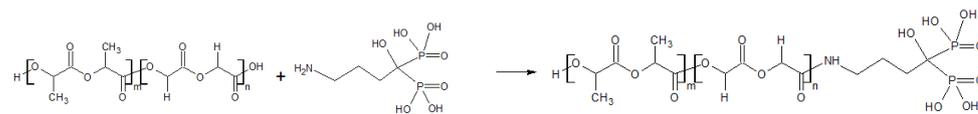
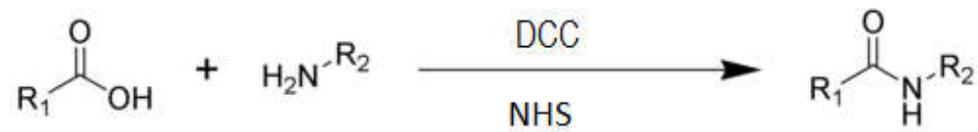
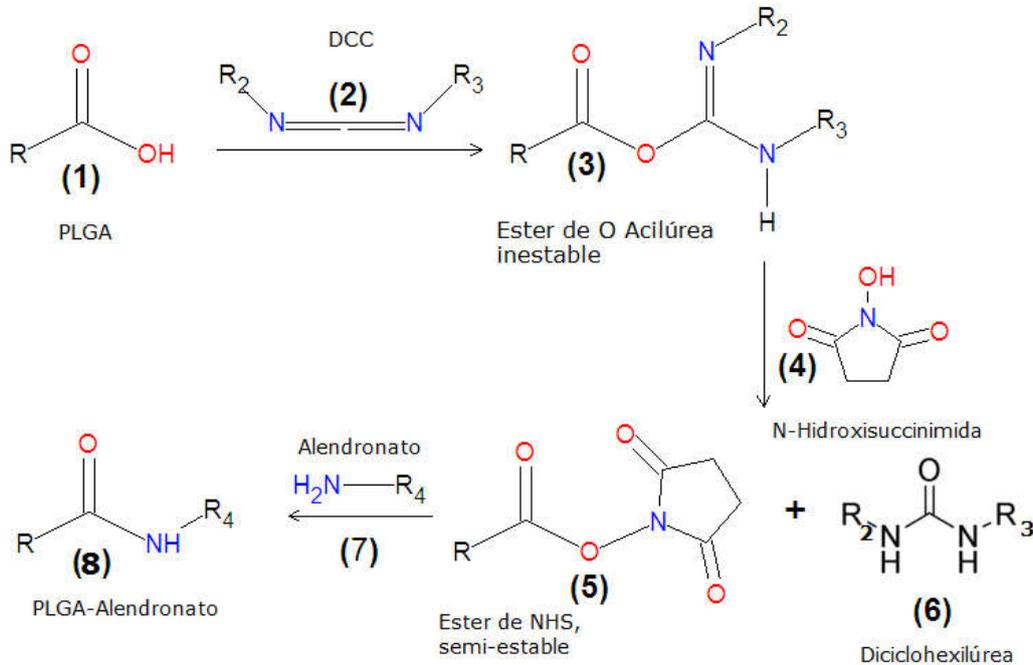


Figura 4-1 Reacción de conjugación y estructura de las especies involucradas

Mecanismo de reacción:



Adaptado de: [http://en.citizendium.org/images/a/ab/Carbodiimide\\_coupling\\_via\\_NHS\\_ester.png](http://en.citizendium.org/images/a/ab/Carbodiimide_coupling_via_NHS_ester.png)

Figura 4-2 Mecanismo de reacción para la conjugación del PLGA-ALE

**Método:**

Se empleó la metodología desarrollada por Choi y colaboradores [31], que básicamente consiste en disolver 2 g de PLGA (terminado en ácido) en 20 mL de acetona, agitar de manera manual durante un minuto y dejar en reposo 1 hora. La solución se preparó en un frasco de vidrio nuevo que permaneció cerrado todo el tiempo. Una vez disuelto el polímero, se adicionaron 100 mg de DCC y 60 mg de NHS, agitando manualmente durante un minuto y se dejó en reposo y a temperatura ambiente ( $\approx 22^{\circ}\text{C}$ ) durante al menos 12 h. Como subproducto se obtiene diciclohexilúrea que es insoluble en la acetona y precipita retirándose por medio de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, PVDF), previa centrifugación durante 5 min a 1419 g (Hettich rotofix 32). El complejo PLGA-NHS que permanece disuelto en la acetona, se precipita por medio de 80 mL de dietil éter frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Dicha precipitación es instantánea, formando un complejo insoluble en la mezcla de solventes, de tal manera que se retira fácilmente empleando una espátula y se retira el exceso de dietileter remanente, secando en un horno a vacío (23,89 kPa) a  $25^{\circ}\text{C}$  y durante 4 h. El

producto es almacenado en un vial tapado y mantenido a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La reacción de conjugación se realiza tomando 200 mg de PLGA activado (PLGA-NHS) que se disuelven inicialmente en 9,5 mL de acetona, se espera 1 h a que esté disuelto y posteriormente se adicionan 9,5 mL de DMSO. A la solución anterior se le adicionan 3 mg de alendronato (bifosfonato) que se encuentra disuelto en 1 mL de agua y se deja agitando magnéticamente por 24h a temperatura ambiente. El polímero conjugado se precipita nuevamente con 80 mL de dietil éter frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ) y se seca nuevamente en el horno a vacío ( $23,89\text{ kPa}$ ) a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 4 h.

#### *Caracterización del polímero conjugado de PLGA-ALE*

La verificación de la reacción de conjugación del polímero se realizó por NMR detectando la presencia de P en la muestra, por infrarrojo para determinar el enlace amida y finalmente determinando el potencial zeta, con el fin de verificar si existía cambio en la estructura electrónica de la superficie, comparado con el polímero sin funcionalizar.

Las pruebas de  $^{31}\text{P}$  NMR se realizaron en un espectrómetro Bruker 400 MHz Avance. Los espectros fueron obtenidos empleando DMSO- $\text{D}_6$  99,8% como solvente. Los espectros de FT-IR se tomaron en un Shimadzu IR Prestige-21 con módulo de ATR, realizando 50 barridos y con una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ . Se fabricaron partículas de PLGA sin funcionalizar y funcionalizo, de acuerdo con la metodología presentada más adelante y se purificaron por centrifugación a 10000 g (Hettich rotofix 32) durante 4 minutos, se resuspendieron en agua, previo lavado en la misma adicionando lentamente 1 mL de agua, retirándolo y repitiendo el proceso por segunda vez. Finalmente se realizaron medidas de potencial zeta de acuerdo al procedimiento descrito para dicha determinación.

#### *Producción de partículas submicrónicas*

La formación de partículas se realizó empleando el método de nanoprecipitación. Se disolvieron 10 mg de PLGA-ALE y 80 mg de NAC en 1 mL de DMSO-acetona (1:1 v/v). Se dejó un tiempo de disolución de mínimo 2 horas a temperatura ambiente. La fase orgánica fue adicionada gota a gota a 3 mL de agua con 30 mg de Pluronic® F127 y 240 mg de NAC. La mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Las partículas fueron caracterizadas determinando su tamaño, potencial zeta, eficiencia de atrapamiento y compuesto activo cargado. Aunque en el capítulo anterior se concluyó que la fase acuosa o no solvente, estaba compuesto por una solución de agua con

propilenglicol, no se implementó en esta parte de la investigación ya que no fue posible separar y resuspender nuevamente las partículas submicrónicas cuando son separadas por centrifugación, pues el incremento de la viscosidad dificultó la recuperación. Por esa razón, fue empleada solamente agua.

*Determinación de NAC:* Se realizó de acuerdo a la metodología del numeral 2.1.1.3.

*Determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta:* Se realizó de acuerdo a la metodología del numeral 2.1.1.4.

*Morfología de las partículas:* Se estudió la forma de las nanopartículas por microscopía electrónica de barrido (SEM) y por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Se empleó un SEM (Zeiss Neon 40) a diferentes magnificaciones (por encima de 100 Kx) a una distancia de 1 mm aproximadamente, y con un voltaje de 1 kV, usando una apertura de 30  $\mu\text{m}$ . Las muestras fueron recubiertas con una capa de 3 nm de Pt antes de realizar los estudios. Para la microscopía electrónica de transmisión se empleó un equipo FEI, modelo TECNAI 20 Twin – 200kV, empleando un voltaje de 120kV.

*Determinación del porcentaje de compuesto activo cargado y la eficiencia de atrapamiento.* Se tomó 1 mL de la suspensión acuosa de partículas y se centrifugó a 20000 g durante 20 minutos, descartando el sobrenadante. Se determinó la cantidad de NAC atrapada en el pellet. El peso de las partículas en la solución se determinó tomando 2 mL de la suspensión y liofilizando. La eficiencia de encapsulación de NAC (% NAC) se determinó dividiendo el peso de NAC atrapada en las partículas sobre el peso adicionado originalmente en la solución del solvente y se multiplicó por 100. El porcentaje de compuesto activo cargado se determinó dividiendo el peso de NAC atrapada en las partículas entre el peso de partículas recuperadas en la muestra y se multiplicó por 100. En capítulos anteriores se habían tenido en cuenta solo la eficiencia de atrapamiento y la carga específica, en este capítulo se determina el porcentaje de compuesto activo cargado, ya que para los ensayos de liberación y las pruebas *in vitro* se requiere conocer cuanta NAC se encuentra presente en la muestra después de haber sido purificada por centrifugación.

*Velocidad de liberación de NAC y degradación del polímero.* Se prepararon 36 muestras. Cada una tenía cerca de 1 mg de partículas en 1 mL de PBS (pH 7,4, 154 mM) en un Eppendorf de 1,5 mL a 37 °C en agitación de tipo horizontal (150 rpm) y se retiran muestras

(un eppendorf por cada muestra) a diferentes tiempos. A cada muestra se le determinó el pH y tamaño de partícula; una vez realizado esto, las muestras fueron centrifugadas a 20000 g durante 20 minutos. Se determinó la cantidad de NAC presente en el sobrenadante y el precipitado fue liofilizado para la determinación del peso molecular del PLGA presente en las nanopartículas. El ensayo se realizó por triplicado.

*Determinación del peso molecular.* Se determinó mediante cromatografía de filtración en gel (GPC), empleando una bomba Waters 515 y usando un detector de índice de refracción Waters 410. Se emplearon dos columnas PLgel 5 $\mu$  Mixed C 300 x 7.5 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; Ref. No. 1110-6500), conectadas en serie, empleando Tetrahidrofurano (THF) como fase móvil con un flujo de 1 mL/min a temperatura ambiente ( $\approx 22^{\circ}\text{C}$ ), la inyección se hizo a través de un *loop* de 20  $\mu\text{L}$ . Las muestras fueron preparadas adicionando 400  $\mu\text{L}$  de THF y dejando un tiempo de disolución de al menos 24 h; después fueron filtradas (0,45  $\mu\text{m}$  PTFE, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania). El peso molecular se determinó empleando estándares de poliestireno, Agilent EasiVial PS M (Ref. No. PL2010-0301), con pesos moleculares entre 164 y 371.000 g/gmol.

*Afinidad de las partículas de PLGA-ALE por la hidroxiapatita.* El ensayo de afinidad se realizó a partir del protocolo desarrollado por Pignatello y colaboradores [79] Se fabricaron nanopartículas con el procedimiento indicado anteriormente, variando el polímero, empleando PLGA y PLGA-ALE; en lugar de NAC se adicionó Oil red O (0,5 mg/mL). Las nanopartículas fueron separadas por centrifugación a 10000 g durante 4 minutos, el precipitado se lavó (adicionando lentamente agua y retirándola) 3 veces con agua tipo II. Las nanopartículas fueron resuspendidas en PBS por medio de un vortex y divididas en dos grupos de 2 mL cada uno. Al grupo 1 se le adicionó 50 mg de huesos triturados (hueso liso de escápula que fue cortado hasta formar pequeñas tiras de alrededor de 2mm de largo, 1mm de ancho y 0,5 mm de espesor) y el grupo 2 se mantuvo en PBS. Ambos grupos se mantuvieron en agitación tipo horizontal a 150 rpm y temperatura ambiente durante 1 hora, empleando *beakers* de 10 mL; pasado este tiempo las soluciones se filtraron y los huesos fueron lavados y secados a 45  $^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Las soluciones filtradas fueron centrifugadas a 20000 g por 30 minutos, el precipitado (partículas que no fueron adheridas a los huesos) fue lavado con agua tres veces con agua, adicionándola lentamente y después siendo retirada así tres veces. Finalmente el precipitado fue resuspendido adicionando un mililitro de DMSO y agitando empleando un vortex hasta disolución completa. Se determinó la cantidad de Oil red O atrapada por espectrofotometría a 523 nm

empleando DMSO como blanco. Las concentraciones se determinaron empleando una curva de calibración previamente realizada (concentración máxima empleada fue de 15 µg/mL y el coeficiente de regresión fue de 0.997). El ensayo se realizó por triplicado.

*Análisis estadístico:* los datos fueron analizados empleando análisis de varianza en una vía y con un nivel de significancia de 0,05.

## **4.2 Resultados**

### **4.2.1 Síntesis y caracterización del conjugado PLGA-ALE**

La reacción de conjugación del alendronato al PLGA, se realizó empleando DCC y NHS para activar el carboxilo terminal del PLGA. Una vez separado y purificado, se hizo reaccionar con alendronato. Terminada la reacción se realizaron diferentes pruebas para verificar la obtención del conjugado. En primer lugar se confirmó la presencia de P dentro de la estructura, por medio de  $^{31}\text{P}$  NMR (Figura 4-3), donde se observó un pico de 19.46 ppm que corresponde a los valores reportados para bifosfonatos [195]. Aunque se realizaron pruebas de  $^1\text{H}$ -NMR, los resultados no se incluyen, ya que los espectros resultantes del PLGA y PLGA-ALE son muy similares. Los espectros de FT-IR (Figura 4-4) de las dos muestras, evidencian la similitud de las dos moléculas, aunque se observa un pequeño pico ( $1647.21\text{ cm}^{-1}$ ) que confirma la presencia de una amida secundaria que se forma por el enlace entre el extremo ácido del polímero y la amina del bifosfonato [196]. El pico de  $3431,36\text{ cm}^{-1}$  corresponde a algo de humedad que pudo haber tenido la muestra. El valor de potencial zeta (Tabla 4-2) pasa de -48.1 mV para el PLGA a -33.3 mV para el material conjugado indicando un cambio en la estructura electrónica del compuesto.

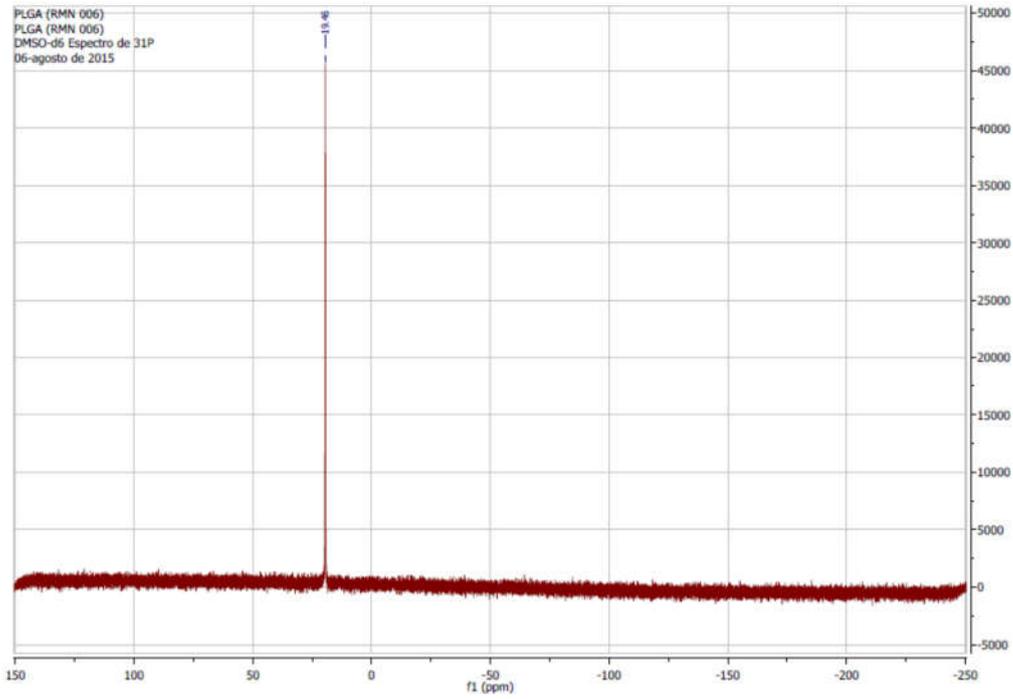


Figura 4-3 Espectro  $^{31}\text{P}$  NMR para el PLGA-ALE

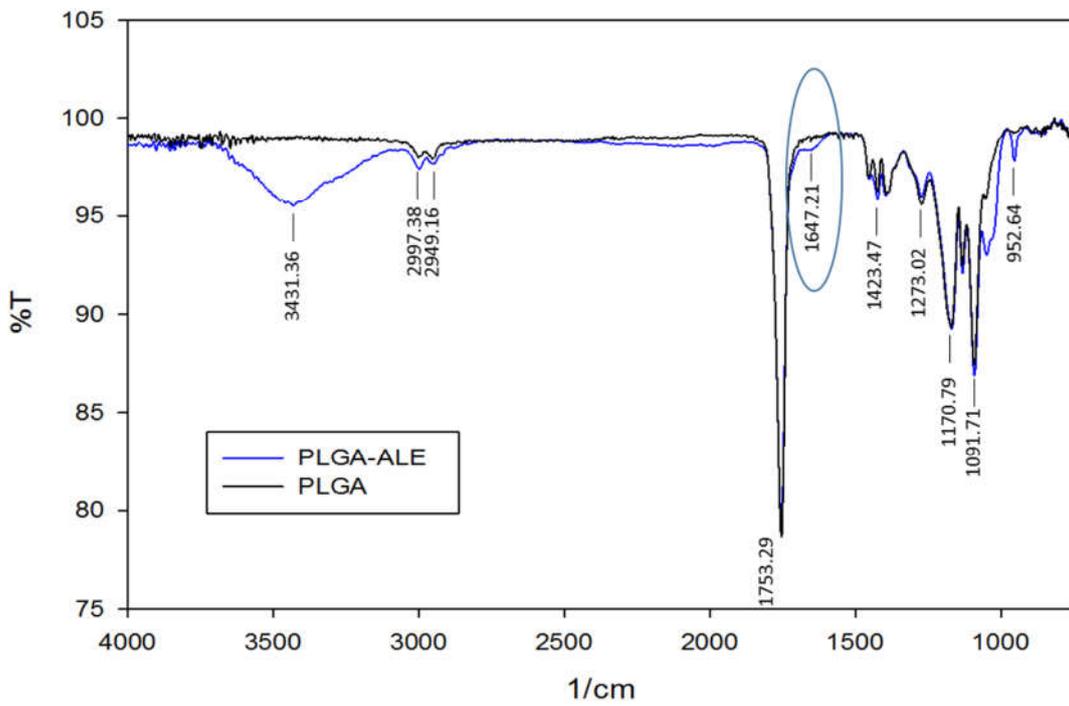


Figura 4-4 Espectro FT-IR para el PLGA-ALE y PLGA disuelto en acetona

### 4.2.2 Producción y caracterización de las partículas submicrónicas.

La Tabla 4-2 resume las características fisicoquímicas de las partículas obtenidas. Se seleccionó el método de nanoprecipitación, ya que estudios previos que comparaban este método con los de emulsión simple y doble emulsión producían partículas con eficiencias de atrapamiento similares, pero el método de nanoprecipitación es un proceso más sencillo, económico, fácilmente escalable y con menores efectos adversos sobre la integridad del polímero y compuesto activo. Se empleó como solvente, una mezcla de acetona y DMSO como estrategia para incrementar la cantidad de NAC disuelta en el solvente, ya que la acetona disuelve NAC hasta valores cercanos a 30 mg/mL, mientras que el DMSO lo hace a proporciones mayores (superior a 200 mg/mL). Cuando se empleó DMSO como solvente, las partículas producidas presentaban mayor tendencia a aglomerarse una vez eran separadas por centrifugación en comparación con el comportamiento presentado cuando se empleaba acetona como solvente. Esto se verifica al comparar el potencial zeta (-33.4 mV para acetona y -9.8 mV para DMSO). Adicionalmente al emplear DMSO como solvente se incrementó el tamaño de las partículas (288 nm). Se determinó que el porcentaje de compuesto activo cargado fue de 1,74%.

En cuanto a la morfología de las partículas producidas, en la Figura 4-5 se observan partículas de tipo esférico con un tamaño cercano a los 200 nm, datos que coinciden con los valores encontrados por DLS.

Tabla 4-2 Características fisicoquímicas de las partículas submicrónicas

Polímero	Solvente	Compuesto		Potencial		Ref
		active	Tp (nm)	PDI	Zeta (mV)	
PLGA-ALE	ACE-DMSO(1:1 v/v)	NAC	228,13	0,105	-17,8	E.T.
PLGA-ALE	ACE-DMSO(1:1 v/v))	--	174,8	0,104	-33,3	E.T.
PLGA-ALE	ACE-DMSO(1:1 v/v))	--	188	0,348	-37,2	[103]
PLGA	ACE-DMSO(1:1 v/v))	--	139	0,080	-48,1	E.T.
PLGA-ALE	Acetona	NAC	223	0,088	-33,4	E.T.
PLGA-ALE	Acetona	--	188	0,258	-37,6	[103]
PLGA-ALE	DMSO	NAC	288	0,198	-9,98	E.T.
PLGA-ALE	DMSO	--	286,9	0,156	-38,9	[103]

E.T. Este trabajo

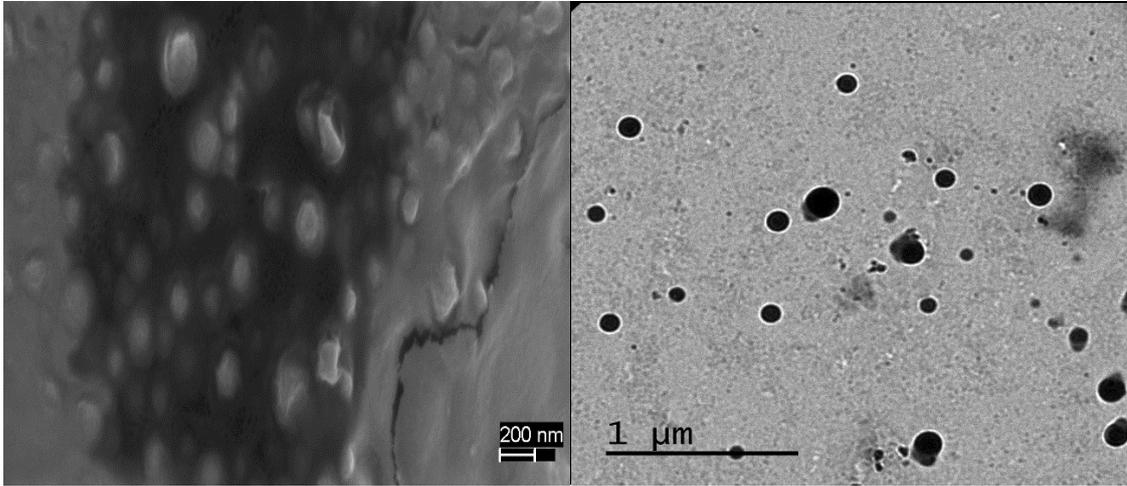


Figura 4-5 Fotografías realizadas para las partículas de PLGA-ALE-NAC. La foto de la izquierda fue tomada empleando un microscopio SEM; la derecha se realizó con un microscopio TEM.

### 4.2.3 Afinidad del polímero por la hidroxiapatita.

En la Figura 4-6 se pueden ver las fotos de los huesos empleados en el ensayo después de sucesivos lavados. La primera foto (A) muestra los huesos que estuvieron en contacto con las partículas de PLGA-ALE, mientras que la foto (B) se ven huesos correspondientes al ensayo con partículas de PLGA. Los resultados de la Figura 4-7 muestran la cantidad de colorante (Oil red O) que quedó retenido sobre la superficie de los huesos empleados. Se observa que ambos tipos de material (PLGA y PLGA-ALE) pueden ser adsorbidos sobre el hueso, aunque las partículas de PLGA-ALE retuvieron casi 2 veces más colorante si se compara con las fabricadas con solo PLGA. Resultados similares fueron reportados para otros vehículos direccionados a hueso [31], [76], [77], [79], [102], [103].



Figura 4-6 Fotos de los huesos empleados en los ensayos de afinidad. **A** Muestra en contacto con partículas de PLGA-ALE; **B** Muestra en contacto con partículas de PLGA

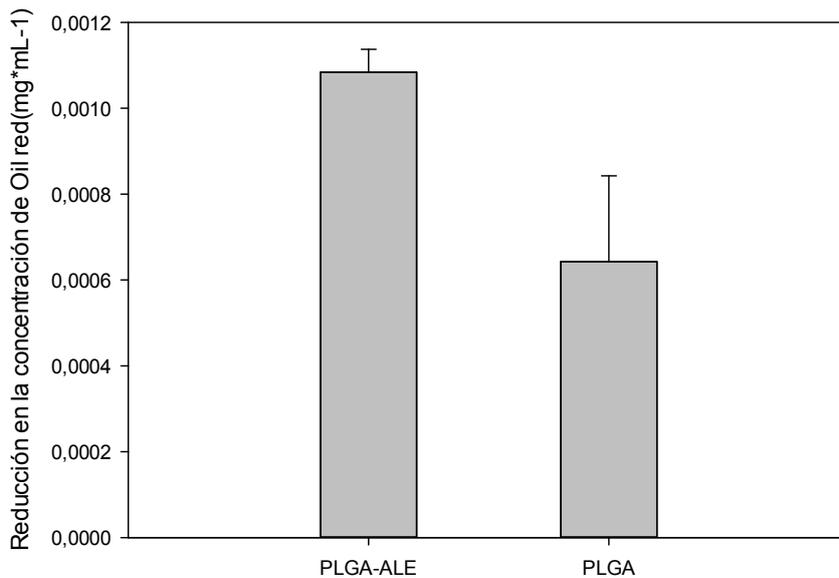


Figura 4-7 Cantidad de Oil red O retenido por las partículas de PLGA-ALE vs PLGA

#### 4.2.4 Velocidad de liberación de NAC

La Figura 4-8 muestra el seguimiento cinético a la liberación de NAC realizado a las primeras 9 h. Durante las primeras 1,5h se observa una etapa de liberación brusca “burst”, liberándose casi el 70% de NAC; pasado este tiempo la velocidad disminuye y a partir de las 6h la cantidad de NAC en el sobrenadante permanece casi constante hasta las 9 h. El

seguimiento cinético se realizó durante 33 días, encontrándose que la cantidad de NAC disminuía hasta las 24 h, pasado este tiempo no fue detectada la presencia del compuesto. Esto indica una posible dimerización del compuesto, dado que el grupo sulfhidrilo es bastante reactivo y tiene tendencia a formar puentes disulfuro, generando N N-Diacetilcistina [119]. Con el fin de asociar la liberación de NAC a partir de las partículas formadas con los diferentes modelos matemáticos para la liberación de fármacos, se ajustaron los modelos cinéticos de Higuchi y Korsmeyer, Peppas, encontrándose un mejor ajuste para el modelo de Higuchi, con una constante cinética (KH) de 0,425 h<sup>-1/2</sup>.

El modelo de Higuchi indica que la relación entre la cantidad liberada en el tiempo t (C(t)) y la cantidad de compuesto activo disponible para la liberación (C<sub>∞</sub>), es decir, la fracción de compuesto activo liberado es proporcional al producto de la constante de Higuchi (KH) y la raíz cuadrada del tiempo (t), de acuerdo a la siguiente ecuación:  $\frac{C(t)}{C_{\infty}} = KH\sqrt{t}$ .

Dicho modelo supone: a) que la cantidad de compuesto activo disponible para liberar es superior a la solubilidad del compuesto; b) el compuesto activo se libera por difusión en una sola dirección; c) el tamaño del compuesto activo a liberar es mucho menor que el espesor del sistema de liberación; d) el hinchamiento de la matriz polimérica y su disolución es insignificante; e) el valor de la difusividad del compuesto activo es constante; f) el sistema de liberación se encuentra perfectamente sumergido en el medio de liberación [197]. El sistema que se estudió cumple todos supuestos con excepción del primero; a pesar de esto presenta una buena aproximación a los datos reales.

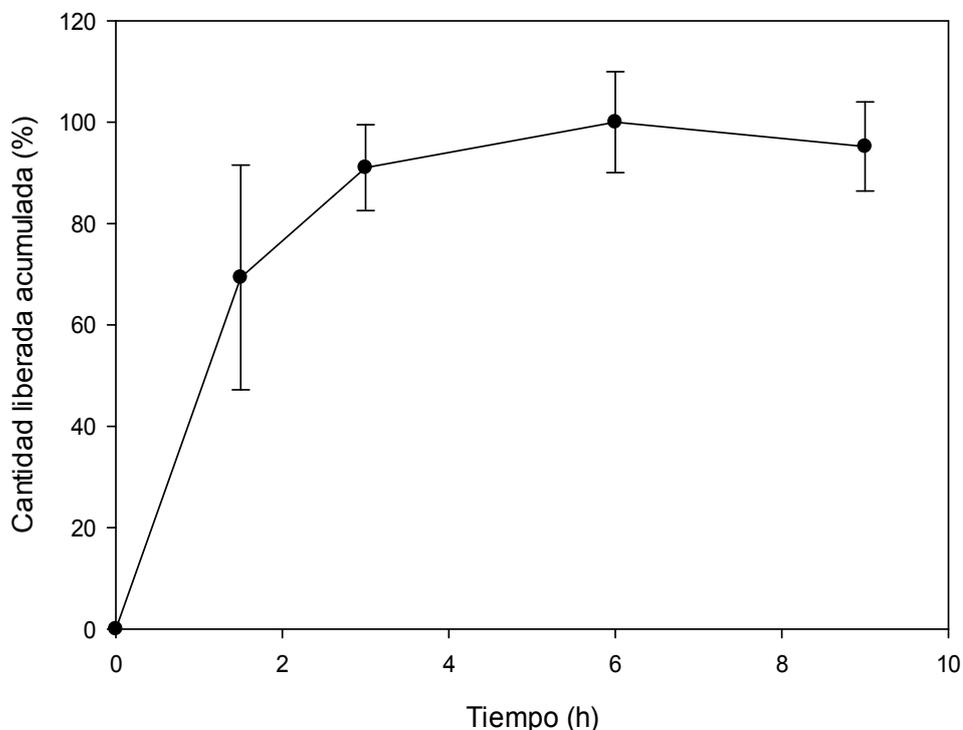


Figura 4-8 Velocidad y ajuste de modelos cinéticos para la liberación de NAC a partir de partículas submicrónicas de PLGA-ALE, en PBS.

#### 4.2.5 Velocidad de degradación

Con el fin de observar el cambio al conjugar el polímero y el efecto de la NAC sobre la degradación del polímero a partir del cual se elaboraron las partículas, se fabricaron tres lotes de partículas y se observó la degradación en medio acuoso realizando un seguimiento a la variación del peso molecular promedio de los polímeros empleados (PLGA, PLGA-ALE y PLGA-ALE): el primer ensayo se realizó con el polímero sin conjugar (PLGA), el siguiente, con el polímero conjugado (PLGA-ALE) y por último con el polímero conjugado y con NAC. Las Figuras 4-9 y 4-10 muestran el cambio en el peso molecular promedio ( $M_w$ ) y en la dispersidad ( $\mathcal{D}$ ) del polímero. Ambas variables disminuyen con el tiempo. Hasta el día 7 se observa una disminución en el peso molecular promedio mucho más marcada para el PLGA que para el polímero conjugado. Las Figura 4-11 y 4-12 muestran los cromatogramas normalizados para el PLGA-ALE y PLGA-ALE-NAC tanto del inicio como del cuarto día de la degradación; el proceso de normalización de cada

cromatograma se realizó dividiendo la altura de cada punto sobre la mayor altura obtenida para cada cromatograma. Cuando se emplea la técnica de GPC para la determinación de pesos moleculares promedio en polímeros, se observa que los polímeros de mayor peso molecular son los primeros en abandonar la columna del cromatografo, mientras que los de pesos moleculares menores emplean más tiempo. En la Figura 4-11 se observa que la distribución de pesos moleculares para los más grandes (tiempos de residencia entre 12 y 16 minutos) es prácticamente la misma tanto para el PLGA-ALE como para el PLGA-ALE-NAC, mientras que para los tiempos de residencia mayores a 17,5 minutos se observa un pequeño incremento en la presencia de moléculas de bajo peso molecular, para las muestras que tienen presencia de NAC. Al comparar el comportamiento del peso molecular para las muestras en el día cuarto de hidrólisis, en presencia y ausencia de NAC se observa un efecto hidrolítico por parte del compuesto activo que se puede ver en la Figura 4-12, donde se muestran los cromatogramas normalizados para este día, y se observa que entre los tiempo de retención de 12 y 14,5 minutos existe mayor presencia de polímeros de alto peso molecular para la muestra de PLGA ALE comparada con la muestra de PLGA-ALE-NAC, esta tendencia se invierte entre los 14,5 y 16,3 minutos, indicando mayor presencia de cadenas de menor peso molecular para el PLGA-ALE-NAC. Para los tres polímeros empleados se encontró que el peso molecular disminuyó con el tiempo de hidrólisis; para el PLGA la degradación total en el tiempo medido fue de 92.6%, mientras que para el PLGA-ALE-NAC fue de 48 % y finalmente para el PLGA-ALE fue de 40.5%.

Con el fin de comparar los datos cinéticos encontrados con otros valores reportados, se ajustó un modelo cinético de orden uno para cada una de las degradaciones (Tabla 4-3). Para los ajustes cinéticos no se tuvieron en cuenta los puntos a los 19 y 26 días para los polímeros PLGA-ALE y PLGA-ALE-NAC, dado el carácter anómalo de los mismos.

Tabla 4-3 Constantes de velocidad para distintos polímeros de PLGA

Polímero	Grupo terminal	Mw (Da)	k (days <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	Ref
PLGA (50/50) (SP)	éster	5000	0,0820	0,927	E.T.
PLGA-ALE (SP)		6000	0,0159	0,9702	E.T.
PLGA-ALE-NAC (SP)		4400	0,0163	0,773	E.T.
PLGA (53/47) (NP)	ácido	11000	0,1210	0,94	[198]
PLGA (50/50) (M)	éster	9500	0,0180	NR	[199]
PLGA (50/50) (M)	ácido	8000	0,0500	NR	[199]
PLGA (50/50) (M)	ácido	21000	0,0440	NR	[199]
PLGA (50/50) (M)	éster	12700	0,0240	NR	[199]
PLGA (75/25) (NP)	NR	96800	0,0768	0,97	[200]
PLGA (53/47) (Film)	éster	NR	0,0630	0,981	[201]
PLGA (85/15) (Scaffold)	NR	120000	0,0315	NR	[202]
PLGA (53/47)	NR	40000	0,0184	0,981	[203]
PLGA (48/52) NP	NR	44000	0,0251	0,975	[204]

NR: No Reportado; SP: Partículas submicrónicas; M: micropartículas; Mw: Peso molecular promedio

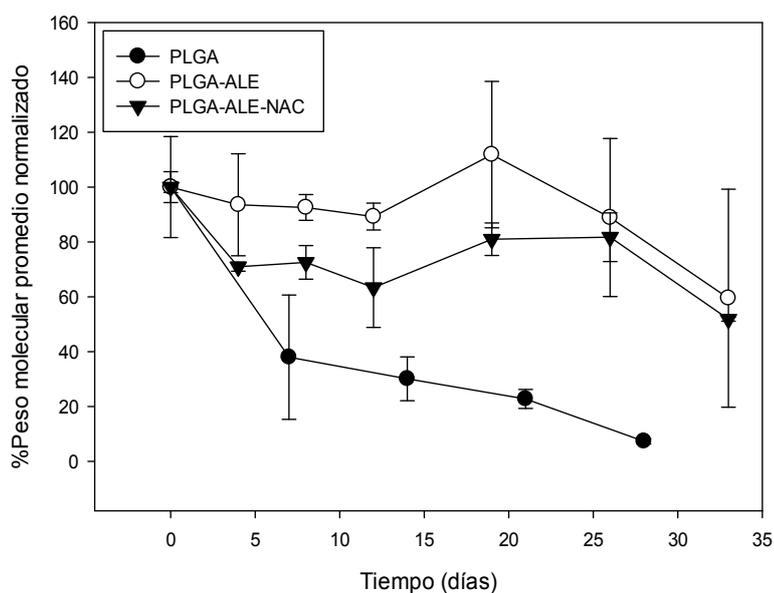


Figura 4-9 Cinética de degradación de las partículas submicrónicas de PLGA-ALE y PLGA

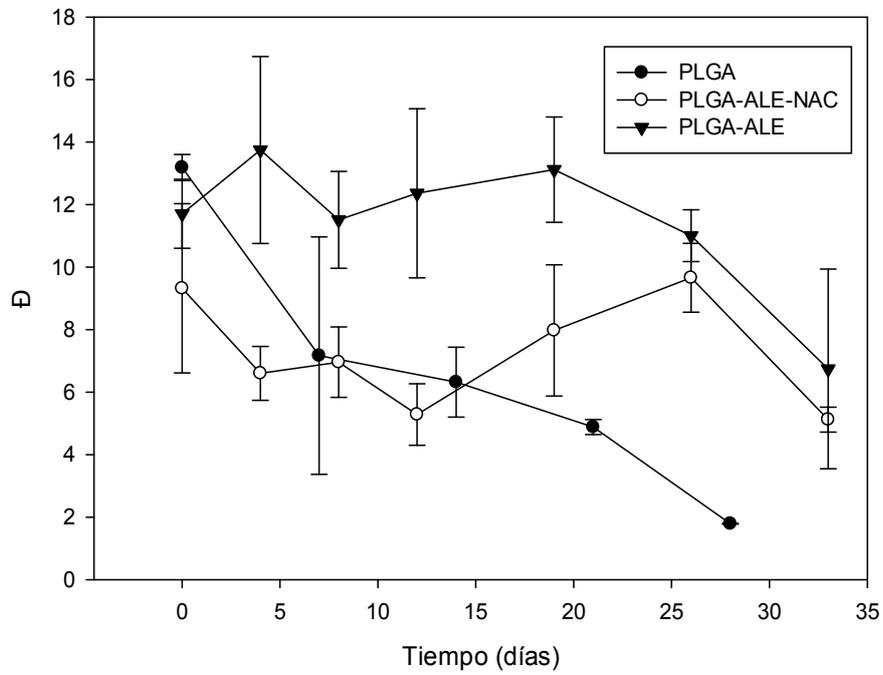


Figura 4-10 Dispersidad ( $\mathcal{D}$ ) para los polímeros durante la cinética

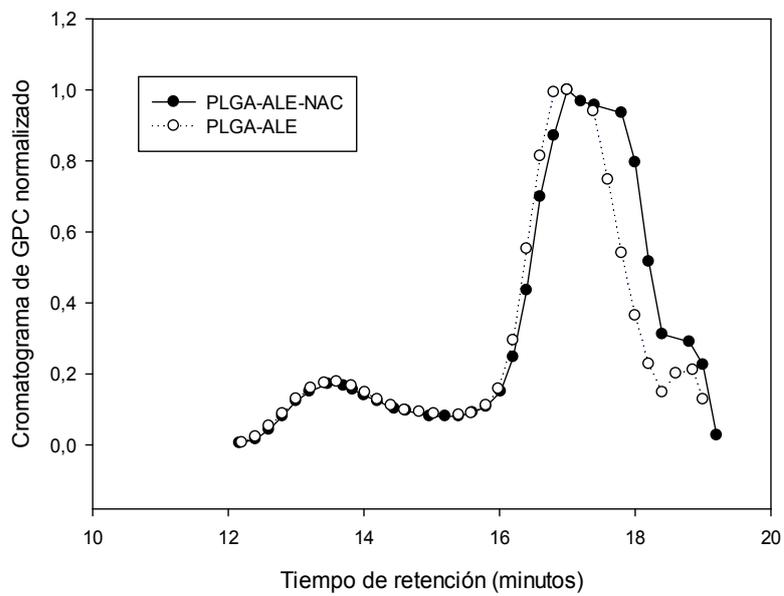


Figura 4-11 Cromatograma normalizado para el inicio de la degradación

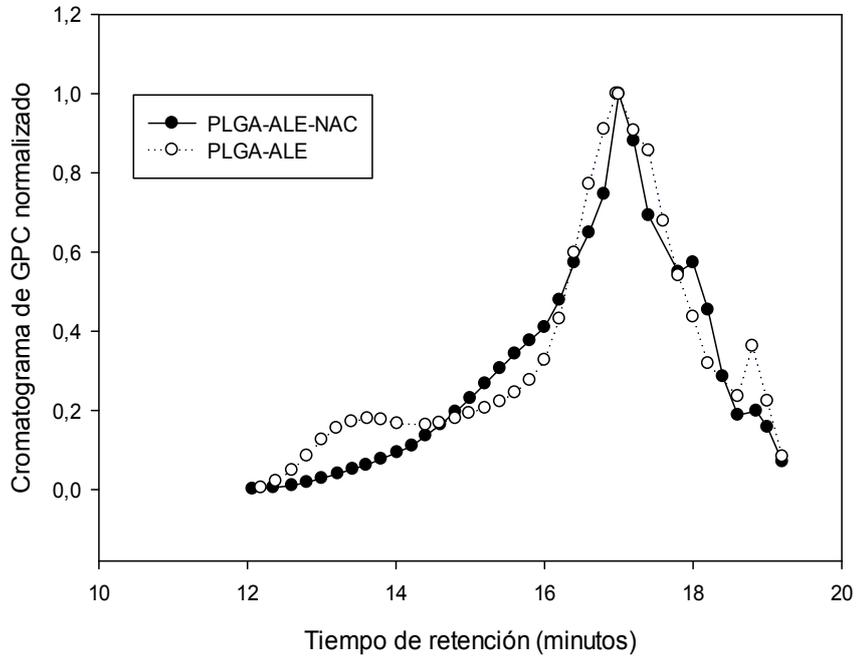


Figura 4-12 Cromatograma normalizado para el 4 día de degradación

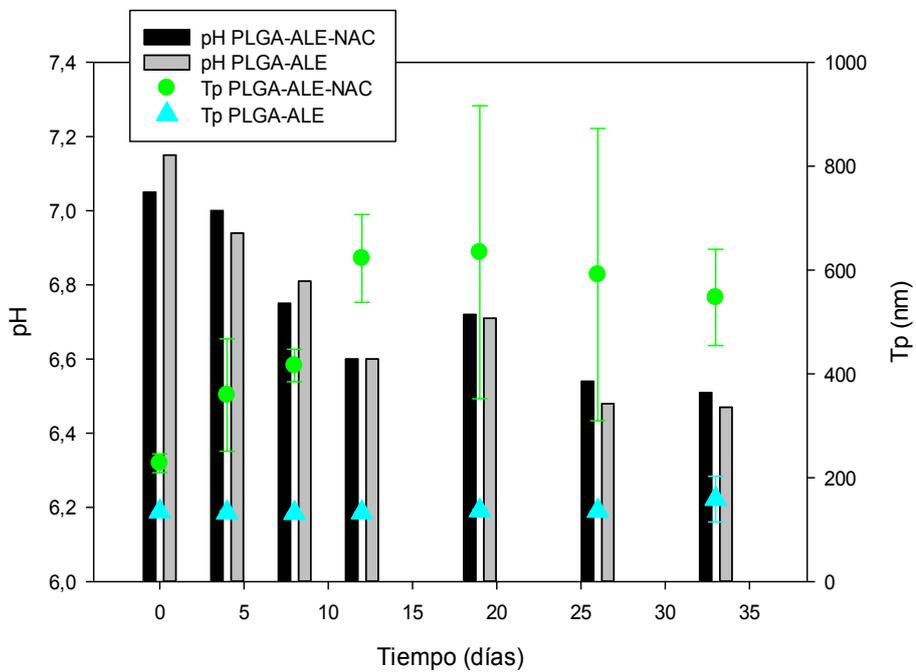


Figura 4-13 Cambio en el pH y tamaño de partícula

La Figura 4-13 muestra el seguimiento al pH y tamaño de partícula. El pH inicia en valores neutros y a medida que pasa el tiempo, este se va acidificando, terminando en 6.5. Esto se da como resultado de la liberación al medio acuoso de ácido glicólico y láctico por parte de la degradación del polímero. Datos similares se han reportado en otras investigaciones [202], [205].

El tamaño de partícula permanece casi constante para las muestras de PLGA-ALE ( $p < 0.05$ ) solo se observa un pequeño incremento al finalizada la degradación. Mientras que las muestras que tienen el compuesto activo (PLGA-ALE-NAC) se observa agregación con el paso del tiempo, particularmente a partir de los 12 días, cuando el tamaño de partícula se incrementa al doble del valor inicial, de ahí en adelante permanece sin cambios significativos.

#### Discusión

Se obtuvo un material conjugado de PLGA y alendronato como agente que direccionara las partículas hacia el tejido óseo. La reacción de conjugación se realizó gracias al grupo amina que posee el bifosfonato, de manera que reacciona con el extremo carboxilo terminal del polímero formando un enlace amida. Las pruebas de afinidad por el tejido óseo, mostraron que el bifosfonato mantiene su atracción por la hidroxiapatita a pesar de encontrarse unido al polímero.

La formación del conjugado de PLGA-ALE que fue confirmado mediante análisis de NMR y FTIR. Se realizaron pruebas de potencial zeta para comparar si existía una diferencia, encontrándose que la presencia de alendronato dentro de la estructura del polímero disminuye el potencial zeta del mismo, pasando de -48,1 a -33,3. Este comportamiento se debe a la desaparición del carboxilo terminal de la cadena polimérica, ya que al reaccionar con el alendronato, este grupo desaparece. El tamaño de partícula también se ve alterado, ya que se incrementó en aproximadamente un 20% por la presencia del alendronato, esto podría indicar que la presencia de grupos carboxilo terminal de polímero se ubicarían hacia el exterior de las partículas, y por esto el potencial zeta sería más negativo (-48,1), de manera que se incrementarían las interacciones hidrofóbicas hacia el interior, generando un centro más denso y disminuyendo el tamaño de partícula. Al ser neutralizados los carboxilos terminales por el alendronato, esto crearía una nueva distribución de cargas

dentro de la partícula que generaría partículas un poco más grandes, menos densas y con menor carga negativa.

Las partículas de PLGA-ALE producidas por la mezcla de solventes sin la presencia de NAC tenían un tamaño de 174,8 nm, valores similares han sido reportados por Avnet y colaboradores [103] (188 nm) empleando el método de nanoprecipitación con la misma concentración de polímero y mezcla de solventes, lo que indica que la técnica de preparación es reproducible.

Cuando se adiciona NAC el tamaño de partícula se incrementa, pasando de 174,8 a 228 nm y el potencial zeta pasa de -33,3 a -17,8 mV, indicando que existe una interacción entre el polímero y la NAC que hace que el tamaño de partícula se incremente y el potencial zeta se acerque un poco más a cero. Esto podría indicar que las moléculas del compuesto activo se distribuyen tanto en el interior como en el exterior de las partículas, incrementando el radio hidrodinámico y variando las interacciones entre las partículas y el agua. Ya que si solo se depositaran al interior no debería alterarse el valor del potencial zeta. Esto indicaría que parte de la NAC puede quedar adsorbida sobre la superficie de las partículas, hecho que se corrobora con la cinética de liberación de la NAC, ya que pasadas 1,5 h se observa que el compuesto activo se libera rápidamente del material (cerca del 70%), indicando que parte del compuesto se encontraría adsorbido de manera superficial sobre el material y por esto se libera de manera rápida.

El porcentaje de NAC cargada obtenida fue de 1,74%, valores similares han sido reportados para compuestos hidrófilos obtenidos por nanoprecipitación [130], [206]. Akbar y colaboradores han reportado porcentaje de NAC cargada de 5%, para partículas de PLGA, [118] aunque el método de obtención empleado fue de electrospray.

En cuanto a la velocidad de liberación de NAC a partir de las partículas submicrónicas, se encontró un comportamiento bifásico, con una primera etapa de velocidad alta, seguida de un periodo de velocidad baja (Figura 4-8). Se ha encontrado que la etapa de liberación rápida (etapa *burst*), corresponde con el comportamiento esperado para la liberación de compuestos de bajo peso molecular y alta solubilidad en medios acuosos [207]. Esto se debe a que la liberación de la NAC se da por el transporte difusivo gracias al gradiente de concentración entre el interior y el exterior que hace que el compuesto migre de manera rápida, ya que al ser un compuesto de bajo peso molecular y tamaño pequeño (radio de

3,7 Angstrom, asumiendo que el compuesto sea una esfera) que viaja a través de los poros del interior de la partícula. Dichos poros, pueden llegar a medir entre 9,6 y 24,7 nanómetros para partículas similares [208]. Esto hace que sea muy fácil y rápida la migración. Lo anterior, se ve ratificado al ajustar diferentes modelos cinéticos y encontrar que el propuesto por Higuchi es el que mejor ajuste presenta, pues dicho modelo supone que la liberación del compuesto activo se da principalmente por difusión [209].

Akbar y colaboradores reportan la liberación de NAC a partir de partículas de PLGA, identificando también un comportamiento bifásico, con una liberación rápida del compuesto, seguida de un periodo de estabilidad. El seguimiento que realizan se hizo durante 48 horas, llegando a una liberación cercana al 100%. Esto contrasta con los resultados del presente trabajo que se realizó durante 33 días, determinándose que a partir de las 9 horas la concentración de NAC fue disminuyendo con el tiempo, y a partir de las 24 horas no se detectó la presencia del compuesto. Esto como consecuencia de la posible dimerización del compuesto activo, tal como lo reportan otras investigaciones [119], [210].

En cuanto a la cinética de degradación de las partículas submicrónicas que se observa en la Figura 4-9, se ve que la modificación del polímero con el alendronato, afecta la velocidad de degradación, ya que el valor para la constante cinética para el PLGA es superior a la del polímero conjugado (PLGA-ALE), indicando una mayor velocidad de degradación para el PLGA. Aunque no existe una diferencia apreciable entre las constantes cinéticas para el PLGA-ALE y el PLGA-ALE-NAC, sí se observa que es mayor el valor cuando se encuentra presente la NAC, indicando que aunque pequeño, sí existe un efecto hidrolítico por parte del compuesto activo, dicho efecto se observa de manera más pronunciada durante los primeros 4 días de hidrolisis, ya que después el compuesto activo pierde actividad al igual que su efecto hidrolítico. Dicho efecto se puede deber a que el pH de las soluciones de NAC es ácido y al ser liberado al medio, puede bajar el valor del pH y con esto convertirse en un catalizador para la reacción de degradación. Otras investigaciones en las cuales también se atrapan compuestos hidrófilos han encontrado que la presencia de dichos compuestos afecta la velocidad acelerando la degradación del polímero [198], [203]. En cuanto al PLGA-ALE se observa que la presencia del alendronato disminuye la velocidad de degradación, ya que el valor de la constante de velocidad ( $0,0159 \text{ días}^{-1}$ ) es inferior al obtenido para el polímero sin modificar (PLGA) y es similar a los valores reportados para micropartículas fabricadas con polímeros terminados en ester ( $0,018 \text{ días}^{-1}$ ).

1). Esto indicaría que la neutralización del carboxilo terminal de la cadena polimérica puede atenuar la degradación del polímero.

La presencia de NAC genera inestabilidad en las partículas, tal como se observa en la Figura 4-13. Esto se debe a la probable interacción entre el compuesto activo y el polímero, neutralizando la carga superficial, disminuyendo el potencial zeta y generando agregación. Caso contrario al que se observa para las partículas sin la presencia del compuesto activo, ya que el tamaño de partícula permanece casi constante con el tiempo. Zweers y colaboradores también reportan una variación pequeña en el tamaño de partícula para nanopartículas de PLGA que no se encuentran cargadas con algún compuesto activo [211].

Al comparar las cinéticas de degradación con la de liberación se puede afirmar que para cuando se inicia la degradación, la mayor parte de la NAC ha sido liberada, confirmándose que la liberación se da por difusión y no por erosión del material polimérico.

#### **Conclusiones:**

Se fabricaron partículas submicrónicas de PLGA-ALE-NAC con un tamaño de 228 nm, que atrapan 1,74% de NAC; dichas partículas mostraron tener afinidad por el tejido óseo, lo que sugiere que podría transportar y direccionar el compuesto activo hacia dicho tejido. La NAC se libera de manera rápida las primeras 1,5 h, después baja la velocidad de liberación. Las partículas le brindan estabilidad al compuesto, ya que una vez liberado el compuesto este se dimeriza, perdiendo actividad. De otro lado, el alendronato direcciona al polímero y adicionalmente le brinda protección contra la hidrólisis. Una vez liberado podría tener acción farmacológica sobre el tejido óseo, esto si el tratamiento terapéutico se realiza sobre pacientes que sufran de osteoporosis, así el vehículo no solamente transportaría un antioxidante poderoso sino un agente antiresortivo. Pasado un mes las partículas han perdido casi un 50% de su peso molecular inicial, indicando el carácter biodegradable del vehículo, hecho que lo hace un buen candidato para liberar de manera controlada medicamentos direccionados hacia el tejido óseo. Es necesario optimizar la cantidad de NAC con el fin de poder ampliar la cantidad que se puede transportar y realizar estudios para verificar su efectividad en un modelo in vitro como in vivo.

## **5. Evaluación de la actividad biológica de la NAC atrapada en partículas submicrónicas de PLGA-ALE en un modelo *in vitro***

Una vez se determinó la metodología para fabricar partículas submicrónicas de PLGA-ALE que atraparán NAC, y estas fueron caracterizadas, se realizaron una serie de ensayos con el fin de verificar si el compuesto activo después de ser sometido al proceso de atrapamiento dentro de partículas submicrónicas poliméricas mantenía su actividad biológica. Para esto se realizó un cultivo con células similares a osteoclastos y se confirmó si la actividad antioxidante de la NAC se mantenía o no, comparando con el comportamiento del compuesto en solución. A continuación se realiza una breve descripción del tejido óseo, las células que lo componen, el modelo de células similares a osteoclastos, y la descripción de algunos de los indicadores que serán tenidos en cuenta para confirmar la actividad biológica de la NAC.

*Tejido óseo:* forma parte del tejido conectivo y está compuesto por células y componentes extracelulares calcificados que conforman la matriz ósea. Su composición química promedio es de un 25% agua, 45% minerales como fosfato y carbonato de calcio y un 30% de materia orgánica [52], [212], [213].

La materia orgánica está a su vez compuesta en un 90% por colágeno de tipo 1, y algunas proteínas exclusivas del hueso como la osteocalcina y la osteopontina entre otras. La matriz inorgánica está compuesta principalmente de fosfato cálcico presente en forma de cristales de hidroxiapatita que aparecen a intervalos regulados de 60 a 70 nm a lo largo de las fibras de colágeno. También posee citrato, bicarbonato, fluoruro, magnesio e iones sodio [57], [212], [213].

La composición de los huesos no permanece fija, sus moléculas son intercambiadas y reemplazadas en un proceso denominado remodelación ósea, esto permite que los huesos

mantengan sus propiedades mecánicas y físicas en el tiempo. Se estima que un 10% del esqueleto cambia cada año. La remodelación involucra 4 tipos diferentes de células: osteoprogenitoras, osteoblastos, osteocitos y osteoclastos [49], [214], [215].

Las células osteoprogenitoras son de origen mesenquimal, tienen la propiedad de diferenciarse hacia condroblastos u osteoblastos, son células que persisten hasta la vida postnatal y se hallan en casi todas las superficies libres de los huesos, son más activas durante la fase de crecimiento óseo y cuando se genera alguna fractura. Los osteoblastos son las células responsables de la síntesis de la matriz ósea y participan en el proceso de mineralización, estos son influenciados por hormonas como la paratiroide, prostaglandinas, estrógenos, vitamina D y algunas citocinas. Estas células están activas durante el proceso de formación del hueso y en el proceso de remodelación ósea.

Los osteoclastos son células grandes (20 – 100  $\mu\text{m}$ ) multinucleadas de origen hematopoyético con linaje mononuclear-fagocítico y responsables del proceso de resorción (degradación del hueso) que se da en el proceso de remodelación ósea. Como característica principal expresan de la Fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), el receptor de calcitonina (CT-R), la anhidrasa carbónica, la ATPasa vacuolar, la Catepsina K y la capacidad de resorber hueso. Los osteoclastos maduros no sintetizan ADN, es decir no tienen actividad mitótica, por lo cual no es posible su proliferación. Se sabe que múltiples factores locales y hormonas sistémicas, como la hormona paratiroidea (PTH), regulan la formación y diferenciación de los osteoclastos, así como el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos es requerido en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas; RANKL (“receptor activador de NF $\kappa$ B ligand”, pertenece a la familia del TNF, es producido por diversas células, incluyendo algunas del sistema inmunitario, células de la pared vascular y osteoblastos/estroma) y RANK (receptor de RANKL situado en la membrana de osteoclastos y pre-osteoclastos). La interacción entre RANKL y su receptor RANK produce una activación de la diferenciación y de la actividad osteoclástica, aumentando la resorción.

Los osteocitos son células que se encuentran en hueso completamente formado ya que residen en lagunas en el interior de la matriz ósea mineralizada. Su forma se adapta al de

la laguna y emiten prolongaciones digitiformes largas que se extienden por los canaliculos de la matriz ósea y esto los pone en contacto con otros osteocitos. [57], [212], [216]

En cada ciclo de remodelado, las células que recubren la superficie ósea son reemplazadas por osteoclastos, que durante un periodo de dos semanas excavan una laguna o cavidad en el tejido óseo. Posteriormente, los osteoclastos son reemplazados por osteoblastos que depositan matriz ósea y gradualmente rellenan el espacio reabsorbido (formación ósea). El impacto de este proceso a nivel tisular viene determinado por el número de unidades de remodelado en el esqueleto y por el balance final de cada ciclo, es decir, por la diferencia entre la cantidad de tejido resorbido y formado en cada unidad. Cuando hay un incremento absoluto o relativo de la resorción frente a la remodelación se produce una pérdida de masa ósea. Ello debe a un aumento de la resorción a consecuencia de que los osteoclastos escavan cavidades muy profundas que los osteoblastos son incapaces de reemplazar (recambio óseo alto), o bien por recambio óseo bajo reflejado en la falta de capacidad para producir y/o mineralizar la matriz ósea que ocurre por disminución en el número de unidades de remodelación (disminución en el número de osteoclastos y osteoblastos). El remodelado es necesario para mantener la unidad estructural del esqueleto y ayudar a su función metabólica como almacén de calcio y fosforo, estando altamente regulado tanto por factores sistémicos como locales. [49], [57], [216], [217]

Durante la menopausia y en la post menopausia, existe una excesiva actividad osteoclástica, porque disminuyen los niveles de estrógeno y esto ocasiona que se libere menos osteoprotegerina (OPG) del osteoblasto, un bloqueador natural de RANKL. De esta manera hay una mayor actividad de RANKL sobre su receptor RANK, en el preosteoclasto, lo cual induce diferenciación y mayor actividad del osteoclasto, removiendo el componente mineral y la matriz orgánica [218]. OPG inhibe la diferenciación sobrevivencia y fusión de los precursores de osteoclastos, bloquea la activación de los osteoclastos maduros e induce a su apoptosis. Si hay suficiente OPG en el medio se unirá al RANKL de los osteoblastos impidiendo su interacción con el RANK de los precursores osteoclásticos lo que frenará el proceso de funcionalización osteoclástica [219]. El equilibrio resortivo está dado por la interacción osteoblasto-osteoclasto, y para mantenerlo también se requiere de factores de crecimiento locales como las prostaglandinas y proteínas sistémicas como la 1,25 (OH)<sub>2</sub> Vitamina D<sub>3</sub>, la PTH, hormonas tiroideas y la insulina, entre otros, cada una con una función determinada pero interrelacionada a la acción de las otras hormonas.[52]

El proceso de resorción implica degradar la fase inorgánica del hueso la cual está constituida por una fase mineral de hidroxiapatita, seguida por la degradación de la parte orgánica del hueso formada en su mayoría por colágeno tipo I (>90%) y proteínas no colágenas. La desmineralización del hueso involucra la acidificación del microambiente extracelular, este proceso es mediado por la enzima vacuolar H<sup>+</sup>-ATPasa (similar a una bomba de protones) localizada en la membrana rizada. El pH intra-osteoclastico es mantenido debido a un abundante transporte de protones por un intercambiador independiente de energía (Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) sobre la superficie opuesta a la membrana rizada (antiresortiva) del osteoclasto mediado por la anhidrasa carbónica II (CAII) a partir de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O [216]. Finalmente la electro neutralidad es preservada por un canal de cloro en la membrana rizada. El resultado de este transporte de iones es la secreción de HCl en el microambiente de resorción llevando a un pH aproximado de 4.5 [220], [221], sumándose a ello la expresión de enzimas líticas como TRAP y pro-CATK, en un pozo de resorción denominado lagunas de Howship o lagunas de resorción. El receptor de Calcitonina, es un regulador importante de homeostasis de Ca<sup>+2</sup> por su acción inhibitoria sobre la resorción ósea en los osteoclastos. La calcitonina liberada por la glándula tiroides, se une a los osteoclastos y causa un aumento del AMPc, e interfiere en los mecanismos de transporte de fosforo y calcio a través de la membrana. La liberación del calcio y el fosforo es reducida al igual que la extensión de la degradación del colágeno. Durante la resorción, la fase orgánica del hueso se degrada por proteasas lisosomales como la capticina K y los productos de la degradación ósea inorgánicos son transportados y liberados en la superficie antiresortiva.

**Marcadores de actividad osteoclastica:** a continuación se describen algunos de los principales indicadores de la actividad osteoclastica y que se emplearon en el presente estudio.

*Metaloproteinasas de matriz (MMP):* son proteínas de matriz, que se encargan de degradar el colágeno y otros componentes de la matriz extracelular ósea [222]–[225].

*Integrina  $\alpha_v\beta_3$  (IB3):* es una glicoproteína que pertenecen a la familia de las proteínas transmembranales, que se encuentran involucradas en diversos procesos celulares como la adhesión del osteoclasto a la matriz extracelular, el reconocimiento célula a célula y la organización del citoesqueleto. Se encuentran altamente expresadas en células

endoteliales y en osteoclastos. Son esenciales en la maduración de los osteoclastos y en la resorción. Su ausencia durante a osteoclastogénesis genera osteoporosis. Se encuentran localizadas en la zona de sellado de los osteoclastos y pueden establecer uniones no solo a la matriz extracelular, también a ligandos endógenos que incluyen proteínas solubles y se unen a la secuencia de aminoácidos arginina-glicina y ácido aspártico (RGD) que se encuentran en los receptores de vitronectina y osteopontina entre otros [49], [226].

*ATPasa*: aunque existen varias formas de ATPasas, la vacuolar H<sup>+</sup> al producir hidrogeniones, es la responsable por la generación del microambiente ácido (pH 4,5) que se tiene entre la zona borde de cepillo y la zona de sellado para formar las llamadas lagunas de resorción. Esta enzima mantiene el equilibrio entre los hidrogeniones presentes en la laguna de resorción y el interior de los osteoclastos [227], [228].

*DC-STAMP (Proteína transmembranal específica para células dendríticas)*: es una proteína transmembranal originariamente identificada en células dendríticas o en macrófagos estimulados con IL-4, recientemente se ha reportado que induce la diferenciación a osteoclastos, ya que se encuentra ampliamente expresada en osteoclastos mas no en macrófagos. Se ha identificado que interviene en el proceso de fusión celular de los osteoclastos [229], [230].

*Anhidrasa carbónica (CA II)*: es una enzima que cataliza la conversión de dióxido de carbono y agua a bicarbonato y protones. Mantienen el balance ácido-base en la sangre y otros tejidos. La anhidrasa carbonica II se encuentra presente en las etapas tempranas de la diferenciación de los osteoclastos, facilita el transporte de protones necesario para la generación del microambiente ácido requerido para el proceso de resorción; también actúa como mediador de las hormonas que estimulan el proceso resorptivo y la formación de osteoclastos [231], [232].

*Catepsina K (CK)*: esta es una colagenasa que se expresa en los osteoclastos, siendo la enzima proteolítica más abundante. Su función principal es la degradación del colágeno tipo I tanto a pH ácido como neutro. La acidificación del espacio pericelular de los osteoclastos aumenta la liberación de la catepsina K para promover la proteólisis extracelular. Esta enzima es decisiva en la remodelación ósea, especialmente en la ruptura de colágeno [233], [234].

*Receptor de Calcitonina (CTR)*: une a calcitonina, que es una hormona que formada por 32 aminoácidos, secretada por la tiroides y que tiene como función la regulación del metabolismo del calcio ya sea inhibiendo la resorción ósea o incrementando la excreción del calcio vía renal. La expresión de este receptor está directamente relacionado con la resorción ósea [235]–[237].

*ADAM 12*: es miembro de la familia de las proteínas desintegrinas y metaloproteasas ADAM. Son glicoproteínas que se encuentran en la superficie de celular y tienen funciones implicadas con la adhesión celular, migración, señalización proteolítica y degradación de proteínas de matriz extracelular ósea. Se han encontrado tanto en osteoblastos como en osteoclastos, lo que sugiere que puede tener una función regulatoria en el hueso. Análisis de inmunohistoquímica han encontrado su presencia en células ubicadas en las lagunas de resorción, lo que indica que se encuentran involucradas en la resorción ósea [238]–[242].

*TRAP (Fosfatasa ácida tartrato-resistente)*: es una enzima que se encuentra en los huesos, células dendríticas y en el sistema inmune. Se conocen dos isoformas: 5a es una glicoproteína con un complejo rico en manosa y ácido siálico en el extremo y 5b, glicoproteína con azúcares complejos sin ácido siálico, se encuentra presente en los osteoclastos y es un indicador del número y actividad de los mismos. Se le asocian varias funciones tanto en el esqueleto como en el sistema inmune, ya que es expresada por osteoclastos, macrófagos, células dendríticas entre otras. Juega un papel crítico en procesos que incluyen el desarrollo óseo, síntesis y degradación de colágeno, mineralización de la matriz ósea, producción de citocinas por parte de células dendríticas y macrófagos. Adicionalmente, pueden degradar fosfoproteínas como la osteopontina [243], [244].

*Especies reactivas de oxígeno (ROS)*: son moléculas que contienen oxígeno y son producidas durante el metabolismo [245], [246]. Estas moléculas incluyen radicales libres, iones de oxígeno y peróxidos. Generalmente son de tamaño pequeño y altamente reactivas, que se forman de manera natural como subproducto del metabolismo del oxígeno y juegan un papel importante en la señalización celular [246], [247]. El estrés oxidativo se asocia a procesos de envejecimiento, inflamatorios y degenerativos [16], [248], [249].

El envejecimiento y la deficiencia de estrógenos incrementan la generación de ROS, que se asocia a una pérdida ósea, la cual se podría tratar con el uso de antioxidantes [246].

Estudios indican que las especies reactivas de oxígeno, incluyendo  $O_2^{\bullet-}$  y el peróxido de hidrógeno pueden regular el proceso de diferenciación a osteoclastos [16], [245], [247], [250]. Diferentes investigaciones se han realizado adicionando antioxidantes como el ácido  $\alpha$  lipoico [249], [251], [252], ácido ascórbico [7], [14], [251], [253], N-acetilcisteína [254]–[258], licopeno [259]–[261], resveratrol [262], [263], rutin [251], [264], simvastatin [101], [265], [266], entre otros y se ha encontrado que atenúan la resorción ósea.

**Modelo para generar un cultivo in vitro de células similares a osteoclastos:** dado que los osteoclastos son células que no tienen actividad mitótica por lo tanto no se reproducen, no es posible encontrar líneas celulares de osteoclastos; esto ha generado una serie de estrategias para desarrollar cultivos de células similares a osteoclastos. Murillo y colaboradores, desarrollaron un modelo de células similares a osteoclastos a partir de células de tipo monocito-macrofago empleando las líneas celulares U937 o J774; dichas células fueron fusionadas empleando polietilenglicol (PEG), siguiendo un protocolo para la fusión de hibridomas. Una vez fusionadas las membranas celulares, se procedía a sembrar las células fusionadas sobre láminas de hueso cortical bovino y se dejaban estabilizar durante 4 a 6 horas, esto con el objetivo de finalizar el proceso de fusión y que se adhirieran a las láminas de hueso. Pasado ese tiempo se adicionaba medio de cultivo y se incubaron durante 4 días [11], [267].

## 5.1 Materiales y métodos

### 5.1.1 Materiales

Fabricación de partículas submicrónicas: PLGA RG 503 H terminado en ácido (Molecular weigh 24 -38 kDa), N-acetilcisteína, Pluronic F127 marca Bioreagent, todos adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Dimetilsulfóxido R.A. (DMSO) marca Panreac (Panreac Applichem, Barcelona, España), Acetona R.A. marca Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Inmunohitoquímica: se usaron anticuerpos contra Metaloproteinasas (MMP) (SC-6840) , la subunidad  $\beta_3$  de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  (IB3) (SC-6627), la subunidad C1 de la ATPasa Vacuolar

H<sup>+</sup> VI (ATPC1) (SC-14756), DC-STAMP (Proteína transmembranal específica para células dendríticas) (SC-98769), Anhidrasa carbónica II (CAII) (SC-25596), Catepsina K (CK), (SC-30056), ADAM-12 (disintegrina y metaloproteasa 12) (SC-16527) y receptor de calcitonina (CTR) (SC-20743), anticuerpo conjugado anti cabra/conejo-FITC, todos fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA).

Medios de cultivo y fusión celular: Los medios de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) y Roswell Park Memorial Institute (RPMI), y el suero fetal bovino (SBF) fueron adquiridos de Invitrogen/Gibco (Carlsbad, CA, USA). Polietilenglicol 1450 (PEG), alendronato sódico trihidratado, N-acetilcisteína, DAPI, HOECHST 33342 (0,016ng/mL) y DHE fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### **5.1.2 Producción y caracterización de partículas submicrónicas**

Se realizó de acuerdo con la metodología del numeral 4-1

### **5.1.3 Láminas de hueso cortical bovino**

Las láminas fueron manipuladas de acuerdo al procedimiento sugerido por Helfrich y Ralston [268]. Para esto se obtuvo un hueso bovino de escápula, que fue lavado y retirado los residuos de tejido suave, por medio de un bisturí. Posteriormente fue cortado y lijado hasta obtener láminas de aproximadamente 4 X 4 X 0,5 mm. Las láminas fueron esterilizadas por radiación UV (30 minutos por cada cara) previo enjuague con etanol 75%.

### **5.1.4 Cultivos celulares**

Se empleó un cultivo de la línea celular U937 (línea celular de monocitos humanos ATCC CRL-1593.2 proveniente de un linfoma histiocítico que crecen en suspensión en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SBF), que han sido cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% suero fetal bovino (SBF) en frascos T25 a 37 °C con CO<sub>2</sub> (5%); hasta que han metabolizado el medio de cultivo; a continuación se centrifugaron a 400×g por 5 minutos, se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 2 mL de medio

de cultivo fresco (DMEM suplementado con SFB al 10%) para realizar un conteo celular en cámara de Neubauer, el cual debe estar alrededor de  $1,5 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>.

### 5.1.5 Fusión celular

Se siguió la metodología sugerida por Murillo y colaboradores [11], [267] que se explica a continuación. Las células provenientes del cultivo fueron contadas, divididas en dos lotes y centrifugadas a 700 g durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el tubo se colocó boca abajo sobre gaza estéril para retirar el medio de cultivo remanente. Esto se realizó para evitar diluir el PEG usado. A continuación a uno de los tubos se le adicionó 50 µL de PEG 1450 (50 %p/v) para obtener una concentración de  $6,02 \times 10^4$  cel/µL y se dieron pequeños golpes para resuspender durante 5 minutos, sin disgregar los agregados. Pasado este tiempo fueron adicionados 50 µL de medio DMEM cada 30 segundos durante 10 minutos y 100 µL cada 30 segundos durante 5 minutos, de acuerdo con la técnica de fusión reportada para la fusión de hibridomas [269]. Al tubo que no se le adicionó PEG se le agregó la misma cantidad de medio (2 mL). Estas células sin fusionar sirvieron de control de la resorción a las células fusionadas con PEG. Una vez diluido el PEG, ambos tubos fueron centrifugados por 10 minutos a 700 g, lavados con DMEM y resuspendidos con medio fresco suplementado con SBF (10%).

### 5.1.6 Siembra y cultivo

Se sembraron cerca de 20 µL de células fusionadas y no fusionadas (aproximadamente  $8 \times 10^5$  células fusionadas/mL) sobre láminas de hueso cortical bovino (0.4 cm x 0.4 cm x 0.5 mm) en cajas de 48 pozos que fueron incubadas durante 4 h a 37 °C, 95% humedad relativa y 5% CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo, se adicionaron 400 µL de medio DMEM suplementado con SFB (10%) y con el tratamiento a aplicar, de la siguiente manera:

1. Suplemento del medio de cultivo con NAC (30 mM)
2. Suplemento del medio de cultivo con NAC (30 mM) atrapado en partículas submicrónicas de PLGA-ALE (NAC-NP)
3. Suplemento del medio de cultivo con partículas de PLGA-ALE sin NAC
4. Suplemento del medio de cultivo con partículas de PLGA
5. Suplemento del medio de cultivo con alendronato (concentración similar a la adicionada con las partículas de PLGA-ALE, aproximadamente 0,6 mg/pozo)

6. Células que solamente son suplementadas con el medio de cultivo (control positivo)

Los dos primeros tratamientos fueron realizados para comparar el comportamiento de la NAC en solución con la atrapada dentro de las partículas (NAC vs NAC-NP). Los tratamientos 3 y 4 fueron realizados para verificar el efecto del material sintetizado que contiene alendronato, frente al material que no lo tiene (PLGA-ALE vs PLGA). El tratamiento 5 se realiza para verificar el efecto del alendronato cuando está solo y poder comparar con el material modificado con alendronato (PLGA-ALE). El tratamiento 6 se realiza para verificar si las células fusionada se comportan como células similares a osteoclastos (control positivo).

Las células sembradas sobre las láminas de hueso fueron incubadas durante 4 días. Luego, a unas láminas óseas se les analizó las especies de oxígeno reactivas (ROS), se adicionó paraformaldehído (4% concentración final) y se dejó a temperatura ambiente protegido de la luz durante 30 minutos. Las demás células se fijaron con acetona/etanol (50:50 v/v) por 40 min a 4 °C y realizadas pruebas para detectar la presencia de marcadores osteoclasticos, presencia de la enzima TRAP y lagunas de resorción.

### **5.1.7 Inmunohistoquímica indirecta**

Las células cultivadas sobre las láminas de hueso cortical bovino se fijaron como se mencionó anteriormente y se lavaron 3 veces con PBS. Luego se permeabilizaron con una solución acuosa de saponina (0,1%), 0,8 M buffer HEPES y 0,5 M de NH<sub>4</sub>Cl, por 30 minutos a 4 °C. Se incubaron con 20 µL del anticuerpo primario (0,4 µg/ml) a 37 °C durante 1 hora en PBS con saponina al 0,1%. Fueron empleados los anticuerpos (10 µg/ml) primarios contra DC-STAMP, CAII, CK, CT-R, ATPasa (provenientes de conejo) y MMP, IB3 y ADAM 12 (provenientes de cabra). Pasado este tiempo, las láminas fueron lavadas 3 veces con PBS y se adicionaron 20 µL del anticuerpo secundario correspondiente (anti conejo o cabra) que estaba conjugado con fluoresceína 5 isotiocianato (FITC, 0,0008 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>) y DAPI con una concentración de 1 µg/ml y se incubó a temperatura ambiente en total oscuridad durante 30 minutos. Finalmente las láminas fueron lavadas 3 veces con PBS y se observaron en el microscopio, empleando el equipo CYTATION 3, con los objetivos 4X y 10X, con un filtro verde (485/528) para FITC y azul (360/460) para DAPI.

Se tomaron mínimo 6 fotos de campos representativos dentro de cada lámina. Una vez finalizado esto, las imágenes fueron procesadas empleando el software GEN5 de Biotek® para determinar el número de células (se observa gracias a la tinción con DAPI, se ven células de color azul, tal como se observa en la Figura 5-2) y la fluorescencia de cada una (la fluorescencia se ve con el filtro verde, observándose una coloración verde intenso, tal como se ve en la Figura 5-2). Se encuentra la fluorescencia basal para cada lámina y se determina el número de células con fluorescencia positiva (superior al valor de fluorescencia basal para cada foto). Posteriormente se hace la relación entre células fluorescentes positivas y células totales y se multiplica por 100 para expresarlo en porcentaje. Como control negativo, se realizó la prueba de inmunofluorescencia indirecta para una lámina de hueso en la que no se habían sembrado ningún tipo de células.

### **5.1.8 Evaluación de las lagunas de resorción**

Para esto, se tomó la lámina con las células, se lavaron tres veces con PBS, y con el fin de desprenderlas se adicionó buffer de lisis RIPA durante 120 minutos. Para eliminar los residuos celulares o células no lisadas del hueso se frota cuidadosamente con un cepillo dental de cerdas suaves. Finalmente se realizó una tinción con azul de Commassie adicionando 30  $\mu$ L del colorante y dejándolo actuar durante 30 minutos sobre la lámina de hueso. Para las láminas que presentaron sobre coloración, se realizó una decoloración con una mezcla de metanol – ácido acético – agua, 50:10:30 en volumen, hasta encontrar el contraste necesario para ver las lagunas de resorción, en microscopio óptico similares a la que se observa en la Figura 5-8. Las láminas de hueso se observaron al microscopio óptico empleando los objetivos 4X y 10X (Olympus BX 41) y se tomaron fotografías con la cámara digital del mismo. El área de la resorción de cada fotografía se evalúa mediante un programa computacional de análisis de imágenes (ImageJ 1.3, Wayne Rasband National Institutes of Health, disponible gratis en <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y se expresaron en porcentaje total de área de resorción.

### **5.1.9 Evaluación de la presencia de la enzima fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP)**

Una vez las células fueron cosechadas, se determinó el número de células con presencia de la enzima fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP). Se realizó empleando la

metodología sugerida por Murillo y colaboradores [270], que a continuación se describe brevemente. Las células fueron fijadas con acetona/etanol (50:50 v/v) por 40 minutos a 4 °C. Luego, las láminas se sumergieron en una solución compuesta por buffer veronal que contenía barbitona de sodio (ácido barbitúrico al 0,53% y NaOH al 1,1%) y acetato de sodio (3,84%); a esta buffer se le adicionó tartrato de sodio y potasio (2,8 mg/mL), luego se agregó una mezcla formada por pararrosanilina hexasotizada (4%) y nitrito de sodio (4%). Finalmente se adicionó como sustrato de la enzima una solución de naftol fosfato (0,0126%) en dimetilformamida. A la solución final se le ajustó el pH a 4,3 +/- 0,2. Las células fueron incubadas con 200 µL de solución durante 2 h a 37 °C y finalmente se lavaron 2 veces con 500 µL de PBS.

Para evaluar la presencia de la enzima TRAP, se realizó un conteo de las células que presentaran coloración rojo ladrillo (ver Figura 5-7) empleando el microscopio óptico. El conteo se realizó en toda la superficie de la lámina ósea empleando el objetivo 40X.

### **5.1.10 Evaluación de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS)**

Se realizó empleando DHE (dihidro-etidio o 3,8-diamino-5,6-dihidro-5 etil-6 fenilfenantridina) como colorante; compuesto que no es fluorescente, y puede entrar fácilmente al interior de la célula, reaccionando con las especies reactivas de oxígeno formado 2-hidroietidio, compuesto fluorescente de color rojo. Las láminas de hueso con las células que fueron sometidas a los diferentes tratamientos, se les adicionó 30 µL de medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SFB, DHE (2,5 µL/µL de medio) y HOESCHT (2,5 µL/mL de medio). Las células fueron incubadas durante 30 minutos a 37 °C, 95% humedad relativa y 5% CO<sub>2</sub>. A continuación se adicionó paraformaldehído al 4% y se dejó a temperatura ambiente protegido de la luz durante 30 minutos. Finalizado este tiempo se realizaron 2 lavados con PBS y se mide la fluorescencia emitida empleando el microscopio del equipo CYTATION 3 (Biotek®), con los objetivos 4X y 10X, con un filtro rojo (531/593) para el DHE y azul (360/460) para HOESCHT. Se tomaron mínimo 6 fotos de campos representativos dentro de cada lámina. Una vez finalizado esto, las imágenes son procesadas empleando el software GEN5 de Biotek® para determinar el número de células y la fluorescencia de cada una. Se encuentra la fluorescencia basal para cada

lámina y se determina el número de células con fluorescencia positiva es decir con fluorescencia superior a la basal. Posteriormente se hace la relación entre células fluorescentes positivas y células totales y se multiplica por 100 para expresarlo en porcentaje. Como control negativo, se realizó la prueba de inmunofluorescencia indirecta para una lámina de hueso sin ningún tratamiento.

**Análisis estadístico:** los datos fueron analizados empleando análisis de varianza en una vía y con un nivel de significancia de 0,05.

## 5.2 Resultados

### 5.2.1 Características de las partículas submicrónicas producidas

Los ensayos *in vitro* se realizaron con partículas de PLGA-ALE y PLGA producidas por el método de nanoprecipitación, empleando acetona-DMSO (1:1 v/v) como solvente con tamaños inferiores a 230 nm (Tabla 5-1) y monodispersas, pues los índices de polidispersidad fueron inferiores a 0,15. Los valores del potencial zeta muestran una pequeña diferencia entre la carga superficial de las partículas con y sin compuesto activo, lo que indicaría un cambio en la carga de la superficie, probablemente debida a la presencia de la NAC. La cantidad de compuesto activo cargado fue de 1,74%

Tabla 5-1 Características fisicoquímicas de las partículas submicrónicas de PLGA-ALE

Polímero	Compuesto			
	activo	Tp (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
PLGA-ALE	NAC	228,13	0,105	-17,8
PLGA-ALE	--	174,8	0,104	-33,3
PLGA	--	139	0,080	-48,1

### 5.2.2 Determinación de la presencia de marcadores de osteoclastos.

Es conocido que la NAC ha sido empleada como agente antioxidante en cultivos de células similares a osteoclastos y se ha encontrado que hay disminución en la presencia de

marcadores de actividad osteoclástica [7], [15], [17]. Se realizó la determinación de la expresión de varios marcadores, con el objetivo de verificar si al atrapar NAC dentro de partículas, podría llegar a afectar su acción biológica. Para esto se determinó la presencia de ocho marcadores moleculares para osteoclastos por inmunofluorescencia indirecta. Adicionalmente se determinó el efecto que podría tener el vehículo ya que este posee como ligando un bifosfonato (solo partículas de PLGA-ALE) y el efecto que tendría el material sin ligando (partículas de PLGA). La Figura 5-1 muestra los resultados de los diferentes marcadores osteoclásticos.

El primero de los marcadores de actividad osteoclastica que se determinó fue la presencia de la metaloproteinasa de matriz extracelular (MMP), proteína que interviene en la degradación de la matriz extracelular ósea. En la Figura 5-1 se observa que la presencia de NAC en solución baja la expresión de esta proteína en un 72%, mientras que NAC-NP logra atenuarla en un 36,1%; el efecto del vehículo (PLGA-ALE) lo hace en un 57,3% y el del vehículo sin alendronato lo hizo en un 0%. El análisis estadístico (ANOVA  $p < 0,05$ ) mostró que si existía diferencia estadística entre los tratamientos y al realizar la comparación de medias (DLS) entre NAC y NAC-NP se encontró que, si existía diferencia, mostrando un mejor desempeño la NAC libre que la atrapada en partículas. En cuanto al efecto del material del vehículo (PLGA-ALE vs PLGA) se encontró que también había diferencia observándose que las partículas de PLGA-ALE lograban atenuar la presencia de este marcador, mientras que las partículas de PLGA no tenían ningún efecto sobre la actividad de MMP.

El segundo de los marcadores determinados fue la subunidad  $\beta_3$  de la integrina  $\alpha_v\beta_3$  (IB3). En la Figura 5-1 se observa que la expresión de esta no se ve atenuada por la NAC libre, y la presencia de NAC-NP la disminuye apenas un 8,7%, mientras que el vehículo de PLGA-ALE lo hace en un 28,2% y el de PLGA un 4%. El análisis estadístico (ANOVA  $p < 0,05$ ) mostró que no hay una diferencia estadística entre los tratamientos empleados, lo que sugiere que pudo existir un error al manipular el anticuerpo empleado, que generó los resultados que se encontraron.

El tercero de los marcadores determinados fue la presencia de la subunidad C1 de la ATPasa Vacuolar  $H^+$  VI (ATPC1). En la Figura 5-1 se observa que la presencia de NAC disminuye la expresión de esta proteína en un 73,4% y la NAC-NP en un 82,2%, las

partículas de PLGA-ALE lo hacen en un 45,6% y las de PLGA en un 60%. El análisis estadístico (ANOVA  $p < 0,05$ ) mostró que si existía diferencia estadística entre los tratamientos y al realizar la comparación de medias (DLS) entre NAC y NAC-NP se encontró que ambos tratamientos eran estadísticamente similares, indicando que el proceso de atrapamiento no afectaba la actividad biológica. En cuanto al efecto del material del vehículo (PLGA-ALE vs PLGA) se encontró que ambos tratamientos eran similares, indicando que la presencia del vehículo no cambiaba la expresión de esta proteína.

El cuarto de los marcadores de actividad osteoclastica que se determinó fue la presencia de DC STAMP, una proteína que interviene en el proceso de fusión celular de los osteoclastos. En la Figura 5-1 se observa que la expresión de ésta se ve atenuada por la NAC libre en un 50,4% mientras la NAC-NP lo hace en un 37,4%. Ninguno de los dos vehículos empleados atenuó la expresión de la proteína, por el contrario, para las partículas submicrónicas de PLGA encontró un 58% más del marcador comparado con el control positivo, esto se pudo deber a que las células se adaptaron mejor a esa lámina ósea y crecieron mejor, comparado con el control positivo. El análisis estadístico (ANOVA  $p < 0,05$ ) mostró que, si hay una diferencia estadística entre los tratamientos empleados, y al realizar la comparación de medias (DLS) entre NAC y NAC-NP no se encontró diferencia estadística, resultados similares se obtuvieron para los tratamientos de PLGA y PLGA-ALE lo que sugiere que la NAC atrapada tiene la misma actividad que la que se encuentra en solución y que los vehículos empleados no interfieren en la expresión de la proteína.

El quinto de los marcadores fue la anhidrasa carbónica II (CAII), una proteína que se encuentra presente en las etapas tempranas de la diferenciación de los osteoclastos. En la Figura 5-1 se observa que la expresión de esta se ve atenuada por la NAC libre en un 48,8% mientras la NAC-NP lo hace en un 55,4%. Ninguno de los dos vehículos empleados atenuó la expresión de la proteína, por el contrario, encontró un 75% más para el PLGA-ALE y doble para PLGA, esto al comparar con el control positivo. Esto se pudo deber a que las células se adaptaron mejor a esa lámina ósea y crecieron mejor, comparado con el control positivo. El análisis estadístico (ANOVA  $p < 0,05$ ) mostró que, si hay una diferencia estadística entre los tratamientos empleados, y al realizar la comparación de medias (DLS) entre NAC y NAC-NP no se encontró diferencia estadística, resultados similares se obtuvieron para los tratamientos de PLGA y PLGA-ALE lo que sugiere que la NAC atrapada tiene la misma actividad que la que se encuentra en solución y que los vehículos empleados no interfieren en la expresión de la anhidrasa carbónica II.

El sexto de los marcadores fue la catepsina K (CK), que es una colagenasa que se encuentra presente en los osteoclastos. En la Figura 5-1 se observa que la expresión de esta se ve disminuida por la NAC libre en un 55,5% mientras la NAC-NP lo hace en un 52%. El vehículo de PLGA-ALE mostró un valor 11% mayor al encontrado para el control positivo, mientras que las partículas de PLGA atenuaron la presencia de la proteína en un 13,7%. El análisis estadístico (ANOVA  $p < 0,05$ ) mostró que, si hay una diferencia estadística entre los tratamientos empleados, y al realizar la comparación de medias (DLS) entre NAC y NAC-NP no se encontró diferencia estadística, resultados similares se obtuvieron para los tratamientos de PLGA y PLGA-ALE lo que sugiere que la NAC atrapada tiene la misma actividad que la que se encuentra en solución y que los vehículos empleados no interfieren en la expresión de la catepsina K.

El séptimo de los marcadores fue Adam 12. En la Figura 5-1 se observa que la expresión de Adam 12 se ve atenuada por la NAC libre en un 85,4% mientras la NAC-NP lo hace en un 93,7%. Las partículas submicrónicas de PLGA-ALE atenuaron la expresión de la proteína en un 59,8%, mientras que las de PLGA no afectaron la expresión de Adam 12, ya que mostraron valores similares a los encontrados para el control positivo. El análisis estadístico (ANOVA  $p < 0,05$ ) mostró que, si hay una diferencia estadística entre los tratamientos empleados, y al realizar la comparación de medias (DLS) entre NAC y NAC-NP no se encontró diferencia estadística, resultados similares se obtuvieron para los tratamientos de PLGA y PLGA-ALE lo que sugiere que la NAC atrapada tiene la misma actividad que la que se encuentra en solución y que los vehículos empleados no interfieren en la expresión de Adam 12.

El octavo de los marcadores de actividad osteoclastica fue el receptor para la calcitonina (CT-R), que se encuentra presente en los procesos resorptivos. En la Figura 5-2 se observa que la expresión del receptor se ve atenuada por la NAC libre en un 76,8% mientras la NAC-NP lo hace en un 61%. Las partículas de PLGA atenuaron la expresión de la proteína en un 32%, mientras que las de PLGA-ALE no la afectaron, pues se encontró una expresión un 21% superior al valor que mostró el control positivo. El análisis estadístico (ANOVA  $p < 0,05$ ) mostró que no hay una diferencia estadística entre los tratamientos empleados, lo que sugiere que el error experimental para este anticuerpo fue grande.

Para resumir el total de los marcadores empleados que fueron medidos por inmunohistoquímica, se construyó la Figura 5-4 promediando la expresión de los diferentes marcadores por tratamiento y la Figura 5-3 se construyó sumando todos los resultados para los diferentes marcadores por tratamiento, de tal manera que se tomó como 100% el valor total que se encontró para las células que no recibieron ningún tratamiento (control positivo) y con respecto a este se determinó el porcentaje de expresión por tratamiento. Como se puede ver, cuando se emplea NAC libre los diferentes marcadores de actividad osteoclastica se expresaron en un 32,1% lográndose una atenuación de 67,9%; para NAC-NP se expresaron en un 39,8%, con una atenuación de 60,2%. Para los diferentes vehículos empleados se encontró que con partículas submicrónicas de PLGA-ALE se expresaron un 68,8% con una atenuación de 31,2%, mientras que las partículas de PLGA se expresaron un 88,8% con una atenuación de 11,2%. Los análisis estadísticos (ANOVA  $p < 0.05$ ) muestran que hay diferencia entre los diferentes tratamientos y al realizar la comparación de medias (DLS) entre NAC y NAC-NP no se encontró diferencia estadística, resultados similares se obtuvieron para los tratamientos de PLGA y PLGA-ALE lo que sugiere que la NAC atrapada tiene la misma actividad que la que se encuentra en solución y que los vehículos empleados no interfieren en la expresión de los diferentes marcadores cuantificados.

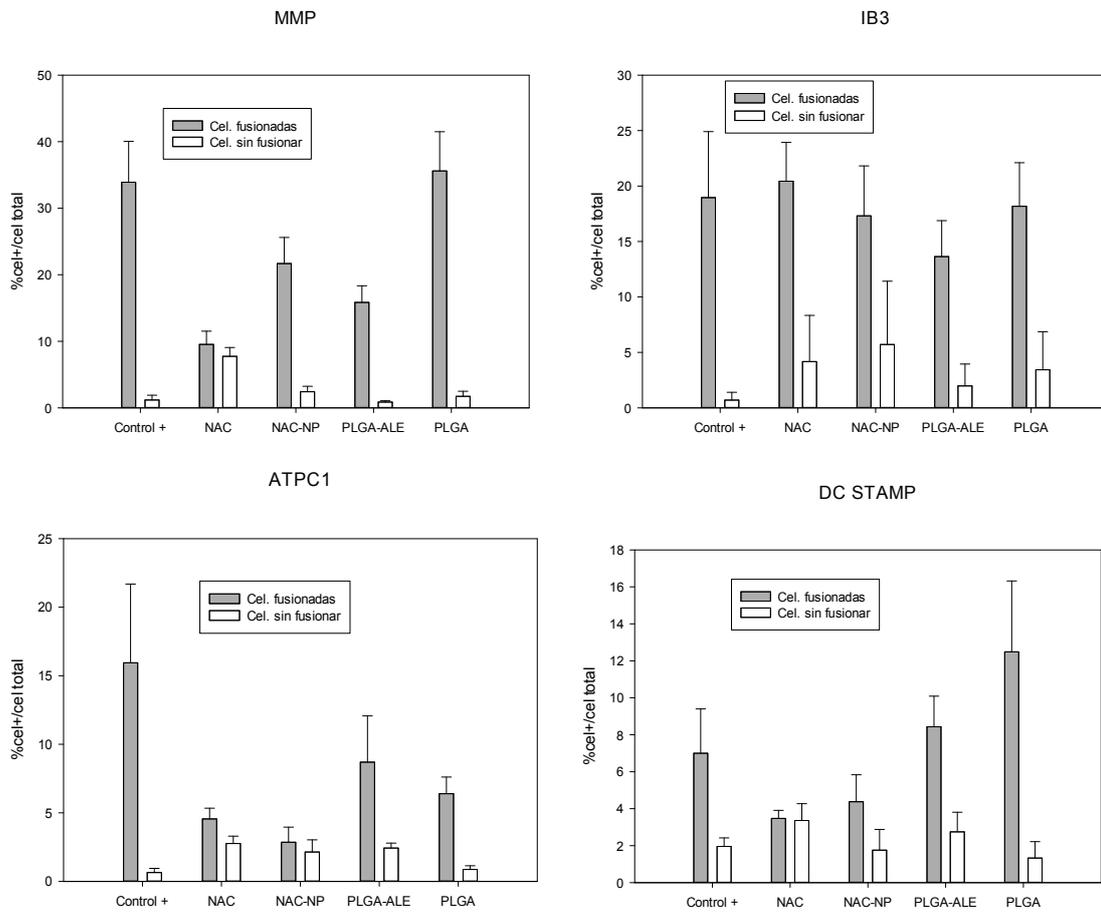
Las células tratadas con NAC libre mostraron menor expresión para todos los marcadores osteoclasticos empleados (excepto IB3). Otros investigadores han reportado resultados similares [7], [15], [18]. Al comparar los resultados entre el uso de NAC libre y atrapada en las partículas (NAC-NP), se puede concluir que no hay diferencia estadística entre los resultados (ANOVA  $p < 0.05$ ) para todos los anticuerpos, con la excepción del marcador MMP, que disminuye 36% la expresión del marcador con NAC-NP y 72% con NAC libre. A pesar que estadísticamente los resultados para estos tratamientos son similares, se pueden observar pequeñas diferencias entre los mismos; por ejemplo, cuando se emplea NAC (A) libre se detectó un 32% de los marcadores, mientras que la NAC-NP (B) lo hace en un 39%. Aunque la diferencia es pequeña permite inferir que el proceso de atrapamiento del compuesto activo logra inactivarlo en un pequeño valor, o que parte del compuesto quedó atrapado en el interior y no salió al terminó del ensayo (4 días).

De lo anterior se puede concluir que el proceso de atrapamiento de NAC dentro de matrices poliméricas de PLGA-ALE no afecta de manera significativa la función biológica de la

misma. Lo anterior es un hallazgo muy importante, ya que, si se quiere emplear este vehículo para el transporte de principios activos, es fundamental que no lo desactive.

Una vez establecido que el vehículo no disminuía la actividad biológica de la NAC, se procedió a investigar el efecto que podría tener el vehículo por sí mismo (PLGA-ALE) y dado que posee un bifosfonato que también puede llegar a tener efecto terapéutico se procedió a comparar con el efecto del mismo vehículo en ausencia del bifosfonato (PLGA). Los resultados para ambos tratamientos muestran que no logran atenuar la presencia de los marcadores en la misma proporción que los tratamientos que tienen NAC. Al comparar los dos tratamientos se observan resultados diversos para los marcadores ATRPC1, CK y CT-R, se encontró que el PLGA atenuaba más la presencia del marcador que el PLGA-ALE, aunque no siempre en la misma proporción, ya que la diferencia fue mínima para la ATRPC1 y CK pero significativa para CT-R. De otro lado, para los marcadores MMP, DC-STAMP, CA II y ADAM 12 el PLGA-ALE atenuó más la presencia del marcador que el PLGA. Nuevamente las diferencias no son siempre las mismas, de manera que para CA II y ADAM 12 no son estadísticamente diferentes (ANOVA  $p < 0,05$ ) mientras que para MMP y DC-STAMP si lo son. En la Figura 5-3 se observa que se expresaron casi el 70% de los marcadores osteoclasticos con el PLGA-ALE, mientras que con el PLGA se encontraron casi el 90%, valor muy cercano al obtenido con las células sin ningún tipo de tratamiento.

Aunque estadísticamente no se encontró diferencia entre el efecto de las partículas submicrónicas de PLGA y PLGA-ALE, si se observó una pequeña disminución en el material de PLGA-ALE lo que sugiere que el alendronato presente en las partículas, aunque pequeño sí puede llegar a tener un efecto biológico sobre algunos de los marcadores osteoclasticos, aunque no es claro el mecanismo de acción.



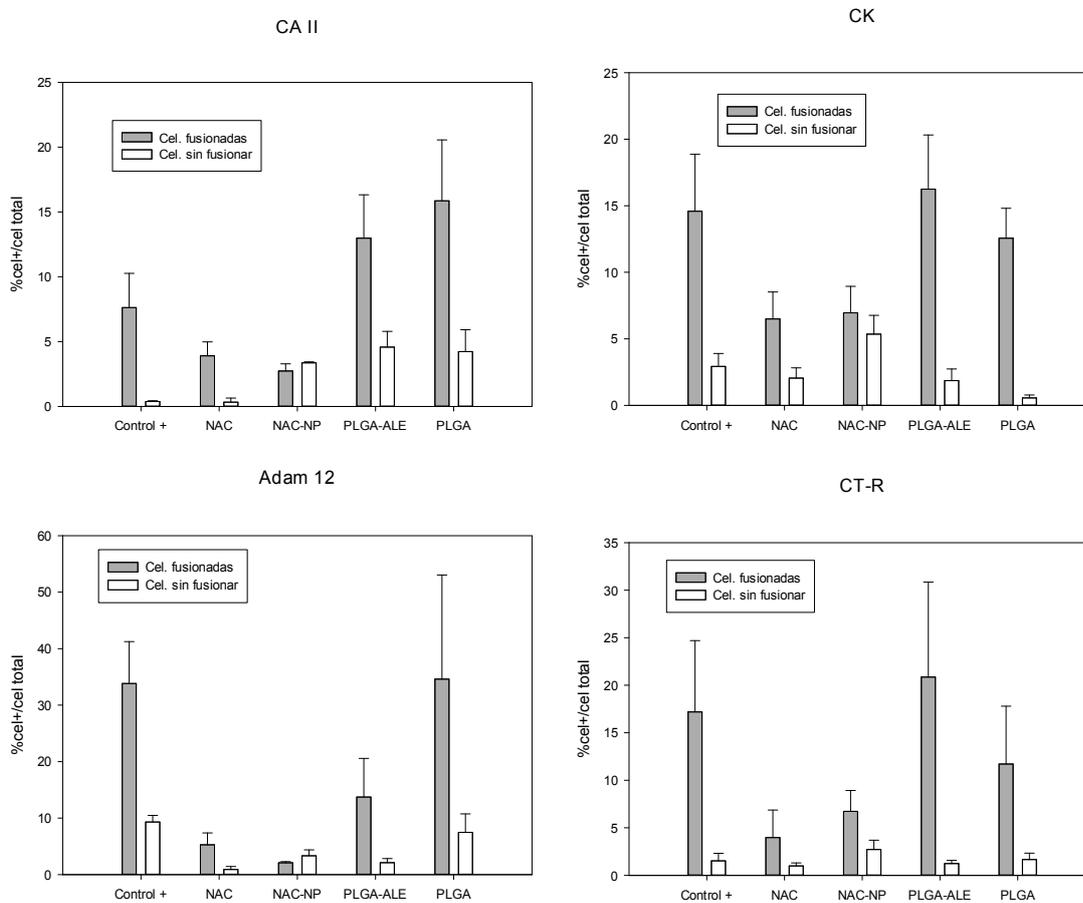


Figura 5-1 Porcentaje de células con presencia de diferentes marcadores osteoclasticos (MMP, IB3, ATPC1, DC-STAMP, CAII, CK, ADAM 12 y CT-R). Células contadas sobre microfotografías de las láminas de hueso obtenidas con el equipo Cytation 3 con el objetivo 10X y procesadas con el software Gen5, para los diferentes tratamientos

### 5.2.3 Evaluación de la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS)

En la Figura 5-6 se observan las células existentes en la lámina de hueso (células visualizadas en color azul) y la fluorescencia roja, que es un indicativo de la presencia de ROS; a mayor intensidad en dicha fluorescencia, mayor es la presencia de ROS en esa célula. Los resultados de la Figura 5-5 confirman el efecto de la NAC tanto libre como en partículas submicrónicas (NAC-NP) sobre las especies reactivas de oxígeno observándose una reducción de la presencia de ROS en un 80,7 y 93,3% respectivamente, comparado con las células a las que no se les suministró el principio activo, es decir el control positivo.

Las partículas submicrónicas de PLGA-ALE disminuyeron la presencia de ROS en un 45,6%, mientras que las de solo PLGA lo hicieron en un 29,3%. Como se quería aclarar si la presencia de alendronato podía tener algún efecto sobre ROS, se adicionó alendronato en la misma concentración que se encuentra en las partículas de PLGA-ALE; como resultado se encontró que bajaba la presencia de ROS en un 11,14%. Los análisis estadísticos (ANOVA  $p < 0,05$ ) mostraron que si había diferencia entre los tratamientos aplicados. Al comparar el efecto de NAC libre con NAC-NP comparando sus promedios (DLS) se encontró que no existía una diferencia estadística significativa. Cuando se comparó el efecto del material de las partículas (PLGA y PLGA-ALE) se encontró que tampoco había diferencia estadística entre los mismos. Finalmente, como se quería aclarar el papel del alendronato, se realizó una comparación de medias (DLS) entre las partículas submicrónicas de PLGA-ALE y el alendronato y se encontró que tampoco existía diferencia estadística.

Se conoce que las especies reactivas de oxígeno (ROS), juegan un papel importante en la diferenciación y el desempeño de los osteoclastos [245], [271]–[275]; es por esto que la NAC ha sido empleada como estrategia para atenuar el funcionamiento de los mismos. Srinivasan y colaboradores ya habían reportado que su uso en células RAW 264.7 estimuladas con RANKL atenuaba la presencia de ROS [16]. Los resultados empleando NAC libre o atrapada (NAC-NP) mostraron resultados similares, confirmando que el proceso de atrapamiento del compuesto activo en un vehículo particulado no afecta su actividad biológica. En cuanto al efecto del vehículo sin la presencia de alendronato (PLGA) se encontró que no tiene efecto sobre ROS. Se conoce que el alendronato actúa sobre la enzima farnesildifosfato sintasa presente en el osteoclasto, no sobre ROS. Por esto, se comparó la presencia de ROS cuando se empleaba PLGA-ALE y solo alendronato en solución y se encontró que no existía diferencia entre estos dos tratamientos; sin embargo, con el complejo PLGA-ALE si se observó una atenuación de 45,6%, lo que podría indicar un posible efecto cuando se encuentra unido al PLGA; el mecanismo por el cual lo hace no es claro, se requerían pruebas adicionales variando la concentración tanto de las partículas de PLGA-ALE, como de alendronato.

#### 5.2.4 Evaluación de la presencia de la enzima fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) y lagunas de resorción

Se ha asociado la presencia de la enzima fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) con la generación de ROS y su presencia en osteoclastos maduros [216], [217], [276]. Las lagunas de resorción, también son un indicativo de la actividad osteoclástica, ya que se forman como consecuencia de la actividad erosiva del osteoclasto sobre la matriz ósea; por lo tanto, para nuestro caso, ambos son indicadores del desempeño de las células similares a osteoclastos que se usaron en el presente ensayo. Las Figura 5-7 y 5-8 muestran que la presencia de NAC libre logra disminuir en un 83,6% la presencia de dichas lagunas, aunque la NAC-NP lo hace en un 76%. Resultados similares se obtuvieron para el número de células TRAP+, ya que NAC libre disminuyó en un 48,7%, mientras que la NAC-NP lo hizo en un 39%. El análisis estadístico (ANOVA  $p < 0,05$ ) mostró que no existía diferencia entre el uso de NAC libre o atrapada. Esto apoya el efecto de NAC en las células similares a osteoclastos. Otros investigadores han reportado resultados similares solamente empleando NAC [7], [15]–[18] ya que no hay reportes en la literatura para NAC-NP.

De otro lado, no se observó efecto biológico por parte del vehículo empleado (PLGA-ALE o PLGA) en relación a afectar el número de células TRAP+ o las lagunas de resorción. Ya que la presencia de PLGA-ALE mostró un 10% más área de resorción y 48% más células TRAP+ comparando con los valores encontrados para el control positivo. El PLGA mostró un 6,2% más área de resorción y 36% más células TRAP+. La comparación entre las medias de los tratamientos (DLS) mostró que no existía diferencia estadística entre los mismos. Cenni y colaboradores realizaron pruebas para verificar la presencia de colágeno 1 y la formación de anillos de actina (ensayos realizados empleando células mononucleares de sangre periférica –CMNSP- estimuladas con el ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa B$  –RANKL- y con el factor estimulante de colonias de macrófagos -M-CSF-) y evaluaron la capacidad antiresortiva empleando partículas submicrónicas de PLGA-ALE y PLGA encontrando que las partículas de PLGA-ALE tenían un efecto antiresortivo, aunque al comparar el resultado con partículas submicrónicas de PLGA se observó que ambos vehículos tenían dicha actividad sugiriendo que el efecto está dado en parte por el PLGA [277].

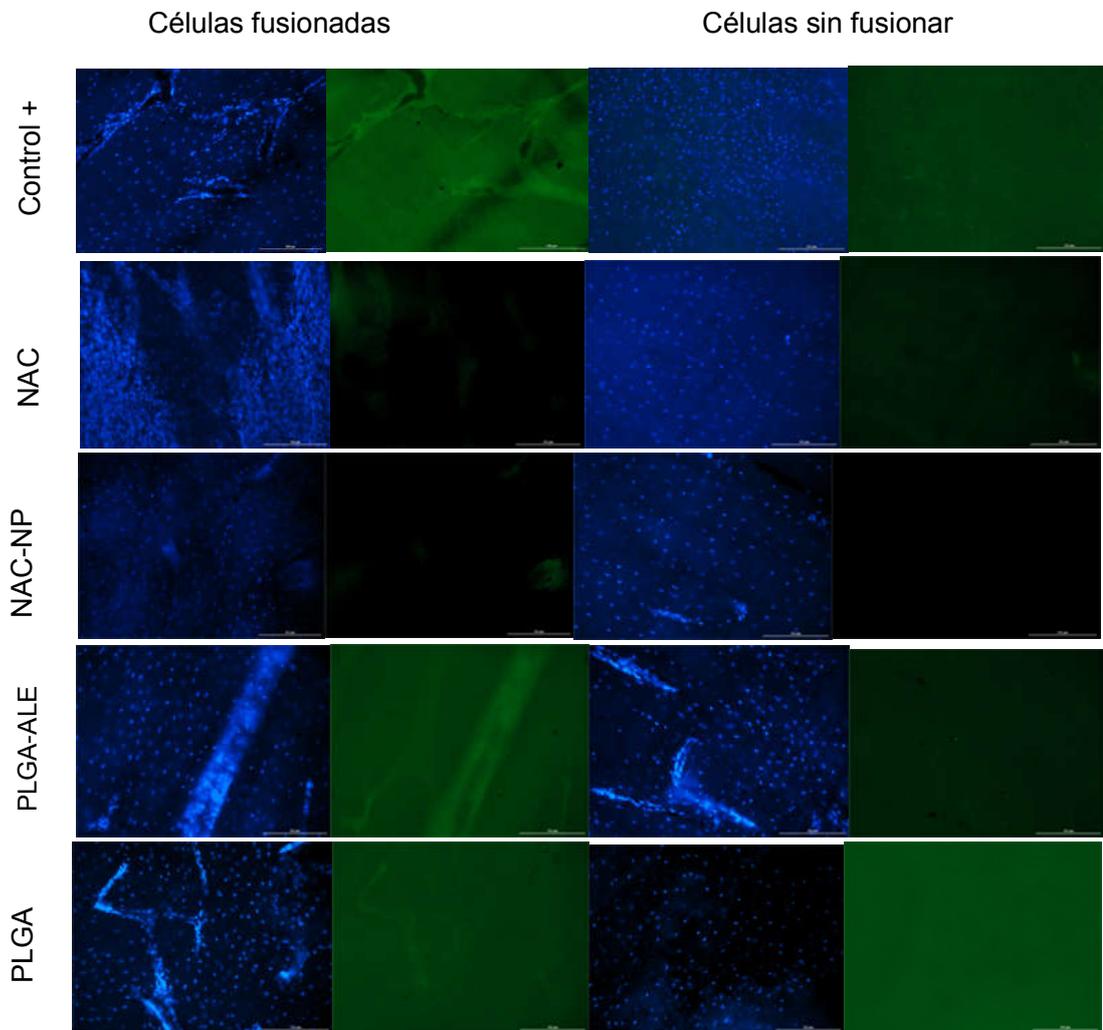


Figura 5-2 Microfotografías representativas de inmunofluorescencia de anticuerpos policlonales para Catepsina K. Tinción con 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DAPI (color azul), fluorescencia obtenida con el filtro verde para FITC. Microfotografías de las láminas de hueso obtenidas con el equipo Cytation 3 con el objetivo 10X y procesadas con el software Gen5, para los diferentes tratamientos.

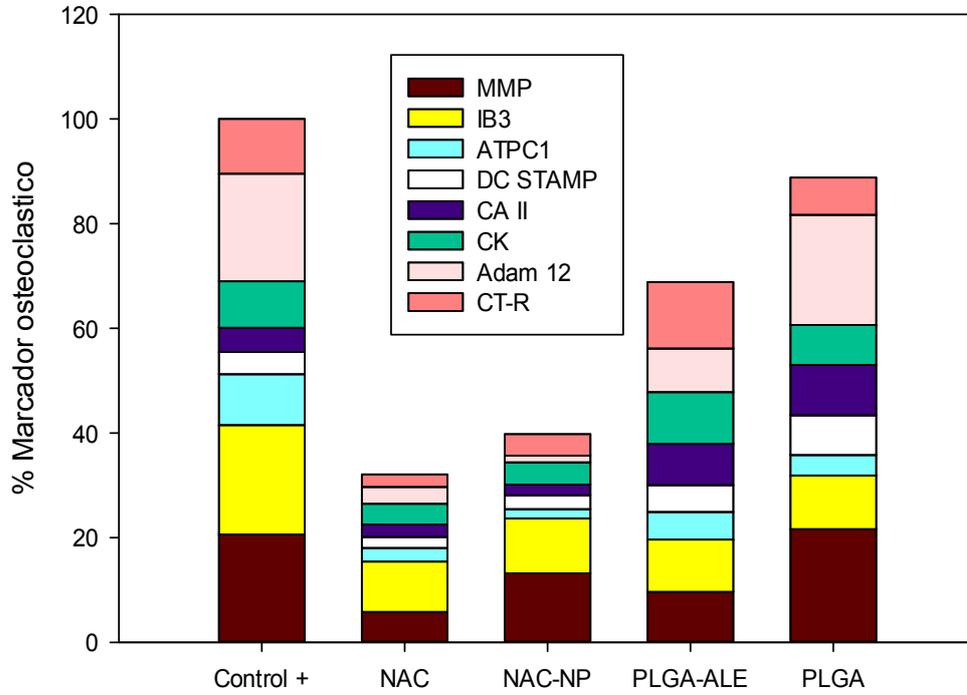


Figura 5-3 Porcentaje total de células que expresan marcadores osteoclasticos.

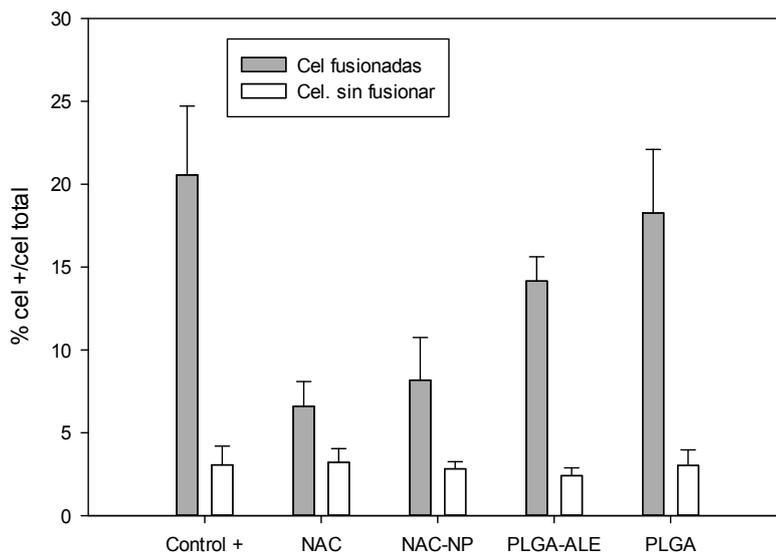


Figura 5-4 Porcentaje promedio de la expresión de todos los marcadores de actividad osteoclastica por tratamiento.

ROS

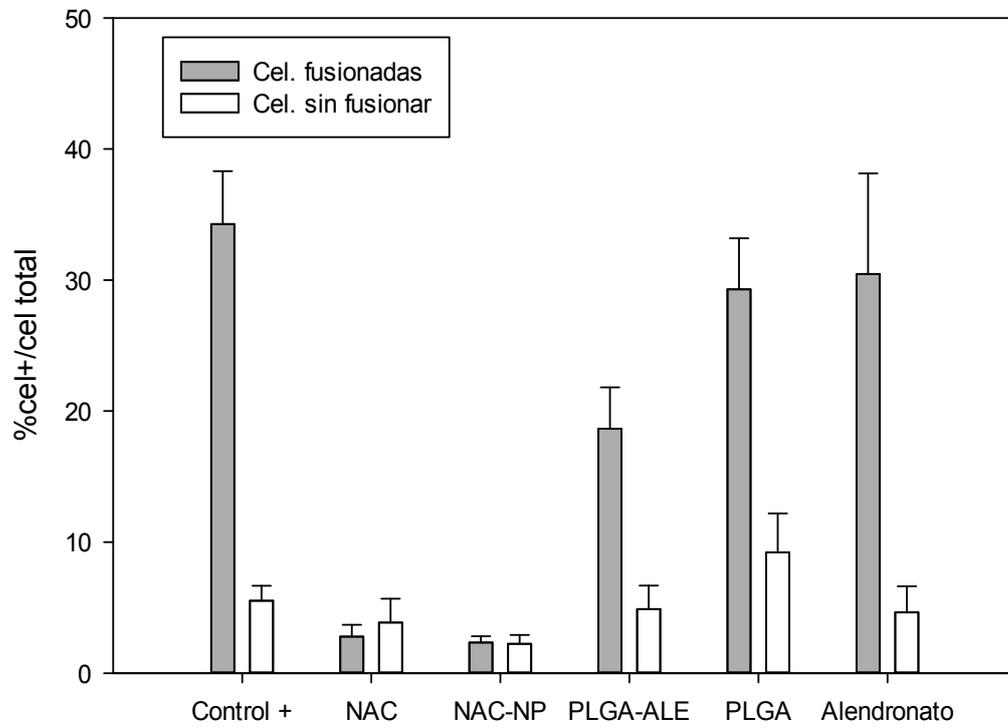


Figura 5-5 Porcentaje de células con presencia de ROS. Células contadas sobre microfotografías de las láminas de hueso obtenidas con el equipo Cytation 3 con el objetivo 10X y procesadas con el software Gen5, para los diferentes tratamientos.

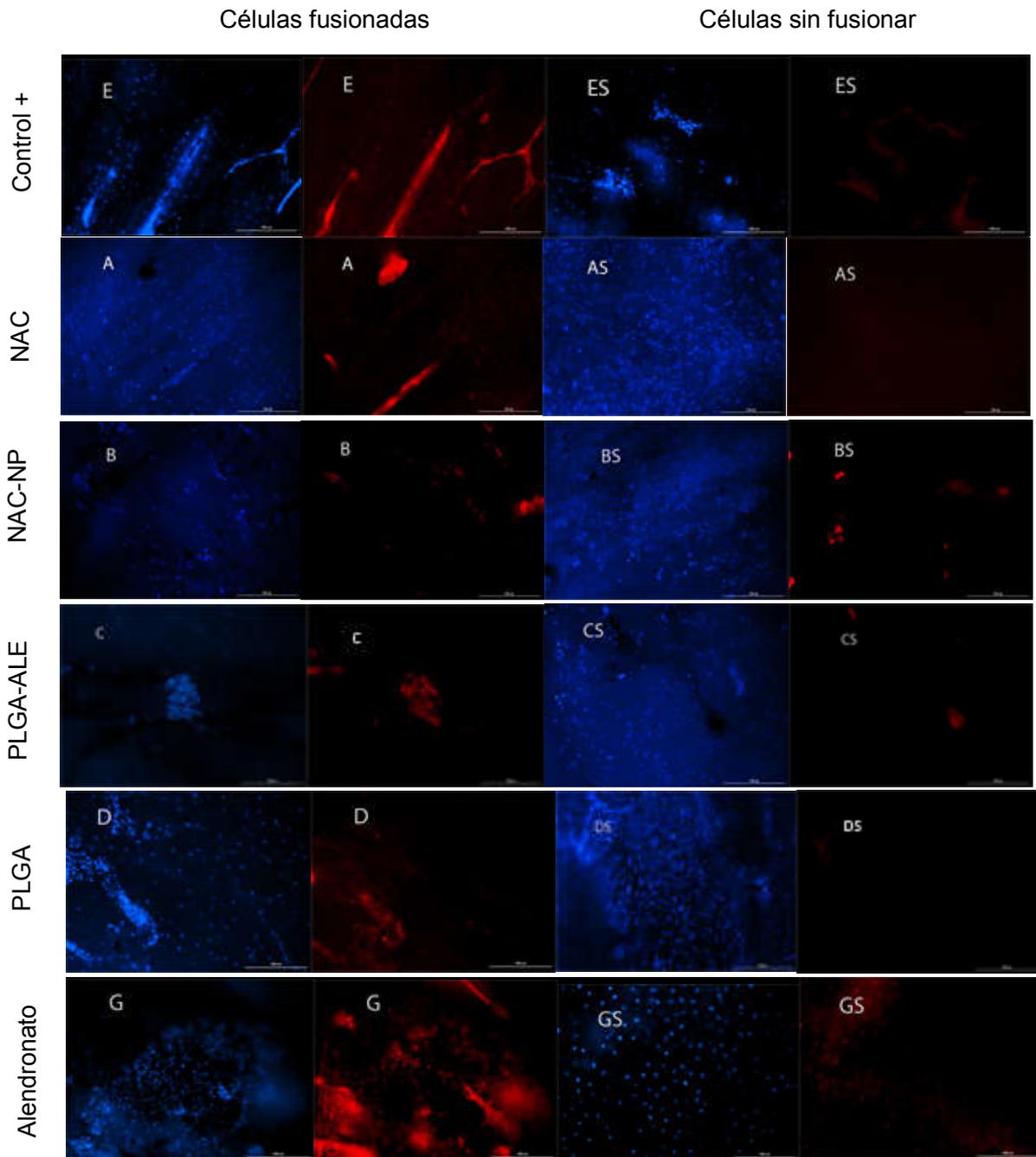


Figura 5-6 Microfotografías representativas de la presencia de ROS. Tinción con 0,1  $\mu\text{g/ml}$  HOESCHT (color azul), fluorescencia obtenida con el filtro rojo que cuantifica la presencia de 2-hidroxi-etidio. Microfotografías de las láminas de hueso obtenidas con el equipo Cytation 3 con el objetivo 10X y procesadas con el software Gen5, para los diferentes tratamientos.

Células TRAP+

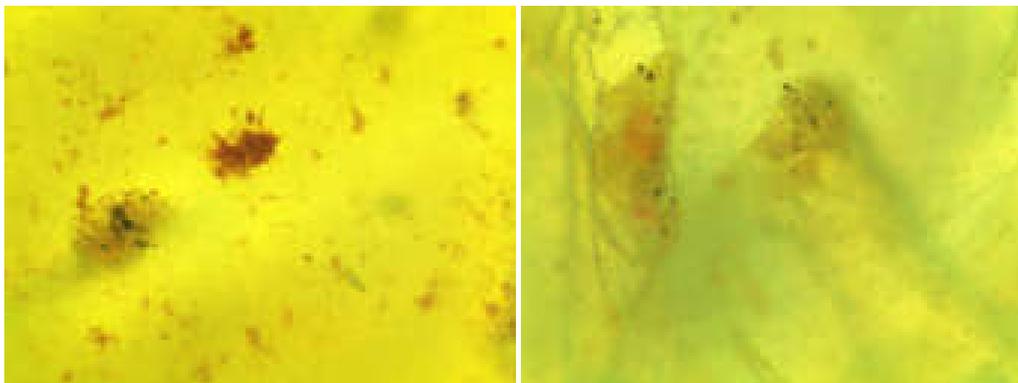
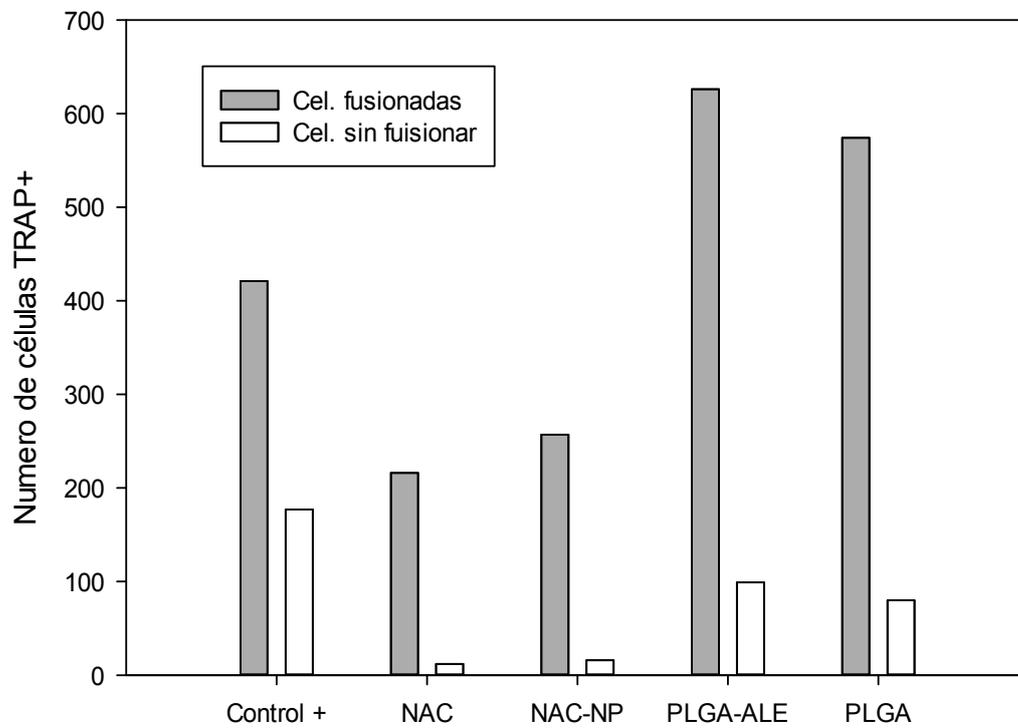


Figura 5-7 Microfotografías de células TRAP+ (derecha) y TRAP-(izquierda) y número de células TRAP+. Células contadas sobre láminas de hueso y obtenidas con el objetivo 10X para los diferentes tratamientos.

## Lagunas Resorción

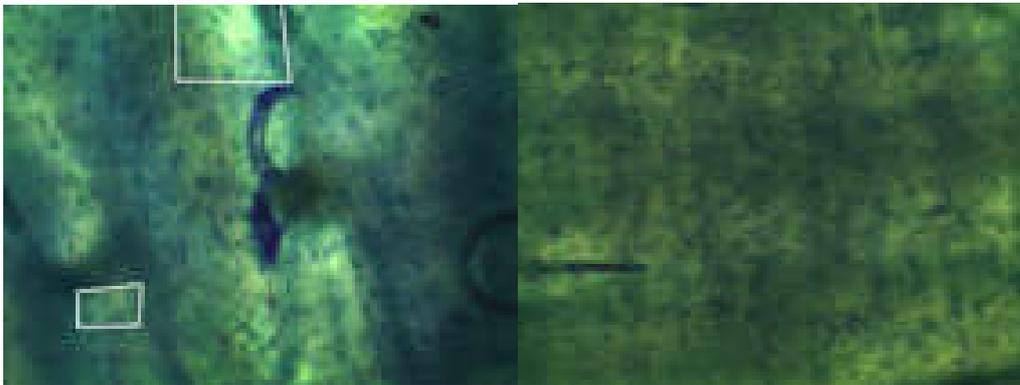
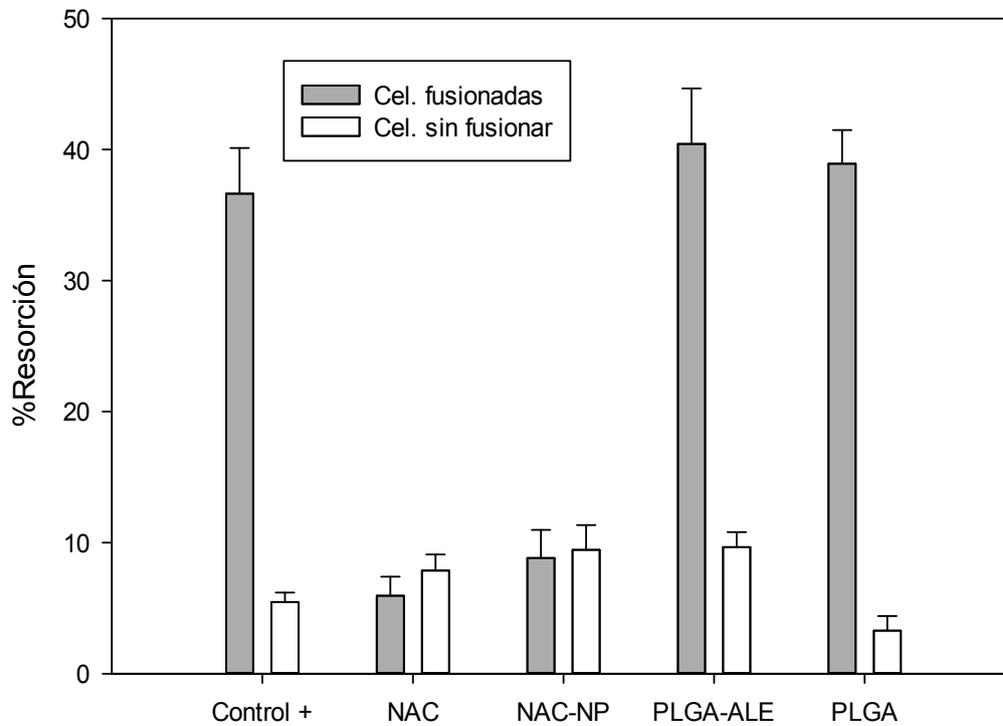


Figura 5-8 Microfotografías y Porcentaje de resorción. Células contadas sobre láminas de hueso y obtenidas con el objetivo 10X para los diferentes tratamientos.

### **5.3 Conclusiones:**

En el modelo utilizando células similares a osteoclastos NAC atrapada en partículas submicrónicas de PLGA-ALE tiene actividad antioxidante, atenua la expresión de los marcadores osteoclasticos y disminuye la actividad TRAP y resorptiva.

El vehículo PLGA-ALE no mostró efecto citotóxico sobre las células empleadas.

NAC atrapada en partículas submicrónicas de PLGA-ALE es una alternativa para transportar y direccionar NAC hacia tejido óseo. Sin embargo, se debe incrementar la capacidad del vehículo para transportar NAC, ya que es baja.



## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

Durante el desarrollo de la presente investigación se analizaron diferentes metodologías para producir nanopartículas o partículas submicrónicas de PLGA que atrapen NAC. Como resultados se encontró que para el método de nanoprecipitación, de las variables estudiadas como el tiempo y velocidad de agitación, el flujo de adición de la fase orgánica a la acuosa y la separación por evaporación del solvente no afectaban el tamaño de partícula, mientras que la presencia de tensoactivos sí.

Empleando al método de emulsión evaporación se encontró que una relación entre la fase orgánica y acuosa (relación O/A) de 1 a 5, un porcentaje de amplitud de 60% y un tiempo de 1 minuto producían nanopartículas de menor tamaño (inferior a 100 nm) pero con un bajo atrapamiento (0,03%).

Al emplear el método de doble emulsión se encontró que el tamaño de partícula varía con el tipo de solvente empleado, aunque se obtuvieron nanopartículas de tamaños pequeños (77 nm) el atrapamiento fue bajo (0.34%)

Al comparar los métodos de nanoprecipitación, emulsión simple y doble; se encontraron resultados similares en cuanto al atrapamiento de NAC. Se escogió el método de nanoprecipitación para realizar un estudio más detallado sobre el atrapamiento de NAC, ya que este es un método sencillo y fácilmente escalable. Como resultado se encontró que al enriquecer la fase orgánica y acuosa con NAC e incrementar la viscosidad del no solvente mejoraba el atrapamiento. El incremento del peso molecular del polímero aumenta levemente tanto el tamaño de partícula como el atrapamiento.

El protocolo desarrollado para la fabricación de nanopartículas de PLGA-ALE que atrapen NAC emplea el método de nanoprecipitación usando una mezcla de solventes de acetona y DMSO (1:1 v/v) adicionando NAC tanto al solvente como al no solvente. Se obtuvieron

partículas submicrónicas de PLGA-ALE-NAC con un tamaño de 228 nm, que atraparon 1,74% de NAC, dichas partículas mostraron tener afinidad por el tejido óseo, lo que indica que puede transportar y direccionar el compuesto activo hacia dicho tejido.

La velocidad de liberación de la NAC muestra ser rápida particularmente en las primeras 1.5 h, después baja. El mecanismo de liberación es difusivo, no erosivo. Las partículas submicrónicas le brindan estabilidad al compuesto, ya que una vez liberado este se dimeriza, perdiendo actividad. De otro lado, el alendronato direcciona al polímero y adicionalmente le brinda protección contra la hidrólisis. Una vez liberado podría tener acción farmacológica sobre el tejido óseo, esto si el tratamiento terapéutico se realiza sobre pacientes que sufran de osteoporosis, así el vehículo no solamente transportaría un antioxidante poderoso si no un agente antiresortivo.

En cuanto a la velocidad de degradación de las partículas, se encontró que pasado un mes, éstas habían perdido casi un 50% de su peso molecular inicial, indicando el carácter biodegradable del vehículo, hecho que lo hace un buen candidato para liberar de manera controlada medicamentos direccionados hacia el tejido óseo. Es necesario optimizar la cantidad de NAC con el fin de poder ampliar la cantidad que se puede transportar.

Los resultados de la actividad biológica del compuesto atrapado muestran que el proceso de fabricación del vehículo no desactiva el principio activo, ya que se comprobó su carácter antioxidante frente a células similares a osteoclastos. Se demostró que logra atenuar la expresión de algunos marcadores osteoclasticos y puede disminuir el desempeño de las células similares a osteoclastos. De tal manera que es una alternativa para transportar y direccionar NAC hacia tejido óseo. Adicionalmente el vehículo fabricado no mostró tener efecto citotóxico sobre las células empleadas, ya que se observó el crecimiento de las mismas a lo largo del ensayo.

Es importante aclarar que para que esto pueda llegar a ser aplicado, se debe incrementar la capacidad del vehículo para transportar NAC, ya que la capacidad de transporte del vehículo actual es baja.

## **6.2 Recomendaciones**

Explorar otros materiales menos hidrófobos para mejorar el atrapamiento.

Realizar pruebas *in vivo* con el fin de verificar la acción terapéutica de las partículas obtenidas.

Adicionar PLGA-PEG para incrementar la carga hidrofílica sobre la superficie y así aumentar el tiempo de circulación por el torrente sanguíneo, al momento de ser administrado de manera parental.

Desarrollar un protocolo de liofilización que no genere agregación por parte del material.



## A. Anexo: Solubilidad de la NAC

Solubilidad de NAC en diferentes solventes:

En el proceso de nanoprecipitación se registran pérdidas de NAC cuando el no solvente empleado es agua, dado el carácter hidrófilo de la misma. Para evitar esto, se realizan pruebas de solubilidad de la NAC en diferentes solventes buscando seleccionar solventes en los cuales es principio activo no sea soluble, o si lo es, que dicha solubilidad sea baja. La selección de solventes se realiza teniendo varios criterios:

- Toxicidad del solvente: se seleccionaron los solventes menos tóxicos teniendo en cuenta la clasificación adoptada por la ICH Q3C (International Conference on Harmonization) donde existen 3 tipos de solventes, siendo los numero 3 los menos tóxicos y los 1 los más.
- El parámetro de solubilidad: se buscan solventes con valores que difieran del parámetro de solubilidad de la NAC ( $23.54 \text{ MPa}^{1/2}$ ).

Materiales y métodos

Materiales: N-acetilcisteína marca Sigma, agua destilada y desionizada, isopropanol, hexano, ciclohexano, heptano, isooctano, metanol, 1 butanol, 2 butanol y acetatos de: metilo, etilo, amilo, isoamilo y butilo. Todos los solventes empleados fueron grado analítico.

Metodología: Se pesaron y adicionaron 25 mg de NAC a 500  $\mu\text{L}$  del solvente, se dejó en agitación por 24 h. Como control se realiza el mismo procedimiento con agua como solvente. Finalizado el proceso de agitación, se observa si se formó una solución o se presentan cristales.

Resultados y discusión: de acuerdo a los resultados existen varios solventes con una toxicidad baja con los cuales se podrían contar como alternativas para escoger un no solvente en el método de nanoprecipitación.

Tabla 1 Solventes, parámetros de solubilidad y solubilidad en NAC

Solvente	Clase (toxicología)	Parámetro de Solubilidad MPa <sup>1/2</sup>	Solubilidad
Isopropanol	3	23.57	+
Hexano	2	14.9	-
Ciclohexano	2	16.8	-
Heptano	3	15.3	-
Etanol	3	26.5	+
Metanol	2	29.6	+
1 Butanol	3	23.2	-
2 Butanol	3	22.2	-
Acetato de metilo	3	18.7	+
Acetato de etilo	3	18.1	+
Acetato de amilo		17.25	-
Acetato de isoamilo		17.1	-
Acetato de butilo	3	17.4	+
Agua		47.8	+

#### Variación de la solubilidad de la N acetilcisteína con el pH

Tebes et al, 2007 demuestra que al variar el pH se puede hacer un compuesto químico más hidrófobo o hidrófilo, para ver este efecto se busca determinar el coeficiente de reparto entre una solución acuosa de NAC preparada a diferentes valores de pH y un solvente (diclorometano).

#### Materiales:

N-acetilcisteína marca Sigma, agua destilada y desionizada, diclorometano, buffers: glicina – ácido clorhídrico (pH 2.4), acetato (pH 4), PBS (pH 7.2) y glicina – hidróxido de sodio (pH 8.6 y 10.6).

#### Metodología:

Se adiciona 1.5 mL de diclorometano y 1.5 mL de NAC (0.5 mg/mL) disuelta en la buffer y se deja en agitación a 220 rpm durante 24 h. Pasado este tiempo se deja en reposo por 1 hora y se separan por diferencia de densidad la fase orgánica de la acuosa. Se determina la cantidad de NAC en la fase acuosa. Cada ensayo se hace por triplicado.

#### Resultados y discusión:

De acuerdo a los resultados obtenidos no se puede observar una diferencia significativa en la cantidad de NAC que se obtiene en la fase acuosa, lo que permite concluir que no existe un efecto apreciable en el cambio de pH con respecto la hidrofiliidad de la NAC.

Tabla 2 Concentración de NAC que en la fase acuosa

pH	NAC (mg/mL)
2,4	0,4614
4,36	0,5322
7,2	0,48916
8,6	0,5255
10,6	0,5336



## **B. Anexo: Estandarización de la técnica de difusión de luz dinámica (DLS) para la determinación del tamaño de partículas submicrónicas de PLGA**

DLS es una técnica para la medida de tamaño de partículas a nivel submicrónico por medio del movimiento Browniano de las partículas, relacionándolo con su tamaño. La determinación se realiza iluminando las partículas con un láser y analizando las fluctuaciones de la luz dispersada.

Esta técnica mide las fluctuaciones de intensidad a lo largo del tiempo, con el fin de determinar el coeficiente de difusión traslacional ( $D$ ), y a partir de éste determinar el diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) de la partícula, empleando la ecuación de Stokes-Einstein. Dicho coeficiente es función de la constante de Boltzmann, la temperatura ( $T$ ), el diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) y la viscosidad del medio ( $\mu$ ). Por lo tanto es importante conocer el valor de las mismas al realizar un ensayo. La temperatura debe permanecer constante, por esto es importante que la cantidad de muestra adicionada a la celda, sea cercana a 1 mL ya que valores mayores pueden generar gradientes térmicos al interior de la celda que pueden alterar el valor de la viscosidad del medio.

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

Se ha reportado que la concentración de partículas y el solvente en el cuál se realice la medida son parámetros que se deben ajustar para cada muestra específica [1]. A continuación se especificará el tipo de solvente a emplear y la concentración de partículas para que la medida sea confiable y reproducible.

Materiales y métodos:

Materiales: PLGA 50/50 Resomer RG 502 (peso molecular 7 – 17 kDa), marca Sigma Aldrich, Pluronic F127 marca Bioreagent, agua destilada y desionizada, acetona grado analítico marca Merck.

Producción de partículas: el método empleado fue el de nanoprecipitación. La fase orgánica estaba compuesta por acetona como solvente y PLGA (10 mg/mL). Se dejó un tiempo de disolución de mínimo 2 horas a temperatura ambiente. El no solvente se formó con agua y Pluronic® F127 1% p/v como tensoactivo. A continuación se formó la suspensión de partículas adicionando lentamente la fase orgánica a la acuosa mientras se realizaba agitación con un magneto durante 10 minutos. A esta mezcla se le denominó mezcla 1.

Concentración y purificación de partículas: las partículas producidas que se encuentran en la mezcla 1, son separadas del medio en el que se encuentran suspendidas por medio de una centrifuga a 10000 g durante 4 minutos y resuspendidas empleando un vortex, usando agua tipo II; a esta mezcla se le denominó mezcla 2. Se eligió agua como solvente, ya que el polímero no es soluble en esta y adicionalmente es un solvente económico, con una alta disponibilidad y sus datos como viscosidad, índice de refracción y constante dieléctrica se encuentran en la base de datos del software del equipo (Zetasizer v6.34). Con el fin de conocer la concentración de partículas en la mezcla 2, se determinó el peso seco de 2 mL de dicha mezcla, adicionándolos a un vial previamente tarado y pesado; dejándolo a 50 °C hasta peso constante (después de 48 h). Dicho ensayo se realizó por triplicado.

Determinación del tamaño de partícula, e índice de polidispersidad: la distribución del tamaño de partícula fue determinada por dispersión dinámica de luz (DLS) empleando un equipo Malvern Zetasizer ZS. Los parámetros de medida empleados fueron los siguientes: se empleó un laser con una longitud de onda de 633 nm (He-Ne), un ángulo de dispersión de 173°. Los ensayos se realizaron a 25 °C, en un cuarto cerrado y con un tiempo para estabilizar la temperatura de 2 minutos. La viscosidad del medio empleado fue de 0.8872 mPa.s y el índice de refracción del medio fue de 1.33, valores que corresponden al agua y fueron obtenidos del software (Zetasizer v6.34). Se realizaron al menos 3 medidas por muestra y se reportó el promedio aritmético de las tres. Se reportó el tamaño de partícula

teniendo en cuenta el valor reportado por el análisis acumulativo siempre y cuando el índice de polidispersidad fuese inferior a 0,2 y el valor del intercepto superior a 0,85 esto último de acuerdo a las recomendaciones realizadas por el fabricante. En los casos que índice de polidispersidad es superior a 0.2 se reporta el valor que haya presentado mayor intensidad, de acuerdo al análisis diferencial, siempre y cuando el valor del intercepto hubiese sido superior a 0,85. Cuando se obtuvo una medida que no cumpliera con estas especificaciones, se reportó como muestra polidispersa y no se reporta valor para el tamaño de partícula pues el resultado no es confiable.

Preparación de las muestras para la determinación del tamaño de partícula: a partir de la mezcla 2 se realizaron una serie de diluciones con agua microfiltrada (0.22  $\mu\text{m}$ ) con el fin de observar la variación de la concentración de partículas con el tamaño de partícula.

#### Resultados

La tabla 1 y la Figura 1 muestran los resultados de las diferentes diluciones realizadas. Como se puede observar el tamaño de partícula tiende a incrementarse a concentraciones altas, mientras que a partir de 1,2 mg/mL el tamaño de partícula se hace independiente de la concentración de partículas. Al realizar una comparación de medias, se encontró que sí existía influencia estadística de la concentración sobre el tamaño de partícula (ANOVA  $p < 0,05$ ). Sin embargo al hacer el mismo análisis para concentraciones entre 1,2 y 0,06 mg/mL, se encontró que no existía diferencia entre el tamaño de partícula y la concentración. Por lo tanto se define que para realizar el análisis de tamaño de partícula se debe diluir la muestra a concentraciones inferiores a 1,2 mg/mL.

Tabla 1 Variación de la concentración de partículas de PLGA con el tamaño de partícula

PLGA (mg/mL)	Tp (nm)	PDI	Intercepto
6	195,93	0,05	0,96
3	183,07	0,06	0,97
2	182,23	0,07	0,95
1,2	177,87	0,06	0,96
0,6	175,97	0,01	0,96
0,12	176,70	0,07	0,97
0,06	177,03	0,05	0,96

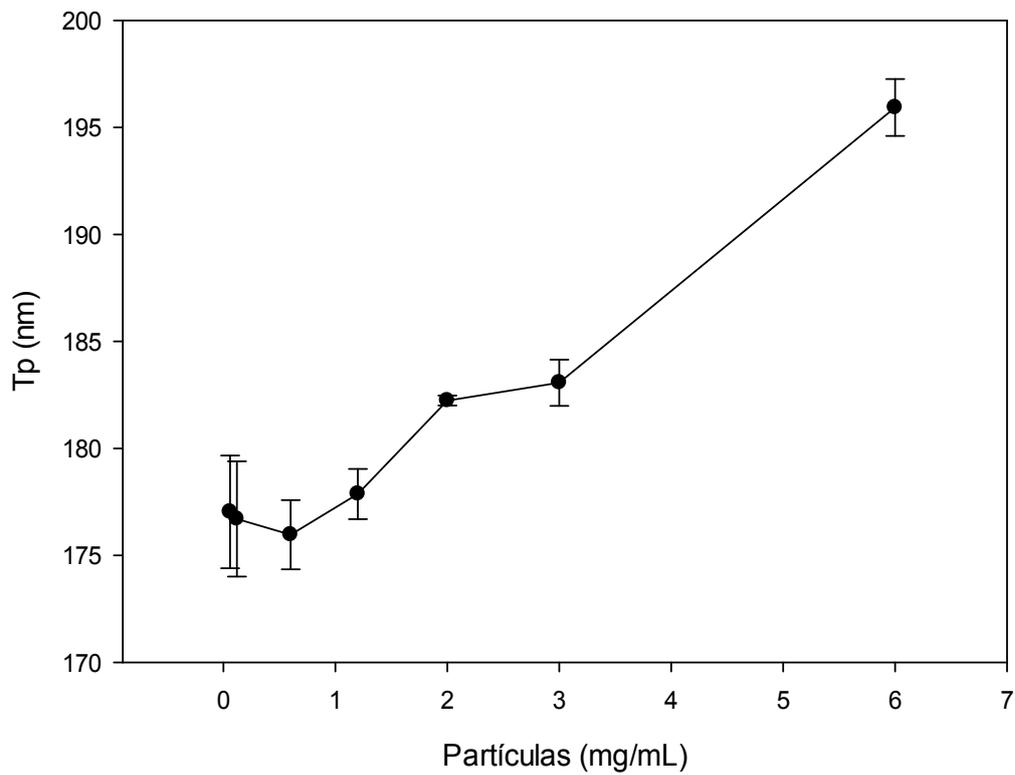


Figura 1 Variación de la concentración de partículas de PLGA, con el tamaño de partícula





## C. Anexo: Datos y análisis estadísticos

En el presente anexo, se encuentran algunos de los datos reportados en esta investigación, junto con las pruebas estadísticas empleadas.

Efecto de la variación del porcentaje de amplitud del ultrasonido sobre el tamaño de partícula (Tp) empleando el método de emulsión simple

% Amplitud	10	20	40	60
Tp (nm)	431,5	100,5	239	136
Tp (nm)	363,7	108,5	218	164
Tp (nm)	306			

Análisis estadísticos:

Prueba	Test	P-valor
Distribución normal	Shapiro Wilk	0,4672
Homocedasticidad	Levene	0,289
Análisis de varianza	Anova	0,003

Efecto de la variación del porcentaje de amplitud del ultrasonido sobre el índice de polidispersidad (PDI) empleando el método de emulsión simple

% Amplitud	10	20	40	60
PDI	0,428	0,212	0,44	0,168
PDI	0,412	0,195	0,223	0,157
PDI	0,55			

Análisis estadísticos:

Prueba	Test	P-valor
Distribución normal	Shapiro Wilk	0,088
Homocedasticidad	Levene	0,0046
Análisis de varianza	Anova	0,036

Efecto de la variación del tiempo de ultrasonido sobre el tamaño de partícula (Tp) empleando el método de emulsión simple

Tiempo (s)	15	60	30	180	300
Tp (nm)	278	94,82	239	91,91	95,26
Tp (nm)	281,9	115,5	218	99,97	110,4
Tp (nm)	237,5			94,18	108,7

Análisis estadísticos:

Prueba	Test	P-valor
--------	------	---------

Distribución normal	Shapiro Wilk	0,002
Homocedasticidad	Levene	0,318
Análisis de varianza	Anova	0,0001

Efecto de la variación del tiempo de ultrasonido sobre el índice de polidispersidad (PDI) empleando el método de emulsión simple

Tiempo (s)	15	60	30	180	300
PDI	0,227	0,149	0,44	0,172	0,19
PDI	0,263	0,156	0,223	0,17	0,348
PDI	0,264			0,197	0,341

Análisis estadísticos:

Prueba	Test	P-valor
Distribución normal	Shapiro Wilk	0,084
Homocedasticidad	Levene	0,0003
Análisis de varianza	Anova	0,122

Efecto de la variación de la relación entre la fase orgánica y acuosa (O/A) sobre el tamaño de partícula (Tp) empleando el método de emulsión simple

Relación O/A	1 a 2	1 a 5	1 a 10	1 a 20
Tp (nm)	249,7	81,36	239	408
Tp (nm)	156	83,32	218	350,8
Tp (nm)	221			316,6

## Análisis estadísticos

Prueba	Test	P-valor
Distribución normal	Shapiro Wilk	0,73
Homocedasticidad	Levene	0,192
Análisis de varianza	Anova	0,001

Efecto de la variación de la relación entre la fase orgánica y acuosa (O/A) sobre el índice de polidispersidad (PDI) empleando el método de emulsión simple

Relación O/A	1 a 2	1 a 5	1 a 10	1 a 20
PDI	0,339	0,252	0,44	0,466
PDI	0,452	0,255	0,223	0,44
PDI	0,22			0,274

## Análisis estadísticos:

Prueba	Test	P-valor
Distribución normal	Shapiro Wilk	0,069
Homocedasticidad	Levene	0,08
Análisis de varianza	Anova	0,648

Efecto de la variación del tiempo de agitación sobre el tamaño de partícula (Tp) empleando el método de nanoprecipitación

Tiempo (min)	10	30	60
Tp (nm)	188,5	185	173,6
Tp (nm)	197,2	211,3	188,7
Tp (nm)	192,7		

Análisis estadísticos:

Prueba	Test	P-valor
Distribución normal	Shapiro Wilk	0,676
Homocedasticidad	Levene	0,297
Análisis de varianza	Anova	0,383

Efecto de la variación del tiempo de agitación sobre el índice de polidispersidad (PDI) empleando el método de nanoprecipitación

Tiempo (min)	10	30	60
PDI	0,046	0,127	0,12
PDI	0,102	0,146	0,206
PDI	0,112		

Análisis estadísticos:

Prueba	Test	P-valor
Distribución normal	Shapiro Wilk	0,857
Homocedasticidad	Levene	0,16
Análisis de varianza	Anova	0,211

Efecto del flujo de adición de solvente a la fase acuosa sobre el tamaño de partícula (Tp) empleando el método de nanoprecipitación

Flujo (mL/min)	0,82	1,63	6,04
Tp (nm)	214,05	188,5	222,4
Tp (nm)	222,45	223,2	194,9
Tp (nm)	185,9		
Tp (nm)	195,6		
Tp (nm)	209,1		

Análisis estadísticos:

Prueba	Test	P-valor
Distribución normal	Shapiro Wilk	0,128
Homocedasticidad	Levene	0,486
Análisis de varianza	Anova	0,975

Efecto del flujo de adición de solvente a la fase acuosa sobre el índice de polidispersidad (PDI) empleando el método de nanoprecipitación

Flujo (mL/min)	0,82	1,63	6,04
PDI	0,1055	0,1435	0,1745
PDI	0,1085	0,1195	0,127
PDI	0,09		
PDI	0,08		
PDI	0,189		

Análisis estadísticos:

Prueba	Test	P-valor
Distribución normal	Shapiro Wilk	0,594
Homocedasticidad	Levene	0,83
Análisis de varianza	Anova	0,55

Efecto de la velocidad de agitación sobre el tamaño de partícula (Tp) empleando el método de nanoprecipitación

Agitación (rpm)	430	870	1300
Tp (nm)	194,7	188,5	191,6
Tp (nm)	192,7	223,2	187,45
Tp (nm)	182,6	210,4	217,65

Análisis estadísticos:

Prueba	Test	P-valor
Distribución normal	Shapiro Wilk	0,123
Homocedasticidad	Levene	0,28
Análisis de varianza	Anova	0,392

Efecto de la velocidad de agitación sobre el índice de polidispersidad (PDI) empleando el método de nanoprecipitación

Agitación (rpm)	430	870	1300
PDI	0,1415	0,1435	0,119
PDI	0,112	0,1195	0,088
PDI	0,084	0,116	0,194

Análisis estadísticos:

---

Prueba	Test	P-valor
Distribución normal	Shapiro Wilk	0,284
Homocedasticidad	Levene	0,173
Análisis de varianza	Anova	0,78

---

## Bibliografía

- [1] K. Lüllmann, H., Hein, L., & Mohr, *Farmacología*. Madrid, 2010.
- [2] K. Jain and R. Panchagnula, "Skeletal drug delivery systems.," *Int. J. Pharm.*, vol. 206, no. 1–2, pp. 1–12, Sep. 2000.
- [3] V. H. López, "Síntesis y Caracterización de Poli(ácido láctico): Aplicación en Mezclas con Almidón y Nanopartículas Funcionales," Universidad de Antioquía, 2010.
- [4] J. Morales-Torres and S. Gutiérrez-Ureña, "The burden of osteoporosis in Latin America.," *Osteoporos. Int.*, vol. 15, no. 8, pp. 625–32, Aug. 2004.
- [5] G. Zayed, "Development of Colloids for Cell and Tissue Targeting Bisphosphonate-Functionalized Gold Nanoparticles for the Investigation of Bone Targeting," University of Regensburg, 2009.
- [6] H. J. Chung and T. G. Park, "Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 4–5, pp. 249–62, May 2007.
- [7] J. M. Lean, J. T. Davies, K. Fuller, C. J. Jagger, B. Kirstein, G. A. Partington, Z. L. Urry, and T. J. Chambers, "A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss," *J. Clin. Invest.*, vol. 112, no. 6, pp. 915–923, 2003.
- [8] L. Shen, "Preclinical Pharmacokinetics and Bioavailability Studies of S-Carboxymethylcysteine, N-Acetylcysteine and (-)-Carbocysteine," University of Georgia, 2008.
- [9] D. E. Owens and N. Peppas, "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles.," *Int. J. Pharm.*, vol. 307, no. 1, pp. 93–102, Jan. 2006.
- [10] B. Vallejo, "Estudio del fenómeno de adhesión a superficies biológicas de películas

- obtenidas a partir de biopolímeros, para aplicación en el área de la salud,” Universidad Nacional de Colombia, 2010.
- [11] A. Murillo, C. Guerrero, O. Acosta, and C. Cardozo, “Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrophage fusion,” *Biol. Res.*, vol. 43, pp. 205–224, 2010.
- [12] S. Zhang, G. Gangal, and H. Uludağ, “‘Magic bullets’ for bone diseases: progress in rational design of bone-seeking medicinal agents.,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 36, no. 3, pp. 507–31, Mar. 2007.
- [13] M. Zafarullah, W. Q. Li, J. Sylvester, and M. Ahmad, “Molecular mechanisms of N -acetylcysteine actions,” *C. Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 60, pp. 6–20, 2003.
- [14] K. Suzuki, “Anti-oxidants for therapeutic use: why are only a few drugs in clinical use?,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 61, no. 4, pp. 287–9, Apr. 2009.
- [15] N. K. Lee, Y. G. Choi, J. Y. Baik, S. Y. Han, D. Jeong, Y. S. Bae, N. Kim, and S. Y. Lee, “A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation,” *Blood*, vol. 106, no. 3, pp. 852–859, 2005.
- [16] S. Srinivasan, A. Koenigstein, J. Joseph, L. Sun, B. Kalyanaraman, M. Zaidi, and N. G. Avadhani, “Role of mitochondrial reactive oxygen species in osteoclast differentiation,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1192, pp. 245–252, 2010.
- [17] J. S. Bedoya T., “Evaluación de la actividad resorptiva de cmnsp fusionadas con polietilenglicol (peg), tratadas con fuerza centrífuga y con n acetilcisteina (nac),” Universidad Nacional de Colombia, 2015.
- [18] C. Shi, J. Wu, Q. Yan, R. Wang, and D. Miao, “Bone marrow ablation demonstrates that estrogen plays an important role in osteogenesis and bone turnover via an antioxidative mechanism,” *Bone*, vol. 79, pp. 94–104, 2015.
- [19] W. M. Zijderduin, N. Levahrt, J. Schuitemaker, P. P. Tak, F. C. Breedveld, and J. M. Van Laar, “High dose intravenous N-acetyl-L-cysteine ( NAC ) therapy in rheumatoid arthritis , results from a pilot study .,” Leiden University, 2006.
- [20] K. M. Sanders, M. a Kotowicz, and G. C. Nicholson, “Potential role of the antioxidant N-acetylcysteine in slowing bone resorption in early post-menopausal women: a pilot study.,” *Transl. Res.*, vol. 150, no. 4, p. 215, Oct. 2007.

- [21] S. K. Sahoo and V. Labhasetwar, "Nanotech approaches to drug delivery and imaging.," *Drug Discov. Today*, vol. 8, no. 24, pp. 1112–20, Dec. 2003.
- [22] J. H. Adair, M. P. Parette, E. Altinoglu, and M. Kester, "Nanoparticulate alternatives for drug delivery," *ACS Nano*, vol. 4, no. 9, pp. 4967–70, 2013.
- [23] Y. H. B. Dongin, "Polymeric Carriers for Anticancer Drugs," in *Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*, S. US, Ed. New York, 2009, pp. 207–243.
- [24] H. Bader, H. Ringsdorf, and B. Schmidt, "Water soluble polymers in medicine†," *Die Angew. Makromol. Chemie*, vol. 123, no. 1, pp. 457–485, 1984.
- [25] L. J. Jones, "Polymeric micelles- a new generation of colloidal drug carriers," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 48, pp. 101–111, 1999.
- [26] L. Zhang, D. Pornpattananangku, C.-M. J. Hu, and C.-M. Huang, "Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 17, no. 6, pp. 585–94, Jan. 2010.
- [27] B. S. Pattni, V. V. Chupin, and V. P. Torchilin, "New Developments in Liposomal Drug Delivery," *Chem. Rev.*, vol. 115, pp. 10938–66, 2015.
- [28] V. Sáez, E. Hernáez, and L. Sanz, "Sistemas de liberación controlada de medicamentos," *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 3, no. 3, 2002.
- [29] A. Kumari, S. K. Yadav, and S. C. Yadav, "Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 75, no. 1, pp. 1–18, Jan. 2010.
- [30] G. Barratt, G. Gouaraze, P. Couvreur, C. Dubernet, and E. Fattal, *Polymeric Biomaterials*. New York, 2001.
- [31] S.-W. Choi and J.-H. Kim, "Design of surface-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for targeted drug delivery to bone.," *J. Control. Release*, vol. 122, no. 1, pp. 24–30, Sep. 2007.
- [32] G. Barratt, "Colloidal drug carriers : achievements and perspectives," *C. Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 60, pp. 21–37, 2003.

- 
- [33] H. Sajja, M. East, H. Mao, A. Wang, S. Nie, and L. Yang, "Development of Multifunctional Nanoparticles for Targeted Drug Delivery and Noninvasive," *Curr. Drug Discov. Technol.*, vol. 6, pp. 43–51, 2009.
- [34] F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, and O. C. Farokhzad, "Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles," *Mol. Pharm.*, vol. 5, no. 4, pp. 505–515, 2008.
- [35] A. Glen, "The impact of nanotechnology in drug delivery: global developments. . Available from:," *Market Anal. Future Prospects*, 2005. [Online]. Available: <http://www.nanomarkets.com>.
- [36] W. Jong and P. Born, "Drug delivery and nanoparticles: applications and hazard," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 3, no. 2, pp. 133–149, 2008.
- [37] S. Gad, *Pharmaceutical manufacturing handbook production and process (Vol. 10)*. New Jersey, 2008.
- [38] R. Infante, A. Cebrián, and A. Vara, "Los polímeros en medicina," 2015. [Online]. Available: [http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/polimeros\\_biodegradables.htm](http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/polimeros_biodegradables.htm). [Accessed: 29-Dec-2015].
- [39] J. Seppala, A. Helminen, and H. Korhonen, "Degradable polyesters through chain linking for packaging and biomedical applications," *Macromol. Biosci.*, vol. 4, no. 3, pp. 208–217, 2004.
- [40] W.-C. Lee and I.-M. Chu, "Preparation and degradation behavior of polyanhydrides nanoparticles," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 84B, no. 1, pp. 138–146, 2008.
- [41] K. Lee, D. Kaplan, and C. Chan, (2006). , vol. 102. 2006.
- [42] J. M. Harris, *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications*. New York, 1992.
- [43] P. R. Lockman, R. J. Mumper, M. a Khan, and D. D. Allen, "Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier.," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2002.
- [44] I. A. Kim and S.-H. Rhee, "Effects of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)

- degradability on the apatite-forming capacity of electrospun PLGA/SiO<sub>2</sub>-CaO nonwoven composite fabrics.," *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.*, vol. 93, no. 1, pp. 218–26, Apr. 2010.
- [45] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, and V. Préat, "PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications.," *J. Control. Release*, vol. 161, no. 2, pp. 505–22, Jul. 2012.
- [46] R. a Jain, "The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices.," *Biomaterials*, vol. 21, no. 23, pp. 2475–90, Dec. 2000.
- [47] S. Hui Ng and I. Hong Ooi, "Effects of Microemulsion Preparation Conditions on Drug Encapsulation Efficiency of PLGA Nanoparticles," *API Conf. Proc.*, vol. 47, pp. 47–50, 2011.
- [48] K. Avgoustakis, A. Beletsi, Z. Panagi, P. Klepetsanis, E. Livaniou, G. Evangelatos, and D. S. Ithakissios, "Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA–mPEG nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, 2003.
- [49] D. Wang, S. C. Miller, P. Kopecková, and J. Kopecek, "Bone-targeting macromolecular therapeutics.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 7, pp. 1049–76, May 2005.
- [50] W. Butler, "The nature and significance of osteopontin," *Connect. Tissue Res.*, vol. 23, pp. 123–36, 1989.
- [51] S. Kasugai, R. Fujisawa, Y. Waki, K. Miyamoto, and K. Ohya, "Selective drug delivery system to bone: small peptide (Asp)<sub>6</sub> conjugation.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 15, no. 5, pp. 936–43, May 2000.
- [52] S. A. Low and J. Kopecek, "Targeting polymer therapeutics to bone," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, pp. 1189–1204, 2012.
- [53] K. Yokogawa, K. Miya, T. Sekido, Y. Higashi, M. Nomura, and R. Fujisawa, "Selective delivery of estradiol to bone by aspartic acid oligopeptide and its effects on ovariectomized mice," *Endocrinology*, vol. 142, pp. 1228–33, 2001.
- [54] S. C. Miller, H. Pan, D. Wang, B. M. Bowman, P. Kopecková, and J. Kopecek, "Feasibility of using a bone-targeted, macromolecular delivery system coupled with

- prostaglandin E(1) to promote bone formation in aged, estrogen-deficient rats.," *Pharm. Res.*, vol. 25, no. 12, pp. 2889–95, Dec. 2008.
- [55] D. Wang, S. Miller, M. Sima, P. Kopecková, and J. Kopecek, "Synthesis and evaluation of water-soluble polymeric bone-targeted drug delivery systems.," *Bioconjug. Chem.*, vol. 14, no. 5, pp. 853–9, 2003.
- [56] H. Frost, "Tetracycline bone labeling in anatomy," *Am. J. Phys. Anthropol.*, vol. 29, pp. 183–95, 1968.
- [57] H. Fleisher, A. Reska, G. Rodan, and M. Rogers, *Principle of Bone Biology*. 2002.
- [58] A. Roelofs, K. Thompson, S. Gordon, and M. Rogers, "Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates," *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, pp. 6222–23, 2006.
- [59] J. Lin, "Bisphosphonates: A Review of their Pharmacokinetic Properties," *Bone*, vol. 18, pp. 75 – 85, 1996.
- [60] D. Wang, S. C. Miller, L. S. Shlyakhtenko, A. M. Portillo, X.-M. Liu, K. Papangkorn, P. Kopecková, Y. Lyubchenko, W. I. Higuchi, and J. Kopecek, "Osteotropic Peptide that differentiates functional domains of the skeleton.," *Bioconjug. Chem.*, vol. 18, no. 5, pp. 1375–8, 2007.
- [61] A. Poma, G. Gutiérrez, and J. Casas, "Bisfosfonatos : Aplicaciones Actuales en Osteoporosis y Cáncer," in *Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 1999, vol. 60, no. 1, pp. 61–65.
- [62] B. J. Gertz, S. D. Holland, W. . Kline, B. K. Matuszewski, A. Freeman, H. Quan, K. C. Lasseter, J. C. Mucklow, and A. G. Porras, "Studies of the oral bioavailability of alendronate," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 58, no. 3, pp. 288–98, 1995.
- [63] H. Hirabayashi and J. Fujisaki, "Bone-Specific Drug Delivery Systems Approaches via Chemical Modification of Bone seeking agents," *Clin. Pharmacokinet.*, vol. 42, no. 15, pp. 1319–1330, 2003.
- [64] H. Hirabayashi, T. Takahashi, J. Fujisaki, T. Masunaga, S. Sato, J. Hiroi, Y. Tokunaga, S. Kimura, and T. Hata, "Bone-specific delivery and sustained release of diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, via bisphosphonic prodrug based on the Osteotropic Drug Delivery System (ODDS).," *J. Control. release*, vol. 70, no. 1–2, pp. 183–91, Jan. 2001.

- [65] K. S. Tanaka, T. J. Houghton, T. Kang, E. Dietrich, D. Delorme, S. S. Ferreira, L. Caron, and F. Viens, "Bisphosphonated fluoroquinolone esters as osteotropic prodrugs for the prevention of osteomyelitis," *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 16, no. 20, pp. 9217–29, 2008.
- [66] D. Wang, M. Sima, R. L. Mosley, J. P. Davda, N. Tietze, C. Miller, P. R. Gwilt, and P. Kope, "Biodistribution Studies of a Bone-targeting Drug Delivery System Based on N-(2-Hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) Copolymers," *Mol. Pharm.*, vol. 3, no. 6, pp. 717–725, 2006.
- [67] W. Thompson, D. Thompson, P. Anderson, and G. Rodan, "Polymalonic acids as bone -affinity agents," 03419611989.
- [68] H. Rawls and I. Cabasso, "Adsorption of phosphonylated polyelectrolytes on hydroxyapatite," in *Adsorption on and Surface Chemistry of Hydroxyapatite*, New York: Plenum Press, 1982, pp. 115–28.
- [69] M. L. Hans and A. M. Lowman, "Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting," *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, vol. 6, pp. 319–327, 2002.
- [70] J. R. Neale, N. B. Richter, K. E. Merten, K. G. Taylor, S. Singh, L. C. Waite, N. K. Emery, N. B. Smith, J. Cai, and W. M. Pierce, "Bone selective effect of an estradiol conjugate with a novel tetracycline-derived bone-targeting agent.," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 3, pp. 680–3, Feb. 2009.
- [71] J. Ishizaki, Y. Waki, T. Takahashi-Nishioka, K. Yokogawa, and K.-I. Miyamoto, "Selective drug delivery to bone using acidic oligopeptides.," *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2009.
- [72] T. M. Willson, B. R. Henke, T. M. Momtahan, D. T. Garrison, L. B. Moore, N. G. Geddie, and P. G. Baer, "Bone Targeted Drugs 2. Synthesis of Estrogens with Hydroxyapatite Affinity," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 6, no. 9, pp. 1047–1050, 1996.
- [73] K. H. Bhandari, M. Newa, J. Chapman, and M. R. Doschak, "Synthesis , characterization and evaluation of bone targeting salmon calcitonin analogs in normal and osteoporotic rats," *J. Control. Release*, vol. 158, no. 1, pp. 44–52, 2012.
- [74] W. Gu, C. Wu, J. Chen, and Y. Xiao, "Nanotechnology in the targeted drug delivery

- for bone diseases and bone regeneration," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 8, pp. 2305–2317, 2013.
- [75] F. Daubine, D. Cortial, G. Ladam, H. Atmani, Y. Haikel, N. Benkirane-jessel, J. Voegel, and P. Clezardin, "Nanostructured polyelectrolyte multilayer drug delivery systems for bone metastasis prevention," *Biomaterials*, vol. 30, pp. 6367–6373, 2009.
- [76] K. Ramanlal Chaudhari, A. Kumar, V. K. Megraj Khandelwal, M. Ukawala, A. S. Manjappa, A. K. Mishra, J. Monkkonen, and R. S. Ramachandra Murthy, "Bone metastasis targeting: a novel approach to reach bone using Zoledronate anchored PLGA nanoparticle as carrier system loaded with Docetaxel.," *J. Control. release*, vol. 158, no. 3, pp. 470–8, Mar. 2012.
- [77] S. I. Thamake, S. L. Raut, Z. Gryczynski, A. P. Ranjan, and J. K. Vishwanatha, "Alendronate coated poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles for active targeting of metastatic breast cancer.," *Biomaterials*, vol. 33, no. 29, pp. 7164–73, Oct. 2012.
- [78] M. Salerno, E. Cenni, C. Fotia, S. Avnet, D. Granchi, F. Castelli, D. Micieli, R. Pignatello, M. Capulli, N. Rucci, a Angelucci, a Del Fattore, a Teti, N. Zini, a Giunti, and N. Baldini, "Bone-targeted doxorubicin-loaded nanoparticles as a tool for the treatment of skeletal metastases.," *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 10, no. 7, pp. 649–59, Nov. 2010.
- [79] R. Pignatello, M. G. Sarpietro, and F. Castelli, "Synthesis and Biological Evaluation of a New Polymeric Conjugate and Nanocarrier with Osteotropic Properties," *J. Funct. Biomater.*, vol. 3, no. 4, pp. 79–99, Jan. 2012.
- [80] E. Alexandrino, S. Ritz, F. Marsico, G. Baier, V. Mailander, K. Landfester, and F. R. Wurm, "Paclitaxel-loaded polyphosphate nanoparticles: a potential strategy for bone cancer treatment," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 10, pp. 1298 – 1306, 2014.
- [81] K. Miller, C. Clementi, D. Polyak, A. Eldar-boock, L. Benayoun, I. Barshack, Y. Shaked, G. Pasut, and R. Satchi-fainaro, "Poly ( ethylene glycol ) e paclitaxel e alendronate self-assembled micelles for the targeted treatment of breast cancer bone metastases," *Biomaterials*, vol. 34, no. 15, pp. 3795–3806, 2013.
- [82] J. Oh, C. Park, and J. Choy, "Intracellular drug delivery of layered double hydroxide nanoparticles," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 11, no. 2, pp. 1632–1635, 2011.

- [83] M. Tan, D. Dunstan, A. Friedhuber, P. Choong, and C. Dass, "A nanoparticulate system that enhances the efficacy of the tumoricide Dz13 when administered proximal to the lesion site," *J. Control. Release*, vol. 144, no. 2, pp. 196–202, 2010.
- [84] K. Corsi, F. Chellat, L. Yahia, and J. Fernandes, "Mesenchymal stem cells, MG63 and HEK293 transfection using chitosan-DNA nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 24, no. 7, pp. 1255–1264, 2003.
- [85] N. Federman, J. Chan, and J. O. Nagy, "Enhanced growth inhibition of osteosarcoma by cytotoxic polymerized liposomal nanoparticles targeting the alcam cell surface receptor," *Sarcoma*, vol. 126906, 2012.
- [86] T. Anada, Y. Takeda, Y. Honda, K. Sakurai, and O. Suzuki, "Synthesis of calcium phosphate-binding liposome for drug delivery.," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 19, no. 15, pp. 4148–50, Aug. 2009.
- [87] X. S. Li, W. Q. Li, and W. B. Wang, "Using targeted magnetic arsenic trioxide nanoparticles for osteosarcoma treatment," *Cancer Biother. Radiopharm.*, vol. 22, no. 6, pp. 772–778, 2007.
- [88] A. Barroug, L. T. Kuhn, L. C. Gerstenfeld, and M. J. Glimcher, "Interactions of cisplatin with calcium phosphate nanoparticles : in vitro controlled adsorption and release," *J. Orthop. Res.*, vol. 22, pp. 703–708, 2004.
- [89] S. M., I. A.K., F. J. Hornicek, H. Mankin, M. M. Amiji, and Z. Duan, "Doxorubicin loaded polymeric nanoparticulate delivery system to overcome drug resistance in osteosarcoma," *BMC Cancer*, vol. 9, p. 399, 2009.
- [90] K. Sun, J. Wang, J. Zhang, M. Hua, C. Liu, and T. Chen, "Dextran-g-PEI nanoparticles as a carrier for co-delivery of adriamycin and plasmid into osteosarcoma cells," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 49, no. 2, pp. 173–180, 2011.
- [91] G. Cai, M. Ni, X. Zhang, M. Xiong, H. Chen, Q. Zeng, and Y. Zuochong, "Poly ( lactic-co-glycolic acid ) nanoparticles conjugated with CD133 aptamers for targeted salinomycin delivery to CD133 + osteosarcoma cancer stem cells," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 2537–2554, 2015.
- [92] M. Morgen, D. Tung, B. Boras, W. Miller, A. M. Malfait, and M. Tortorella, "Nanoparticles for improved local retention after intra-articular injection into the knee joint," *Pharm. Res.*, vol. 30, no. 1, pp. 257–268, 2013.

- 
- [93] X. Zhang, C. Yu, Xushi, C. Zhang, T. Tang, and K. Dai, "Direct chitosan-mediated gene delivery to the rabbit knee joints in vitro and in vivo," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 341, no. 1, pp. 202–208, 2006.
- [94] K. Feng, H. Sun, M. A. Bradley, E. J. Dupler, W. V. Giannobile, and P. X. Ma, "Novel antibacterial nanofibrous PLLA scaffolds," *J. Control. Release*, vol. 146, no. 3, pp. 363–369, 2010.
- [95] K.-T. Peng, C.-F. Chen, I.-M. Chu, Y.-M. Li, W.-H. Hsu, R. W.-W. Hsu, and P.-J. Chang, "Treatment of osteomyelitis with teicoplanin-encapsulated biodegradable thermosensitive hydrogel nanoparticles," *Biomaterials*, vol. 31, no. 19, pp. 5227–36, Jul. 2010.
- [96] N. L. Ignjatović, P. Ninkov, R. Sabetrasekh, and D. P. Uskoković, "A novel nano drug delivery system based on tigecycline-loaded calciumphosphate coated with poly-DL-lactide-co-glycolide," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 21, no. 1, pp. 231–239, 2010.
- [97] H. D. Lu, H. Q. Zhao, K. Wang, and L. Lv, "Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles as non-viral gene delivery vectors targeting osteoarthritis," *Int. J. Pharm.*, vol. 420, no. 2, pp. 358–365, 2011.
- [98] S. Ohashi, T. Kubo, and T. Ikeda, "Cationic polymer-mediated genetic transduction into cultured human chondrosarcoma-derived HCS-2/8 cells," *J. Orthop. Sci.*, vol. 6, no. 1, pp. 75–81, 2001.
- [99] A. Alhaddad, M. P. Adam, and J. Botsoa, "Nanodiamond as a vector for siRNA delivery to Ewing sarcoma cells," *Small*, vol. 7, no. 21, pp. 3087–3095, 2011.
- [100] G. Wang, C. Kucharski, X. Lin, and H. Uludağ, "Bisphosphonate-coated BSA nanoparticles lack bone targeting after systemic administration," *J. Drug Target.*, vol. 18, no. 8, pp. 611–26, Sep. 2010.
- [101] S. Deb, S. Son, A. Sadiasa, Y. Ki, and B. Taek, "Preparation and characterization of PLGA microspheres by the electrospraying method for delivering simvastatin for bone regeneration," *Int. J. Pharm.*, vol. 443, no. 1–2, pp. 87–94, 2013.
- [102] A. Swami, M. R. Reagan, P. Basto, Y. Mishima, N. Kamaly, S. Glavey, S. Zhang, M. Moschetta, D. Seevaratnam, Y. Zhang, J. Liu, M. Memarzadeh, J. Wu, S. Manier, J. Shi, N. Bertrand, Z. N. Lu, K. Nagano, R. Baron, A. Sacco, A. M. Roccaro, O. C. Farokhzad, and I. M. Ghobrial, "Engineered nanomedicine for

- myeloma and bone microenvironment targeting,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 28, pp. 10287–10292, 2014.
- [103] S. Avnet, N. Baldini, F. Castelli, E. Cenni, and C. Fotia, “A novel biomaterial for osteotropic drug nanocarriers: synthesis and biocompatibility evaluation of a PLGA-ALE conjugate,” *Nanomedicine*, vol. 2, p. 161, 2009.
- [104] K. Ogawa, T. Mukai, Y. Inoue, M. Ono, and H. Saji, “Development of a novel  $^{99m}\text{Tc}$ -chelate-conjugated bisphosphonate with high affinity for bone as a bone scintigraphic agent,” *J. Nucl. Med.*, vol. 47, no. 12, pp. 2042–7, Dec. 2006.
- [105] V. Hengst, C. Oussoren, T. Kissel, and G. Storm, “Bone targeting potential of bisphosphonate-targeted liposomes. Preparation, characterization and hydroxyapatite binding in vitro,” *Int. J. Pharm.*, vol. 331, no. 2, pp. 224–7, Mar. 2007.
- [106] I. Özcan, K. Bouchemal, F. Segura Sánchez, Ö. Özer, T. Güneri, and G. Ponchel, “Synthesis and Characterization of Surface-Modified PBLG Nanoparticles for Bone Targeting : In vitro and In Vivo Evaluations,” *Pharm. Nanotechnol.*, vol. 100, no. 11, pp. 4877–4887, 2011.
- [107] R. S. Navath, Y. E. Kurtoglu, B. Wang, S. Kannan, R. Romero, and R. M. Kannan, “Dendrimer–Drug Conjugates for Tailored Intracellular Drug Release Based on Glutathione Levels,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 19, no. 12, pp. 2446–2455, Nov. 2008.
- [108] R. Stockley, S. Rennard, K. Rabe, and B. Celli, *Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Practical Guide to Management*. 2008.
- [109] R. S. Navath, B. Wang, S. Kannan, R. Romero, and R. M. Kannan, “Stimuli-responsive star poly(ethylene glycol) drug conjugates for improved intracellular delivery of the drug in neuroinflammation,” *J. Control. Release*, vol. 142, no. 3, pp. 447–56, Mar. 2010.
- [110] L. Pendyala and P. J. Creaven, “Pharmacokinetic and Pharmacodynamic a Potential Chemopreventive Phase I Trial ” Studies Agent of during a,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 4, no. May, pp. 245–251, 1995.
- [111] B. Wang, R. S. Navath, R. Romero, S. Kannan, and R. Kannan, “Anti-inflammatory and anti-oxidant activity of anionic dendrimer-N-acetyl cysteine conjugates in activated microglial cells,” *Int. J. Pharm.*, vol. 377, no. 1–2, pp. 159–68, Jul. 2009.

- 
- [112] Y. E. Kurtoglu, R. S. Navath, B. Wang, S. Kannan, R. Romero, and R. M. Kannan, "Poly ( amidoamine ) dendrimer – drug conjugates with disulfide linkages for intracellular drug delivery," *Biomaterials*, vol. 30, no. 11, pp. 2112–2121, 2009.
- [113] S. Kannan, S. Kannan, H. Dai, R. S. Navath, B. Balakrishnan, and A. Jyoti, "Palsy in a Rabbit Model Dendrimer-Based Postnatal Therapy for Neuroinflammation and Cerebral Palsy in a Rabbit Model," *Sci. Transl. Med.*, vol. 4, no. 130, pp. 1–11, 2012.
- [114] E. Nance, M. Porambo, F. Zhang, M. K. Mishra, M. Buelow, R. Getzenberg, M. Johnston, R. M. Kannan, A. Fatemi, and S. Kannan, "Systemic dendrimer-drug treatment of ischemia-induced neonatal white matter injury," *J. Control. Release*, vol. 214, pp. 112–120, 2015.
- [115] P. Mitsopoulos, A. Omri, M. Alipour, N. Vermeulen, M. G. Smith, and Z. E. Suntres, "Effectiveness of liposomal-N-acetylcysteine against LPS-induced lung injuries in rodents.," *Int. J. Pharm.*, vol. 363, no. 1–2, pp. 106–11, Nov. 2008.
- [116] A. F. Ourique, P. D. S. Chaves, G. D. Souto, A. R. Pohlmann, S. S. Guterres, and R. C. R. Beck, "Redispersible liposomal-N-acetylcysteine powder for pulmonary administration: Development, in vitro characterization and antioxidant activity," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 65, pp. 174–182, 2014.
- [117] M. Odziomek, T. R. Sosnowski, and L. Gradoń, "Conception, preparation and properties of functional carrier particles for pulmonary drug delivery.," *Int. J. Pharm.*, vol. 433, no. 1–2, pp. 51–9, Aug. 2012.
- [118] A. Akbar, K. Zarchi, S. Abbasi, M. Ali, K. Gilani, M. Ghazi-khansari, and A. Amani, "Development and optimization of N-Acetylcysteine-loaded poly ( lactic-co-glycolic acid ) nanoparticles by electrospray," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 72, pp. 764–770, 2015.
- [119] K. Desai, S. Mallery, and S. Schwendeman, "Formulation and Characterization of Injectable Poly( -lactide-co- glycolide) Implants Loaded with N-Acetylcysteine, a MMP Inhibitor," *Pharm. Res.*, vol. 25, no. 3, pp. 586–597, 2008.
- [120] P. Mitsopoulos and Z. E. Suntres, "Protective Effects of Liposomal N-Acetylcysteine against Paraquat-Induced Cytotoxicity and Gene Expression," vol. 2011, 2011.
- [121] O. A. R. A. Zaid, A. F. Badawi, and S. A. Elsayes, "Studies on the

- Chemopreventive Potential of N-acetyl cysteine / zinc oxide nanocomposite combined with High ascorbate on 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene Induced Mammary Carcinogenesis in Rats," *Int. J. Pharma Sci.*, vol. 5, no. 2, pp. 976–980, 2015.
- [122] A. J. Ondricek, "The Neuroprotective Efficacy of Antioxidants Against In Vitro Models of Oxidative Stress and Their Theoretical Application Via Intravitreal Injection Encapsulated in Nanoparticles," University of North Texas Health Science Center at Fort Worth, 2010.
- [123] K. Avgoustakis, "Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery.," *Curr. Drug Deliv.*, vol. 1, no. 4, pp. 321–33, Oct. 2004.
- [124] X. Song, Y. Zhao, W. Wu, Y. Bi, Z. Cai, Q. Chen, Y. Li, and S. Hou, "PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency.," *Int. J. Pharm.*, vol. 350, no. 1–2, pp. 320–9, Feb. 2008.
- [125] E. Cohen-sela, S. Teitlboim, M. Chorny, N. Koroukhov, H. D. Danenberg, J. Gao, and G. Golomb, "Single and Double Emulsion Manufacturing Techniques of an Amphiphilic Drug in PLGA Nanoparticles : Formulations of Mithramycin and Bioactivity," *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no. 4, pp. 1452–1462, 2009.
- [126] R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R. Muller, and J. Verbavatz, "The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres," *Adv. drug Deliv.*, vol. 16, pp. 215–223, 1995.
- [127] M. T. Peracchia, R. Gref, Y. Minamitake, A. Domb, N. Lotan, and R. Langer, "PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers : Investigation of their drug encapsulation and release characteristics," *J. Control. release*, vol. 46, pp. 223–231, 1997.
- [128] P. Quellec, R. Gref, L. Perrin, E. Dellacherie, F. Sommer, J. M. Verbavatz, and M. J. Alonso, "Protein encapsulation within polyethylene glycol-coated nanospheres. I. Physicochemical characterization.," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 42, no. 1, pp. 45–54, 1998.
- [129] H. Fessi, F. Puisieux, J. Devissaguet, N. Ammoury, and S. Benita, "Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement," *Int. J. Pharm.*, vol. 55, pp. R1–R4, 1989.

- 
- [130] T. Govender, S. Stolnik, M. C. Garnett, L. Illum, and S. S. Davis, "PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug.," *J. Control. Release*, vol. 57, no. 2, pp. 171–85, Feb. 1999.
- [131] T. Riley, T. Govender, S. Stolnik, C. . Xiong, M. . Garnett, L. Illum, and S. . Davis, "Colloidal stability and drug incorporation aspects of micellar-like PLA-PEG nanoparticles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 16, no. 1–4, pp. 147–159, Nov. 1999.
- [132] H. Takeuchi, H. Yamamoto, and Y. Kawashima, "Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 47, no. 1, pp. 39–54, Mar. 2001.
- [133] T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, N. Kunou, and Y. Kawashima, "Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior," *J. Control. Release*, vol. 25, pp. 89–98, 1993.
- [134] U. Bilati, E. Allémann, and E. Doelker, "Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles.," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 24, no. 1, pp. 67–75, Jan. 2005.
- [135] A. Dalpiaz, E. Vighi, B. Pavan, and E. Leo, "Fabrication Via a Nonaqueous Nanoprecipitation Method , Characterization and In Vitro Biological Behavior of N 6 -Cyclopentyladenosine-Loaded Nanoparticles," *Pharm. Nanotechnol.*, vol. 98, no. 11, pp. 4272–4284, 2009.
- [136] A. Dalpiaz, F. Sacchetti, A. Baldisserotto, B. Pavan, E. Maretti, V. Iannuccelli, and E. Leo, "Application of the 'in-oil nanoprecipitation' method in the encapsulation of hydrophilic drugs in PLGA nanoparticles," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, pp. 1–8, 2015.
- [137] R. C. Mundargi, V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel, and T. M. Aminabhavi, "Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives.," *J. Control. release*, vol. 125, no. 3, pp. 193–209, Feb. 2008.
- [138] R. Sridhar and S. Ramakrishna, "Electrosprayed nanoparticles for drug delivery and pharmaceutical applications," *Biomatter*, vol. 3, no. 3, pp. 1–12, 2013.

- [139] S. M. Moghimi, A. C. Hunter, and J. C. Murray, "Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice," *Pharmacol. Rev.*, vol. 53, no. 2, pp. 283–318, 2001.
- [140] F. Lince, D. L. Marchisio, and A. A. Barresi, "Strategies to control the particle size distribution of poly- $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 322, no. 2, pp. 505–515, 2008.
- [141] C. Gomes, R. G. Moreira, and E. Castell-Perez, "Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles with entrapped trans-cinnamaldehyde and eugenol for antimicrobial delivery applications.," *J. Food Sci.*, vol. 76, no. 2, pp. N16–24, Mar. 2011.
- [142] M. N. V. Ravi Kumar, U. Bakowsky, and C. M. Lehr, "Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers," *Biomaterials*, vol. 25, no. 10, pp. 1771–1777, May 2004.
- [143] C. E. Astete and C. M. Sabliov, "Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles.," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 17, no. 3, pp. 247–89, Jan. 2006.
- [144] J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, J. Sung, G. Luther, F. X. Gu, E. Levy-Nissenbaum, A. F. Radovic-Moreno, R. Langer, and O. C. Farokhzad, "Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery.," *Biomaterials*, vol. 28, no. 5, pp. 869–76, Feb. 2007.
- [145] M. Gaumet, R. Gurny, and F. Delie, "Fluorescent biodegradable PLGA particles with narrow size distributions: preparation by means of selective centrifugation.," *Int. J. Pharm.*, vol. 342, no. 1–2, pp. 222–30, Sep. 2007.
- [146] Y. Kanakubo, F. Ito, and Y. Murakami, "Novel one-pot facile technique for preparing nanoparticles modified with hydrophilic polymers on the surface via block polymer-assisted emulsification/evaporation process.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 78, no. 1, pp. 85–91, Jun. 2010.
- [147] R. M. Mainardes and R. C. Evangelista, "PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution.," *Int. J. Pharm.*, vol. 290, no. 1–2, pp. 137–44, Feb. 2005.
- [148] L. Kukoc-Modun and N. Radić, "Kinetic spectrophotometric determination of N-acetyl-L-cysteine based on a coupled redox-complexation reaction.," *Anal. Sci.*, vol. 26, no. 4, pp. 491–5, Jan. 2010.

- [149] L. Kukoc-Modun and N. Radić, "Spectrophotometric determination of N-acetyl-L-cysteine and N-(2-mercaptopropionyl)-glycine in pharmaceutical preparations.," *Int. J. Anal. Chem.*, pp. 1–6, Jan. 2011.
- [150] Malvern, *Zetasizer nano series user manual*. Worcestershire: Malvern Instruments Ltd, 2010.
- [151] X. Song, Y. Zhao, S. Hou, F. Xu, R. Zhao, J. He, Z. Cai, Y. Li, and Q. Chen, "Dual agents loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 69, no. 2, pp. 445–53, Jun. 2008.
- [152] A. Budhian, S. J. Siegel, and K. I. Winey, "Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: systematic study of particle size and drug content.," *Int. J. Pharm.*, vol. 336, no. 2, pp. 367–75, May 2007.
- [153] G. Dalwadi and B. Sunderland, "An ion pairing approach to increase the loading of hydrophilic and lipophilic drugs into PEGylated PLGA nanoparticles.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 71, no. 2, pp. 231–42, Feb. 2009.
- [154] L. Peltonen, J. Aitta, S. Hyvönen, M. Karjalainen, and J. Hirvonen, "Improved entrapment efficiency of hydrophilic drug substance during nanoprecipitation of poly(l)lactide nanoparticles.," *AAPS PharmSciTech*, vol. 5, no. 1, p. E16, Mar. 2004.
- [155] A. Mehrotra and J. Pandit, "Critical Process Parameters Evaluation of Modified Nanoprecipitation Method on Lomustine Nanoparticles and Cytostatic Activity Study on L132 Human Cancer Cell Line," *J. Nanomed. Nanotechnol.*, vol. 03, no. 07, 2012.
- [156] G. Tosi, a V Vergoni, B. Ruozi, L. Bondioli, L. Badiali, F. Rivasi, L. Costantino, F. Forni, and M. a Vandelli, "Sialic acid and glycopeptides conjugated PLGA nanoparticles for central nervous system targeting: In vivo pharmacological evidence and biodistribution.," *J. Control. Release*, vol. 145, no. 1, pp. 49–57, Jul. 2010.
- [157] V. Saxena, M. Sadoqi, and J. Shao, "Indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro release.," *Int. J. Pharm.*, vol. 278, no. 2, pp. 293–301, Jul. 2004.
- [158] M. Beck-broichsitter, M. Knuedeler, T. Schmehl, and W. Seeger, "Following the

- Concentration of Polymeric Nanoparticles During Nebulization,” *Part. Sci. Technol.*, vol. 30, pp. 16–24, 2013.
- [159] H. Zhang, W. Cui, J. Bei, and S. Wang, “Preparation of poly(lactide-co-glycolide-co-caprolactone) nanoparticles and their degradation behaviour in aqueous solution,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 91, no. 9, pp. 1929–1936, Sep. 2006.
- [160] M. Beck-Broichsitter, E. Rytting, T. Lehardt, X. Wang, and T. Kissel, “Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: a shift in the ‘ouzo region’ upon drug loading,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 41, no. 2, pp. 244–53, Oct. 2010.
- [161] C. E. Mora-Huertas, H. Fessi, and A. Elaissari, “Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods. Critical comparison,” *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 163, no. 2, pp. 90–122, Apr. 2011.
- [162] F.-Y. Cheng, S. P.-H. Wang, C.-H. Su, T.-L. Tsai, P.-C. Wu, D.-B. Shieh, J.-H. Chen, P. C.-H. Hsieh, and C.-S. Yeh, “Stabilizer-free poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles for multimodal biomedical probes,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 13, pp. 2104–12, May 2008.
- [163] K. S. Yadav and K. K. Sawant, “Modified nanoprecipitation method for preparation of cytarabine-loaded PLGA nanoparticles,” *AAPS PharmSciTech*, vol. 11, no. 3, pp. 1456–65, Sep. 2010.
- [164] M. Mohan, B. K. Gupta, M. Jaggi, and S. C. Chauhan, “Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 351, no. 1, pp. 19–29, 2010.
- [165] M. Esfandyari-Manesh, Z. Ghaedi, M. Asemi, M. Khanavi, A. Manayi, H. Jamalifar, F. Atyabi, and R. Dinarvand, “Study of antimicrobial activity of anethole and carvone loaded PLGA nanoparticles,” *J. Pharm. Res.*, vol. 7, no. 4, pp. 290–295, 2013.
- [166] M. Kato, H. Toyoda, T. Namikawa, M. Hoshino, H. Terai, S. Miyamoto, and K. Takaoka, “Optimized use of a biodegradable polymer as a carrier material for the local delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2),” *Biomaterials*, vol. 27, no. 9, pp. 2035–41, Mar. 2006.
- [167] W. Shi, Z. Zhang, Y. Yuan, E. Xing, and Y. Qin, “Optimization of Parameters for Preparation of Docetaxel-loaded PLGA Nanoparticles by Nanoprecipitation

- Method," *J. Huazhong Univ. Sci. Technol.*, vol. 33, no. 5, pp. 754–758, 2013.
- [168] I.-S. Kim, S.-K. Lee, Y.-M. Park, Y.-B. Lee, S.-C. Shin, K. C. Lee, and I.-J. Oh, "Physicochemical characterization of poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles with polyethylenimine as gene delivery carrier.," *Int. J. Pharm.*, vol. 298, no. 1, pp. 255–62, Jul. 2005.
- [169] H. Gupta, M. Aqil, R. K. Khar, A. Ali, A. Bhatnagar, and G. Mittal, "Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery.," *Nanomedicine*, vol. 6, no. 2, pp. 324–33, Apr. 2010.
- [170] J. U. Menon, S. Kona, A. S. Wadajkar, F. Desai, A. Vadla, and K. T. Nguyen, "Effects of surfactants on the properties of PLGA nanoparticles.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 100, no. 8, pp. 1998–2005, Aug. 2012.
- [171] S. Galindo-Rodriguez, E. Alle, H. Fessi, and E. Doelker, "Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-out , Nanoprecipitation Methods," *Pharm. Res.*, vol. 21, no. 8, pp. 1428–1439, 2004.
- [172] T. H. Anh Nguyen and V. C. Nguyen, "Formation of nanoparticles in aqueous solution from poly( $\epsilon$ -caprolactone)–poly(ethylene glycol)–poly( $\epsilon$ -caprolactone)," *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 1, pp. 1–5, Jun. 2010.
- [173] F. N. Costa, A. L. Ibiapino, L. P. de Figueiredo, E. J. Barreiro, L. M. Lima, D. N. do Amaral, C. E. de Castro, F. C. Giacomelli, and F. F. Ferreira, "Preliminary evaluation of the encapsulation of new antidiabetic sulphonylhydrazone and antitumor *N*-acylhydrazone derivatives using PLGA nanoparticles," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 617, p. 012015, 2015.
- [174] C. Draheim, F. de Crécy, S. Hansen, E.-M. Collnot, and C.-M. Lehr, "A Design of Experiment Study of Nanoprecipitation and Nano Spray Drying as Processes to Prepare PLGA Nano- and Microparticles with Defined Sizes and Size Distributions," *Pharm. Res.*, pp. 2609–2624, 2015.
- [175] P. K. Sharma, M. J. Reilly, D. N. Jones, P. M. Robinson, and S. R. Bhatia, "The effect of pharmaceuticals on the nanoscale structure of PEO – PPO – PEO micelles," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 61, pp. 53–60, 2008.
- [176] G. Dumortier, J. L. Grossiord, F. Agnely, and J. C. Chaumeil, "A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics.," *Pharm. Res.*, vol. 23, no. 12, pp. 2709–28, Dec. 2006.

- [177] H. Mok and T. G. Park, "Direct plasmid DNA encapsulation within PLGA nanospheres by single oil-in-water emulsion method.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 68, no. 1, pp. 105–11, Jan. 2008.
- [178] F. Tewes, E. Munnier, B. Antoon, L. Ngaboni Okassa, S. Cohen-Jonathan, H. Marchais, L. Douziech-Eyrolles, M. Soucé, P. Dubois, and I. Chourpa, "Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods.," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 66, no. 3, pp. 488–92, Jun. 2007.
- [179] "Guidance for Industry Q3C — Tables and List U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Biologics Evaluation and Research (CBER)," 2012. [Online]. Available: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/01b-0431-gdl0001.pdf>. [Accessed: 05-Jan-2016].
- [180] D. Sharma, N. Sharma, Rakesh Kumar Sharma, R. Gabrani, S. K. Sharma, J. Ali, and S. Dang, "Nose-To-Brain Delivery of PLGA-Diazepam Nanoparticles," *AAPS PharmSciTech* Oct. 2015, Vol. 16, Issue 5, pp 1108-1121 First online 21 Febr. 2015, vol. 16, no. 5, pp. 1108–1121, 2015.
- [181] L. Zhang, Q. Yin, J. Li, H. Huang, Q. Wu, and Z. Mao, "Biodegradable PLGA nanoparticles loaded with hydrophobic drugs: confocal Raman microspectroscopic characterization," *J. Mater. Chem. B*, vol. 3, no. 18, pp. 2245–2251, 2015.
- [182] G. Mittal, D. K. Sahana, V. Bhardwaj, and M. N. V Ravi Kumar, "Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo.," *J. Control. Release*, vol. 119, no. 1, pp. 77–85, May 2007.
- [183] H. Van de Ven, C. Paulussen, P. B. Feijens, a Matheeussen, P. Rombaut, P. Kayaert, G. Van den Mooter, W. Weyenberg, P. Cos, L. Maes, and a Ludwig, "PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome.," *J. Control. Release*, vol. 161, no. 3, pp. 795–803, Aug. 2012.
- [184] H.-Y. Kwon, J.-Y. Lee, S.-W. Choi, Y. Jang, and J.-H. Kim, "Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification–diffusion method," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 182, no. 1–3, pp. 123–130, Jun. 2001.
- [185] D. Quintanar-guerrero, H. Fessi, E. Allmann, and E. Doelker, "Influence of

- stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly ( D , L-lactic acid ) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique,” *Int. J. Pharm.*, vol. 143, pp. 133–141, 1996.
- [186] B. Noszál, D. Visky, and M. Kraszni, “Population , Acid - Base , and Redox Properties of N -Acetylcysteine Conformers,” *J. Med. Chem.*, vol. 43, pp. 2176–2182, 2000.
- [187] S. Aldrich Sigma, “Data sheet, N-acetyl-L-cysteine,” 2012.
- [188] F. Danhier, N. Lecouturier, B. Vroman, C. Jérôme, J. Marchand-Brynaert, O. Feron, and V. Préat, “Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation.,” *J. Control. Release*, vol. 133, no. 1, pp. 11–7, Jan. 2009.
- [189] A. Beletsi, Z. Panagi, and K. Avgoustakis, “Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers.,” *Int. J. Pharm.*, vol. 298, no. 1, pp. 233–41, Jul. 2005.
- [190] E. Cenni, D. Granchi, S. Avnet, C. Fotia, M. Salerno, D. Micieli, M. G. Sarpietro, R. Pignatello, F. Castelli, and N. Baldini, “Biocompatibility of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles conjugated with alendronate.,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 10, pp. 1400–11, Apr. 2008.
- [191] B. Sinha, B. Mukherjee, and G. Pattnaik, “Poly-lactide-co-glycolide nanoparticles containing voriconazole for pulmonary delivery: in vitro and in vivo study.,” *Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 94–104, Jan. 2013.
- [192] K. C. Song, H. S. Lee, I. Y. Choung, K. I. Cho, Y. Ahn, and E. J. Choi, “The effect of type of organic phase solvents on the particle size of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 276, no. 1–3, pp. 162–167, Mar. 2006.
- [193] K. Avgoustakis, A. Beletsi, Z. Panagi, P. Klepetsanis, a G. Karydas, and D. S. Ithakissios, “PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties.,” *J. Control. Release*, vol. 79, no. 1–3, pp. 123–35, Feb. 2002.
- [194] D. Moreno, S. Zalba, I. Navarro, C. Tros de Ilarduya, and M. J. Garrido, “Pharmacodynamics of cisplatin-loaded PLGA nanoparticles administered to tumor-bearing mice.,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 74, no. 2, pp. 265–74, Feb. 2010.

- [195] A.-L. Alane, H. Hyvönen, M. Lahtinen, M. Ylisirniö, P. Turhanen, E. Kolehmainen, S. Peräniemi, and J. Vepsäläinen, "Systematic study of the physicochemical properties of a homologous series of aminobisphosphonates.," *Molecules*, vol. 17, no. 9, pp. 10928–45, 2012.
- [196] B. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Chichester, 2004.
- [197] S. Dash, P. Murthy, L. Nath, and P. Chowdhury, "Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems," *Acta Pol. Pharm.*, vol. 67, no. 3, pp. 217–223, 2010.
- [198] D. T. Birnbaum and L. Brannon Peppas, "Molecular weight distribution changes during degradation and release of PLGA nanoparticles containing epirubicin HCl," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2003.
- [199] M. A. Tracy, K. L. Ward, L. Firouzabadian, Y. Wang, N. Dong, R. Qian, and Y. Zhang, "Factors affecting the degradation rate of poly ( lactide-co-glycolide ) microspheres in vivo and in vitro," *Biomaterials*, vol. 20, pp. 1057–1062, 1999.
- [200] D. Lemoine, C. Francois, F. Kedzierewicz, V. Preat, M. Hoffman, and P. Maincent, "Stability study of nanoparticles of and poly ( D , L-lactide-co-glycolide )," *Biomaterials*, vol. 17, no. 22, pp. 2191–2197, 1996.
- [201] C. L. Huang, T. W. J. Steele, E. Widjaja, F. Y. C. Boey, S. S. Venkatraman, and J. S. C. Loo, "The influence of additives in modulating drug delivery and degradation of PLGA thin films," *NPG Asia Mater.*, vol. 5, no. 7, pp. e54–11, 2013.
- [202] R. Dorati, C. Colonna, I. Genta, T. Modena, and B. Conti, "Effect of porogen on the physico-chemical properties and degradation performance of PLGA scaffolds," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 95, no. 4, pp. 694–701, Apr. 2010.
- [203] A. Frank, S. K. Rath, and S. S. Venkatraman, "Controlled release from bioerodible polymers : effect of drug type and polymer composition," *J. Control. Release*, vol. 102, pp. 333–344, 2005.
- [204] M. Dunne, O. Corrigan, and Z. Ramtoola, "Influence of particle size and dissolution conditions on the degradation properties of polylactide-co-glycolide particles," *Biomaterials*, vol. 21, pp. 1659–1668, 2000.

- 
- [205] A. S. Hussein and F. Ahmadun, "In vitro degradation of poly ( D , L-lactide-co-glycolide ) nanoparticles loaded with linamarin," *IET Nanobiotechnology*, vol. 7, no. 2, pp. 33–41, 2013.
- [206] W. S. Cheow and K. Hadinoto, "Enhancing encapsulation efficiency of highly water-soluble antibiotic in poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Modifications of standard nanoparticle preparation methods," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 370, no. 1–3, pp. 79–86, Nov. 2010.
- [207] O. I. Corrigan and X. Li, "Quantifying drug release from PLGA nanoparticulates," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 37, pp. 477–485, 2009.
- [208] N. Rescignano, M. Amelia, a. Credi, J. M. Kenny, and I. Armentano, "Morphological and thermal behavior of porous biopolymeric nanoparticles," *Eur. Polym. J.*, vol. 48, no. 7, pp. 1152–1159, Jul. 2012.
- [209] J. Siepmann and N. Peppas, "Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 48, no. 2–3, pp. 139–157, 2001.
- [210] J. Arroub, J. Bergès, Z. Abedinzadeh, J. Langlet, and M. Gardès, "On N-acetylcysteine. Part I. Experimental and theoretical approaches of the N-acetylcysteine/H<sub>2</sub>O complexation," *Can. J. Chem.*, vol. 72, pp. 2094 – 2101, 1994.
- [211] M. L. T. Zweers, G. H. M. Engbers, D. W. Grijpma, and J. Feijen, "In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide).," *J. Control. Release*, vol. 100, no. 3, pp. 347–56, Dec. 2004.
- [212] J. A. Buckwalter, M. J. Glimcher, R. R. Cooper, and R. Recker, "Bone Biology. Part I: Structure, Blood Supply, Cells, Matrix and Mineralization," *J. bone Jt. Surg.*, vol. 77, pp. 1256–1275, 1995.
- [213] J. E. Shea and S. C. Miller, "Skeletal function and structure : Implications for tissue-targeted therapeutics," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, pp. 945–957, 2005.
- [214] X. Liu, "Bone site-specific delivery of siRNA," *J. Biomed. Res.*, vol. 30, no. 000, pp. 000–000, 2016.
- [215] D. Stepensky, L. Kleinberg, and A. Hoffman, "Bone as an effect compartment

- Models for uptake and release of drugs," *Clin. Pharmacokinet.*, 2003.
- [216] H. C. Blair and N. A. Athanasou, "Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption," *Histol. Histopathol.*, vol. 19, pp. 189–199, 2004.
- [217] J. Lenora, K. K. Ivaska, and P. Gerdhem, "Use of Bone Turnover Markers in Osteoporosis," *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, May 2009.
- [218] T. Suda, N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M. Gillespie, and T. Martin, "Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families," *Endocr. Rev.*, vol. 20, pp. 345–57, 1999.
- [219] W. Simonet, D. Lacey, C. Dunstan, and M. Kelley, "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density," *Cell*, vol. 89, pp. 159–61, 1997.
- [220] B. Lee, S. Gluck, and L. Holliday, "Interaction between Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and Microfilaments during Osteoclast Activation," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 41, pp. 29164–71, 1999.
- [221] J. Mattsson, X. Li, S. Peng, F. Nilsson, P. Andersen, and L. Lundberg, "Properties of three isoforms of the 116-kDa subunit of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase from a single vertebrate species. Cloning, gene expression and protein characterization of functionally distinct isoforms in *Gallus gallus*," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 13, pp. 4115–26, 2000.
- [222] B. Reel, C. G. Korkmaz, M. Z. Arun, G. Yildirim, and D. Ogut, "The Regulation of Matrix Metalloproteinase Expression and the Role of Discoidin Domain Receptor 1 / 2 Signaling in Zoledronate-treated PC3 Cells," *J. Cancer*, vol. 6, no. 10, pp. 1020–1029, 2015.
- [223] S. M. Krane and M. Inada, "Matrix metalloproteinases and bone," *Bone*, vol. 43, pp. 7–18, 2008.
- [224] X. F. Yu and Z. C. Han, "Matrix metalloproteinases in bone marrow : roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies," *Histol. Histopathol.*, vol. 21, pp. 519–531, 2006.
- [225] S. Löffek, O. Schilling, and C.-W. Franzke, "Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance," *Eur. Respir. J.*, vol. 38, no. 1, pp. 191–208,

- 2011.
- [226] H. Sil and A. Chatterjee, "Integrin Alpha-V Beta-3-Matrix," *J. Cancer Ther.*, vol. 6, pp. 793–802, 2015.
- [227] T. Yoneda, M. Hiasa, Y. Nagata, T. Okui, and F. A. White, "Acidic microenvironment and bone pain in cancer-colonized bone," *Bonekey Rep.*, vol. 690, no. 4, pp. 1–9, 2015.
- [228] C. S. Thudium, K. Henriksen, C. Flores, J. S. Thomsen, A. Bru, A. V Neutzsky-wulff, G. E. J. Langenbach, N. Sims, M. Askmyr, T. J. Martin, V. Everts, M. A. Karsdal, and J. Richter, "Dissociation of Bone Resorption and Bone Formation in Adult Mice with a Non-Functional V-ATPase in Osteoclasts Leads to Increased Bone Strength," *PLoS One*, vol. 6, no. 11, pp. 1–11, 2011.
- [229] M. Yagi, T. Miyamoto, Y. Sawatani, K. Iwamoto, N. Hosogane, N. Fujita, K. Morita, K. Ninomiya, T. Suzuki, K. Miyamoto, Y. Oike, M. Takeya, Y. Toyama, and T. Suda, "DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells.," *J. Exp. Med.*, vol. 202, no. 3, pp. 345–51, Aug. 2005.
- [230] B. G. Ha, J. M. Hong, J.-Y. Park, M.-H. Ha, T.-H. Kim, J.-Y. Cho, H.-M. Ryoo, J.-Y. Choi, H.-I. Shin, S. Y. Chun, S.-Y. Kim, and E. K. Park, "Proteomic profile of osteoclast membrane proteins: identification of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger domain containing 2 and its role in osteoclast fusion.," *Proteomics*, vol. 8, no. 13, pp. 2625–39, Jul. 2008.
- [231] P. Lehenkari, T. A. Hentunen, T. Laitala-leinonen, J. Tuukkanen, and H. K. Väänänen, "Carbonic Anhydrase II Plays a Major Role in Osteoclast Differentiation and Bone Resorption by Effecting the Steady State Intracellular pH and Ca<sup>2+</sup>," *Exp. Cell Res.*, vol. 242, pp. 128–137, 1998.
- [232] M. M. Adeva-andany, C. Fernández-Fernández, R. Sanchez-Belllo, C. Donalpetry-García, and J. Martínez-Rodríguez, "The role of carbonic anhydrase in the pathogenesis of vascular calcification in humans," *Atherosclerosis*, vol. 241, pp. 183–191, 2015.
- [233] R. Reyes and M. Muñoz-Torres, "Cathepsina K : aspectos biológicos y posibilidades terapéuticas," *Med. Clin. (Barc.)*, vol. 131, no. 6, pp. 218–220, 2008.
- [234] J. Guay, J. P. Falgout, A. Ducret, M. D. Percival, and J. A. Mancini, "Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides.,"

- Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 20, pp. 6311–8, Oct. 2000.
- [235] J. Beaudreuil, S. Balasubramanian, J. Chenais, J. Taboulet, M. Frenkian, P. Orcel, A. Jullienne, W. C. Horne, M. C. De Vernejoul, and M. Cressent, “Molecular characterization of two novel isoforms of the human calcitonin receptor B,” *Gene*, vol. 343, pp. 143–151, 2004.
- [236] P. Cafforio, M. De Matteo, A. E. Brunetti, F. Dammacco, and F. Silvestris, “Functional expression of the calcitonin receptor by human T and B cells,” *Hum. Immunol.*, vol. 70, pp. 678–685, 2009.
- [237] F. Silvestris, P. Cafforio, M. De Matteo, C. Quatraro, and F. Dammacco, “Expression and function of the calcitonin receptor by myeloma cells in their osteoclast-like activity in vitro,” *Leuk. Res.*, vol. 32, pp. 611–623, 2008.
- [238] D. Kanakis, U. Lendeckel, P. Theodosiou, and H. Dobrowolny, “ADAM 12 : A putative marker of oligodendrogliomas ?,” *Dis. Markers*, vol. 34, pp. 81–91, 2013.
- [239] P. Boissy, T. R. Lenhard, T. Kirkegaard, J. J. Peschon, C. Ovejero, R. A. Black, J. Delaisse, and M. del C. Ovejero, “An assessment of ADAMs in bone cells : absence of TACE activity prevents osteoclast recruitment and the formation of the marrow cavity in developing long bones,” *FEBS Lett.*, vol. 553, pp. 257–261, 2003.
- [240] M. Kveiborg, R. Albrechtsen, L. Rudkjær, G. Wen, K. Damgaard-pedersen, and U. M. Wewer, “ADAM12-S Stimulates Bone Growth in Transgenic Mice by Modulating Chondrocyte Proliferation and Maturation,” *J. bone Miner. Res.*, vol. 21, no. 8, pp. 1288–1296, 2006.
- [241] M. Ruff, A. Leyme, F. Le Cann, D. Bonnier, L. J. Seyec, F. Chesnel, L. Fattet, R. Rimokh, G. Baffet, and N. Théret, “The Disintegrin and Metalloprotease ADAM12 Is Associated with TGF-  $\beta$  -Induced Epithelial to Mesenchymal Transition,” *PLoS One*, no. 9, pp. 1–24, 2015.
- [242] S. Verrier, A. Hogan, N. Mckie, and M. Horton, “ADAM gene expression and regulation during human osteoclast formation,” *Bone*, vol. 35, pp. 34–46, 2004.
- [243] A. R. Hayman, “Tartrate-resistant acid phosphatase ( TRAP ) and the osteoclast / immune cell dichotomy,” *Autoimmunity*, vol. 41, no. 3, pp. 218–223, 2008.
- [244] A. R. Hayman, M. J. Warburton, J. A. S. Pringle, B. Colest, and T. J. Chambers, “Purification and characterization of a tartrate-resistant acid phosphatase from

- human osteoclastomas," *Biochem. J.*, vol. 261, pp. 601–609, 1989.
- [245] M. Arai, Y. Shibata, K. Pugdee, Y. Abiko, and Y. Ogata, "Effects of Reactive Oxygen Species ( ROS ) on Antioxidant System and Osteoblastic Differentiation in MC3T3-E1 Cells," *IUBMB Life*, vol. 59, no. January, pp. 27–33, 2007.
- [246] E. Filaire and H. Toumi, "Reactive oxygen species and exercise on bone metabolism : Friend or enemy ?," *Jt. Bone Spine*, vol. 79, pp. 341–346, 2012.
- [247] H. Ha, H. Bok, S. Woong, H. Mi, H. Kim, H. Kim, and Z. Hee, "Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts," *Exp. Cell Res.*, vol. 301, pp. 119–127, 2004.
- [248] N. C. J. Pedraza-chaverri, "Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes : aspectos básicos," *Educ. Química*, vol. 17, no. 2, pp. 164–173, 2005.
- [249] D. A. Callaway and J. X. Jiang, "Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis , skeletal aging and bone diseases," *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 33, pp. 359–370, 2015.
- [250] K. Ke, O.-J. Sul, E.-K. Choi, A. M. Safdar, E.-S. Kim, and H.-S. Choi, "Reactive oxygen species induce the association of SHP-1 with c-Src and the oxidation of both to enhance osteoclast survival," *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, vol. 307, pp. 61–70, 2014.
- [251] R. Nicoll, J. M. Howard, and M. Henein, "Cardiovascular calcification and bone : A comparison of the effects of dietary and serum antioxidants," *Int. Cardiovasc. Forum J.*, vol. 2, pp. 8–15, 2015.
- [252] H. J. Kim, E. Chang, H. Kim, S. B. Lee, H.-D. Kim, G. S. Kim, and H.-H. Kim, "Antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid inhibits osteoclast differentiation by reducing nuclear factor- $\kappa$ B DNA binding and prevents in vivo bone resorption induced by receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and tumor necrosis factor- $\alpha$ ," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 40, pp. 1483–1493, 2006.
- [253] P. Aghajanian, S. Hall, M. D. Wongworawat, and S. Mohan, "The Roles and Mechanisms of Actions of Vitamin C in Bone : New Developments," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 30, no. 11, pp. 1945–1955, 2015.

- [254] C. Romagnoli, G. Marcucci, F. Favilli, R. Zonefrati, C. Mavilia, G. Galli, A. Tanini, T. Iantomasi, M. L. Brandi, and M. T. Vincenzini, "Role of GSH / GSSG redox couple in osteogenic activity and osteoclastogenic markers of human osteoblast-like," *FEBS J.*, vol. 280, pp. 867–879, 2013.
- [255] F. Fontani, G. Marcucci, T. Iantomasi, M. L. Brandi, and M. T. Vincenzini, "Glutathione , N -acetylcysteine and Lipoic Acid Down-Regulate Starvation-Induced Apoptosis , RANKL / OPG Ratio and Sclerostin in Osteocytes : Involvement of JNK and ERK1 / 2 Signalling," *Calcif. Tissue Int.*, vol. 96, pp. 335–346, 2015.
- [256] H. Aita, N. Tsukimura, M. Yamada, N. Hori, K. Kubo, N. Sato, H. Maeda, K. Kimoto, and T. Ogawa, "N-acetyl cysteine prevents polymethyl methacrylate bone cement extract-induced cell death and functional suppression of rat primary osteoblasts.," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 92, no. 1, pp. 285–96, Jan. 2010.
- [257] H. Toker, H. Ozdemir, H. Balç, and H. Ozer, "N -acetylcysteine decreases alveolar bone loss on experimental periodontitis in streptozotocin-induced diabetic rats," *J. Periodontal Res.*, vol. 47, pp. 793–799, 2012.
- [258] J. J. Cao and M. J. Picklo, "N -Acetylcysteine Supplementation Decreases Osteoclast Differentiation and Increases Bone Mass in Mice Fed a High-Fat Diet," *J. Nutr.*, vol. 144, no. 3, pp. 289–296, 2014.
- [259] M. M. Ardawi, M. H. Badawoud, S. M. Hassan, A. A. Rouzi, J. M. S. Ardawi, N. M. Alnosani, M. H. Qari, and S. A. Mousa, "Lycopene treatment against loss of bone mass , microarchitecture and strength in relation to regulatory mechanisms in a postmenopausal osteoporosis model ☆," *Bone*, vol. 83, pp. 127–140, 2016.
- [260] Y. Iimura, U. Agata, and S. Takeda, "The protective effect of lycopene intake on bone loss in ovariectomized rats," *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 33, pp. 270–278, 2015.
- [261] H. Kondo, S. Takeuchi, and A. Togari, "Adrenergic signaling stimulates osteoclastogenesis via reactive oxygen species," *Am. J. Physiol. Metab.*, vol. 304, pp. 507–515, 2013.
- [262] X. He, G. Andersson, U. Lindgren, and Y. Li, "Resveratrol prevents RANKL-induced osteoclast differentiation of murine osteoclast progenitor RAW 264 . 7 cells through inhibition of ROS production," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 401, pp. 356–362, 2010.
- [263] M. Almeida, "Aging mechanisms in bone," *Bonekey Rep.*, vol. 1, no. 7, pp. 1–7,

2012.

- [264] T. W. Kyung, J. E. Lee, H. H. Shin, and H. S. Choi, "Rutin inhibits osteoclast formation by decreasing reactive oxygen species and TNF-alpha by inhibiting activation of NF-kappaB.," *Exp. Mol. Med.*, vol. 40, no. 1, pp. 52–8, Feb. 2008.
- [265] H. Moon, S. E. Kim, Y. P. Yun, Y. Hwang, J. B. Bang, J.-H. P. Park, and I. K. Kwon, "Simvastatin inhibits osteoclast differentiation by scavenging reactive oxygen species," *Exp. Mol. Med.*, vol. 43, no. 11, pp. 605–612, 2011.
- [266] M. Kheirallah and H. Almeshaly, "Simvastatin, dosage and delivery system for supporting bone regeneration, an update review," *J. Oral Maxillofac. Surgery, Med. Pathol.*, 2015.
- [267] E. Manrique, L. M. Castillo, O. Lazala, C. A. Guerrero, and O. Acosta, "Bone resorptive activity of human peripheral blood mononuclear cells after fusion with polyethylene glycol," *J. Bone Miner. Metab.*, no. 3, 2016.
- [268] M. H. Helfrich and S. H. Ralston, Eds., *Bone Research Protocols*. New Jersey: Humana Press, 2003.
- [269] A. M. Campbell, "The production and characterization of rodent and human hybridomas," in *Monoclonal antibody technology*, Laboratory., van K. P. (eds) Burdon RH, Ed. New York: Elsevier, 1984, pp. 120–134.
- [270] A. Murillo, C. A. Guerrero, O. Acosta, and C. A. Cardozo, "Bone resorptive activity of osteoclast-like cells generated in vitro by PEG-induced macrophage fusion," *Biol. Res.*, vol. 43, pp. 205–224, 2010.
- [271] C. Cervellati, G. Bonaccorsi, E. Cremonini, A. Romani, E. Fila, M. C. Castaldini, S. Ferrazzini, M. Giganti, and L. Massari, "Oxidative Stress and Bone Resorption Interplay as a Possible Trigger for Postmenopausal Osteoporosis," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–8, 2014.
- [272] O. Faruk, Y. Turan, E. Tastaban, and M. Serter, "Antioxidant status in patients with osteoporosis : A controlled study," *Jt. Bone Spine*, vol. 76, pp. 514–518, 2009.
- [273] S. Yang, Y. Zhang, W. Ries, and L. Key, "Expression of Nox4 in Osteoclasts," *J. Cell. Biochem.*, vol. 92, pp. 238–248, 2004.

- [274] F. Wauquier and L. Leotoing, "Oxidative stress in bone remodelling and disease," *Trends Mol. Med.*, vol. 15, no. 10, pp. 468–477, 2009.
- [275] O. Altindag, O. Erel, N. Soran, H. Celik, and S. Selek, "Total oxidative / anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis," *Rheumatol. Int.*, vol. 28, pp. 317–321, 2008.
- [276] J. M. Halleen, S. Räsänen, J. J. Salo, S. V. Reddy, G. D. Roodman, T. A. Hentunen, P. P. Lehenkari, H. Kaija, P. Vihko, and H. K. Väänänen, "Intracellular Fragmentation of Bone Resorption Products by Generated by Osteoclastic Phosphatase," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 33, pp. 22907–22911, 1999.
- [277] E. Cenni, S. Avnet, D. Granchi, C. Fotia, M. Salerno, D. Micieli, M. G. Sarpietro, R. Pignatello, and N. Baldini, "The Effect of Poly ( d , l-Lactide- Conjugate Nanoparticles on Human Osteoclast Precursors," *J. Biomater. Sci.*, vol. 23, pp. 1285–1300, 2012.