



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**EVALUACION DE LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR
NANOPARTICULAS DE QUITOSAN Y POLIETILCIANOACRILATO *IN
VIVO***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

PRESENTA:

JOSE ANGEL RIVERO GONZALEZ

ASESOR: Dra: PATRICIA RAMIREZ NOGUERA

COASESOR: Dr. ROBERTO DIAZ TORRES

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
 UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
 ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
 DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
 PRESENTE



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
 Jefa del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: TESIS

Evaluación de la citotoxicidad inducida por nanopartículas de quitosán y polietilenoacrilato *in vivo*

Que presenta el pasante: José Ángel Rivero González
 Con número de cuenta: 30207642-4 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 “POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
 Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Octubre de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DAR. Juan José Díaz Esquivel	
VOCAL	DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er SUPLENTE	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	
2do SUPLENTE	Dr. José Juan Escobar Chávez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
 HHA/pm

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres por ese apoyo incondicional que siempre me han brindado, por el infinito amor y ejemplo de vida por el cual me han guiado para ser un hombre de bien, preparado para la vida, porque gracias a ellos he concluido esta etapa de mi vida que un día fue un sueño y hoy una realidad. Siempre les estaré agradecido.

A mis hermanos por todos esos momentos que hemos compartido y todo el apoyo que siempre he recibido de ustedes.

A Karen Janet por ser el ángel que me ha guiado y apoyado, por permitir cruzar esta etapa tan importante de mi vida a tu lado, por el camino que poco a poco hemos y seguiremos forjando, por elegirnos diariamente, pero lo que más agradezco es la oportunidad de trascender en esta vida contigo, siempre juntos, de la mano TE AMO.

A la Dra. Patricia y al Dr. Roberto por haber sido mis asesores y profesores. Porque además de recibir su apoyo y conocimiento, me brindaron su amistad y calidez humana.

A mi alma mater, la UNAM, donde me encontré a personas que cambiaron mi vida, donde me convertí en la persona que siempre quise ser, orgulloso de pertenecer a esta gran universidad.

DEDICATORIA:

Este trabajo se lo dedico a mi familia y a Karen mi ángel terrenal, porque siempre estuvieron a mi lado en las buenas y en las malas, porque sin ellos no hubiera podido realizar este sueño.

ÍNDICE

1	MARCO TEÓRICO.....	1
1.1	DEFINICIÓN DE NANOPARTÍCULAS	1
1.2	HISTORIA	2
1.3.	MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.....	4
1.3.1.	DISPERSIÓN DE POLÍMEROS PREFORMADOS	5
1.3.1.1	Evaporación del disolvente	5
1.3.1.2	Evaporación del disolvente tras la formación de una emulsión	5
1.3.1.3	Salting-out	6
1.3.1.4	Nanoprecipitación.....	7
1.3.1.5	Diálisis.....	7
1.3.1.6	Tecnología de fluidos supercríticos.....	8
1.3.1.6.1	Rápida expansión de solución supercrítica (RESS).....	9
1.3.1.6.2	Rápida expansión de una solución en un solvente líquido supercrítico (RESOLV)	9
1.3.2	POLIMERIZACIÓN DE MONÓMEROS	9
1.3.2.2	Polimerización en emulsión	9
1.3.2.3	Polimerización por doble o múltiple emulsión	10
1.3.2.4	Polimerización aniónica/anfótera	10
1.3.2.5	Polimerización Interfacial.....	11
1.3.2.6	Polimerización radicalaria viva controlada	11
1.3.3	COACERVACIÓN O GELACIÓN IÓNICA.....	12
2	CARACTERIZACIÓN	12
2.3	Potencial Zeta.....	13
2.4	Tamaño de partícula	15
2.4.1.2	Dispersión de luz dinámica.....	15
2.4.1.3	Difracción Láser	16
2.5	Microscopia electrónica de transmisión (MET).....	16
2.6	Microscopia electrónica de barrido (MEB)	17
3	NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN Y POLI(ETIL-2-CIANOACRILATO) (PECA)	19
2.	NANOTOXICOLOGIA	20

2.1.	Biomarcadores de exposición	20
2.2.	Biomarcadores de susceptibilidad.	21
2.3.	Biomarcadores de respuesta (o efecto)	21
3.	EVALUACIONES DE LA CAPACIDAD TOXICA DE NANOPARTICULAS	22
3.1.	Ensayo cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico	24
3.1.1.	Producción de especies reactivas al oxígeno (ros)	25
3.2.	ENSAYO DE GLUTATION (GSH)	25
3.2.1.	Fuentes de oxidantes	27
4.	ANIMALES COMO MODELO DE EXPERIMENTACION EN NANOTOXICOLOGIA.....	28
4.1.	Aspectos bioéticos sobre la experimentación animal.	29
4.2.	Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.....	31
5.	JUSTIFICACIÓN.....	31
6.	OBJETIVO	33
a.	Objetivo general.	33
b.	Objetivos particulares	33
7.	METODOLOGÍA.....	33
7.1.	MATERIALES	33
7.1.1.	Preparación de nanopartículas	33
7.1.2.	Cuidado y uso de animales de laboratorio	33
7.1.3.	Ensayo de TBARS.....	34
7.1.4.	Ensayo de Glutación	34
7.1.5.	Soluciones	34
7.1.5.1.	Soluciones ensayo TBARS	34
7.1.5.2.	Soluciones ensayo GSH.....	34
7.1.5.3.	Soluciones para preparación de nanopartículas	34
7.1.6.	Equipos.....	35
7.2.	MÉTODOS.....	35
7.2.1.	Modelo experimental.....	35
7.2.2.	Preparación de nanopartículas	35
7.2.2.1.	Nanopartículas de Quitosán.....	35
7.2.2.2.	Nanopartículas de Polietilcianoacrilato.....	36
7.2.2.3.	Nanopartículas de Quitosán/Polietilcianoacrilato.	36

7.2.3.	Acondicionamiento de las suspensiones de nanopartículas para caracterización.	36
7.2.4.	Cuantificación de material en los sistemas de nanopartículas.	37
7.2.5.	Exposición de nanopartículas por vía intraperitoneal en ratas wistar.	37
7.2.5.1.	Cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en tejido.	38
7.2.5.2.	Tratamiento de las muestras para TBARS.	38
7.2.5.3.	Preparación de la curva de calibración de TBA.	39
7.2.5.4.	Cuantificación de proteínas totales en tejido (método de Bradford).	39
7.2.5.5.	Preparación de la curva de calibración de Bradford para proteínas totales.	40
7.2.5.6.	Cálculo de TBARS.	40
7.2.5.7.	Cuantificación de glutatión (GSH).	41
7.2.5.8.	Tratamiento de las muestras para GSH.	41
7.2.5.9.	Cálculo de GSH.	42
8.	RESULTADOS.	43
8.1.	Caracterización.	43
8.1.1.	Tamaño de partícula.	43
8.1.2.	Potencial Zeta.	45
8.1.3.	Microscopia electrónica de barrido (SEM).	46
8.1.4.	Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).	47
8.1.5.	Cantidad de material en suspensión de los sistemas.	49
8.2.	EVALUACIONES CITOTOXICOLÓGICAS.	49
8.2.1.	Cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).	49
8.2.2.	Cuantificación de Glutatión (GSH).	51
8.3.	Análisis estadístico.	52
9.	ANALISIS DE RESULTADOS.	53
9.1.	CARACTERIZACION DE NANOPARTICULAS.	53
9.2.	EVALUACIÓN CITOTOXICOLÓGICA.	55
10.	CONCLUSIONES.	56
11.	BIBLIOGRAFÍA.	57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ilustración de la clasificación de las nanopartículas de polímeros nanoesferas y nanocápsulas	1
Figura 2 Representación gráfica del número de publicaciones citadas en la base de datos Scopus ® en nanopartículas de polímeros durante el período de 1996-2010 (J. Prasad Raoa, 2011).	3
Figura 3 Técnicas de preparación de nanopartículas de polímero.	4
Figura 4 Preparación de doble emulsión w / o / w: (a) emulsificación a alta agitación y (b) la emulsificación de baja agitación.	5
Figura 5 Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de emulsificación/evaporación.....	6
Figura 6 Representación esquemática del método de preparación de nanopartículas de polímero basado en osmosis.	8
Figura 7 del mecanismo de polimerización aniónica y anfótera (Arias J. L., 2003)	10
Figura 9 Ejemplos de arquitecturas poliméricas complicadas controladas, que se pueden sintetizar por técnicas de polimerización radicalaria viva controlada (Heuts & Muñoz-Bonilla, 2010)... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 10 Efecto de la carga sobre las partículas coloidales de polímero.....	13
Figura 11 Representación de la doble capa con dos formas de visualizarla (Zeta-MeterInc, 2010).14	
Figura 12 Esquema que muestra los componentes de un microscopio electrónico de transmisión (TEM) y un microscopio electrónico de barrido (SEM)	18
Figura 13 Mecanismo de reacción (aniónico) de polimerización del monómero de alquilcianoacrilato.	19
Figura 14 Ciclo de Peroxidación de lípidos. El ciclo de la Peroxidación de lípidos tiene tres fases: a) iniciación, b)propagación y c) terminación. (Timothy M. Potter, 2011)	25
Figura 15 Estructura de glutatión, representación estereoquímica del γ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina.....	26
Figura 16. Reacción de OPT con GSH para formar el complejo fluorescente OPT-GSH a pH=8 (Henry Jay Forman, 2009).	28
Figura 17 Micrografía de nanopartículas de quitosán a diferentes aumentos: a) 10000X, b) 15000X y c) 20000X.....	46
Figura 18 Micrografía de nanopartículas de PECA a) 30000X y b) 20000X	47
Figura 19 Micrografía de nanopartículas de Quitosán/PECA a) 10000X, b) 20000X, c) 20000X y c) 10000X.....	47
Figura 20 Micrografías obtenidas por TEM de nanopartículas de Quitosán 30000X.....	47
Figura 21 Micrografías obtenidas por TEM de nanopartículas de PECA a) 30000X y b) 15000X ..	48
Figura 22 Micrografías obtenidas por TEM de nanopartículas de Quitosán/PECA a) 30000X y b) 15000X.....	48

Índice de Tablas

Tabla 1 Tipo de estabilidad de acuerdo al potencial zeta Riddick, Control of Colloid Stability through Zeta Potential. Zeta-Meter Inc. New York. 1968.....	15
Tabla 2 Resultados de la caracterización de NP en Z-sizerNanoseries	43
Tabla 3 Resultados de cantidad de material en suspensión de los sistemas.	49
Tabla 4 Dosis administradas.....	49

Índice de Gráficos

Gráfico 1 Comparación del Diámetro promedio de los sistemas de nanopartículas de Quitosán, PECA y Quitosán/PECA.....	43
Gráfico 2 Índice de Polidispersidad (PdI) de los sistemas de nanopartículas. Resultados de los sistemas finales.....	44
Gráfico 3 Valores de Potencial zeta de los sistemas de nanopartículas.	45
Gráfico 4 Niveles de TBARS en Hígado de ratas expuestas a NP de Quitaos, PECA y Quitosán/PECA en dosis altas y bajas.	50
Gráfico 5 Niveles de TBARS en Riñón de ratas expuestas a NP de Quitosán, PECA y Quitosán/PECA a dosis baja y alta.	50
Gráfico 6 Niveles de GSH en Hígado de ratas expuestas a NP de Quitosán, PECA y Quitosán/PECA frente a un control y un blanco.....	51
Gráfico 7 Niveles de GSH en Plasma de ratas expuestas a NP de Quitosán, PECA y Quitosán/PECA frente a un control y un blanco.....	51
Gráfico 8 Niveles de GSH en Plasma de ratas expuestas a NP de Quitosán, PECA y Quitosán/PECA frente a un control y un blanco.....	52

ANEXOS

Anexo I. Análisis estadístico

Anexo II. Análisis de Potencial Z

Anexo III Análisis de tamaño de partícula

Tabla de abreviaturas

ATRP - Polimerización radical por transferencia de átomo

AVMA - Asociación médica veterinaria americana

CICUAE-FESC - Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación-de la Facultad de estudios superiores Cuautitlán.

C/LRP - Polimerización radicalaria controlada viva

DNA – Ácido desoxirribonucleico

GSH – Glutación reducido

GSSG – Glutación oxidado

IP – Polimerización interfacial.

NMP - Polimerización mediada por nitroxidos

NP – Nanopartículas

MDA - Malondialdehido

LD - Difracción láser

OPT o-ftaldialdehido

PBS – Buffer de fosfatos del inglés “*Phosphatebufferedsaline*”

PCS - Espectroscopia de correlación de fotones

NPP- Nanopartículas poliméricas

RAFT - Transferencia por adición-fragmentación reversible

REDOX – Reacción de oxidación - reducción

RESS – Expansión rápida de soluciones supercríticas.

RESOLV – Expansión rápida de soluciones supercríticas en solvente líquido.

MEB - Microscopia electrónica de barrido

NSL – Nanopartículas sólidas lipídicas

TBA – Acido tiobarbitúrico

TBARS – Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

MET – Microscopia electrónica de transmisión.

TPP – Tripolifosfato

1. MARCO TEÓRICO

1.1.DEFINICIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas son a menudo definidas como partículas sólidas, coloidales en el rango de 10-1000nm. Nanopartículas poliméricas es un término colectivo dado para cualquier tipo de nanopartículas de polímeros, pero específicamente para las nanoesferas y nanocápsulas. Las nanoesferas son partículas matriciales, es decir, partículas que en toda su masa es sólida y las moléculas pueden ser absorbidas en la superficie de la esfera o encapsuladas dentro de la partícula y en general, son esféricas (J. Prasad Rao, 2011). Las nanocápsulas son sistemas vesiculares, actuando como una especie de depósito, en el que las sustancias atrapadas se limitan a una cavidad que consta de un núcleo líquido (agua o aceite) rodeado por una capa de materia sólida (Couvreur P, 1995). Una representación esquemática de las nanopartículas poliméricas se muestra en la fig. 1.

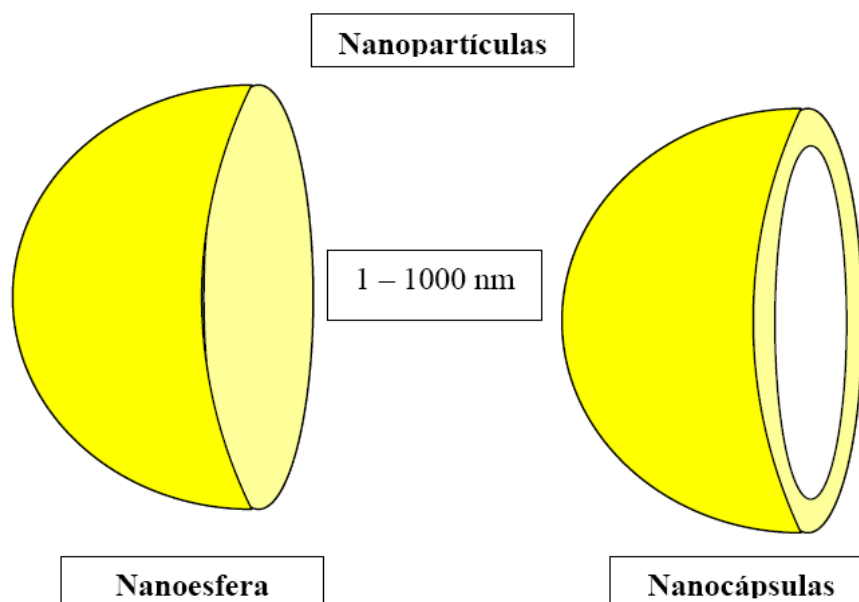


Figura 1 Ilustración de la clasificación de las nanopartículas de polímeros nanoesferas y nanocápsulas

Además de las nanopartículas poliméricas, destacan las formadas a partir de lípidos sólidos, conocidas como NSL (nanopartículas sólidas lipídicas). En las cuales se han conjuntado las ventajas de las partículas sólidas con las de las emulsiones y la de los liposomas. Las NSL se han generado simplemente intercambiando el lípido líquido de las emulsiones por un lípido sólido, lo que significa que las NSL son sólidas a temperatura ambiente así como a la temperatura del cuerpo. Las ventajas de la utilización de las nanopartículas lipídicas como transportadores incluyen la utilización de lípidos fisiológicamente aceptables para su preparación, la posibilidad de evitar el uso de solventes orgánicos en su preparación y un espectro de utilización alto ya que se utilizan para la administración sobre la piel, por vía oral y por vía intravenosa (De la Cruz Medina, 2010).

Entre las principales ventajas de las nanopartículas como sistemas de liberación de fármaco, se encuentran los logros de su diseño al poder controlar el tamaño de partícula, las propiedades superficiales y la relación farmacológica de los agentes activos en el sitio específico de acción del fármaco en el rango óptimo terapéutico y régimen de dosificación.

Algunas de las ventajas de las nanopartículas como sistemas de liberación de fármaco son las siguientes:

- El tamaño y las características de superficie pueden ser manipulados para la activación pasiva o activa de liberación del fármaco en una dosificación parenteral.
- El control y la relación de la duración en el transporte del fármaco y en el sitio de acción, alterando la liberación y distribución del fármaco y en consecuencia la concentración del fármaco en el organismo, por tanto se controla la depuración, reducción de efectos secundarios y el incremento en la eficacia del fármaco.
- La liberación controlada y las características de degradación pueden ser realmente moduladas por la elección de los constituyentes de la matriz.
- Los sistemas pueden ser dirigidos al sitio de entrega por la adhesión de un ligando a la superficie de las partículas.
- Los sistemas pueden ser usados por varias rutas de administración incluyendo oral, nasal, parenteral, intraocular, etc (Brenda Gasca, 2012).

1.2.HISTORIA

La nanotecnología, aunque se considera una ciencia moderna, tiene su historia que data desde el siglo IX. Las nanopartículas de oro y la plata fueron utilizadas por los artesanos de Mesopotamia para generar un efecto brillante a las ollas. La primera descripción científica de las propiedades de las nanopartículas fue proporcionada en 1857 por Michael Faraday en su artículo “Experimental relations of gold (and other metals) to light” (Manoj Singh, 2010).

Los orígenes del término nanotecnología se encuentran en el nacimiento de este campo con una conferencia dictada por Richard Feynman en 1959 (Feynman, 1992), donde se subrayó la posibilidad teórica de las formas extremas de la miniaturización (la metáfora arquetípica es la posibilidad de reducir la Enciclopedia Británica en la cabeza de un alfiler).

Durante las últimas décadas, ha habido un interés considerable en el desarrollo de nanopartículas biodegradables (NPB) como dispositivos eficaces de administración de fármacos. Se han utilizado diversos polímeros en la investigación de suministro de fármacos, ya que efectivamente puede entregar el fármaco a un sitio de acción y así aumentar el beneficio terapéutico, mientras que se minimizan los efectos secundarios. La liberación controlada de los agentes farmacológicamente activos en el sitio de acción específico en el tiempo y régimen de dosis terapéuticamente óptimo ha sido una meta importante en el diseño de estos dispositivos. Se han utilizado los liposomas como vehículos de fármacos potenciales en lugar de las formas de dosificación convencionales, debido a sus ventajas únicas que incluyen la capacidad para proteger fármacos de la degradación, reducir los efectos de toxicidad y dirigir el medicamento al sitio de acción. Sin embargo, el trabajo de desarrollo en liposomas se ha visto limitado debido a problemas inherentes tales como la baja

eficiencia de encapsulación, una fuga rápida de fármaco soluble en agua en presencia de componentes de la sangre y la estabilidad pobre de almacenamiento. Por otro lado, las nanopartículas poliméricas NPP ofrecen algunas ventajas específicas sobre los liposomas. Por ejemplo, estas ayudan a aumentar la estabilidad de los fármacos y proteínas además poseen propiedades útiles como sistemas de liberación controlada (Kumaresh S. Soppimatha, 2001).

El campo de las nanopartículas de polímeros (NPP) se está expandiendo rápidamente y está jugando un papel fundamental en un amplio espectro de áreas que van desde la realización de los materiales a los sensores, de la medicina a la biotecnología, y así sucesivamente, durante las últimas décadas. Este hecho se puede observar a partir del número cada vez mayor de publicaciones como se muestra en la figura. 2. Esta tendencia se basa en sus propiedades únicas, que abarcan una amplia gama de aplicaciones y necesidades del mercado.

Las propiedades de las NPP tienen que ser optimizadas en función de la aplicación particular. Con el fin de lograr las propiedades de interés, el modo de preparación juega un papel vital. Por lo tanto, es muy ventajoso disponer de las técnicas de preparación a la mano para obtener las NPP con las propiedades deseadas para una aplicación particular, por ejemplo; el tamaño de las partículas y la distribución de tamaño de partícula de las NPP son de gran importancia porque determinan propiedades fundamentales tales como la viscosidad, área superficial y la densidad de embalaje (J. Prasad Rao, 2011).

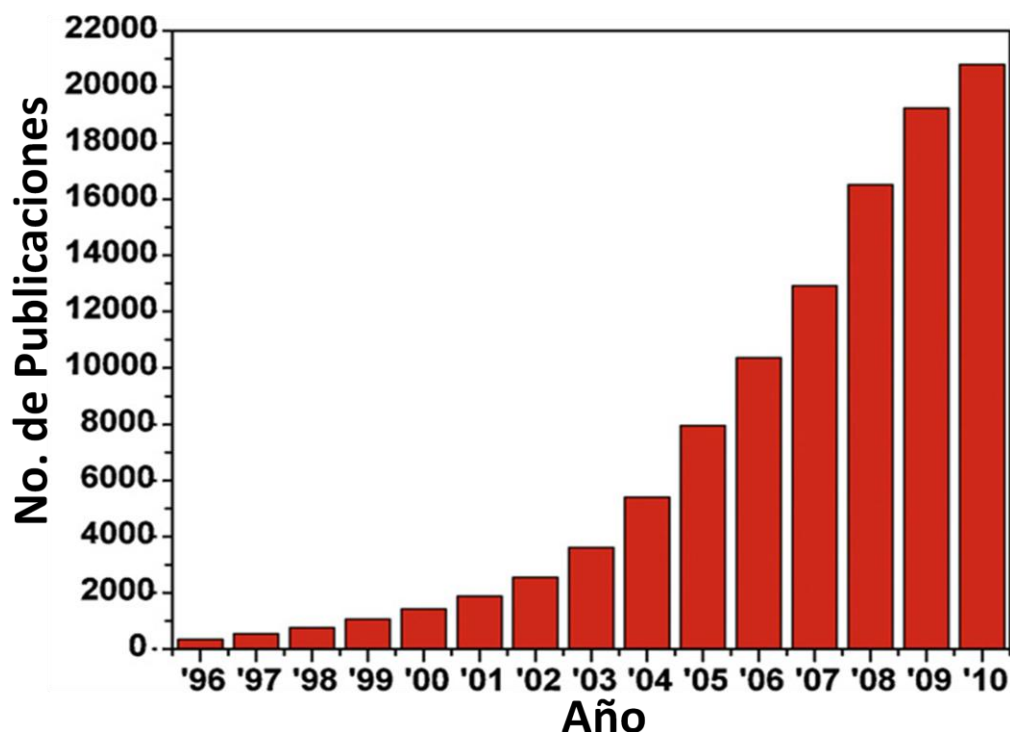


Figura 2 Representación gráfica del número de publicaciones citadas en la base de datos Scopus © en nanopartículas de polímeros durante el período de 1996-2010 (J. Prasad Rao, 2011).

1.3.MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

Las NP pueden ser convenientemente preparadas a partir de polímeros preformados, por polimerización directa de monómeros con polimerización clásica o polireacciones y por coacervación o gelación iónica de polímeros hidrofílicos (Mohanraj and Y Chen, 2006).

Métodos como la evaporación del disolvente, salting-out, diálisis, tecnología de fluidos supercríticos, involucramiento de la rápida expansión de una solución supercrítica o la expansión rápida de una solución supercrítica en un solvente líquido, pueden ser utilizados para la preparación de las PNP a partir de polímeros preformados. Por otro lado, las PNP pueden ser directamente sintetizadas por la polimerización de monómeros con diferentes técnicas de polimerización tales como microemulsión, miniemulsión, emulsión sin tensoactivo y la polimerización interfacial. Una ilustración de las diferentes técnicas de preparación de nanopartículas se muestra en la figura. 3. La elección del método de preparación se hace sobre la base de una serie de factores como el tipo de sistema polimérico, área de las necesidades de tamaño de las aplicaciones, etc. Por ejemplo, un sistema polimérico que se ha desarrollado para una aplicación en el campo biomédico o el medio ambiente debe estar completamente libre de aditivos o reactivos, tales como tensoactivos o trazas de disolventes orgánicos. En este caso, las técnicas como RESS (expansión rápida de una solución supercrítica) o RESOLV (expansión rápida de una solución supercrítica en un solvente líquido) puede ser seleccionado, ya que no utilizan ningún tensoactivo o un disolvente orgánico durante la preparación de las NP. Estos son sólo algunos de los muchos factores que deben tenerse en cuenta antes de elegir una determinada técnica para la preparación de la PNP.

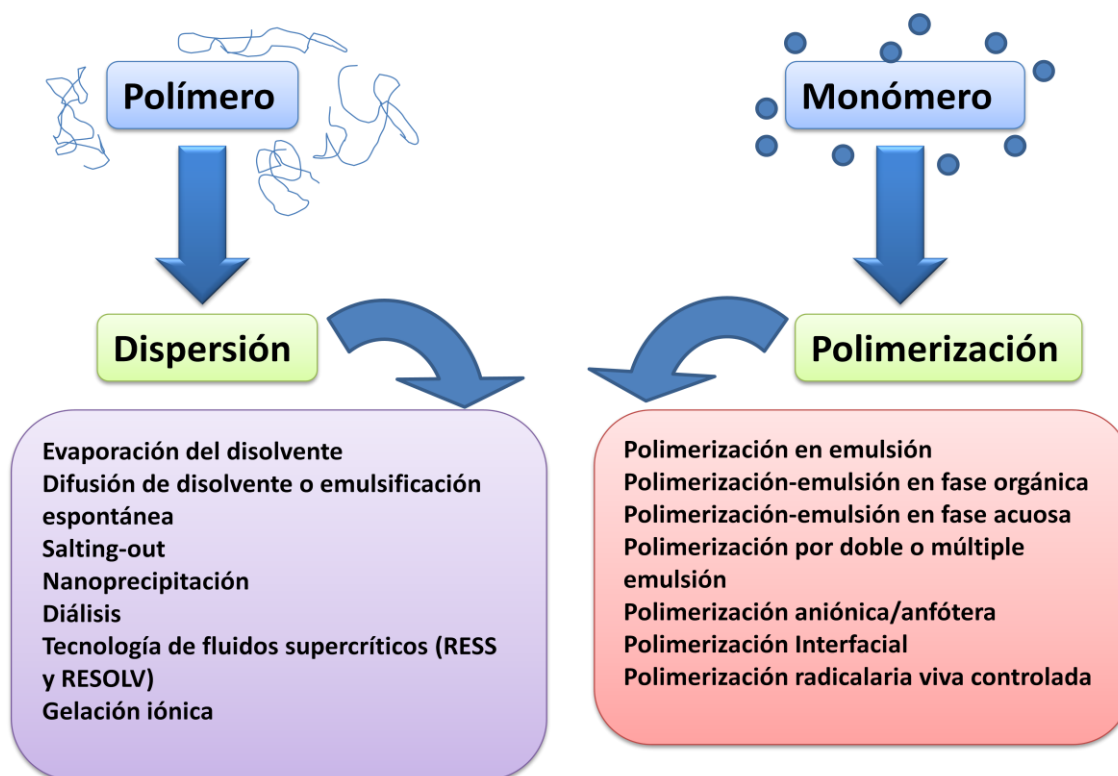


Figura 3 Técnicas de preparación de nanopartículas de polímero.

1.3.1. DISPERSIÓN DE POLÍMEROS PREFORMADOS

1.3.1.1 Evaporación del disolvente

La Evaporación del disolvente fue el primer método desarrollado para preparar nanopartículas de un polímero preformado (J. Prasad Rao, 2011). Aunque originalmente propuesto por químicos de polímeros, sus principales novedades se encuentran en la tecnología farmacéutica, donde los polímeros biodegradables se han aplicado en la producción de fármacos. En este método, las soluciones de polímeros se preparan en los disolventes volátiles y se prepara la emulsión. En el pasado se utilizaban ampliamente el cloroformo y diclorometano pero se sustituyen ahora con acetato de etilo, que tiene un mejor perfil toxicológico (Allemann E, 1993). La emulsión se convierte en una suspensión de nanopartículas en la evaporación del disolvente para el polímero, que se difunde a través de la fase continua de la emulsión. La Evaporación de disolvente es la técnica más utilizada para preparar nanopartículas de polímeros en la literatura actual en las técnicas de uso de una dispersión de polímeros preformados. En los métodos convencionales, hay dos estrategias principales que se utilizan para la formación de emulsiones: la preparación de una emulsión simple, por ejemplo, de aceite en agua (O / W) o emulsiones dobles, por ejemplo, (agua en aceite) en agua, (w / o) / w. Estos métodos utilizan la homogeneización de alta velocidad o ultrasonidos, seguido por evaporación del disolvente, ya sea por la continua agitación magnética a temperatura ambiente o bajo presión reducida. A continuación, las nanopartículas que se solidificaron pueden ser recogidas por ultracentrifugación y se lavan con agua destilada para eliminar los aditivos tales como los tensoactivos. Finalmente, el producto se liofiliza. Por lo general, un polímero disuelto en un solvente orgánico forma parte de la fase oleosa, mientras que la parte que contiene el estabilizador forma la fase acuosa. Fig. 4 resume el método de preparación por el método de evaporación de doble emulsión de disolvente.

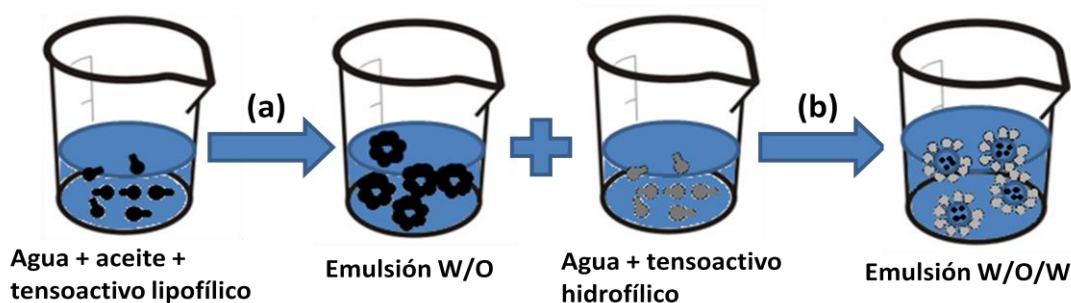


Figura 4 Preparación de doble emulsión w / o / w: (a) emulsificación a alta agitación y (b) la emulsificación de baja agitación.

1.3.1.2 Evaporación del disolvente tras la formación de una emulsión

Es el método más utilizado para formar nanopartículas poliméricas y se basa en la emulsificación de una solución orgánica que contiene el polímero con una solución acuosa de un agente tensoactivo, seguida de la evaporación del disolvente orgánico. El polímero se disuelve en un disolvente apropiado. La fase interna de la emulsión se añade sobre la fase externa acuosa, en la que se disuelve un agente tensoactivo que proporciona estabilidad a la emulsión. La emulsificación tiene

lugar mediante agitación para reducir el tamaño de partícula de la emulsión (directamente relacionada con el tamaño final de las nanopartículas), este proceso se muestra en el diagrama presentado en la **Figura 5**. A este proceso de emulsificación le sigue la evaporación del disolvente orgánico, que provoca la precipitación del polímero y la formación de las nanopartículas. Como paso final, la suspensión de las nanopartículas formadas se somete a una serie de lavados con agua purificada para eliminar el exceso de agente tensoactivo (Rocha Formiga, 2009).

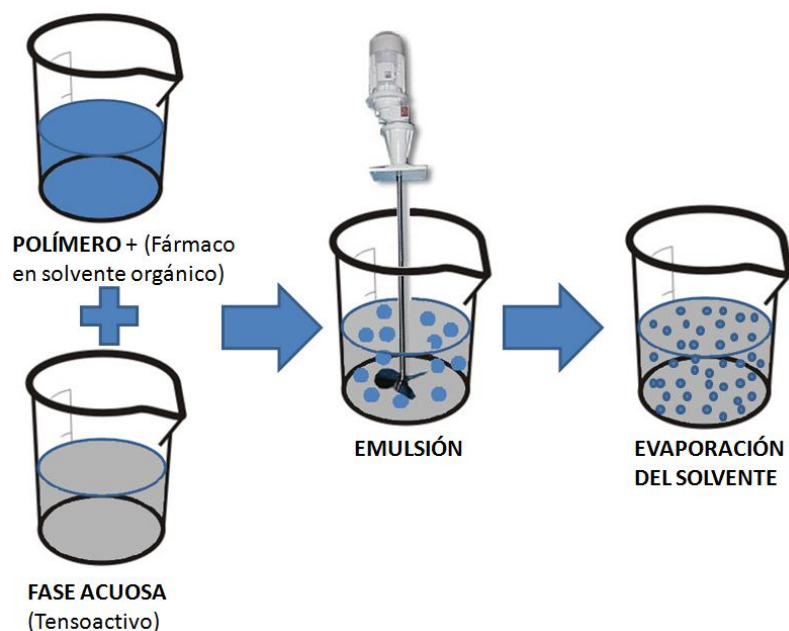


Figura 5 Representación esquemática de la preparación de nanopartículas por el método de emulsificación/evaporación

1.3.1.3 Salting-out

Los métodos descritos en la sección anterior requieren el uso de disolventes orgánicos, que son peligrosos para el medio ambiente, así como a los sistemas fisiológicos. Para superar este obstáculo, Bindschaedler et al. (Bindschaedler C, 1990) publicó en 1990 una versión modificada del proceso de emulsión que consiste en un proceso de salting-out, lo que evita los tensoactivos y disolventes clorados. La emulsión está formulada con un disolvente de polímero que normalmente es totalmente miscible con agua, es decir, la acetona, y la emulsión de la solución de polímero en la fase acuosa se consigue, más como un efecto Ouzo, sin emplear ninguna fuerza de corte alta, por la disolución de la alta concentración de sal o sacarosa elegida, por un fuerte efecto salting-out en la fase acuosa. Se utilizan electrolitos adecuados como cloruro de magnesio, cloruro de calcio y de acetato de magnesio. Las propiedades de miscibilidad del agua con otros disolventes se modifican conforme estos componentes se disuelven en el agua. Un efecto salting-out inverso, obtenido por dilución de la emulsión con un gran exceso de agua, conduce a la precipitación del polímero disueltos en las gotas de la emulsión. De hecho, tras la dilución, la migración de los solventes del polímero de las gotitas de la emulsión es inducida por la reducción de la sal o la concentración de sacarosa en la fase continua de la emulsión (J. Prasad Rao, 2011).

1.3.1.4 Nanoprecipitación

El método de nanoprecipitación, también llamado “método de desplazamiento de disolvente” fue desarrollado por Fessi et al (H. Fessi, 1989). Para la preparación de nanopartículas de polímero. El principio de esta técnica se basa en la deposición interfacial de un polímero después del desplazamiento de un solvente semi-polar, miscible con agua, a partir de una solución lipofílica. La rápida difusión del disolvente hacia la fase acuosa da como resultado la disminución de la tensión interfacial entre las fases, lo que permite un aumento en el área de superficie del disolvente orgánico y permite la formación de pequeñas gotas de la fase orgánica.

El sistema de Nanoprecipitación consta de tres componentes básicos: el polímero, el disolvente del polímero y el no disolvente del polímero. Como disolvente de polímero se utilizan disolventes orgánicos miscibles en agua y fáciles de quitar por evaporación, principalmente se utiliza acetona o una mezcla binaria de acetona con agua o metanol. La otra fase, en la cual no es soluble el polímero, está compuesta por un no solvente (ejemplo: agua) o una mezcla de no solventes de polímero y es complementada con uno o más tensoactivos.

El sistema de nanopartículas se produce mediante la adición lenta de la fase orgánica a la fase acuosa con agitación moderada. Incluso, revertiendo el orden mediante la adición de la fase acuosa a la fase orgánica también conduce a la formación de nanopartículas. La rápida difusión del solvente del polímero hacia la fase acuosa permite una distribución de tamaño estrecha, además de una forma bien definida.

Las variables clave que determinan el éxito del método y que afectan a las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas son las relacionadas con las condiciones de la adición de la fase orgánica a la fase acuosa, tales como la tasa de inyección de la fase orgánica, la tasa de agitación de la fase acuosa, el método de la adición de la fase orgánica y la fase orgánica a la relación de fase acuosa. Del mismo modo, las características de las nanopartículas están influenciadas por la naturaleza y concentración de sus componentes. A pesar de que un agente tensoactivo no está obligado a garantizar la formación de la nanopartícula por nanoprecipitación, el tamaño de partícula es influenciada por la naturaleza y la concentración de tensoactivo. Por otra parte, la adición de tensoactivos ayuda a preservar las suspensiones de nanopartículas de aglomeración en largos periodos de almacenamiento (J. Prasad Rao, 2011).

El método comprende de tres etapas: nucleación, crecimiento y agregación. El tiempo en que se realiza cada paso determina el tamaño de la partícula, y esto depende de la relación entre la concentración de polímero y la solubilidad del polímero en la mezcla de disolventes (Federica Lince, 2008).

La nanoprecipitación es un método simple, rápido y reproducible, además de ser utilizado para la formación tanto de nanoesferas como de nanocápsulas (J. Prasad Rao, 2011).

1.3.1.5 Diálisis

La diálisis ofrece un método sencillo y eficaz para la preparación de pequeñas nanopartículas con una distribución de tamaño estrecha. Este método se basa en el uso de una barrera física,

específicamente la membrana de diálisis o membrana semipermeable, que permite el transporte pasivo de disolventes para frenar la mezcla de la solución de polímero con un no disolvente del mismo. El polímero se disuelve en un solvente orgánico y es colocado dentro de un tubo de diálisis con un corte de peso molecular adecuado. La diálisis se lleva a cabo en contra de un no-solvente del polímero miscible con el solvente del polímero (**Figura 6**). El desplazamiento del disolvente dentro de la membrana es seguido por la agregación progresiva del polímero debido a la pérdida de solubilidad y la formación de suspensiones homogéneas de las nanopartículas.

El mecanismo de formación de las nanopartículas por el método de diálisis no se conoce en la actualidad pero se sugiere que está basado en un mecanismo similar al de la nanoprecipitación.

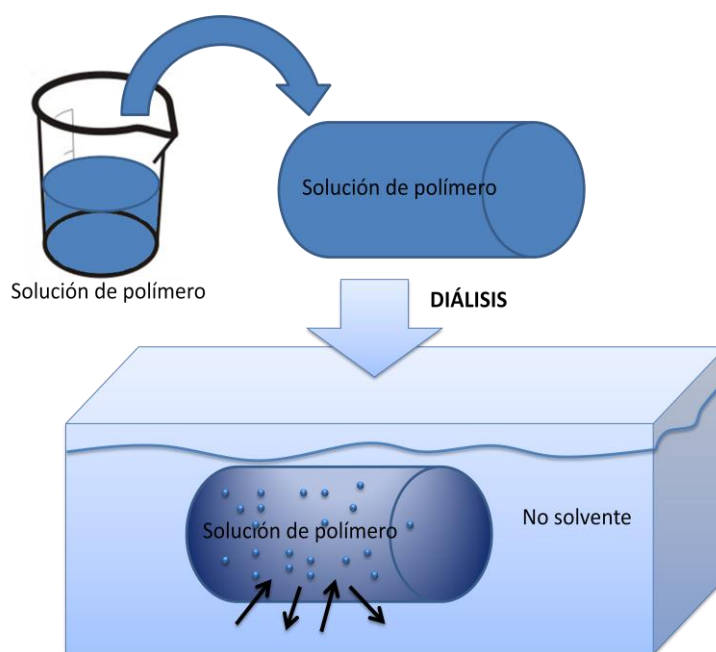


Figura 6 Representación esquemática del método de preparación de nanopartículas de polímero basado en osmosis.

1.3.1.6 Tecnología de fluidos supercríticos

Los métodos anteriormente mencionados implican disolventes orgánicos, y la necesidad de desarrollar métodos ambientalmente seguros para la producción de nanopartículas ha motivado el desarrollo de métodos basados en la tecnología de fluidos supercríticos como disolventes más amigables con el medio ambiente, ya que pueden producir NPP sin rastros de disolventes orgánicos. Se espera que los fluidos supercríticos y la tecnología de gas denso ofrezcan una técnica interesante y efectiva de la producción de nanopartículas, evitando la mayor parte de los inconvenientes de los métodos tradicionales (J. Prasad Rao, 2011).

Se han desarrollado dos métodos principales para la producción de NP usando fluidos supercríticos:

1. La rápida expansión de la solución supercrítica (RESS).
2. La rápida expansión de la solución en un solvente líquido supercrítico (RESOLV).

1.3.1.6.1 Rápida expansión de solución supercrítica (RESS)

En RESS tradicional el polímero se disuelve en un fluido supercrítico (ejemplo CO₂) para formar una solución, posteriormente se realiza la expansión de la solución haciéndola pasar a través de una boquilla capilar u orificio hacia un área con presión ambiental. La sobresaturación, acompañada por la rápida reducción de presión da como resultado la formación de nanopartículas homogéneas.

1.3.1.6.2 Rápida expansión de una solución en un solvente líquido supercrítico (RESOLV)

RESOLV es una modificación simple del método de RESS, en donde la expansión de la solución se realiza en un disolvente supercrítico en lugar del medio ambiente. El disolvente líquido aparentemente suprime el crecimiento de nanopartículas en su formación, lo que permite la obtención de partículas nanométricas (J. Prasad Rao, 2011).

1.3.2 POLIMERIZACIÓN DE MONÓMEROS

Las técnicas anteriormente descritas implican la formación de NP a partir de polímeros preformados, y no se realiza ninguna reacción de polimerización durante el proceso. El diseño de polímeros para la preparación de nanopartículas permite conseguir propiedades deseadas para alguna aplicación específica, lo cual es posible realizar durante los procesos de polimerización.

1.3.2.2 Polimerización en emulsión

La polimerización en emulsión es el método más común para la producción de una gran gama de polímeros. El agua como medio de dispersión es amigable con el medio ambiente, además permite la disipación del calor adecuadamente durante la reacción de polimerización. Este método puede realizarse con o sin tensoactivo (J. Prasad Rao, 2011). El principio de la polimerización en emulsión está basado en la emulsificación espontánea generada por la mezcla de una fase orgánica y una fase acuosa (Sushmitha Sundar, 2010).

La polimerización/emulsificación es uno de los métodos más rápidos para la preparación de nanopartículas y es fácilmente escalable. El método es clasificado en dos categorías, basadas en el uso de una fase continua orgánica o acuosa.

1.3.2.3 Polimerización por doble o múltiple emulsión

Gracias a este método se ha hecho posible la encapsulación de compuestos hidrofílicos. En este método, el fármaco hidrofílico y el tensoactivo se disuelven en la fase acuosa, con esta solución se prepara la emulsión primaria por dispersión de la fase acuosa en un solvente orgánico que contiene el polímero disuelto. Posteriormente se realiza una re-emulsificación con una nueva fase acuosa que contiene también tensoactivo. Luego, el procedimiento de eliminación de disolvente y recolección de las nanopartículas es similar a la emulsión simple (Brenda Gasca, 2012).

1.3.2.4 Polimerización aniónica/anfótera

Este es un método rápido y fácil de realizar, por otra parte es utilizable en procesos biomédicos ya que no utiliza catalizadores agresivos, incluso bases muy débiles como los iones OH^- derivados de la disociación del agua son capaces de iniciarla. Los iniciadores clásicos son compuestos iónicos (I^- , CH_3COO^- , Br^- , OH^- , etc.) pero también compuestos nucleofílicos pueden iniciarla (bases terciarias: piridina, fosfina). Presumiblemente estos generan *zwitteriones* (ion híbrido con carga negativa y positiva), más que especies iónicas cargadas capaces de realizar una propagación aniónica. En este caso, los iones de OH^- de la disociación del agua son los encargados de actuar como iniciadores de la reacción de polimerización (Arias J. L., 2003). En la **Figura 7** se muestra el mecanismo de polimerización aniónica anfótera de un monómero de cianoacrilato.

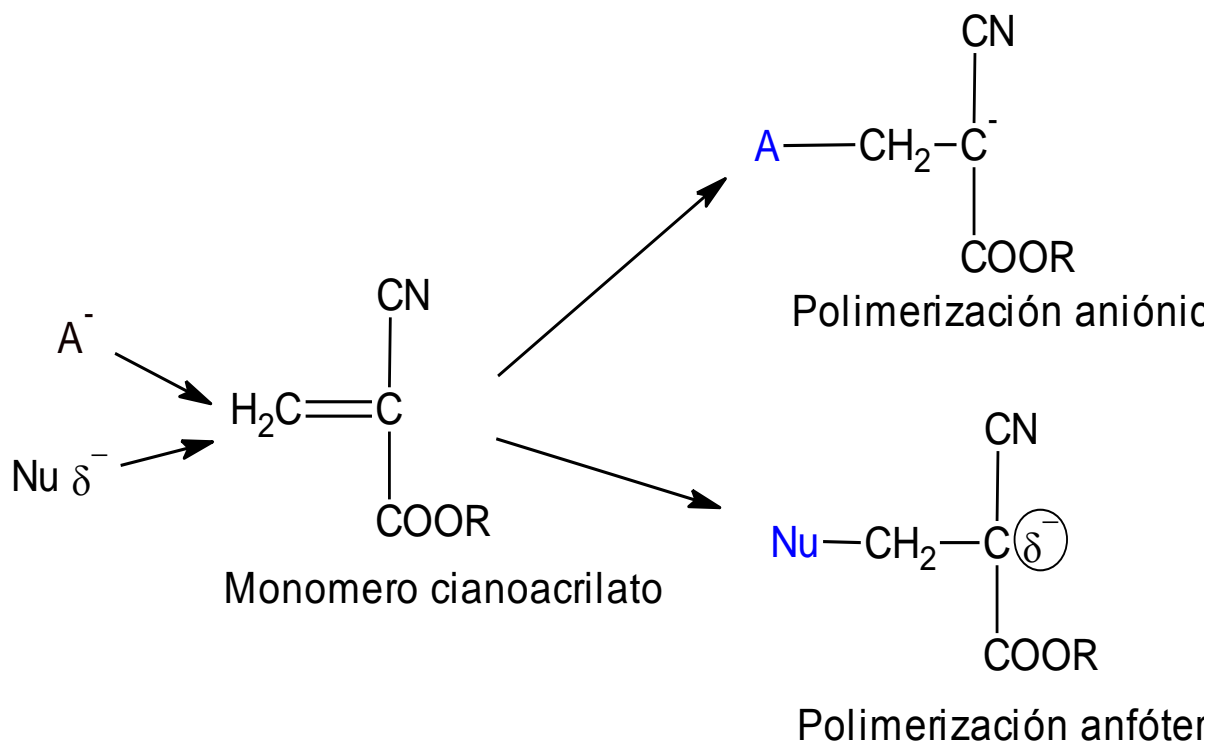


Figura 7 del mecanismo de polimerización aniónica y anfótera (Arias J. L., 2003)

1.3.2.5 Polimerización Interfacial

Polimerización interfacial es uno de los métodos bien establecidos utilizados para la preparación de nanopartículas de polímeros. Se trata una polimerización de un paso de dos monómeros reactivos o agentes, que se disuelven, respectivamente, en dos fases (es decir, en fase continua y dispersa), y la reacción se lleva a cabo en la interfase de los dos líquidos. Por la relativa facilidad de obtención de la polimerización interfacial (IP), esta se ha convertido en una técnica preferida en muchos campos, que van desde la encapsulación de los productos farmacéuticos hasta la preparación de polímeros conductores.

Se pueden obtener nanocápsulas que contienen aceite por la polimerización de monómeros en la interfase aceite/agua de una microemulsión muy fina. El disolvente orgánico, que es completamente miscible con agua, sirve como un vehículo de monómeros y la polimerización interfacial del monómero se cree que se produce en la superficie de las gotitas de aceite que se formaron durante la emulsificación. Para promover la formación de nanocápsulas, se utilizan disolventes apróticos, tales como acetona y acetonitrilo. Por otra parte se pueden obtener nanocápsulas que contiene agua por la polimerización interfacial de monómeros en microemulsiones de agua en aceite. En estos sistemas, el polímero se forma en la interfase agua-aceite y el sistema se precipita para producir la cáscara de la nanocápsula. La utilización de solventes apróticos, tales como el etanol, n-butanol y el isopropanol inducen la formación de nanoesferas junto con nanocápsulas.

La polimerización interfacial en combinación con la emulsificación espontánea es una nueva técnica utilizada para la formación de nanocápsulas (J. Prasad Rao, 2011).

1.3.2.6 Polimerización radicalaria viva controlada

Las principales limitaciones de la polimerización por radicales incluyen la falta de control sobre la masa molar, la distribución de masa molar, las funciones de extremo y de la arquitectura macromolecular. Las limitaciones se deben a las inevitables reacciones rápidas por la terminación radical-radical.

Con la reciente aparición de muchos de los llamados métodos de polimerización radicalaria controlada y viva, se ha abierto una nueva área utilizando una técnica de polimerización vieja. Las técnicas más utilizadas y estudiadas actualmente son: polimerización mediada por nitróxidos, polimerización radical por transferencia de átomo, y transferencia por adición-fragmentación reversible. El objetivo principal es el control de las características del polímero en términos de masa molar, distribución, arquitectura y función (J. Prasad Rao, 2011). Y estas técnicas han permitido alcanzar en gran parte estos objetivos. Actualmente, seleccionando (una combinación de) técnicas apropiadas, tenemos la capacidad de sintetizar polímeros con distribuciones muy estrechas, tamaños controlados y arquitecturas complejas, como las que aparecen en la **Figura 8**, sin la necesidad de utilizar polimerizaciones iónicas ni metodologías complejas en síntesis orgánica (Heuts & Muñoz-Bonilla, 2010).

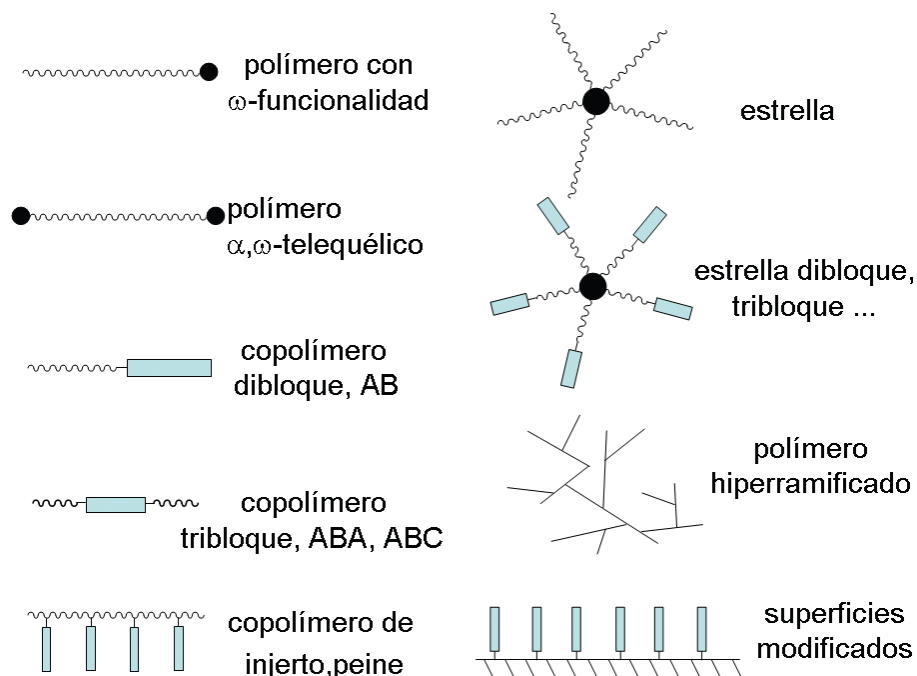


Figura 8 Ejemplos de arquitecturas poliméricas complicadas controladas, que se pueden sintetizar por técnicas de polimerización radicalaria viva controlada (Heuts & Muñoz-Bonilla, 2010).

1.3.3 COACERVACIÓN O GELACIÓN IÓNICA

El método de coacervación o gelación iónica involucra una mezcla de dos fases acuosas, una es el polímero y la otra es un polianión. Un ejemplo es el caso del Quitosán; el grupo amino está cargado positivamente e interactúa con las cargas negativas del Tripolifosfato para formar coacervados con un tamaño en el rango de nanómetros. Los coacervados son formados como resultado de la interacción electrostática entre las dos fases acuosas, mientras que la gelación iónica envuelve el material sufriendo una transición del líquido a gel debido a la interacción iónica de las condiciones a temperatura ambiente (Mohanraj and Y Chen, 2006).

2 CARACTERIZACIÓN

La capacidad de medir y caracterizar los materiales, así como determinar su forma, tamaño y propiedades físicas a escala nanométrica es de vital importancia para los nanomateriales y dispositivos. Estas características determinan la distribución *in vivo*, el destino biológico, la toxicidad y la capacidad dirigida de sistemas de nanopartículas. Además, también pueden influir en la carga y liberación del fármaco y la estabilidad de las nanopartículas, por lo que estos sistemas necesitan ser producidos con un alto grado de precisión y fiabilidad, para realizar las aplicaciones de las nanotecnologías (Mohanraj and Y Chen, 2006).

La nanometrología es la ciencia que se encarga de realizar las mediciones en proporciones de nanoescala, y su aplicación está presente en toda la nanotecnología, esta incluye la longitud y/o el tamaño (en donde las dimensiones son por lo general en nanómetros), así como la medición de la fuerza, masa, carga eléctrica y otras propiedades (Bandi Ramesh, may 2011).

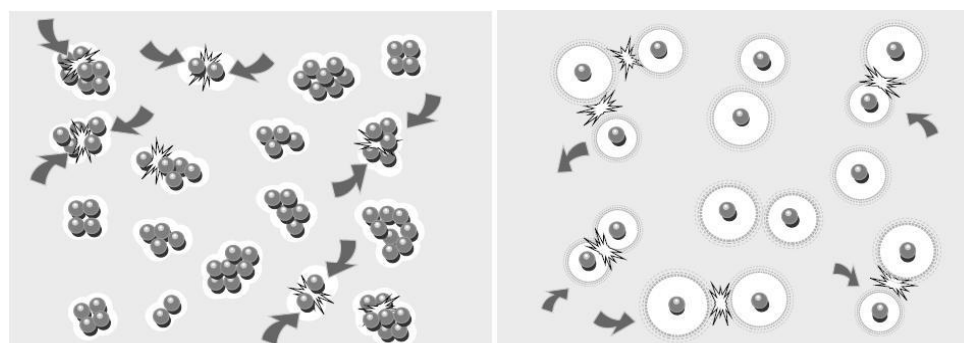
Caracterización de Nanopartículas	
Potencial Zeta	• Dispersión electroforética de luz.
Tamaño de partícula	• Dispersión de luz dinámica • Difracción láser
Morfología	• Microscopia electrónica de barrido. • Microscopia electrónica de transmisión.

2.3 Potencial Zeta

El potencial zeta de una nanopartícula es comúnmente utilizado para caracterizar la propiedad de carga de la superficie de las nanopartículas. Este refleja el potencial eléctrico de las partículas y es influenciado por la carga de los diferentes componentes de las nanopartículas, especialmente tensoactivos localizados en la interface con el medio de dispersión, así como la composición del medio de dispersión, además los valores de potencial Z puede ser generalmente asociados con los valores de pH del sistema (De la Cruz Medina, 2010).

Cada coloide contiene una carga eléctrica que suele ser de naturaleza negativa, aunque también puede ser positiva. Estas cargas producen fuerzas de repulsión electrostática entre los coloides vecinos. Si la carga es suficientemente elevada los coloides permanecen discretos, dispersos y en suspensión. Reduciendo o eliminando estas cargas se obtiene el efecto opuesto y los coloides se aglomeran y sedimentan fuera de la suspensión (Zeta-MeterInc, 2010).

Las nanopartículas con un potencial zeta por encima de (+/-) 30 mV han demostrado ser estables en suspensión, debido a que la carga de la superficie evita la agregación de las partículas (En la **Tabla 1** se muestran valores asociados a tipos de estabilidades en función del potencial zeta). El potencial zeta también se puede utilizar para determinar si un material cargado activo se encapsula en el centro de la nanocápsulas o adsorbidos sobre la superficie (Mohanraj and Y Chen, 2006).



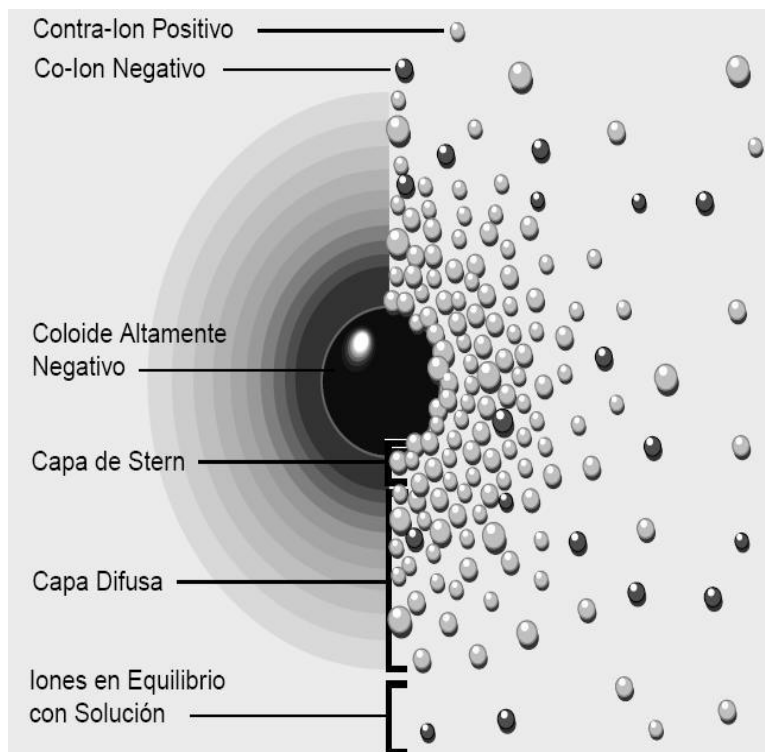
Partículas Sin Carga están libres para chocar y aglomerar.

Partículas Cargadas se repelan unas á otras.

Figura 9 Efecto de la carga sobre las partículas coloidales de polímero (Zeta-MeterInc, 2010).

Se usa el modelo de la doble capa para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad del coloide cargado y para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión. Es posible entender este modelo como una secuencia de etapas que ocurren alrededor de un solo coloide negativo, si los iones que neutralizan sus cargas son repentinamente sacados.

La atracción del coloide negativo hace que algunos iones positivos formen una rígida capa adyacente alrededor de la superficie del coloide; esta capa de contra-iones es conocida como la capa de Stern. Otros iones positivos adicionales son todavía atraídos por el coloide negativo, pero estos son ahora rechazados por la capa de Stern, así como por otros iones positivos que intentan acercarse al coloide. Este equilibrio dinámico resulta en la formación de una capa difusa de contra-iones. Los contra-iones tienen una alta concentración cerca de la superficie, la cual disminuye gradualmente con la distancia, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de los contra-iones en el seno de la disolución. En forma similar, aunque opuesta, en la capa difusa hay un déficit de iones negativos, llamados co-iones pues tienen la misma carga que el coloide. Su concentración se incrementa gradualmente al alejarse del coloide, mientras que las fuerzas repulsivas del coloide son compensadas por los iones positivos, hasta alcanzar nuevamente el equilibrio. La capa difusa puede ser visualizada como una atmósfera cargada rodeando al coloide. A cualquier distancia de la superficie, la densidad de carga es igual a la diferencia de concentración entre iones positivos y negativos. La densidad de carga es mucho mayor cerca del coloide y gradualmente disminuye a cero cuando las concentraciones de iones positivos y negativos se asemejan. Los contra-iones de la capa de Stern y de la capa difusa son los que juntos llamaremos la doble (Figura 10). El espesor de esta doble capa depende del tipo y concentración de los iones de la solución (Zeta-MeterInc. s.f.).



Dos Maneras de Visualizar la Doble Capa

La vista izquierda muestra el cambio en la densidad de carga alrededor del coloide. La derecha muestra la distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide cargado.

Figura 10 Representación de la doble capa con dos formas de visualizarla (Zeta-MeterInc, 2010).

Tabla 1 Tipo de estabilidad de acuerdo al potencial zeta Riddick, Control of Colloid Stability through Zeta Potential. Zeta-Meter Inc. New York. 1968

Estabilidad	Potencial Z (mV)
Muy buena	-100 a -60
Buena	-60 a -40
Moderada	-40 a -30
Umbral de dispersión	-30 a -15
Umbral de aglomeración	-15 a -10
Fuerte aglomeración y precipitación	-5 a +5

2.4 Tamaño de partícula

Tamaño de partícula y distribución del tamaño son las características más importantes de los sistemas de nanopartículas. Muchos estudios han demostrado que las nanopartículas tienen una serie de ventajas con respecto a las micropartículas como sistemas de administración de fármacos. Las partículas más pequeñas tienen mayor superficie, por lo tanto, la mayoría de los medicamentos asociados estarían sobre o cerca de la superficie de la partícula, lo que lleva a la liberación rápida del fármaco (Sushmitha Sundar, 2010). Considerando que las partículas más grandes tienen grandes núcleos, se encapsula una mayor cantidad de fármaco, debido a esto la difusión se lleva a cabo lentamente, esto en comparación con partículas de menor tamaño. Generalmente las nanopartículas tienen una alta absorción intracelular en comparación con las micropartículas, además de ser viables para una amplia gama de aplicaciones u objetivos biológicos, debido a su tamaño y movilidad relativa, sin embargo, las partículas más pequeñas también tienen un mayor riesgo de agregación durante el almacenamiento y transporte, por lo que siempre es un reto el desarrollo de formulaciones de sistemas nanoparticulados, manejando el tamaño más pequeño posible, pero manteniendo máxima estabilidad del sistema (Mohanraj and Y Chen, 2006).

Para determinar el tamaño de partícula, la espectroscopia de correlación de fotones (PCS) y la difracción láser (LD) son las técnicas más utilizadas (Sushmitha Sundar, 2010).

2.4.1.2 Dispersión de luz dinámica.

La Dispersión de luz dinámica (DLS, por su nombre en inglés; dynamic light scattering) o Espectroscopía de correlación de fotones (PCS, photon correlation spectroscopy) mide la fluctuación de la intensidad de la luz esparcida, la cual es causada por el movimiento browniano de la partícula. Por esta razón, el tamaño de partícula está influenciado por la interacción de las partículas con el medio en el que se encuentran, por lo cual debe conocerse la viscosidad del medio. La precisión de los tamaños de partícula mejora si se utilizan factores de esparcimiento derivados de la teoría de Mie. El cálculo de los factores de Mie requiere conocer el índice de refracción de las partículas, el cual puede sustituirse por el índice de refracción del polímero con el cual se hayan fabricado las nanopartículas. Este método abarca tamaños en un intervalo de pocos nanómetros hasta 6 micras. La PCS es una buena herramienta para la caracterización de nanopartículas, pero no

es una buena opción para determinar tamaños de partículas muy grandes (De la Cruz Medina, 2010).

2.4.1.3 Difracción Láser

Al contrario que la dispersión de luz dinámica, la dispersión de luz estática (también conocida como difracción láser) no determina el tamaño de las partículas a partir de la variación temporal sino de la dependencia de los ángulos de la intensidad de dispersión.

Al hacer pasar un rayo laser monocromático a través de una muestra pulverizada en seco o en suspensión, la luz se difracta y se produce una figura de difracción de simetría radial en el plano focal de la lente. La intensidad luminosa de los anillos claros es directamente proporcional al número de partículas vistas con el haz luminoso, y los radios de los anillos son inversamente proporcionales al diámetro de las partículas: Las partículas grandes generan anillos muy cercanos (ángulo de dispersión pequeño), mientras que las partículas pequeñas dan lugar a anillos muy separados (ángulo de dispersión grande) (M. Frias, 1988).

La ventaja de usar la dispersión de luz es la posibilidad de analizar las muestras que contienen una distribución amplia de especies de masas moleculares muy diferentes (por ejemplo, una proteína nativa y varios tamaños de agregados), y para detectar cantidades muy pequeñas de las especies de mayor masa (<0.01% en muchos casos) (De la Cruz Medina, 2010).

2.5 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

El microscopio electrónico de transmisión convencional (TEM) genera un haz de electrones en un cañón, por lo general por el calentamiento de un filamento de tungsteno y la aplicación de un alto voltaje de potencial negativo en el rango de -75 000 V. El calor y el alto voltaje negativo causa de expulsión de los electrones de valencia del tungsteno en la punta de los filamentos en forma de V. Un muy negativo, dispositivo parecido a una taza, denominado escudo, aumenta la energía de los electrones para convertirlos en una nube cerca de la punta del filamento. Una abertura en el escudo permite la salida de algunos de los electrones hacia una placa ánodo. En este paso los electrones están viajando a la mitad de la velocidad de la luz, a continuación, entran en los campos magnéticos de las lentes del condensador primario y secundario, en donde se centran sobre la muestra.

Las lentes de los microscopios electrónicos son bobinas de cable de cobre, o solenoides, que generan un campo magnético cuando una corriente eléctrica pasa a través del cable. Cuando los electrones entran a los campos magnéticos de las lentes del condensador, estos llegan a concentrarse en ciertas distancias o longitudes focales, desde la lente. Mediante el ajuste de la corriente que corre a través del serpentín del condensador del objetivo, la distancia focal se ajusta de modo que los electrones iluminan la muestra en el área a estudiar en el TEM.

Después de que electrones golpean en la muestra, se desvían en diversos grados, dependiendo de la masa de los componentes de la muestra. Áreas de gran masa desvían los electrones de tal manera que son eliminadas del eje óptico del microscopio. Estas zonas, donde los electrones se han restado, aparecen como aéreas oscuras cuando son proyectadas en la pantalla de visualización. Las áreas

que tienen menor masa, generan una dispersión de electrones en menor grado, entonces aparecen más brillantes en la pantalla de visualización. Como resultado de la dispersión de electrones por la muestra, se forma una imagen detallada en la lente del objetivo. Esta imagen es luego ampliada hasta un millón de veces por las tres lentes restantes del TEM. A pesar de que cada objetivo se puede aumentar a 100 veces o menos, el aumento final es el producto de todos los lentes y puede llegar rápidamente a grandes aumentos.

Las lentes de imágenes electromagnéticas se construyen de la misma manera como la iluminación o las lentes del condensador. Lentes de imágenes se utilizan para enfocar y ampliar la imagen que se formó como resultado de la interacción de los electrones con la muestra. En última instancia, los electrones se proyectan en una pantalla de visualización recubierta con un material fosforescente que brilla cuando es golpeado por electrones. Un mayor número de electrones (de las áreas de la muestra que tienen menos densidad) generan las áreas más brillantes en la pantalla. Dado que las emulsiones fotográficas son sensibles a los electrones, así como a los fotones, la imagen se graba mediante el levantamiento de la pantalla de visualización y permite a los electrones generar una impresión sobre una película fotográfica colocada debajo. Este tipo de imágenes se llaman micrografías electrónicas.

Además de una gran ampliación, que se refiere a un aumento en el tamaño de un objeto, TEM produce imágenes con alta resolución. Las imágenes de alta resolución tienen gran detalle y pueden soportar el gran aumento que hace que los detalles sean visibles.

2.6 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

El cañón de electrones y las lentes en el microscopio electrónico de barrido (SEM, **Figura 11**) son casi idénticos a los TEM. Sin embargo, en vez de formar una imagen, las lentes SEM enfocan el haz de electrones a un lugar muy pequeño en la muestra. Cada una de las tres lentes del condensador en el SEM hace el haz de electrones cada vez más pequeño. Cuando el haz de electrones golpea la muestra, se produce la expulsión de baja energía, de los electrones secundarios de la superficie de la muestra. Electrones secundarios transmiten información sobre la superficie de la muestra y se utilizan para generar la imagen.

En contraste con el TEM, que ilumina la superficie de la muestra con un haz sencillo y grande, el SEM explora una pequeña mancha de electrones a través de la muestra. Esto es muy similar a la del haz de electrones que es generado en el interior de un tubo de televisión. En cada punto donde el haz de electrones del SEM golpea la muestra, varios electrones secundarios se generarán, dependiendo principalmente de la topografía, el ángulo de entrada del haz en la muestra y el grosor de porciones elevadas de la muestra. Los electrones secundarios (formación de imágenes) son atraídos fuertemente a un detector de electrones secundarios que se coloca a un alto voltaje positivo de alrededor de 12 000 V. Cuando los electrones secundarios golpean un recubrimiento fosforescente en el detector, estos generan una explosión de luz que viaja a través de una guía de luz y hacia un fotomultiplicador, donde los fotones se convierten en fotoelectrones y la señal débil es amplificada. Áreas de la muestra que generan un gran número de electrones secundarios aparecen muy brillantes cuando se ven en la pantalla de la SEM, mientras que las zonas con pocos electrones

son oscuras. Los distintos tonos de gris que se ven en la imagen da la impresión de profundidad, al igual que una fotografía en blanco y negro transmite la tridimensionalidad.

Dos eventos de exploración se realizan simultáneamente, pero en distintos lugares de la SEM. El haz de electrones es escaneado a través de la muestra, al mismo tiempo que un haz de electrones secundarios se escanean a través de un monitor o pantalla de visualización. Para cada punto de la muestra, hay un punto correspondiente en la pantalla de visualización, el brillo de estos depende del número de electrones secundarios generados por la muestra. El tamaño del área escaneada es ajustada, basada en el tamaño de la pantalla (15 cm x 20 cm, por ejemplo). Sin embargo, el tamaño de la zona analizada en la muestra es completamente variable.

La ampliación de la SEM se explica de la siguiente forma:

Como el área de la exploración va disminuyendo en la muestra, ya que es necesario que el punto de electrones sobre la muestra se vaya haciendo proporcionalmente más pequeño. En el SEM, por lo tanto, enfocar consiste en utilizar las lentes del condensador para ajustar el tamaño de la mancha en la muestra con el tamaño apropiado para la ampliación que se utiliza. Para el trabajo de grandes aumentos es necesaria la utilización de lentes de exploración muy pequeños, ya que se necesita reducir el tamaño de la mancha de electrones a puntos muy pequeños de 1-2 nm (Bozzola, 2001).

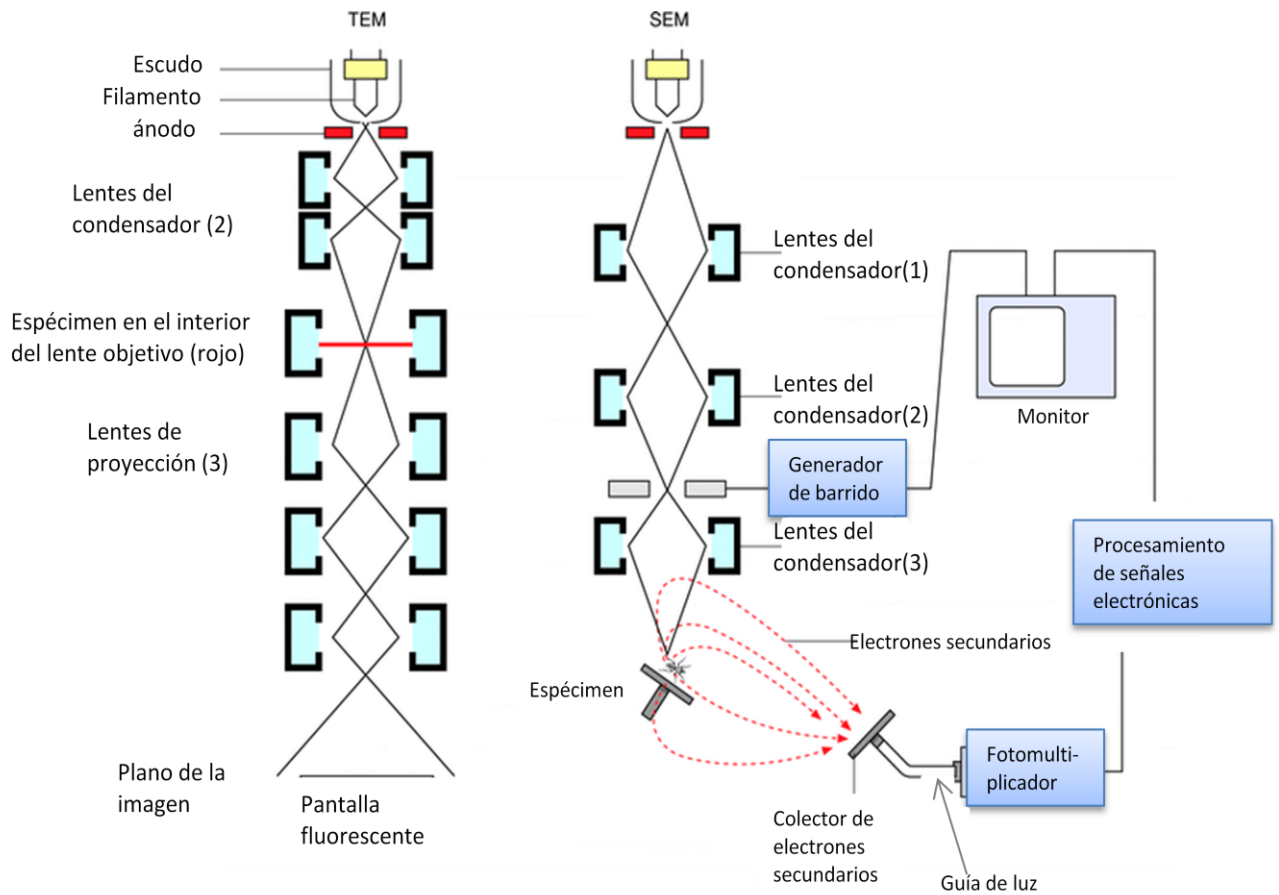


Figura 11 Esquema que muestra los componentes de un microscopio electrónico de transmisión (TEM) y un microscopio electrónico de barrido (SEM)

3 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSÁN Y POLI(ETIL-2-CIANOACRILATO) (PECA)

Las nanoesferas del monómero PECA se preparan mediante un proceso de emulsión/polimerización, en el que gotas de monómero insoluble en agua se emulsionan en fase acuosa. El mecanismo de polimerización se lleva a cabo mediante un proceso aniónico, ya que se inicia en presencia de iniciadores nucleófilos como OH⁻, CH₃O⁻ y CH₃OO⁻, que conduce a la formación de NP pequeñas de bajo peso molecular, debido a la rápida polimerización. La reacción se produce en micelas tras la difusión de moléculas de monómero a través de la fase acuosa rápidamente. Otro factor que induce la formación de las NP son la concentración del monómero y la velocidad de corte. Por otra parte, el tamaño y peso molecular de la NP depende del tipo y concentración del tensoactivo (Kumaresh S. Soppimatha, 2001).

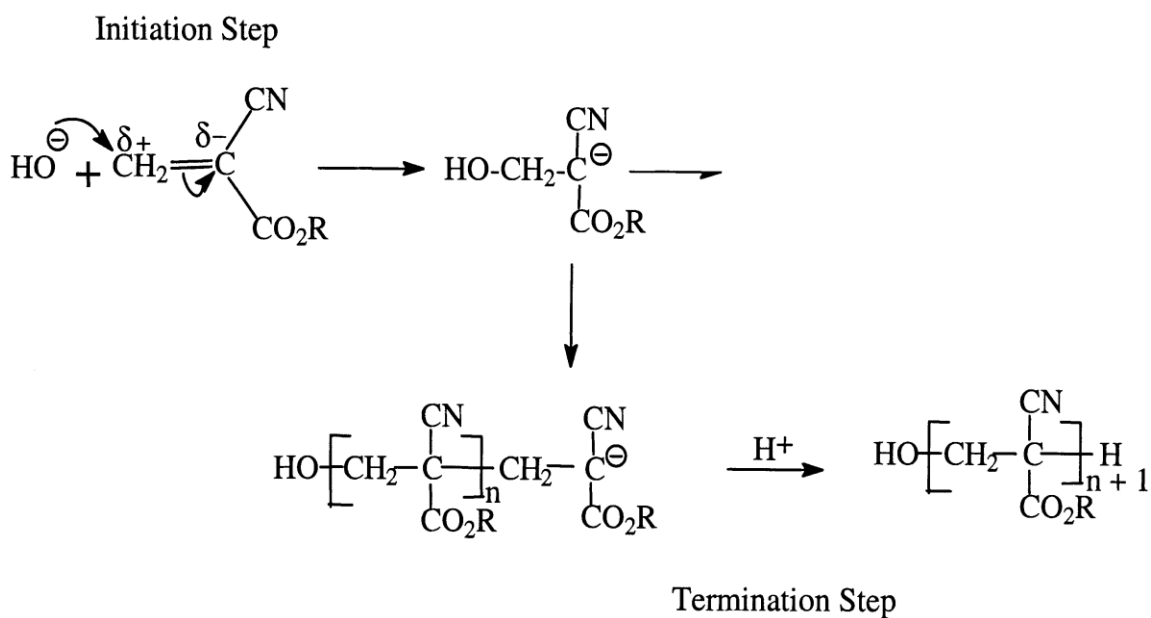


Figura 12 Mecanismo de reacción (aniónico) de polimerización del monómero de alquilocianoacrilato.

Con respecto a las nanopartículas de Quitosán, son formadas por el método de gelación iónica en el cual el pH del medio determina la velocidad de polimerización y la adsorción de fármaco cuando este último es ionizable, ya que el Quitosán es soluble a pHs ácidos. La formación de las nanopartículas se inicia con la adición de Tripolifosfato pentasódico (TPP) que es un polianión o un agente que satura el medio de cargas negativas para que éstas sean captadas por las cargas positivas del Quitosán.

Ambas preparaciones coinciden en la saturación de iones negativos en el medio para llevar a cabo el proceso, ya sea en agitación a gran velocidad o de forma espontánea. Tomando como punto de partida esta condición se fabrican las nanopartículas de los dos componentes mezclando las dos técnicas, en este caso, cuando el quitosán encuentra en solución por lo que conforma la fase continua, entonces se requiere que la adición del polianión y el monómero (PECA) sean casi simultáneas pues la formación de las nanopartículas es espontánea por el efecto que por sí solo tiene

el medio en cada componente, aunado a la agitación a la que se somete el medio, para asegurar la formación de sistemas del orden de nanómetros.

La formación de las nanopartículas es muy rápida por lo que se deben controlar algunos aspectos en su preparación como la agitación y el tiempo para lograr la formación e integración de ambos componentes. El tamaño de las partículas es variable, pero pueden incluirse en un rango de 40 a 200nm empleando tensoactivos no iónicos en el medio de polimerización (Brenda Gasca, 2012).

2. NANOTOXICOLOGIA

Los avances en ingeniería de nanoestructuras con un control muy preciso en forma y tamaño, la elucidación de sus propiedades únicas y la demostración de sus amplias aplicaciones han hecho a la nanotecnología una excitante área de investigación. Ya que este campo pasó de descubrimientos académicos a productos industriales, han surgido ciertas preocupaciones respecto a la toxicidad de las nanoestructuras. Actualmente, no se tiene un entendimiento completo sobre la relación de las interacciones con respecto a la forma, tamaño, composición y agregación de estos sistemas y no es claro si la exposición a humanos, animales, insectos y plantas pueden producir respuestas biológicas dañinas. Es por esto que surgió una nueva subdisciplina de la nanotecnología, llamada nanotoxicología (Chan, 2007).

Dentro de la nanotoxicología los estudios *in vitro* utilizando líneas celulares son actualmente los más socorridos y pueden dar indicios muy importantes sobre la toxicidad de sistemas mesoscópicos en general. Sin embargo, siempre hay que tomar en cuenta las ventajas y desventajas al momento correlacionar los resultados en estos modelos. Las alteraciones bioquímicas, fisiológicas moleculares o celulares inducidas por agentes xenobióticos permiten correlacionar estos eventos con la dosis de exposición y los niveles del agente tóxico con la magnitud de los diferentes efectos al organismo. Por ello se ha tenido que utilizar biomarcadores, los cuales son observaciones medibles de las alteraciones biológicas. Se pueden definir como modificaciones, presencia de componentes, estructuras, procesos y/o reacciones que se atribuyen de manera directa o indirecta a la exposición de sustancias xenobioticas. (Brenda Gasca, 2012). En general todos los autores distinguen tres tipos de biomarcadores: de exposición, de susceptibilidad y de respuesta (o efecto) (Manahan, 2002).

2.1. Biomarcadores de exposición

Los xenobióticos o sus metabolitos pueden ser medidos directamente en tejidos, orina, sangre y heces así como en el aire exhalado y otros fluidos corporales y en algunos casos reflejar la magnitud de la exposición. Los compuestos carcinógenos o sus metabolitos son generalmente especies electrofílicas que pueden causar cambios bioquímicos por su afinidad a grupos nucleofílicos que se encuentran en biomoléculas o moléculas orgánicas e inorgánicas. Estos efectos pueden cuantificarse y considerarse como biomarcadores de exposición (Manahan, 2002).

Bernard y Lauwerys (Bernard A, 1986) dividen los biomarcadores de exposición en dos subgrupos: selectivos y no selectivos, basándose en la especificidad de las pruebas de detección. Los biomarcadores selectivos se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos (p. ej. plomo en sangre) y los no selectivos constituyen un grupo de indicadores

inespecíficos de exposición (p.ej. tioéteres en orina como indicadores de exposición a sustancias electrófilas y, por tanto, reflejo de la absorción de sustancias mutagénicas y cancerígenas).

2.2. Biomarcadores de susceptibilidad.

Sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Se deben generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN y sus fragmentos de restricción (RFLPs), clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas.

Podemos distinguir dos tipos: marcadores de polimorfismos de sistemas activadores y marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores. Los marcadores de polimorfismos de sistemas activadores permiten la medida de actividad de los enzimas del citocromo P-450. Las hemoproteínas conocidas como citocromos P450 (CYP) están implicadas en la toxicidad de numerosos xenobióticos. El sistema isoenzimático microsomal del citocromo P450 humano está constituido por un mínimo de 30 genes diferentes, que se agrupan en distintas familias (en función de la semejanza de secuencias aminoacídicas) de las cuales las más importantes son las familias I, II, III y IV [11-13] que a su vez, se agrupan en subfamilias (A, B, C, D,.....) constituidas por genes polimórficos, de los cuales los más importantes son el CYP1A1 de la familia I (representa la actividad de la arilhidrocarburohidroxilasa) y el CYP1C8 y CYP1D6, de la familia II.

Se han realizado estudios tratando de asociar algunos polimorfismos génicos con enfermedades sobre todo de tipo canceroso, sin embargo las conclusiones han sido aún poco definitivas. Sin embargo, las implicaciones toxicológicas de los polimorfismos del citocromo P450 que afectan al uso terapéutico de determinados fármacos se conocen relativamente bien.

Los marcadores de polimorfismos de sistemas detoxificadores son medidas de actividad de enzimas tales como la glutatión-S-transferasa, la acetiltransferasa, la sulfotransferasa, la glucuroniltransferasa o la paraoxonasa.

2.3. Biomarcadores de respuesta (o efecto)

El biomarcador de respuesta o efecto es indicativo de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARN-m, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos (autoanticuerpos) contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (núcleo, membrana, etc.) (Gil Hernández, 2000).

Un aspecto importante del uso de nanopartículas radica en que estas, en comparación con el material a granel con una composición química idéntica, el nanomaterial posee una gran diferencia en cuanto a las propiedades fisicoquímicas (nanocaracterísticas), como es la alta reactividad, una enorme área de superficie, características electrónicas especiales, efectos cuánticos, etc. Por lo que las partículas con tamaño de 100nm tendrán diferentes propiedades que aquellas que tengan 5 o 10 nm (Yuliang Zhao, 2007). Las nanoestructuras han demostrado que estas propiedades están relacionadas a sus dimensiones físicas, y el rompimiento de estas nanoestructuras podría traer un efecto tóxico único que es difícil de predecir, las superficies de las nanoestructuras están

involucradas en muchas reacciones oxidativas y catalíticas. Si estas reacciones inducen citotoxicidad, la toxicidad podría ser más grande que la materia prima debido a la relación área volumen para el material a nanoescala es mucho más grande, y algunas nanoestructuras contienen metales o compuestos con toxicidad conocida, entonces el rompimiento de estos materiales podría causar respuestas tóxicas similares al material no nanoestructurado (Fischer HC, 2007).

Investigaciones demostraron que cuando materiales normalmente inocuos se elaboran a manera de partículas ultra finas tienden a volverse tóxicos.

Actualmente existen evidencias que demuestran que dado el tamaño de las nanoestructuras les permite entrar fácilmente a los tejidos, células, organelos e interactuar con macromoléculas ya que el tamaño físico actual de las nanoestructuras es similar a muchas moléculas biológicas (anticuerpos, proteínas) y a otras estructuras (virus). Algunos estudios recientes han demostrado que debido a su tamaño, cierto tipo de nanoestructuras no entran libremente a todos los sistemas biológicos, si no que su acceso está gobernado por moléculas funcionales adicionadas a sus superficies. Por ejemplo, las nanoestructuras de oro estabilizadas con citrato entran a células mamarias pero no fueron capaces de penetrar el citoplasma o el núcleo. Existe la posibilidad de crear nanoestructuras con superficies químicamente modificadas para ingresar al núcleo o a la mitocondria. Algunos estudios *in vivo* han mostrado que las nanoestructuras tienen dificultad para entrar en el cerebro, el cual está protegido por la barrera hematoencefálica, a menos que se diseñe una apropiada funcionalización de la superficie de la nanoestructura. Los investigadores han propuesto el diseño y desarrollo de nanoestructuras útiles en dirigir la biodistribución intracelular o *in vivo* pero el efecto metabólico final es aún desconocido y falta la estrategia para evitar comportamientos secundarios no intencionales. En general la relación entre tamaño, forma y química de superficie en las nanoestructuras y su correlación con la biodistribución intracelular *in vivo* es desconocida. Sistemáticamente, no se pueden predecir los movimientos y la localización de las nanoestructuras después de su exposición intracelular o *in vivo* basado en las propiedades de la nanoestructura en este momento, y tales estudios tienen que ser hechos antes que se evalúe la toxicidad de nanoestructuras de forma sistemática (Chan, 2007)

3. EVALUACIONES DE LA CAPACIDAD TOXICA DE NANOPARTICULAS

La citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado.

Los llamados ensayos de citotoxicidad son capaces de detectar mediante diferentes herramientas metodológicas, alteraciones a mecanismos celulares conocidos, efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o reparación del daño entre otras. Estos nos permiten conocer las repercusiones producto de la exposición de sustancias xenobióticas con la potencialidad para comprometer la viabilidad de diversos fenómenos celulares, bioquímicos o moleculares. Actualmente se ha recomendado evaluar las propiedades citotóxicas y genotóxicas *in vitro* que pueden presentar los nuevos sistemas de nanopartículas cuyo uso potencial esté en el ámbito de la industria farmacéutica o en el área de las Ciencias de la Salud y en la industria. En la tabla 2 se muestran algunas de las pruebas que se pueden realizar a sistemas

nanoparticulados y cuya información en conjunto otorga hallazgos importantes en los sistemas de experimentación en uso. Algunas de las pruebas referidas solo pueden ser realizadas *in vitro* sin embargo su relación con los hallazgos *in vivo* es muy importante. Debido a esto, en el presente trabajo también se elaboro la cuantificación de Glutación reducido, ya que este juega un rol muy importante en la protección contra especies reactivas que pueden traer consecuencias patológicas. (Brenda Gasca, 2012).

Tabla 2 Ensayos para evaluar el grado patogénico y potencial de los Nanomateriales (Jedd M. Hillegass, 2010)

Criterios de evaluación	Ensayos
Citotoxicidad	<ul style="list-style-type: none"> • Azul de Tripán • MTT o MTA • Clonogénico (CFE) • Medida de la actividad de la Lactato Deshidrogenasa (LDH) • Técnica Apostan • PI con Citometría de Flujo • 7AAD y/o Anexina V • <u>Lipoperoxidación</u> • Relación citocromo C con mitocondria • Activación de Caspasa
Proliferación	<ul style="list-style-type: none"> • Contenido de DNA • Incorporación de Timidina • Incorporación de BrdU • Ki-67 • Detección de PCNA
Genotoxicidad	<ul style="list-style-type: none"> • Ames (S. typhimurium o E. coli) • Detección de modificaciones basadas en DNA • Análisis de cariotipo (inducción de aberraciones cromosómicas y micronúcleos) • Ensayo Cometa
Expresión de genes	<ul style="list-style-type: none"> • Análisis Northern blot • Proteína ribonucleasa (RPA) • PCR en tiempo real • Matrices PCR • Micromatrices

Se considera que el estrés oxidativo es una respuesta celular producto de las funciones bioquímicas de un organismo, Se expresa por una relación anormal entre especies de alto potencial oxidante y los sistemas antioxidantes, a favor de las primeras; con alteraciones en la relación estructura-función de los diferentes niveles de organización biológica. La magnitud del estrés dependerá de la capacidad de los tejidos de detoxificar las especies reactivas (Ela Céspedes Miranda, 2008).

A continuación se mencionan los dos ensayos utilizados en este trabajo de tesis para cuantificar el estrés oxidativo generado por las nanopartículas de quitosán y polietilenoacrilato en un estudio *in vivo*.

3.1. Ensayo cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico

La cuantificación de especies reactivas de oxígeno utilizando ácido tiobarbitúrico (TBA) permite estimar la lipoperoxidación celular en la cual el malondialdehído (MDA) es derivatizado.

Es bien conocido que los organismos aeróbicos requieren del oxígeno para realizar sus funciones vitales pero una vez que el oxígeno es activado se convierte en tóxico para este tipo de organismos. El exceso de formas activas de oxígeno conduce al estrés oxidativo. La estructura electrónica del oxígeno hace que sea susceptible a reducciones parciales, produciéndose Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).

Las células viables están constantemente expuestas a ERO como son: Radical Superóxido, Peróxido de Hidrógeno, Radical Hidroxilo, Radicales Orgánicos; algunas de las cuales son capaces de iniciar la lipoperoxidación al extraer un protón alílico de un ácido graso poliinsaturado. Este proceso por múltiples etapas conduce a la formación de hidroperóxidos. Los radicales libres atacan a los ácidos grasos poli-insaturados de las membranas celulares y lipoproteínas transformándolos en ácidos grasos peroxidados, los cuales sufren un acortamiento de su cadena lateral liberando MDA, de tal manera que la concentración sérica de MDA es proporcional a los ácidos grasos poliinsaturados oxidados y, por lo tanto, un buen indicador de peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica se relaciona con la formación de radicales libres reactivos e inestables a nivel de membrana celular, con reacciones en cadena subsiguientes que dan pie a oxidación y muerte celular (**Figura 13**). Los peróxidos lipídicos alteran la estructura primaria de las moléculas endógenas por medio de entrecruzamiento y fragmentación de moléculas. El entrecruzamiento impone restricciones tanto estructurales como funcionales sobre las moléculas enlazadas. La peroxidación lipídica destruye a los lípidos en las membranas celulares y también genera formas tóxicas endógenas como los radicales lípidos LOO^{\cdot} y LO^{\cdot} que son especies reactivas con vida media más larga y, por lo tanto, tienen capacidad de difundirse hacia moléculas más distantes como el DNA.

Además de la desintegración hidrolítica del DNA por LOO^{\cdot} y LO^{\cdot} , se le atribuyen también la fragmentación de proteínas.

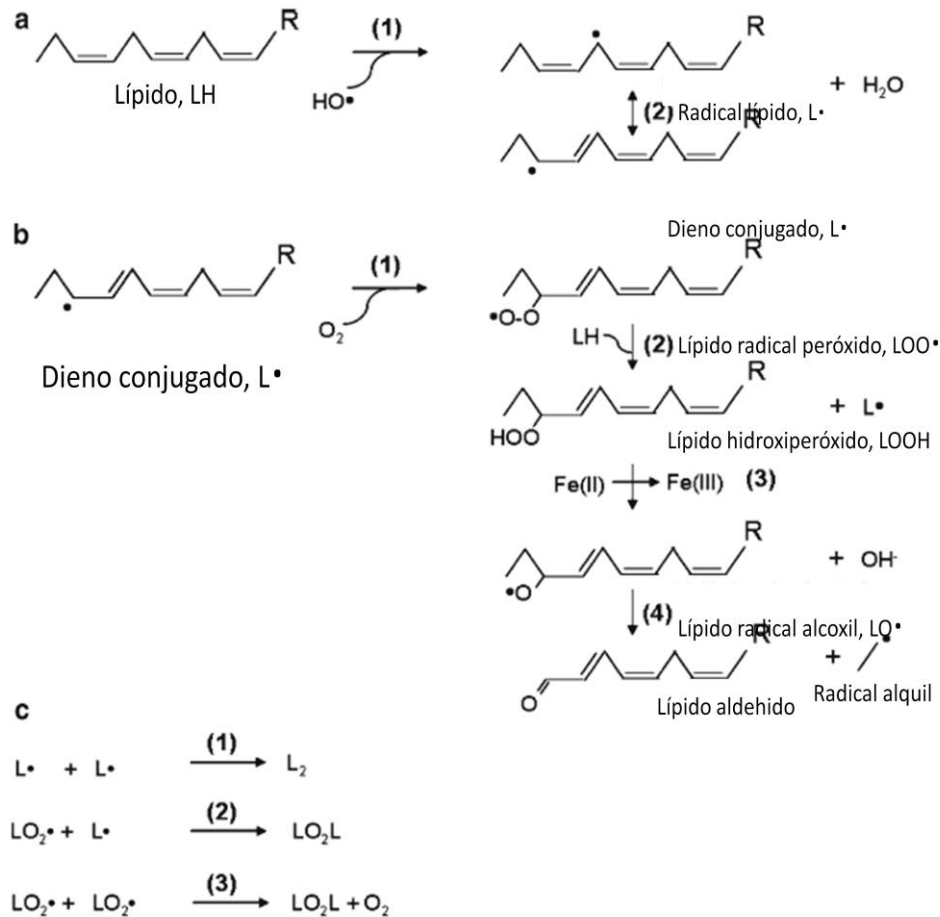


Figura 13 Ciclo de Peroxidación de lípidos. El ciclo de la Peroxidación de Lípidos tiene tres fases: a) iniciación, b) propagación y c) terminación. (Timothy M. Potter, 2011)

3.1.1. Producción de especies reactivas al oxígeno (ros)

Uno de los mecanismos de toxicidad más importantes es la producción de especies reactivas al oxígeno (ROS). Si un electrón captura el O₂ puede llevar la información del radical superóxido O₂⁻, el cual entonces genera además ROS. Normalmente, el glutatión y otras enzimas antioxidantes mantienen en equilibrio el cuerpo. Un incremento en el índice generación de ROS causa estrés oxidativo y desencadenar respuestas inflamatorias. Altos niveles en el estrés oxidativo perturba el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (poro PT) y entorpece la transferencia de electrones, lo cual puede producir apoptosis o necrosis celular (Brenda Gasca, 2012).

3.2. ENSAYO DE GLUTATION (GSH)

El tripéptido, γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina conocido como glutatión (GSH), es el más importante antioxidante de bajo peso molecular sintetizado en las células (En la **Figura 14** se muestra la estructura de GSH). Es sintetizada por la adición secuencial de cisteína a glutamato seguido por la

adición de glicina. El grupo sulfhidrilo (-SH) de la cisteína está implicada en las reacciones de reducción y conjugación que normalmente se consideran como las funciones más importantes de GSH. Estas reacciones proporcionan los medios para la eliminación de los peróxidos y muchos compuestos xenobióticos, sin embargo, GSH es también implicada en la regulación del ciclo celular (Henry Jay Forman, 2009).

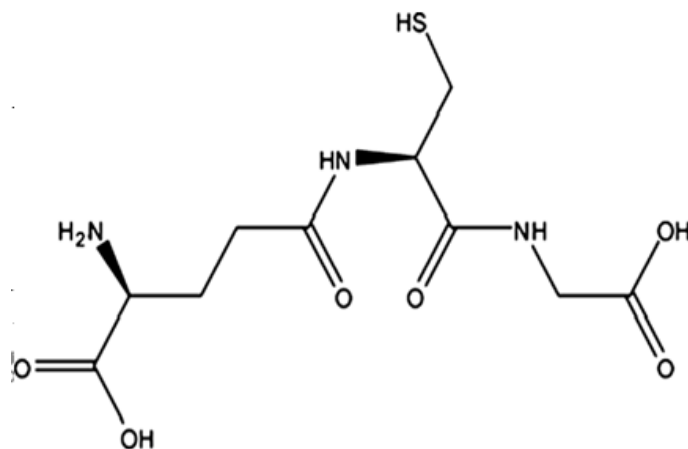


Figura 14 Estructura de glutatión, representación estereoquímica del γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina

El glutatión está ampliamente distribuido entre las células vivas, y aparentemente involucrado en muchas funciones biológicas. El glutatión que está presente en forma oxidada (GSSG) se convierte fácilmente en el glutatión reducido (GSH) por la enzima glutatión reductasa. Se ha informado de que el glutatión está presente principalmente en su forma reducida en los tejidos biológicos, a concentraciones tan altas como 3100 $\mu\text{g/g}$ de tejido. Sin embargo, se ha reportado la presencia de GSSG en concentraciones mucho más pequeñas, que van desde 0 hasta 244 $\mu\text{g/g}$ de tejido (Paul J. Hissin, 1976).

El GSH juega un rol muy importante en la protección contra especies reactivas que pueden traer consecuencias patológicas, este desempeña funciones importantes en los diferentes compartimentos celulares. En la mitocondria juega un papel clave en la regulación de la apoptosis frente a la necrosis. En el núcleo, el GSH es un regulador clave de la división celular, mientras que los pulmones están claramente afectados por la concentración baja de GSH intracelular y extracelular. El glutatión reducido (GSH) interactúa con las especies reactivas, cambiando a su forma oxidada (GSSG), la cual puede ser revertida a GSH por la acción de la enzima glutatión reductasa.

El tripeptido glutatión (GSH) en su forma reducida, es el antioxidante que se encuentra en mayor concentración dentro de la célula. Actúa como cofactor de la GPx para detoxificar H_2O_2 y es capaz de interactuar directamente con ROS como OH^\cdot , ROO^\cdot , RO^\cdot , HClO y O_2^\cdot . También actúa como agente quelante, y en diversos procesos metabólicos como la comunicación celular o la degradación de proteínas (Ugartondo Casadevall, 2009).

3.2.1. Fuentes de oxidantes

Las quinonas son una clase de moléculas con un ciclo óxido-reductor (REDOX) las cuales incluyen algunos fármacos y compuestos xenobioticos. El ciclo REDOX en este contexto se refiere a la capacidad de la molécula de cumplir un ciclo entre su forma oxidada y su forma reducida, y además en el proceso se generan especies reactivas al oxígeno (ROS), tales como el ion superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En este caso, la quinona se reduce por una reacción de transporte de electrón para producir una semiquinona, la cual es un radical libre capaz de reaccionar con el oxígeno para producir O_2^- .

Hay otros lugares en las células donde se pueden generar las especies reactivas de oxígeno. En los fagocitos, una parte importante del mecanismo de matar microorganismos implica la producción de especies de reactivas de oxígeno (ROS). La primera enzima en cuestión es la NADPH oxidasa (NOX) que produce O_2^- . Una vez que el O_2^- es producido, este puede dismutar en H_2O_2 tanto por una reacción rápida no enzimática como por una reacción catalizada por la superóxido-dismutasa. (SOD). Esto sucede ya que algunos fagocitos tienen la capacidad de secretar unas enzimas llamadas mieloperoxidasas las cuales catalizan una reacción de H_2O_2 y un haluro (cloruro o bromuro) para producir ácido hipocloroso (HOCl) y ácido hipobromoso (HOBr) los cuales ayudan a la eliminación de microorganismos.

El H_2O_2 formado también puede ser potencialmente peligroso si hay metales reducidos presentes en las células ya que el H_2O_2 puede reaccionar con el hierro ferroso (Fe^{2+}) y producir el radical hidroxilo (OH^-) el cual es capaz de oxidar cualquier molécula orgánica cercana. Uno de los peligros de producir OH^- es cuando se produce cerca de una membrana es la lipoperoxidación en donde los lípidos pueden ser oxidados por el radical OH^- y comenzar una reacción en cadena de radicales libres que pueden dañar la membrana.

Otro componente que provoca daño oxidativo es el peroxinitrito ($ONOO^-$). Este ion es generado en la reacción entre el óxido nítrico (NO^-) y el ion superóxido O_2^- . Estos dos radicales libres reaccionan rápidamente. En su forma básica $ONOO^-$ no reacciona con moléculas orgánicas, ya que esta se disocia en su forma de nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). Pero cuando el peroxinitrito es protonado, este se vuelve altamente reactivo (Henry Jay Forman, 2009).

Uno de los problemas importantes en la determinación tanto de los mecanismos de estrés oxidativo y de señalización REDOX es la medición de las diferentes formas de tioles en las células. Las formas predominantes son la forma reducida de glutatión (GSH) y su forma oxidada GSSG (Henry Jay Forman, 2009).

Existen diversos métodos para estimar la concentración de GSH, en este trabajo utilizamos el método desarrollado por Hissin y Hilf en el cual el glutatión reducido (GSH) celular se hace reaccionar con o-ftalaldehído (OPT) en un medio de con pH=8 para producir un compuesto fluorescente, el cual puede ser cuantificado, es importante destacar que en los estudios de Hissin et al. Demostraron que GSH reacciona específicamente con OPT a pH 8,0, obteniéndose un producto altamente fluorescente que puede ser activado a 350 nm con un pico de emisión a 420 nm. La reacción fue dependiente del pH final, así como la fluorescencia (Paul J. Hissin, 1976). La reacción se encuentra representada en la **Figura15**.

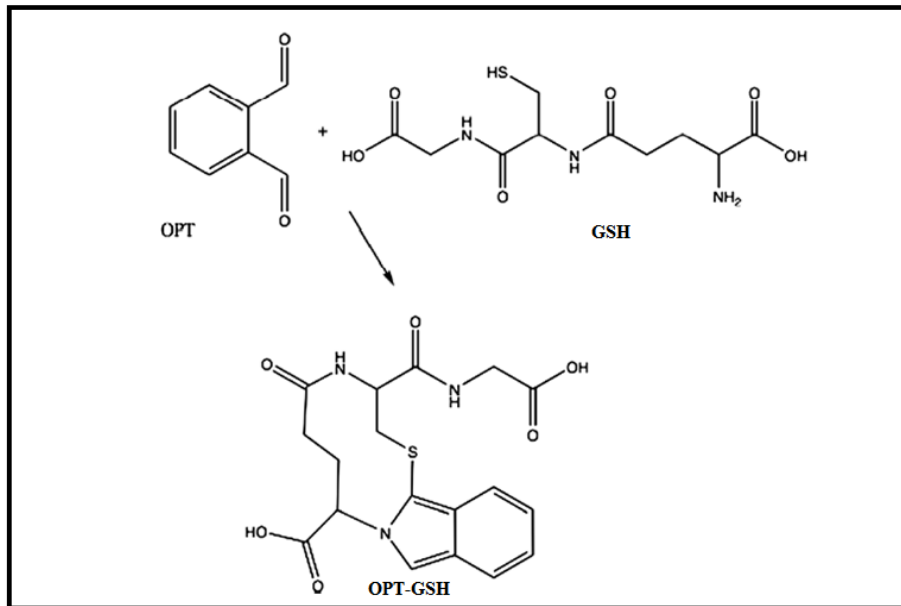


Figura 15. Reacción de OPT con GSH para formar el complejo fluorescente OPT-GSH a pH=8 (Henry Jay Forman, 2009).

4. ANIMALES COMO MODELO DE EXPERIMENTACION EN NANOTOXICOLOGIA

Los modelos animales se han utilizado ampliamente en todas las especialidades médicas y han resultado cruciales para el conocimiento de aspectos básicos y clínicos de las diferentes tologías. El modelo debe utilizar un animal adecuado para el experimento, además permitir la rápida observación de numerosos sujetos (muestra) en un espacio de tiempo relativamente corto y una extrapolación al hombre valida (aplicación clínica) y reproducible de los datos y resultados. Los diseños más complejos son los de tipo clínico, siendo muchas veces irrealizables o no viables éticamente con humanos, por lo que es necesario recurrir a la experimentación animal (López, 2007).

El modelo animal debe ser validado, no sirviendo cualquier animal para cualquier investigación, por lo que en primer lugar hay que demostrar o al menos razonar la utilización de un animal en vez de otro. La importancia de la interpretación de los resultados y la extrapolación de estos, de una especie a otra depende del modelo experimental utilizado. No existe un modelo perfecto extrapolable al hombre, pero existen una infinidad de modelos experimentales, cuyas respuestas fragmentarias incrementan el significado biológico del fenómeno observado. Todo protocolo de experimentación donde se incluyan animales debe ser aprobado por un comité de ética, que debe de existir en los centros de investigación, en la FES-Cuautitlán actualmente el comité denominado CICUAE-FESC por sus siglas e español (Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación de la FES-Cuautitlán) mismo que aprobó el uso y manejo de los animales que fueron empleados en este trabajo de tesis experimental.

La experimentación animal es muy importante para la determinación de la nanotoxicidad, en particular, para determinar toxicidad aguda y valores de DL50 que son las bases para la clasificación del tipo de toxicidad para diversos nanomateriales y nanopartículas. Las técnicas de biología celular tienen plena aplicación en el estudio de la nanotoxicología celular, en particular, para comprender las interacciones de las nanopartículas con las células y sus consecuencias (Yuliang Zhao, 2007).

La experimentación biomédica en animales ha permitido conocer de forma más detallada y precisa, la fisiología de los diferentes aparatos y sistemas que componen a humanos y animales, así como la patogénesis de las enfermedades infecciosas y degenerativas, favoreciendo el avance del conocimiento acerca de las enfermedades, su tratamiento y prevención. El uso de los animales en investigación, enseñanza, pruebas de laboratorio, producción de biológicos y mejoramiento de las técnicas quirúrgicas, ha sido y sigue siendo esencial para el desarrollo y avance de los conocimientos en las ciencias médicas y de la salud. Los adelantos logrados dentro de este campo, tienen mucho que agradecer a los experimentos hechos en gran variedad de especies animales, los cuales han contribuido a lograr un mayor bienestar y mejor calidad de vida para el ser humano y los demás animales. Entre las principales especies de vertebrados que se siguen utilizando como sujetos de investigación están los ratones, ratas, cobayos, conejos, hámsteres, perros, gatos, primates no humanos, cerdos, cabras, borregos, pollos y anfibios, en quienes se realizan investigaciones sobre fisiología, patología, toxicología, farmacología, inmunología, cirugía experimental y psicología, por citar algunos ejemplos; empleándose también para llevar a cabo pruebas diagnósticas y desafíos para probar vacunas.

Sin embargo, el hecho de realizar experimentos con seres capaces de sentir dolor, implica una responsabilidad hacia ellos por parte de la comunidad científica. La experimentación en animales requiere de normas y lineamientos éticos que les aseguren condiciones mínimas de sufrimiento y maximización de su bienestar y al mismo tiempo, se deben encontrar diferentes alternativas para sustituir a los animales en la búsqueda de respuestas y en la resolución de problemas que la medicina actual nos plantea (Vanda-Canton, 2003).

4.1. Aspectos bioéticos sobre la experimentación animal.

Desde el punto de vista ético y antropológico se ha restringido el uso de humanos para la investigación biomédica, por lo que el uso de modelos animales para el estudio de “enfermedades y condiciones humanas” han jugado un papel importante para entender estos procesos y, de hecho, han sido de gran valor para el diseño de tratamiento, donde múltiples variedades de especies de vertebrados e invertebrados, han sido utilizados, Y como ya se ha mencionado (López, 2007), el empleo de animales en todos estos estudios implica una responsabilidad por su vida y su estado físico y emocional. Las consideraciones éticas son tan importantes para los humanos como para los vertebrados no humanos, por tanto, la experimentación en animales también requiere de códigos sustentados en ciertos principios que la comunidad científica debe aceptar (Vanda-Canton, 2003).

En 1959 Russel y Burch publicaron su libro “The Principles of Human Experimental Technique”, en el que proponen el principio de las “3 R’s” de la técnica humanitaria: Reemplazar, Reducir y

Refinar, conceptos que se han vuelto clásicos en la literatura sobre animales en la experimentación (Aluja, 2002). La reducción de animales utilizados y el refinamiento de los métodos y técnicas en investigación sólo se lograrán si se planea el trabajo con detalle y con una auténtica responsabilidad, lo que implica disponer del mínimo necesario de animales para alcanzar una significancia estadística y obviamente, antes que nada, realizar una exhaustiva revisión bibliográfica acerca del tema, con el fin de no repetir lo que ya se sabe. El refinamiento en los experimentos y en las diversas maneras de elaborar preguntas a los sistemas biológicos para obtener respuestas, debe también exigir la disminución del dolor y malestar en los sujetos experimentales. El reemplazo o sustitución de animales mediante métodos alternativos como son los cultivos celulares, protozoarios, bacterias, modelos matemáticos computarizados, simuladores, multimedia, etc., pueden reducir en gran medida, el número de animales requeridos en experimentos y también evitarían el sacrificio inútil de muchos de ellos, con el beneficio adicional de que, a mediano plazo, resultan menos costosos que trabajar con animales (Vanda-Canton, 2003).

En el Reino Unido existen numerosos instructivos que regulan el uso de los animales en la experimentación. En Canadá, el “Canadian Council on Animal Care” han elaborado instrucciones para el uso de los animales utilizados en la investigación y existen lineamientos para definir el punto final humanitario que decide cuándo se le debe practicar la eutanasia a los animales, por no poderlos exponer por más tiempo a un experimento que les está produciendo un dolor excesivo y que los ha llevado a un punto de agotamiento que por razones éticas y humanitarias ya no es permisible, ni justificable. Entre los otros países que han elaborado guías se encuentran Nueva Zelanda, Holanda, y los Estados Unidos de Norteamérica. La guía de los Estados Unidos de Norteamérica, ha sido traducida al español y publicada en México por la Academia Nacional de Medicina, donde se puede adquirir. El Consejo Internacional de Ciencias Médicas ha publicado principios para guiar la investigación biomédica que involucra animales. La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, publicó en el Diario Oficial del Gobierno Mexicano el 28 de junio de 2001 la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: “Especificaciones técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio” (Aluja, 2002).

Esta norma especifica las características que deben tener los bioterios privados e institucionales en cuanto a su ubicación, ventilación y áreas de actividades; la adquisición de los animales, el tamaño de las jaulas para las diferentes especies; los ingredientes de los alimentos; las obligaciones de la institución para vigilar el buen funcionamiento, la higiene y el bienestar animal; el tipo de personal con el que debe contar, la preparación y los conocimientos que éste, tanto técnico como académico debe tener. También explica las indicaciones acerca del traslado de animales, características del confinamiento y del tipo de transporte, cuidados durante el mismo. En la norma se encuentran además lineamientos referentes a técnicas experimentales, anestesia, analgesia, administración de fluidos y de otras sustancias, la obtención de sangre y los métodos permitidos de eutanasia. Finalmente explica los métodos de bioseguridad y salud ocupacional para el personal. En los apéndices informativos se encuentran datos sobre zoonosis que afectan a los animales y al hombre, así como una clasificación de las actividades experimentales de acuerdo al grado de invasión, molestia o daño producido (Aluja, 2002).

Como mencionamos anteriormente, el CICUAE-FESC; Es la autoridad institucional que se encarga de regular el buen uso de los animales de experimentación y docencia en la FES-Cuautitlán. Este tiene como objetivo promover un trato humanitario a los animales de experimentación destinados a la investigación y enseñanza; fomentar la reducción del uso de animales y/o su reemplazo por otros métodos de investigación alternativos, así como garantizar los elementos que se regulan en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

El Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales de la UNAM, (CICUAE) encuentra su formación a partir de los requerimientos de la NOM- 062-ZOO-1999 artículos 4.2.2; 4.2.2.1; 4.2.2.2; 4.2.2.3 (Publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 22 de agosto de 2001), la cual establece que todas las Instituciones en las cuales se utilizan animales para la investigación, constatación de biológicos o para docencia deben contar con un comité que evalúe estas actividades.

CICUAE-FESC Establece un reglamento que tiene como propósito el fomentar un uso racional y humanitario de los animales de experimentación en los procesos de investigación, constatación de biológicos, pruebas de laboratorio, de docencia, entre otros que realice el personal académico, administrativo, alumnos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y usuarios visitantes.

Entre las atribuciones del CICUAE son: la inspección de instalaciones, evaluación de programas y áreas con actividad animal, presentación de reportes oficiales de responsabilidad de la institución, examinar los usos propuestos de los animales para investigación, evaluación de biológicos y enseñanza (v.gr. protocolos), y el establecimiento de mecanismos para recibir y revisar todo lo concerniente al manejo, cuidado y uso de los animales en la institución (UNAM, 2009).

4.2.Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio

El conjunto principal de las directrices para el cuidado y uso de animales de laboratorio es “The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (“La guía”) que fue desarrollada por “The National Academy of Sciences”. Este documento fue publicado por primera vez en 1963 y ha sido revisado muchas veces desde entonces. La última versión publicada en 1996 tiene cambios substanciales sobre el enfoque sobre el cuidado y uso de los animales de laboratorio y es la que está siendo utilizada actualmente. La Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (la *Guía*) enfatiza la convicción de que toda persona que cuide o use animales para investigación científica, enseñanza superior o pruebas de laboratorio debe asumir la responsabilidad de su bienestar. La *Guía* se aplica únicamente después de tomar la decisión de utilizar animales en investigación científica, enseñanza superior o pruebas de laboratorio. Las decisiones relacionadas con la necesidad de utilizar animales no están dentro de la incumbencia de la *Guía*, pero la responsabilidad del investigador por el bienestar de los animales se inicia con dicha decisión. La guía no puede ser utilizada apropiadamente sin un comité institucional sobre el cuidado y uso de animales de laboratorio (Wallace Hayes A, 2007).

5. JUSTIFICACIÓN

La ciencia farmacológica actual encamina sus estudios hacia la búsqueda de un vehículo capaz de transportar el fármaco hasta su lugar de acción, a fin de evitar, en lo posible, sus efectos adversos.

En los últimos años se han desarrollado nuevos sistemas de administración de fármacos, como lo son los liposomas, las micropartículas y las nanopartículas entre otros, los cuales son acarreadores coloidales particulares que se usan como sistemas de liberación (Ramos D, 2007).

Un aspecto importante del uso de nanopartículas radica en que estas, en comparación con el material a granel con una composición química idéntica, el nanomaterial posee una gran diferencia en cuanto a las propiedades fisicoquímicas (nano características), como es la alta reactividad, una enorme área de superficie, características electrónicas especiales, efectos cuánticos, etc. Por lo que las partículas con tamaño de 100nm tendrán diferentes propiedades que aquellas que tengan 5 o 10 nm (Yuliang Zhao, 2007). Las nanoestructuras han demostrado que estas propiedades están relacionadas a sus dimensiones físicas y sus características fisicoquímicas. Modificaciones en estas propiedades podrían estar asociadas a un efecto tóxico que es difícil de predecir.

Como se mencionó, se están desarrollando nuevos sistemas de administración de fármacos, como las nanopartículas y durante la última década se ha demostrado que las propiedades de superficie de las nanopartículas fueron el factor clave que determina su destino *in vivo*. Vehículos coloidales de medicamentos con propiedades de superficie de repulsión de proteínas se han diseñado con el fin de reducir la opsonización por las proteínas del suero y la activación del complemento ya que estos fenómenos juegan un papel importante en la eliminación rápida de las partículas de la sangre y en su reconocimiento por los macrófagos de los fagocitos mononucleares sistema (MPS). El resultado es que la opsonización de las nanopartículas a través de su adsorción por proteínas de suero se reduce, y en consecuencia las nanopartículas son menos reconocidas por los macrófagos (Cédric Chauvierre, 2003), por lo que se mejora el tiempo de vida media de las nanopartículas dentro del organismo al no ser reconocidas por el sistema inmune. Para lograr esto, es necesario añadir a la superficie de las nanopartículas, propiedades específicas, lo cual aun no se ha alcanzado con éxito. Sin embargo se han tenido buenos resultados recubriendo las nanopartículas con polisacáridos como el quitosán, mejorando las características antes mencionadas (Cédric Chauvierre, 2003). Además, la modificación superficial de las nanopartículas tales, pueden mejorar las propiedades hidrófilas de las nanopartículas preparadas por polímeros biodegradables sintéticos, y hacerlos portadores ideales para fármacos hidrófilos tales como péptidos, proteínas y moléculas hidrófilas, tales como fármacos contra el cáncer (S.C. Yang, 2000).

En este trabajo el interés particular fue el diseño de sistemas de nanopartículas a base de etilcianoacrilatos y quitosán con objeto de generar sistemas híbridos y únicos (a base de solo uno de los componentes). Cabe mencionar que los sistemas de nanopartículas empleados en este trabajo fueron previamente caracterizados y observamos que se obtuvieron partículas esféricas menores o igual a 200 nm. Además se evaluó la capacidad citotóxica de los sistemas mencionados mediante los ensayos de TBARS, MTT y ensayo de cinética de proliferación celular; en esos resultados se mostró que dichos sistemas no inducen un efecto citotóxico agudo.

Como hemos mencionado anteriormente, las superficies de las nanoestructuras están involucradas en muchas reacciones oxidativas y catalíticas dadas sus propiedades fisicoquímicas y constituyentes. Los estudios *in vitro* utilizando líneas celulares son actualmente los más socorridos y pueden dar indicios muy importantes sobre la toxicidad de sistemas mesoscópicos en general. Sin embargo, siempre queda la duda de si en un sistema biológico completo la toxicidad será correlacionable, por lo que se pretende generar datos experimentales sobre el impacto producido por nanopartículas administradas a un organismo vivo, en este caso ratas wistar macho, evaluando la capacidad citotóxica generada por las mismas. Así mismo, teniendo una caracterización fisicoquímica será posible entender cómo interactúan las nanopartículas en los sistemas biológicos, llevando el estudio de lo general a lo particular, es decir, conociendo la forma, estructura y tamaño será posible evaluar los eventos que debe realizar la célula o mantenerla de manera continua, y así

saber mediante técnicas de identificación indirecta el riesgo que inducen las nanopartículas fabricadas.

6. OBJETIVO

a. Objetivo general.

Implementar, adaptar y/o crear métodos de elaboración de sistemas mesoscópicos de quitosán, polietilcianoacrilato y quitosán/polietilcianoacrilato así como la evaluación del aspecto citotóxico en un estudio *in vivo*.

b. Objetivos particulares

- Implementar, adaptar y/o crear métodos de elaboración de sistemas mesoscópicos de quitosán, polietilcianoacrilato y quitosán/polietilcianoacrilato.
- Realizar la caracterización de los sistemas mesoscópicos elaborados.
- Desarrollo, estandarización e implementación de técnicas para evaluar estrés oxidativo en modelos experimentales *in vivo*.

7. METODOLOGÍA

7.1.MATERIALES

7.1.1. Preparación de nanopartículas

- Quitosán de cáscara de camarón $\geq 75\%$ deacetilado (*Sigma*)
- Tripolifosfato 96.2% (*Procter & Gamble Manufactura*)
- Etil 2-cianoacrilato (*Aldrich*)
- Pluronic F-68 (*Sigma-Aldrich*)
- Ácido acético glacial (*J.T. Baker*)

7.1.2. Cuidado y uso de animales de laboratorio

- Cajas de acrílico para ratas
- Bebederos de plástico 500mL
- Agujas calibre 23G(azules)
- Jeringas 5mL
- Tubos capilares heparinizados
- Cubreobjetos
- Estuche de disección
- Criotubos
- Tubos eppendorf 1mL
- Viales 5mL

7.1.3. Ensayo de TBARS

- Ácido perclórico (*J. T. Baker*)
- Protease inhibitor cocktail tablets. Complete mini, EDTA-free. (*ROCHE*)
- Detergente biológico Triton®
- Malondialdehído (MDA) bis (dimetyl acetal) 99% (*Aldrich*)
- Albúmina sérica bovina Molecular Biology Tested (*Sigma*)
- Ácido 2-tiobarbiturico $\geq 98\%$ (*Sigma-Aldrich*)
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate (*BIO RAD*)

7.1.4. Ensayo de Glutación

- Ácido perclórico (*J. T. Baker*)
- Protease inhibitor cocktail tablets. Complete mini, EDTA-free. (*ROCHE*)
- Detergente biológico Triton®
- EDTA sal disódica, dihidrato, cristal. Reactivo (*J. T. BAKER*)
- Glutathione reduced. (*MP Biomedicals. LLC*).
- o-Phthaldialdehyde (OPT) , $\text{mínimum } 97\%$. (*Sigma-Aldrich*)
- Albúmina sérica bovina Molecular Biology Tested (*Sigma*)
- Protein Assay Dye Reagent Concentrate (*BIO RAD*)

7.1.5. Soluciones

7.1.5.1. Soluciones ensayo TBARS

- PBS con 1% de Tritón® e inhibidor de proteasas
- Ácido Perclórico 2.5%
- Ácido Tiobarbitúrico al 0.67%
- Reactivo de Bradford Dilución 1:4
- Stock de Albúmina sérica Bovina 1mg/ml
- Stock de Malondialdehído (MDA) 0.05M

7.1.5.2. Soluciones ensayo GSH

- PBS con 1% de Tritón® e inhibidor de proteasas
- Ácido Perclórico 2.5%
- Stock de Glutación 0.05M
- Solución de OPT 1%
- Buffer PBS/EDTA 0.005M pH=8

7.1.5.3. Soluciones para preparación de nanopartículas

- Ácido acético 1%
- Quitosán al 0.3%

- Tripolifosfatopentasódico (TPP) 0.1%
- Hidróxido de sodio 1M

7.1.6. Equipos

- Agitador magnético MRC® Modelo GMH-5E
- Agitador mecánico Homogenizer Glas-Col Variable Speed Reversible. Modelo: CAT:099C K54
- Balanza analítica Sartorius BL 120S
- Balanza granataria DGN
- Baño seco MRC
- pHmetro OAKTON Ph 510 series pH/mV/°C meter
- Microcentrífuga con control de temperatura Microfuge® 22R Centrifuge Beckman Coulter
- Ultrasonido Ultrasonic Processor Mod. CPX 130 Cole Parmer
- Vórtex Vortex-2 Gene Scientific Industries
- Fluorometro VersaFluor™ Fluorometer
- Microscopio Electrónico de Barrido JEOL Mod. 25SII
- Microscopio Electrónico de Transmisión
- Zeta sizer Nanoseries
- Lector de microplaca.
- Estufa

7.2. MÉTODOS

7.2.1. Modelo experimental

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 170 – 190g como modelo animal. De estos individuos se tomaron muestras de hígado, riñón y plasma después del sacrificio.

7.2.2. Preparación de nanopartículas

7.2.2.1. Nanopartículas de Quitosán.

Se adicionaron 2g de Pluronic F-68 pesados balanza analítica a 100mL de Quitosán al 0.3%*. Esta solución se deja reposar hasta que el Pluronic F-68 se hidrate por completo (aproximadamente de 30 a 40min). Posteriormente se agregaron lentamente 100mL de tripolifosfato (TPP) al 0.1% en agitación mecánica. La solución se dejó en agitación mecánica durante una hora.

Una vez terminado el tiempo de agitación la suspensión se filtro por membrana 0.22µm y se almaceno en tubos estériles.

*La solución de Quitosán al 0.3% se preparo con ácido acético al 1% como disolvente.

7.2.2.2. Nanopartículas de Polietilcianoacrilato.

Se adicionaron 2 g de Pluronic F-68 pesados en balanza analítica a 200mL de ácido acético al 1%. La solución se dejó reposar para permitir que el Pluronic F-68 se hidratara por completo (aproximadamente de 20 a 30 min). Esta solución se puso en agitación mecánica y se le adicionaron 350 µL de Polietilcianoacrilato, esto se realizó poco a poco en gotas pequeñas y se mantuvo en agitación durante una hora.

Una vez transcurrido el tiempo de agitación, la suspensión fue filtrada por membrana 0.22µm y se almacenó en tubo estériles.

7.2.2.3. Nanopartículas de Quitosán/Polietilcianoacrilato.

Se adicionaron 2 g de Pluronic F-68 pesados en balanza analítica a 100mL de Quitosán al 0.3%, y la solución se dejó en reposo para permitir que el Pluronic F-68 se hidratara por completo. En agitación magnética se agregaron 100mL de TPP al 01%, inmediatamente se agregó 350µL de Polietilcianoacrilato. La agitación se mantuvo durante una hora. Una vez transcurrido el tiempo de agitación, la suspensión se dejó reposar por 1 hora y posteriormente se filtró a través de membrana 0.22µm y se guardó en tubos estériles.

A partir de las suspensiones de nanopartículas, se prepararon dosis para ser administradas, una dosis alta y una dosis baja, además de un control de Pluronic F-68 en ácido acético. Este control será administrado a un lote para comparar los resultados de las pruebas con suspensiones de nanopartículas y eliminar interferencias en los resultados generadas por el manejo y ambiente de trabajo, además de comprobar si el solvente o el tensoactivo producen algún efecto tóxico.

Dosis alta.

A partir de las suspensiones de nanopartículas preparadas anteriormente se tomaron 12.5mL y se llevaron a un aforo de 25mL con solución salina fisiológica.

Dosis baja.

A partir de las suspensiones de nanopartículas preparadas anteriormente se tomaron 1.25mL y se les adicionó 11.25mL de ácido acético 1% y se llevó al aforo con 12.5mL de Solución salina fisiológica.

Control Pluronic-68 en ácido acético.

Se tomaron 12.5mL de una solución de Pluronic F-68 al 1% en ácido acético* y se llevó a 25mL con solución salina fisiológica.

*El ácido acético utilizado se preparó al 1%.

7.2.3. Acondicionamiento de las suspensiones de nanopartículas para caracterización.

Una vez obtenidas las nanopartículas, se guardaron en tubos estériles. Para SEM, se tomó un poco de la solución filtrada y recién resuspendida con pipeta o cuentagotas, se fijó en un cubreobjetos el cual era previamente limpiado con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente evitando el contacto con polvo o impurezas del lugar.

Con respecto a las pruebas en TEM, tamaño de partícula y potencial Z, se entregó una porción de las soluciones filtradas al personal responsable de realizar las pruebas. Para TEM, únicamente se requería una gota fijando en una rejilla de cobre-carbono. Se dejó secar a temperatura ambiente. En cuanto al tamaño de partícula y potencial Z, las determinaciones se realizaron en solución y en celdas especiales para las determinaciones descritas, estableciendo las especificaciones de materiales y disolventes en el equipo.

7.2.4. Cuantificación de material en los sistemas de nanopartículas.

Se lavaron viales de 5mL y se enjuagaron con agua desionizada. Posteriormente se metieron en la estufa por 2hrs a 70°C, una vez transcurrido el tiempo se pesaron hasta mantener un peso constante (peso inicial) y se colocaron en un desecador.

Se agregaron 2mL de los sistemas nanoparticulados a los viales y se colocaron en la estufa durante 48hrs a 70°. Después se volvieron a pesar (peso final) y se calculó la cantidad de material en el vial. Todo el proceso se realizó por triplicado.

$$\text{peso final} - \text{peso inicial} = \text{cant. de material en suspension}$$

7.2.5. Exposición de nanopartículas por vía intraperitoneal en ratas wistar.

El estudio *in vivo* se realizó en ratas wistar macho de 170 a 190 g de peso*. Se ocupó un lote de 15 ratas por cada tratamiento (Quitosán, Peca y Quitosán/PECA). En cada lote se administraron las 2 concentraciones (alta y baja) además de un control de Pluronic F-68 en ácido acético, con un total de 3 grupos de 5 ratas en cada lote.

Los individuos fueron expuestos durante 5 días por vía intraperitoneal con dosis alternadas de las suspensiones de nanopartículas y el control. Una vez terminado el tratamiento, se realizó el sacrificio por dislocación cervical.

Después del sacrificio se obtuvieron muestras de hígado, riñón y plasma las cuales se congelaron (a -20°C) hasta su uso. En estos tejidos de muestra es donde se realizaron las pruebas de citotoxicidad (TBARS y cuantificación de Glutación).

*Los animales de laboratorio fueron obtenidos de la UNIDAD DE PRODUCCION Y EXPERIMENTACION DE ANIMALES DE LABORATORIO. UPEAL-CINVESTAV.

7.2.5.1. Cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en tejido.

Se llevó a cabo en el hígado y riñón de ratas expuestas a las suspensiones de nanopartículas. Este ensayo no se realizó en plasma ya que existen publicaciones en donde los autores enfatizan que el ensayo del TBA no es útil para la determinación de la peroxidación lipídica en el suero por falta de especificidad, ya existen fuentes no lipídicas en el suero como los carbohidratos y las glicoproteínas que producen aductos MDA-TBA durante la reacción colorimétrica. Además, el TBA también reacciona con varios compuestos presentes en el suero (pirimidinas, hemoglobina y bilirrubina) y con sus productos de oxidación para formar compuestos que interfieren en los ensayos fluorimétricos y espectrofotométricos (Estepa, Ródenas, & M.C., 2001).

Para la determinación de las especies reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBARS) y de proteínas totales se realizaron curvas de calibración estándar. En el caso de TBARS, se realizó una curva de calibración usando como reactivo stock Malondialdehído (MDA). Con respecto a la estimación de proteínas totales, el reactivo stock utilizado fue albúmina sérica bovina (SBA). Ambas curvas de calibración correlacionan la absorbancia obtenida con la concentración de TBARS por mg de proteínas totales de cada muestra (nmol de TBARS/mg de proteína total de tejido). Las determinaciones, tanto para las curvas de calibración estándar como de las muestras analizadas, se realizaron en un equipo lector de microplacas a una longitud de onda de 540 nm para TBARS y 620nm para Bradford.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford que se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. Se emplea un colorante hidrofóbico cuyas disoluciones acuosas en presencia de ácido fosfórico tienen un color pardo y que, al encontrarse en el entorno hidrofóbico del interior de una proteína, origina un color azul intenso que se puede medir fácilmente con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre que tiene un máximo de 595 nm. Este método depende, de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico y las proteínas, por lo que es relativamente sensible a la presencia de contaminantes, tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol. Este método es sensible (1-15 µg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación.

Para determinar la concentración de proteína total presente en una muestra se requiere la preparación de una curva de calibración empleando una proteína patrón, que generalmente suele ser la albúmina sérica bovina (Brenda Gasca, 2012).

7.2.5.2. Tratamiento de las muestras para TBARS

La cuantificación de TBARS se estimó en tres tejidos: Hígado, riñón y plasma considerando su papel en la toxicocinética y toxicodinamia de xenobióticos en las ratas. Los tejidos fueron extraídos inmediatamente después del sacrificio. Los tejidos fueron guardados en hielo y congelados a -20°C hasta su uso.

HIGADO Y RIÑÓN

El tejido fue descongelado en hielo, y se tomo una porción de aproximadamente 0.5cm^3 con un bisturí. El resto volvió a congelarse. A la muestra se le adicionó 500mL de solución PBS/tritón 0.1%/inhibidor de proteasas y se homogenizo con el aparato *Homogenizer Glas-COL*, cuidando siempre de mantener la muestra fría. Posteriormente el homogenizado se sónico con 3 pulsos (10s cada pulso) a 97% de amplitud. La solución obtenida se centrifugo a 12000rpm por 7min, manteniendo una temperatura de 4°C en la microcentrífuga *Microfuge® 22R Centrifuge Beckman Coulter* y se recupero el sobrenadante, cuidando de medir la cantidad recuperada (Se recuperaban $400\mu\text{L}$ en promedio). De la solución obtenida se toman $5\mu\text{L}$ del sobrenadante para realizar la prueba de Bradford.

Al sobrenadante recuperado se le adiciona una cantidad igual de acido perclórico 2.5% y se deja incubar por 30min a temperatura ambiente para desproteinizar la muestra. Posteriormente se centrifuga a 12000rpm por 10min a una temperatura de 4°C y se separa el sobrenadante. Esta solución de congela hasta su uso.

Lectura

Para la lectura, la solución obtenida en el procesado de la muestra (hígado, riñón y plasma) se descongela y se le adiciona una cantidad igual de TBA 0.67% y se deja incubar por 30min a 90°C . De esta solución se toman $200\mu\text{L}$ y se colocan en un pozo de la microplaca y se lee a 540nm.

7.2.5.3. Preparación de la curva de calibración de TBA

El *stock* de Malonaldehído (MDA) se preparó una concentración de 0.04M cubriendo siempre de la luz y manteniendo en refrigeración.

Se definieron los sistemas (12 en total) cuyas concentraciones de MDA se encontraban en el rango de las lecturas obtenidas de las muestras a analizar. A cada alícuota se añadió MDA, agua desionizada y $250\mu\text{l}$ de TBA para tener siempre $500\mu\text{L}$ ml de solución. Se dejó incubando a 90°C por 30 minutos y se colocaron $200\mu\text{L}$ da cada sistema en cada pozo de la microplaca. Este se leyó a una longitud de onda de 540nm.

Cada curva se realizo por triplicado.

A partir de los resultados se realizo una regresión lineal para poder interpolar los datos de las muestras.

7.2.5.4. Cuantificación de proteínas totales en tejido (método de Bradford)

En el tratamiento de las muestras para la lectura de TBARS de hígado y riñón, antes de adicionar el acido perclórico se guardaron $5\mu\text{L}$ de la solución. Estos microlitros se descongelan en hielo y se le adiciona $500\mu\text{L}$ de PBS. De esta solución 1:100 se toman $200\mu\text{L}$ y se llevan a 1mL con PBS para obtener una dilución final del 0.2%.

En el caso de Plasma, este se descongela y se realiza una dilución directa 1:100 con PBS, de esta dilución se toman $100\mu\text{L}$ y se llevan a 1mL con PBS para obtener una dilución final de 0.1%.

De la dilución final de cada muestra se toman 40µL y se depositan en un pozo de la microplaca y se le adicionan 160µ de reactivo de Bradford diluido 1:4 y se leen a 620nm.

7.2.5.5. Preparación de la curva de calibración de Bradford para proteínas totales.

Se preparó el reactivo de Bradford (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate BIO RAD*) diluyéndolo 1:3 con agua desionizada. Así mismo, para la curva de calibración se preparó el *stock* de albúmina sérica bovina a una concentración de 1 mg/mL. Para realizar la curva se prepararon 10 sistemas de concentración conocida incluyendo el blanco y, cuyos valores de absorbancia se encontraban en el rango de las muestras problema.

Los sistemas contenían una alícuota de solución de BSA y un volumen PBS suficiente para obtener 1mL para cada sistema. Primero se adiciona el PBS y posteriormente la alícuota de BSA enjuagando 3 veces la micropipeta.

De cada sistema se tomaron 40µL y se depositaron cada pozo de la microplaca, posteriormente se les adicionaron 160µL de reactivo de Bradford diluido. Se dejaron incubar por 15 min a temperatura ambiente y se leyeron en el equipo a 595nm. Esta curva se realizo por triplicado. Con los resultados se realizo la curva de calibración de proteínas.

7.2.5.6. Cálculo de TBARS

De la ecuación de la recta ($y = mx \pm b$) obtenida a partir de la curva patrón de TBARS y Bradford se pueden interpolar los datos obtenidos de las muestras analizadas.

$$y_{TBARS} = m_{TBARS}x - b_{TBARS}$$

$$y_{prot. tot.} = m_{prot. tot.}x - b_{prot. tot.}$$

Donde:

x = concentración de las muestras en cada caso.

y_{TBARS} = Absorbancia obtenida de las muestras.

m_{TBARS} = Pendiente obtenida por la regresión lineal de las curvas de TBARS

b_{TBARS} = Ordenada al origen obtenida por la regresión lineal de las curvas de TBARS

$y_{prot. tot.}$ = Absorbancia obtenida de las muestras.

$m_{prot. tot.}$ = Pendiente obtenida por la regresión lineal de las curvas de BSA.

$m_{prot. tot.}$ = Pendiente obtenida por la regresión lineal de las curvas de BSA

$b_{prot. tot.}$ = Ordenada al origen obtenida por la regresión lineal de las curvas de BSA

∴Una vez obtenido el valor de la concentración de TBARS y proteínas totales de los sistemas, estas concentraciones se corrigieron multiplicando por el factor de dilución para llegar a la concentración real de la muestra. Con estos datos se puede determinar la concentración de TBARS por cada mg de proteína en tejido.

$$\frac{\text{mmol TBARS}}{\text{mg prot en tejido}}$$

7.2.5.7. Cuantificación de glutatión (GSH).

Se llevo a cabo en el hígado, riñón y plasma de ratas expuestas a las suspensiones de nanopartículas. Para la cuantificación de GSH, se realizó una curva de calibración usando como reactivo stock una solución de Glutatión reducido *MP Biomedicals* con una concentración de 0.005M, este método está basado en la interacción del GSH con o-ftaldialdehido (OPT) con lo cual se produce un compuesto fluorescente, el cual puede ser cuantificado en un fluorómetro. La cuantificación de proteínas se realizo mediante el método de Bradford antes mencionado. Ambas curvas de calibración correlacionan la absorbancia, en el caso de Bradford, y las unidades relativas de fluorescencia, en el caso del ensayo de GSH, obtenidas con la concentración de GSH por mg de proteínas totales de cada muestra (nmol de GSH/mg de proteína total de tejido). La lectura de GSH se realizo en el Fluorómetro *VersaFluor™ Fluorometer* utilizando Gain medio y el ensayo de Bradford se leyó en el equipo lector de microplaca a 595nm.

7.2.5.8. Tratamiento de las muestras para GSH

El tratamiento de las muestras (hígado, riñón y plasma) para la cuantificación de GSH se realizó mediante el método descrito anteriormente para el ensayo de TBARS, hasta el punto en el que se congelan.

Lectura

Para la lectura, la solución obtenida en el procesado de la muestra (hígado, riñón y plasma) se descongela y se preparan sistemas en tubos eppendorf color ámbar, colocando 50µL de muestra, 1.8mL de solución Buffer EDTA/PP4-2 pH=8 y 50µL de agua desionizada. (Todo se realiza teniendo los tubos eppendorf en hielo).

Posteriormente se les adiciona 100µL de OPT 1%, cuidando de proteger los tubos de la luz, se agita en el vortex para mezclar perfectamente y se dejan incubar por 15min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo se leen en el fluorómetro *VersaFluor™ Fluorometer* utilizando el Gain medio. Esto se realizo en un cuarto con iluminación baja para disminuir la degradación del complejo OPT-GSH.

7.2.5.9. Cálculo de GSH

La cuantificación de proteínas totales se realizó por el método de Bradford de la misma forma que las muestras de TBARS. A partir de estos datos se realiza la cuantificación.

De la ecuación de la recta ($y = mx \pm b$) obtenida a partir de la curva patrón de GSH y Bradford se pueden interpolar los datos obtenidos de las muestras analizadas.

$$y_{GSH} = m_{GSH}x - b_{GSH}$$

$$y_{prot. tot.} = m_{prot. tot.}x - b_{prot. tot.}$$

Donde:

x = concentración de las muestras en cada caso.

y_{GSH} = Unidades relativas de fluorescencia obtenida de las muestras.

m_{GSH} = Pendiente obtenida por la regresión lineal de las curvas de GSH

b_{GSH} = Ordenada al origen obtenida por la regresión lineal de las curvas de GSH

$y_{prot. tot.}$ = Absorbancia obtenida de las muestras.

$m_{prot. tot.}$ = Pendiente obtenida por la regresión lineal de las curvas de BSA.

$m_{prot. tot.}$ = Pendiente obtenida por la regresión lineal de las curvas de BSA

$b_{prot. tot.}$ = Ordenada al origen obtenida por la regresión lineal de las curvas de BSA

∴ Una vez obtenido el valor de la concentración de GSH y proteínas totales de los sistemas, estas concentraciones se corrigieron multiplicando por el factor de dilución para llegar a la concentración real de la muestra. Con estos datos se puede determinar la concentración de GSH por cada mg de proteína en tejido.

$$\frac{\text{mmol GSH}}{\text{mg prot en tejido}}$$

8. RESULTADOS

8.1. Caracterización

8.1.1. Tamaño de partícula

Se realizó el análisis de tamaño de partícula, sobre las soluciones finales, las cuales fueron filtradas por membrana de 0.22μ para esterilizar. El análisis se realizó en el equipo Zeta-sizer Nanoseries Malvern.

Tabla 3 Resultados de la caracterización de NP en Zeta-sizer Nanoseries Malvern

Sistema	size (d-nm)	Pdl*	Potencial zeta (mV)
Quitosan	328	0.472	26.2
PECA	298.2	0.639	-4.27
Quit/PECA	24.2	0.436	21.9

*Índice de polidispersidad.

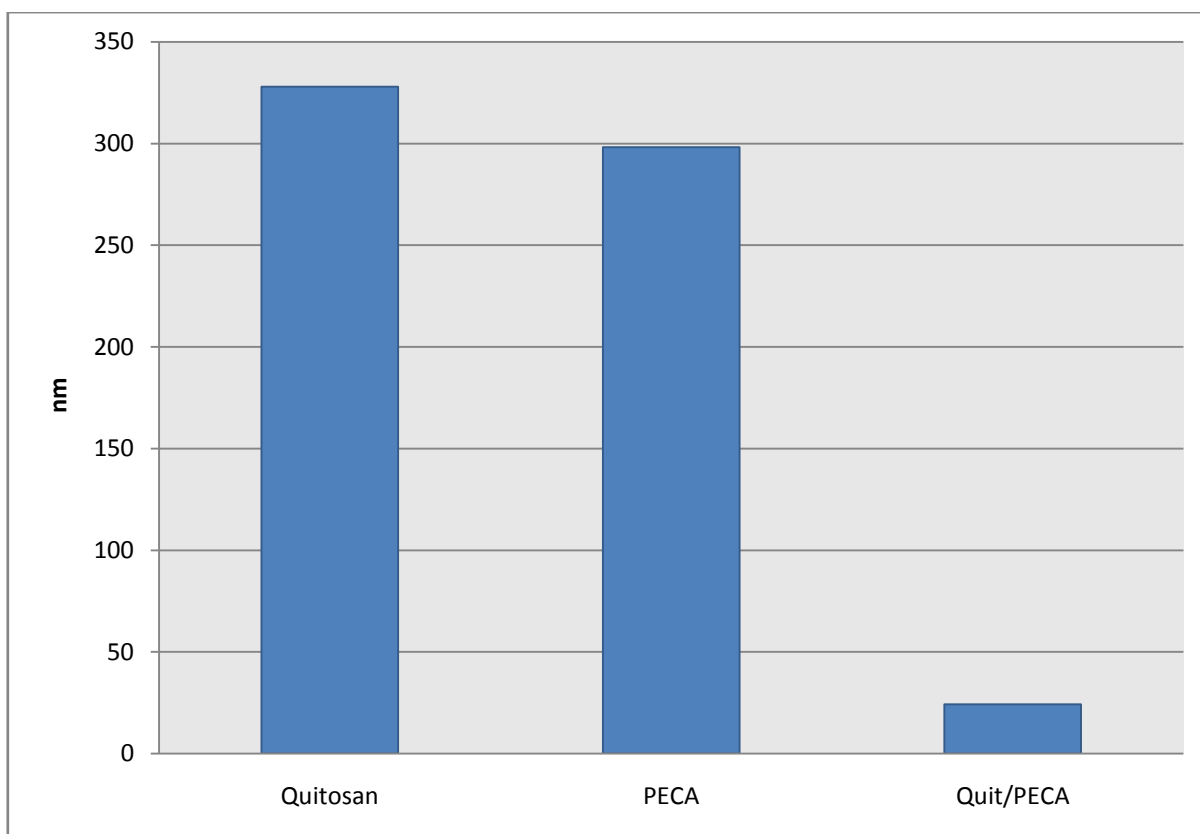


Gráfico 1 Comparación del Diámetro promedio de los sistemas de nanopartículas de Quitosán, PECA y Quitosán/PECA.

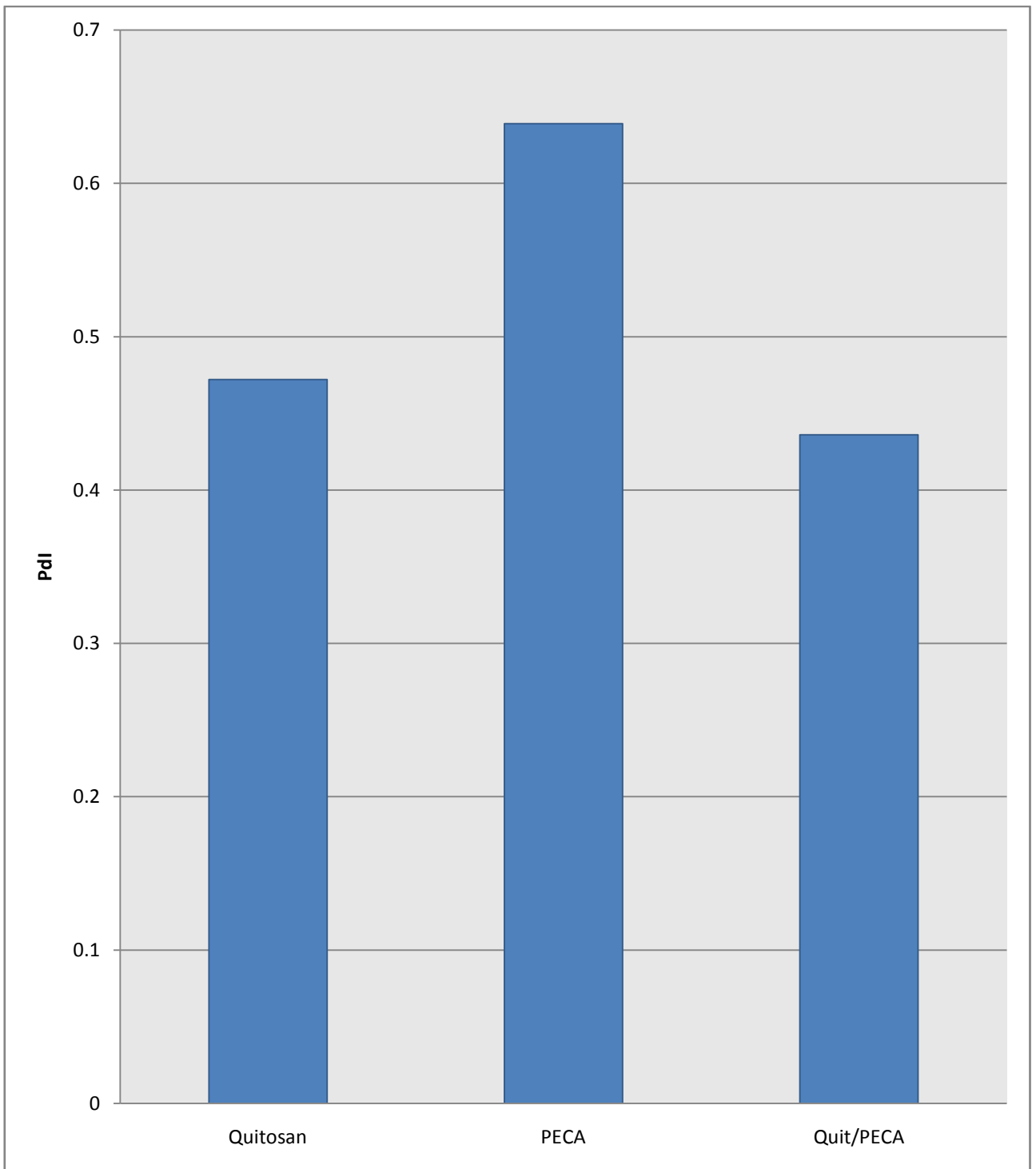


Gráfico 2 Índice de Polidispersidad (PdI) de los sistemas de nanopartículas. Resultados de los sistemas finales.

El **gráfico 2** indica el tipo de dispersión en la población observada en la muestra durante el análisis, teniendo valores de 0 a 1, siendo 0 una población monodispersa o con un tamaño uniforme en toda la muestra y 1 refiere a una población polidispersa o con múltiples tamaños en la muestra.

8.1.2. Potencial Zeta

En la gráfica se presentan los valores de potencial zeta obtenidos en el equipo Zeta sizer Malvern, el análisis se realizó en los sistemas finales, es decir, aquellos que ya estaban filtrados.

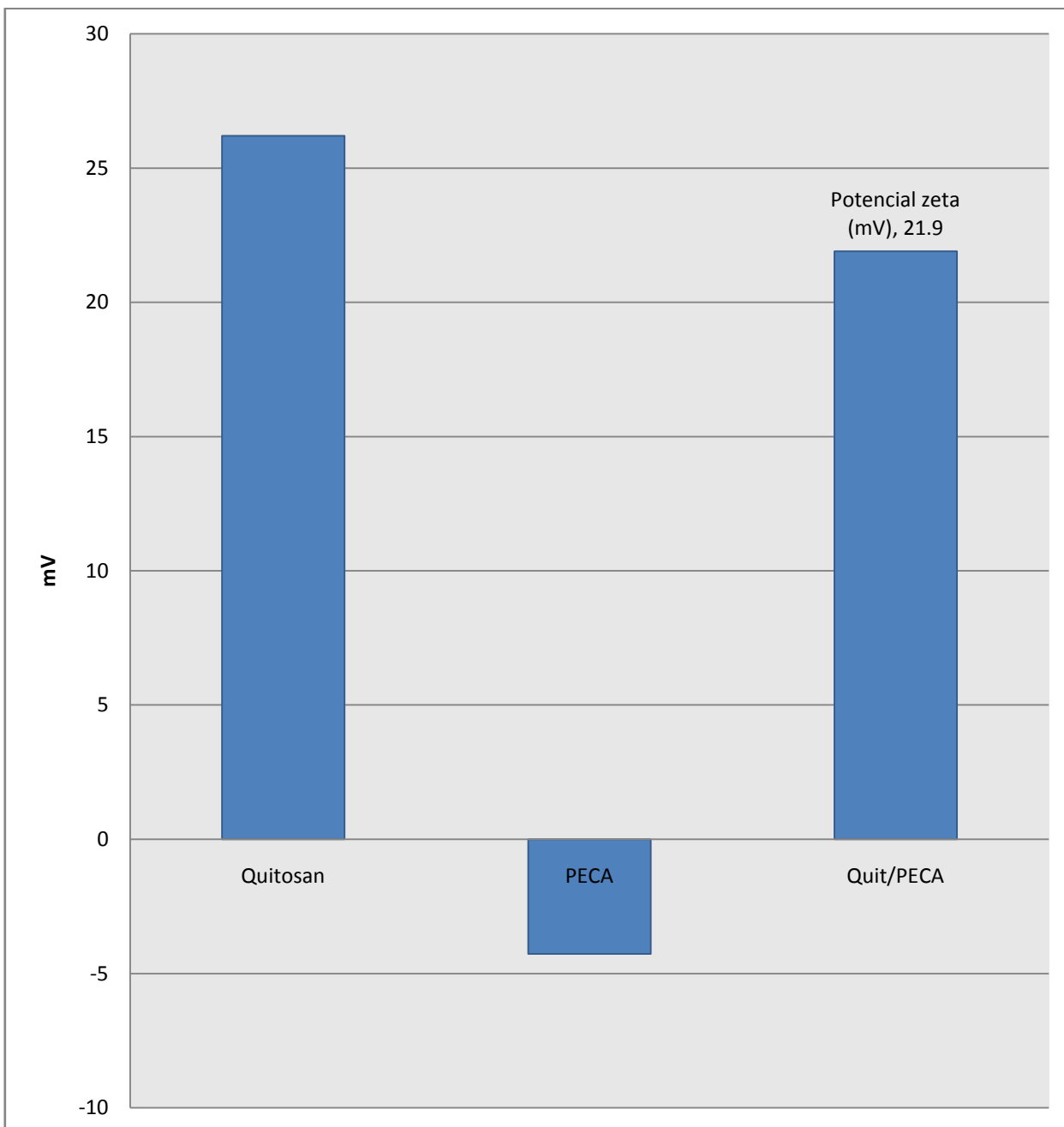


Gráfico 3 Valores de Potencial zeta de los sistemas de nanopartículas.

8.1.3. Microscopia electrónica de barrido (SEM)

A continuación se muestran imágenes obtenidas en microscopio electrónico de barrido (SEM)¹ de los sistemas de nanopartículas fabricados que fueron Quitosán, PECA y Quitosán/PECA. La barra inferior en cada fotografía representa 1 μm .

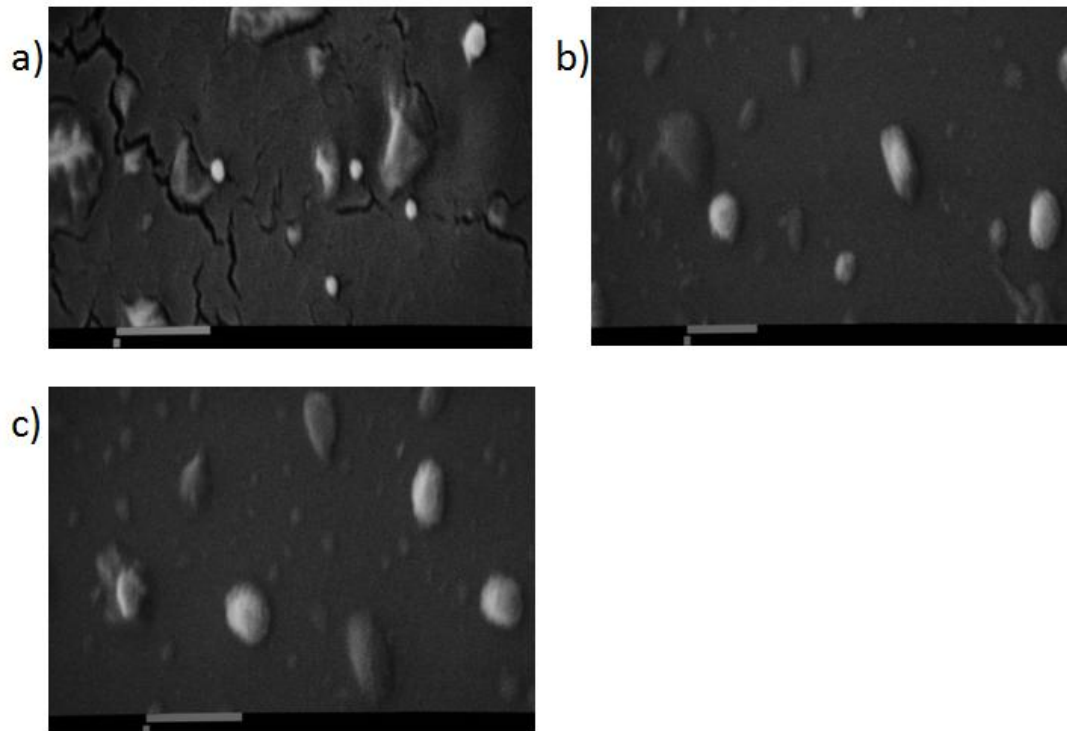
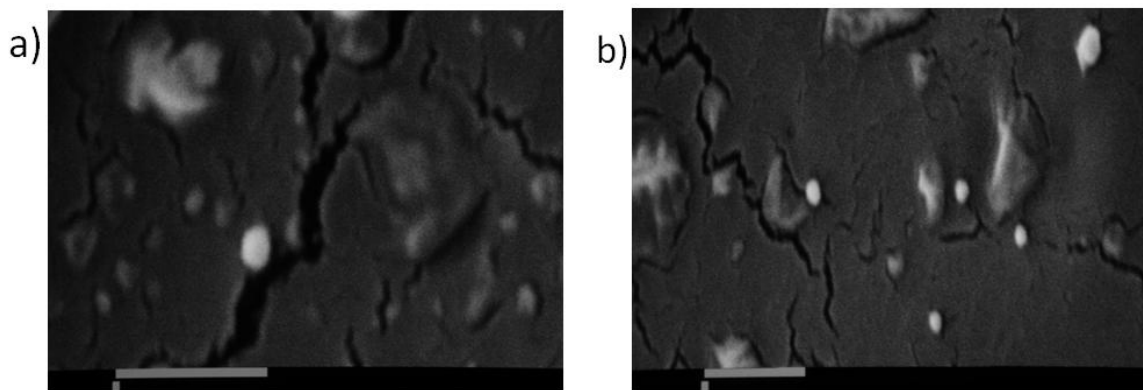


Figura 16 Micrografía de nanopartículas de quitosán a diferentes aumentos: a) 10000X, b) 15000X y c) 20000X.



¹ Imágenes tomadas por el Técnico Rodolfo Robles en Campo 1 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Figura 17 Micrografía de nanopartículas de PECA a) 30000X y b) 20000X

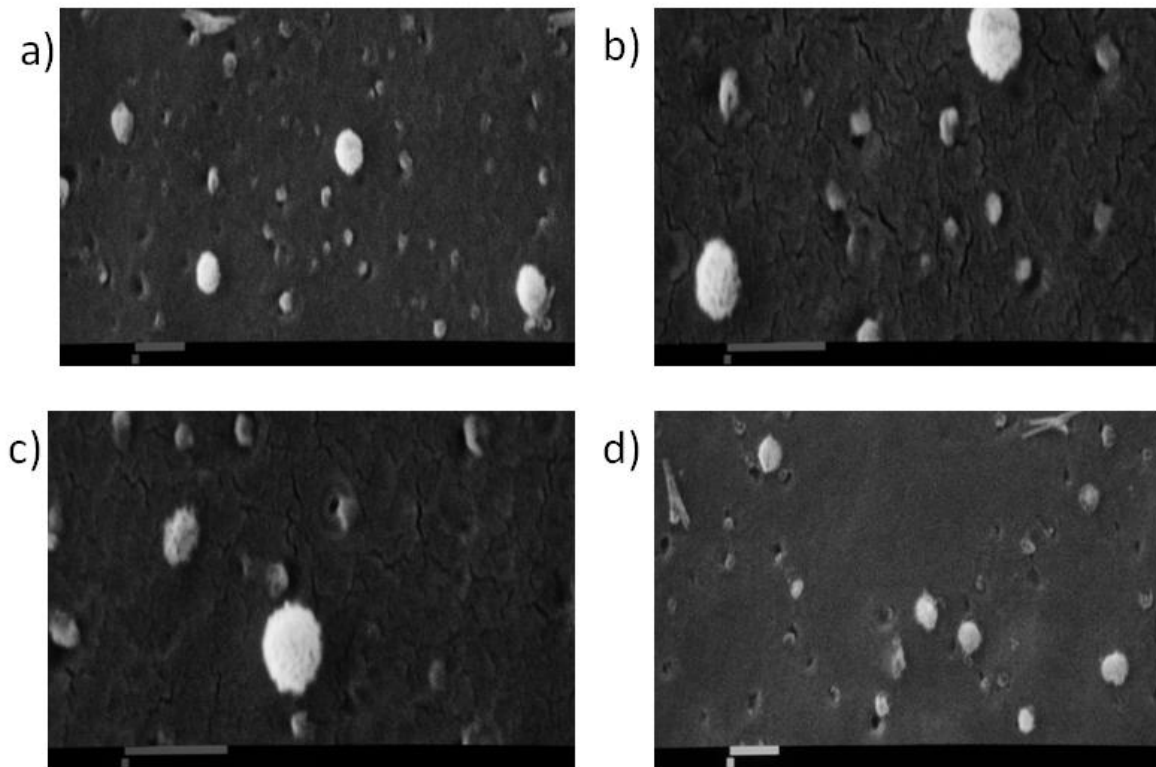


Figura 18 Micrografía de nanopartículas de Quitosán/PECA a) 10000X, b) 20000X, c) 20000X y c) 10000X.

8.1.4. Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

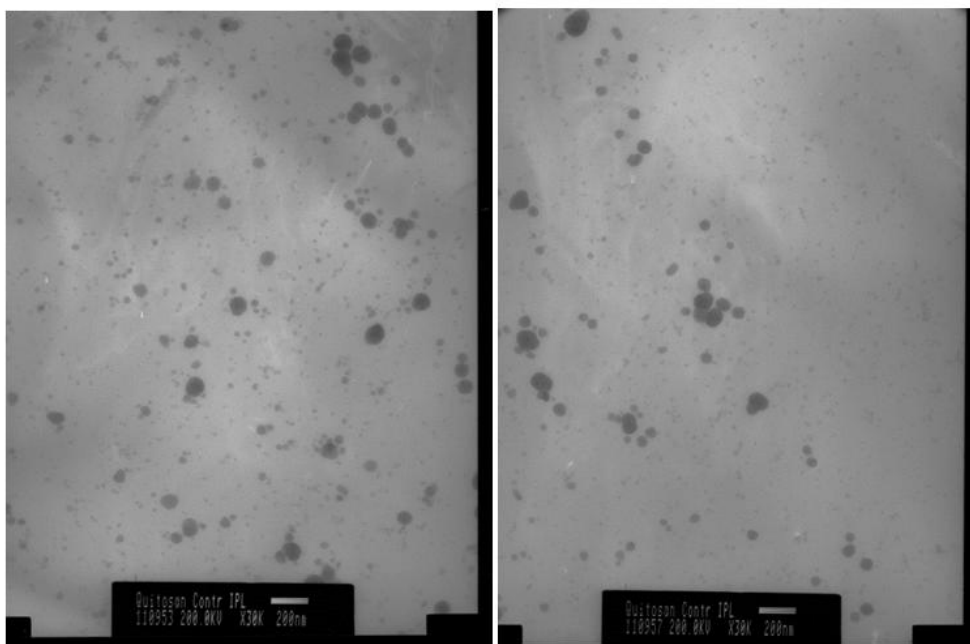


Figura 19 Micrografías obtenidas por TEM de nanopartículas de Quitosán 30000X

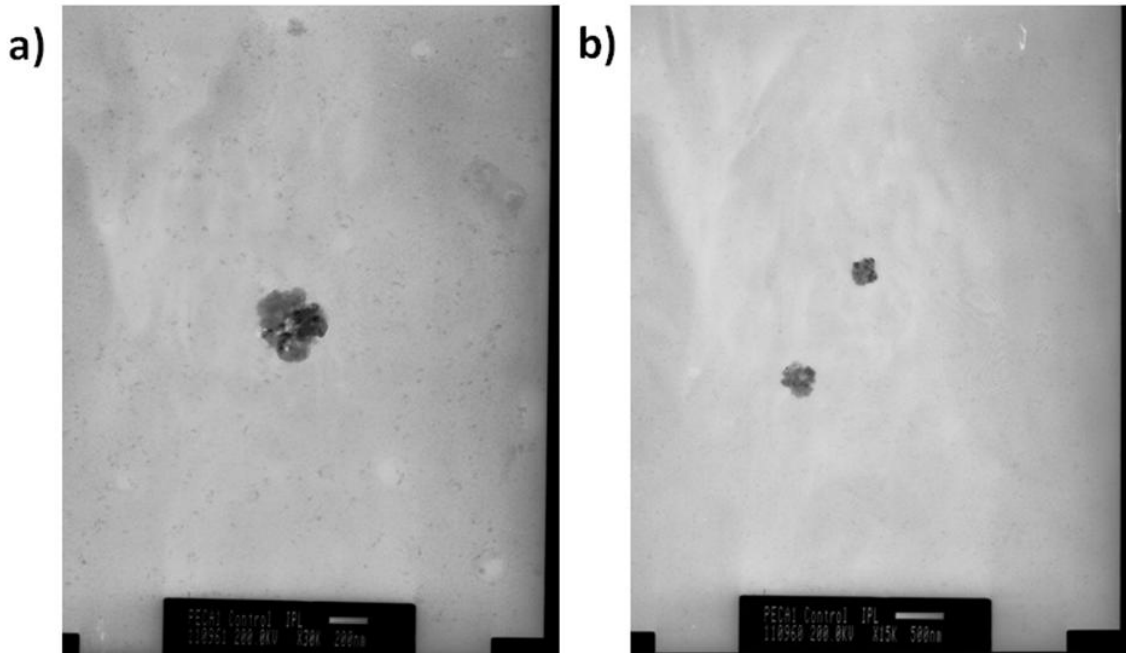


Figura 20 Micrografías obtenidas por TEM de nanopartículas de PECA a) 30000X y b) 15000X

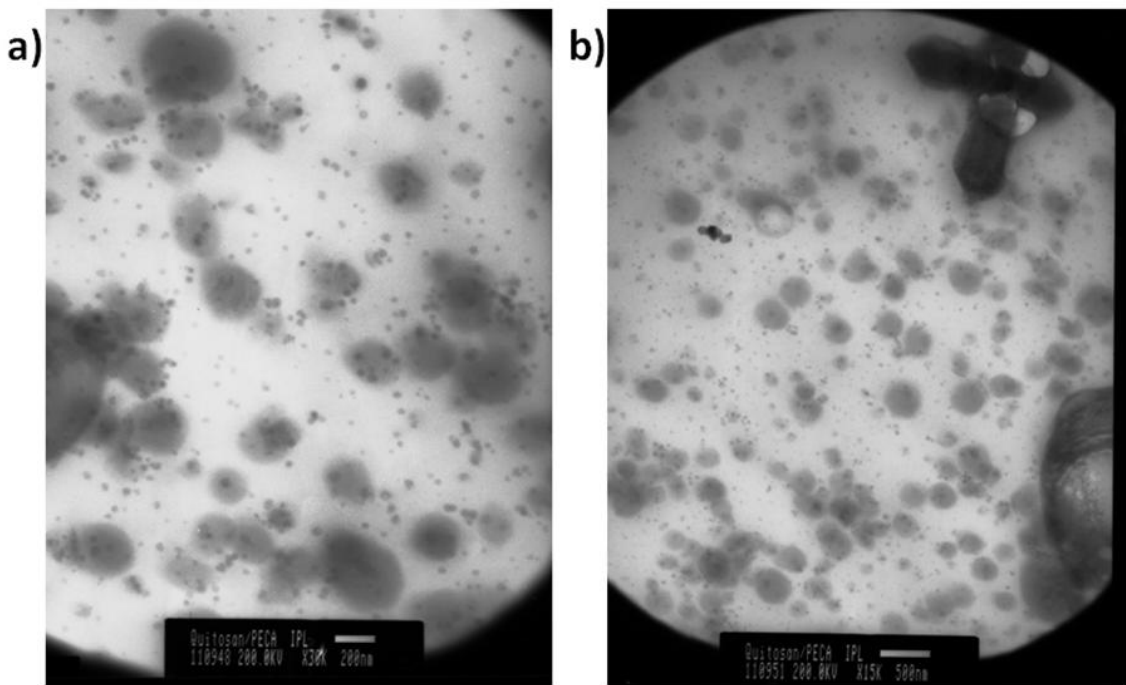


Figura 21 Micrografías obtenidas por TEM de nanopartículas de Qitosán/PECA a) 30000X y b) 15000X

8.1.5. Cantidad de material en suspensión de los sistemas

Para determinar la cantidad de material que es administrado a los animales de laboratorio, se procedió a desecar la muestra y cuantificarla. Debido al proceso realizado no es posible cuantificar solo material nanoparticulado, sino todo el material presente en la suspensión.

Tabla 4 Resultados de cantidad de material en suspensión de los sistemas.

Sistema	(mg/mL)
Quitosán	10.3
PECA	9.8833
Quitosán/PECA	9.3833

A partir de estas suspensiones estandar se realizaron las diluciones administradas, referidas en los métodos. Las dosis administradas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 5 Dosis administradas

sistema	Dosis baja (mg/mL)	Dosis alta (mg/mL)
Quitosán	0.515	5.15
PECA	0.4941	4.9416
Quitosán/PECA	0.4691	4.6916

8.2. EVALUACIONES CITOTOXICOLÓGICAS

Las muestras de cada tejido en estudio fueron analizadas, realizando los ensayos de TBARS y GSH por duplicado. Teniendo cuatro muestras por dosis (4 ratas por dosis) de cada sistema de NP. En las graficas se muestra el promedio de los resultados de TBARS y GSH por tejido en porcentaje referidos al control, así mismo los gráficos muestran las barras de error estándar de la media.

8.2.1. Cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Los siguientes gráficos muestran las comparaciones de los niveles de TBARS en cada órgano por separado (riñón e hígado), estos datos representan los valores obtenidos (nmol TBARS/mg proteína total) de las muestras de ratas expuestas a los sistemas de nanopartículas que fueron administrados en dosis bajas y altas, frente a un control y un blanco.

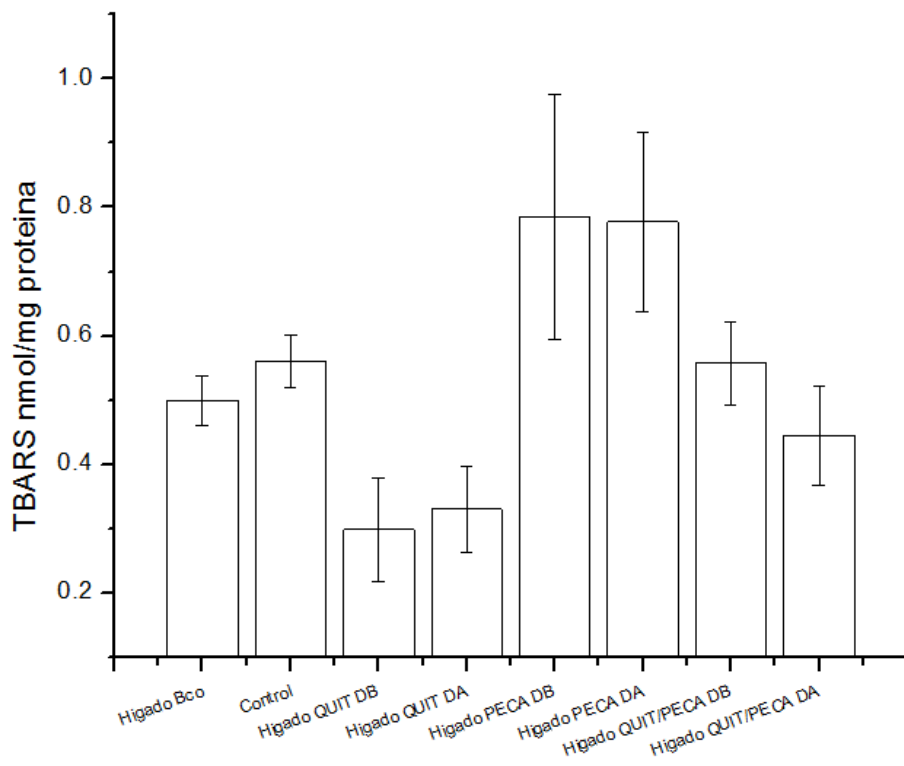


Gráfico 4 Niveles de TBARS en Hígado de ratas expuestas a NP de Quitaoas, PECA y Quitosán/PECA en dosis altas y bajas.

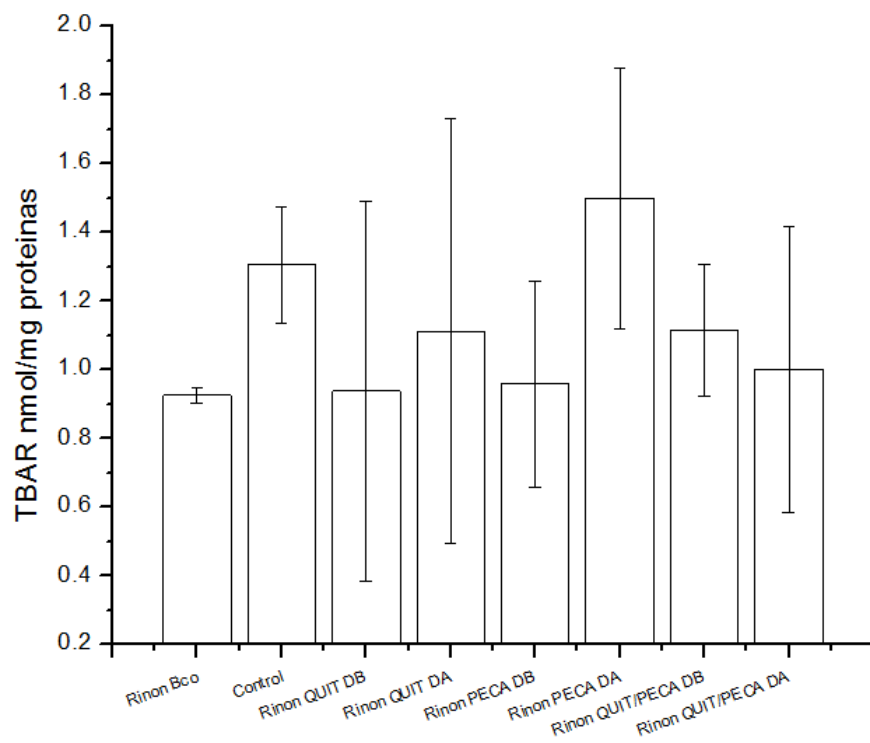


Gráfico 5 Niveles de TBARS en Riñón de ratas expuestas a NP de Quitosán, PECA y Quitosán/PECA a dosis baja y alta.

8.2.2. Cuantificación de Glutación (GSH)

Los siguientes gráficos muestran las comparaciones de los niveles de GSH en cada órgano por separado (plasma, riñón e hígado), estos datos representan los niveles obtenidos de las muestras de ratas expuestas a los sistemas de nanopartículas que fueron administrados en dosis bajas y altas, frente a su control y un blanco.

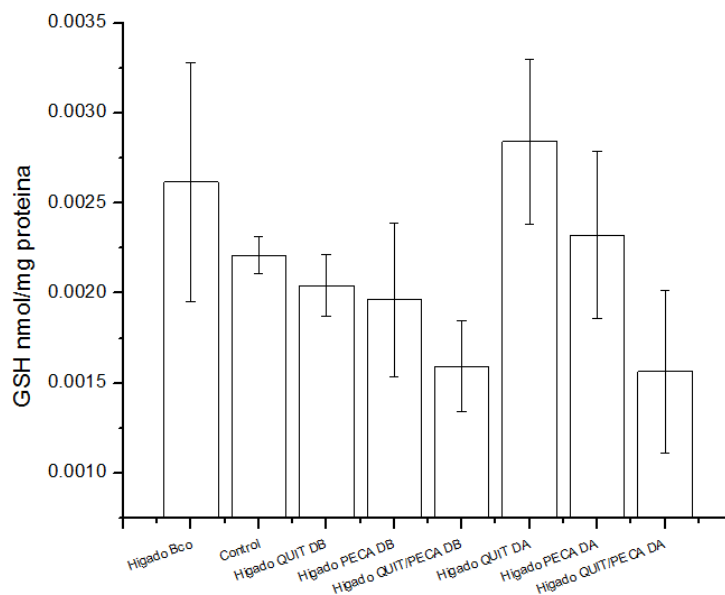


Gráfico 6 Niveles de GSH en Hígado de ratas expuestas a NP de Quitosán, PECA y Quitosán/PECA frente a un control y un blanco.

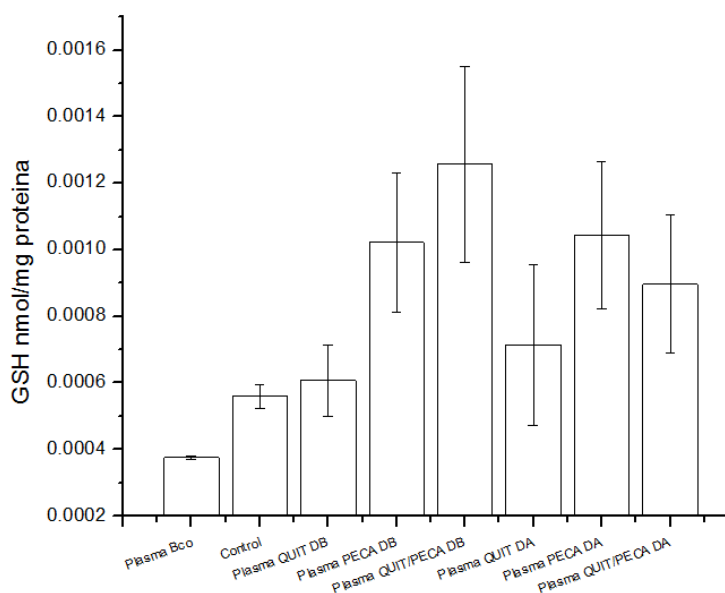


Gráfico 7 Niveles de GSH en Plasma de ratas expuestas a NP de Quitosán, PECA y Quitosán/PECA frente a un control y un blanco.

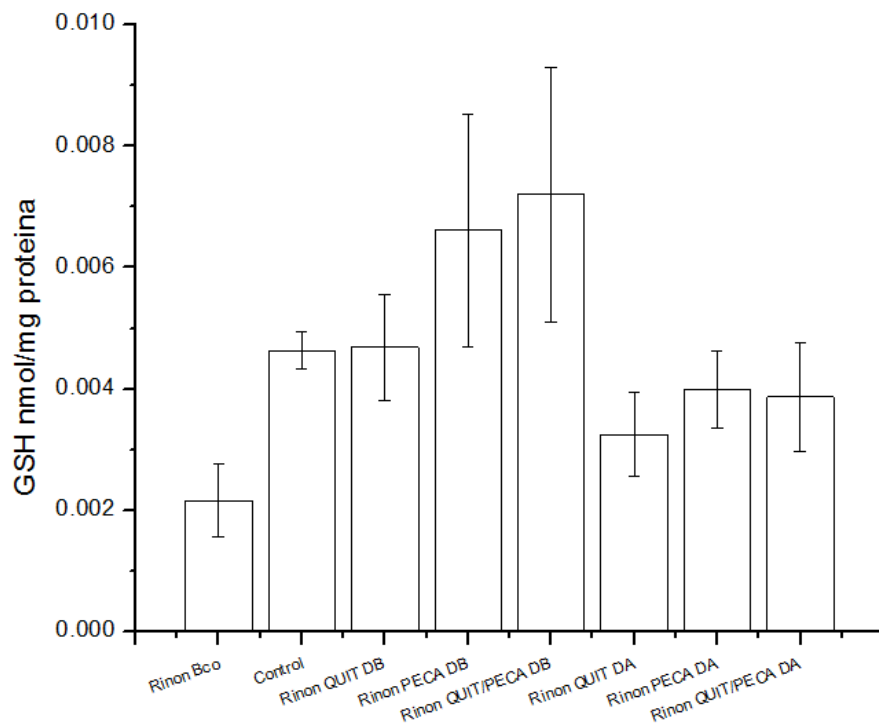


Gráfico 8 Niveles de GSH en Plasma de ratas expuestas a NP de Quitosán, PECA y Quitosán/PECA frente a un control y un blanco.

8.3. Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue elaborado con el programa Origin 8, en el cual se realizaron los análisis de ANOVA y prueba múltiple de rango (Tukey) con un nivel de confianza del 90% para determinar si existe diferencia significativa entre la exposición con diferentes sistemas de NP (Quitosán, PECA y Quitosán/PECA) frente a un blanco y un control que contenía el medio de suspensión de los sistemas. Las pruebas se realizaron haciendo las comparaciones de los niveles de TBARS en cada tipo de órgano expuesto a diferentes NP, además de la comparación del efecto inducido por un solo tipo de NP en cada órgano a diferentes dosis frente a un control y un blanco. Se realizó el mismo análisis para la comparación de la cantidad de GSH en tejido.

Al observar la graficas de los valores de TBARS, observamos que existe una tendencia, en donde los valores de TBARS en hígado de ratas expuestas a los sistemas de PECA tanto en dosis altas como bajas reflejan los valores más altos; a diferencia de los valores encontrados en los tejidos de las ratas expuestas a los sistemas de Quitosán, los cuales reflejan valores más bajos, incluso por debajo del blanco. Esto lo podemos observar en el gráfico 4. Al realizar el análisis estadístico observamos que existe una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de TBARS entre estos dos sistemas (Quitosán y PECA tanto dosis baja como alta), denotando la tendencia antes mencionada en donde estos últimos generan los valores más altos de la estimación.

Al observar el gráfico (5) de los valores de TBARS en Riñón, observamos de nuevo, que el sistema de PECA DA genera los valores más altos, sobresaliendo de los demás sistemas los cuales se mantienen sin tanta diferencia con respecto al control o el blanco. Sin embargo, el análisis estadístico no refleja ninguna diferencia estadísticamente significativa entre estos valores.

En cuanto a los niveles de GSH, reflejados en los **gráficos 6, 7 y 8**, observamos que el sistema de NP de Quitosán/PECA en dosis baja presenta los valores más altos, tanto en riñón como en plasma, seguido de los sistemas elaborados con PECA. Sin embargo, solo los niveles encontrados en las muestras expuestas al sistema Quitosán/PECA en dosis baja (Grafico 6) presentan una diferencia estadísticamente significativa contra el blanco. Por otro lado, en la estimación de GSH en hígado, el sistema de Quitosán en dosis alta fue el que genero un mayor nivel de GSH, siendo el único que se encontró por encima del blanco, sin embargo no se separa mucho del mismo, así mismo, el análisis estadístico no reflejo que existiera alguna diferencia significativa con las demás muestras.

El análisis estadístico completo se puede consultar en el ANEXO I.

9. ANALISIS DE RESULTADOS

9.1. CARACTERIZACION DE NANOPARTICULAS

Se obtuvieron nanopartículas esféricas en un rango de tamaño de 60 hasta 300 nm aproximadamente, estables a pH ácido después de haber sido filtradas por membrana con un tamaño de poro de 0.2 μm para su esterilidad, conservando sus características aún con las modificaciones en diluciones de los sistemas y así poder administrarse en ratas wistar.

Analizando los sistemas por separado obtenemos características fisicoquímicas diferentes entre los sistemas.

En los resultados obtenidos de la caracterización del sistema correspondiente al control de quitosán, podemos observar que se obtuvieron como resultado nanopartículas esféricas con un diámetro promedio de 328 nm. La formación de NP de quitosán-TPP se produjo espontáneamente tras la adición de los iones TPP en la solución de quitosán, el cual es un polianión el cual satura el medio con iones de carga negativa para que éstas sean captadas por las cargas positivas del Quitosán. Los resultados mostraron que la apariencia de la solución cambió cuando una cierta cantidad de iones de TPP se añadió a la solución de quitosán, pasó de una solución clara a una opalescente que indica un cambio de los estados físicos del quitosán para formar nanopartículas, posteriormente micropartículas y eventualmente agregados (Haliza Katas, 2006). El filtrado se utilizó para controlar el tamaño de partícula y eliminar agregados y partículas de mayor tamaño, además de obtener una suspensión estéril para poder ser administrada a los animales de laboratorio para el estudio *in vivo*.

Una vez filtrada la solución se obtuvo un tamaño de partícula que permite tener una suspensión translúcida, y clara, ya que las NP resultantes tuvieron un diámetro menor a la longitud de onda visible, por lo que la luz no se dispersa al atravesar la suspensión.

En las micrografías obtenidas por SEM (figura 19) pueden apreciarse NP esféricas, con una superficie irregular, característica que diferencia estas de las obtenidas en el sistema de PECA. En cuanto al Potencial zeta, este fue de 26.2 mV. Basándonos en el modelo de doble capa, la carga neta positiva de las partículas era deseable para evitar la agregación de las mismas y promover la interacción electrostática con la carga global negativa de la membrana celular. Además, la distribución de las NP en el cuerpo después de la administración está muy influenciada por su interacción con el entorno biológico, que también depende de sus propiedades físico-químicas, como carga de la superficie de las nanopartículas (Haliza Katas, 2006).

En cuanto al sistema correspondiente al control de PECA, observamos en los resultados que se obtuvieron NP esféricas con un diámetro promedio de 298.2 nm (ver tabla 4). En este caso la formación de NP se da por un proceso de emulsión/polimerización, en donde el monómero se emulsiona en fase acuosa. El proceso de polimerización, como se había mencionado, es de tipo aniónico, en donde la reacción entre los monómeros, al ser muy reactivos, se puede iniciar simplemente con los iones OH^- de la disociación del agua, sin embargo, el factor más importante y que genera que la reacción sea muy rápida es la presencia de iones CH_3COO^- los cuales provienen de la solución de ácido acético, el cual se utilizó como medio para la preparación de dichos sistemas. La propagación se produce tras la formación de carbaniones capaces de reaccionar con otra molécula de monómero (Arias J. L., 2003). De esta manera se forman cadenas poliméricas vivas en una reacción rápida. Gracias a esta rápida polimerización se pueden obtener NP de bajo peso molecular y un tamaño pequeño de partícula. En las micrografías obtenidas por SEM (figura 20) se pueden observar partículas esféricas, en un rango aproximado de 200 nm.

En los valores de potencial zeta obtenidos, observamos un potencial de -4.27mV, el cual denota una carga negativa sobre la superficie de la partícula, sin embargo, este no es suficiente para mantener una suspensión estable, ya que el umbral de precipitación se encuentra entre -15 a -10 mV, por lo tanto potenciales tan pequeños permiten aglomeración y precipitación de las NP (Riddick, 1968). Este hecho explica el grado de dispersión en cuanto al tamaño de partícula, ya que estas pueden estar aglomerando en la suspensión, formando partículas más grandes y generando las lecturas mayores a los 200 nm.

Al analizar el sistema de NP de quitosán/PECA se observa que se obtuvieron nanopartículas de un tamaño promedio de 24.2 nm, sin embargo se obtuvieron 3 picos en la lectura del Zeta-sizer (ver anexo I), lo cual puede ser a que existe material sin polimerizar en la muestra, lo que genera estas lecturas.

La formación de estas NP se debe gracias a que ambas técnicas de preparación requieren de la saturación de iones negativos en el medio para su formación. Partiendo de esto pudimos mezclar las dos técnicas de preparación para la formación de las NP con los dos polímeros utilizados, obteniendo sistemas nanoparticulados con los dos componentes, lo cual se puede apreciar en las micrografías obtenidas por SEM (figura 21) en las cuales se observan partículas del orden de nanómetros. Para la formación de las NP se utilizó la solución de quitosán en ácido acético como

fase continua, y a continuación se agregó la solución de TPP e inmediatamente el monero de PECA, ya que la reacción de polimerización y gelación iónica suceden espontáneamente tan solo por los aniones en el medio, aunado a esto el sistema se encontraba en agitación. Estas condiciones permitieron la polimerización y gelación iónica simultáneas para conformar una NP con los dos componentes. Cabe mencionar que la superficie de las partículas presenta una morfología peculiar, en relación con los sistemas de quitosán y PECA por separado, en donde la superficie parece ser muy irregular, lo cual es bueno, ya que el área de superficie es mayor que si fueran lisas y con esto se pueden cargar las nanopartículas con una mayor cantidad de fármaco adhiriéndolo a la superficie.

En cuanto al potencial zeta obtenido, como podemos observar en la tabla 4, este fue de 21.9 mV, el cual resulta adecuado para mantener una suspensión estable, ya que las partículas se repelen entre sí y se evita la aglomeración y la consecuente precipitación. La disminución de potencial zeta en este último sistema se le atribuye a la combinación con el polímero PECA que tiene un potencial negativo.

9.2.EVALUACIÓN CITOTOXICOLÓGICA

Al analizar los **gráficos 4 y 5** que reflejan los datos obtenidos del ensayo de TBARS sobre hígado y riñón de ratas expuestas a las NP fabricadas, observamos que en estos dos tejidos, los valores obtenidos de las muestras expuestas a NP de PECA presentan los valores más altos, presentando solo en hígado una diferencia estadísticamente significativa entre los lotes expuestos a NP de Quitosán y PECA (tanto en dosis alta como en dosis baja). Aunque solo en hígado el análisis estadístico arroja una diferencia significativa, observamos que esta tendencia se observa en de igual forma en riñón, en donde los niveles de TBARS para tejidos tratados con nanopartículas de PECA son los más altos.

Estos niveles de TBARS sobre el blanco los atribuimos a la interacción de las nanopartículas con las células, ya que la interacción de ciertos compuestos con las células pueden generar estrés oxidativo, en este caso los sistemas nanoparticulados, modificando o interfiriendo en los procesos de respiración mitocondrial, isquemia/perfusión e inflamación, así como en el metabolismo de otros compuestos, generando especies oxidantes denominadas especies reactivas al oxígeno (ROS) (Manahan, 2002). En este ensayo se observó que las nanopartículas de PECA indujeron cierta citotoxicidad sobre los tejidos expuestos, este daño podría estar relacionado con la liberación de productos de degradación de las nanopartículas, aunado a que las nanopartículas se pueden adherir a la membrana celular lo que conduce a una liberación *in situ* de los productos de degradación. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para determinar con precisión los mecanismos de este efecto. Hay que remarcar que se ha observado que estos efectos son claramente reversibles después de interrumpir el tratamiento con nanopartículas biodegradables de PECA (Rocio Fernandez-Urrusuno, 1995), por lo que este vehículo sigue siendo un candidato para su uso clínico.

Otra técnica utilizada para cuantificar la citotoxicidad fue la cuantificación de glutatión (GSH). Los niveles de GSH en los tejidos nos ayudan a vislumbrar si existe un efecto citotóxico ya que se sabe que los oxidantes causan la inducción en la biosíntesis de GSH, por otra parte una gran cantidad de agentes xenobióticos forman conjugados con GSH, lo que incrementa la transcripción de genes γ -glutamylcisteina sintetasa. Además entre los compuestos que aumentan la velocidad y cantidad de

síntesis de GSH se encuentran las especies reactivas al oxígeno (ROS) y al nitrógeno (Reed, 2008). Debido a esto, la cuantificación de glutatión nos denota si existe un grado de toxicidad celular, así como la cantidad del daño.

En las gráficas 6, 7 y 8 se observan los resultados en la cuantificación de Glutatión. En donde los niveles encontrados en plasma de ratas expuestas a nanopartículas de Quitosán/PECA en dosis baja presenta los niveles más altos, aunque este solo presenta diferencias significativas contra el blanco, se aprecia que tanto los sistemas como el control generan un efecto citotóxico evidente en plasma, el cual podríamos atribuirle al medio, el cual contiene ácido acético.

En riñón los niveles más altos de GSH se encontraron para los sistemas PECA en dosis alta y Quitosán/PECA en dosis baja, aunque el análisis estadístico no arroja una diferencia significativa, podemos notar esta tendencia vista anteriormente en el ensayo de TBARS, lo cual se explica de igual forma por los productos de degradación del polímero PECA.

Por último en la gráfica 8 observamos los niveles de GSH encontrados en hígado, en donde el sistema de Quitosán en dosis alta es el que presenta el mayor nivel sin denotar una diferencia estadísticamente significativa contra el blanco o los demás lotes de ratas. Este nivel de toxicidad se puede deber a que entre los posibles sitios de degradación del polímero se encuentran el hígado y el riñón, esto se deduce ya que en algunos estudios se ha localizado quitosán en estos órganos (T. Kean, 2010). Después de la deposición las nanopartículas de Quitosán se degradan dentro del tejido o células diana y son eliminadas en consecuencia, estos productos de degradación son los posibles causantes del efecto observado en el tejido, sin embargo, hay que tomar en cuenta que el mecanismo de degradación del quitosán (y sus derivados) no se entiende completamente cuando se usa *in vivo*, y que puede haber mecanismos de adaptación que aumentan su degradación en el tiempo (T. Kean, 2010), por lo que se necesitan otros estudios para poder entender este proceso que conlleva a un efecto citotóxico.

10.CONCLUSIONES

Se modificó e implementó un método de elaboración de sistemas nanoparticulados a base de Quitosán y polietilenoacrilato (PECA).

Se evaluó la capacidad citotóxica a través de la estimación de GSH y TBARS en muestras de tejido expuestas a los sistemas nanoparticulados que fueron fabricados a base de Quitosán y Polietilenoacrilato (PECA).

Se caracterizaron los sistemas fabricados, determinando: potencial zeta, tamaño de partícula, SEM, TEM, para determinar su morfología y propiedades fisicoquímicas. Encontrando nanopartículas esféricas con un rango de 278 a 328nm de diámetro.

Se evaluó la capacidad citotóxica de los sistemas descritos mediante el ensayo de TBARS y GSH en donde se encontró que en estas pruebas el sistema combinado (quitosán/PECA) en dosis alta no presenta efecto citotóxico.

11. Bibliografía

- Allemann E, G. R. (1993). Drug loaded nanoparticles preparation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* , 91-173.
- Allemann E, G. R. (1992). Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *International Journal of Pharmaceutics* , 247–253.
- Aluja, A. S. (2002). Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gaceta Médica de México* , 295-298.
- Arenciba, D. (Habana Cuba, 2003). Principales Ensayos para determinar la Citotoxicidad de una Sustancia, Algunas Consideraciones y su Utilidad. *Revista Toxicológica en Línea SERTOX* , 41-52.
- Arias, J. L. (2003). *Evaluación de Nanopartículas de Poli (Etli-2-Cianoacrilato) con Núcleo Magnético como Sistemas de Liberación Controlada del Antineoplásico 5 Fluorouracilo*. Universidad de Granada: Tesis Doctoral.
- AVMA, A. V. (june 2007). AVMA Guidelines on Euthanasia. 1-39.
- Balbus, J., Maynard, A., Colvin, V., Castranova, V., Daston, G., Denison, R., y otros. (2007). Meeting Report: Hazard Assessment for Nanoparticles—Report from an Interdisciplinary Workshop. *Environmental Health Perspectives* , 1654-1659.
- Bandi Ramesh, N. G. (may 2011). Nano Particulate Drug-Delivery Systems: An overview. *Journal of Pharmacy Research* , 1688-1690.
- Bernard A, L. (1986). Present status and trends in biological monitoring of. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* , 559.
- Bindschaedler C, G. R. (1990). *Patente nº 4,968,350*. US patent.
- Bozzola, J. J. (2001). *Electron Microscopy*. Southern Illinois University, Carbondale, Illinois, USA: eLS.
- Brenda Gasca. (2012). *Evaluación de la Capacidad Citotóxica de Sistemas Nanoparticulados de Quitosán y PECA*. Mexico: Tesis de licenciatura para obtener el título de Q.F.B.
- Cédric Chauvierre, D. L. (2003). Novel Polysaccharide-Decorated Poly(Isobutyl Cyanoacrylate) Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* , 1776-1793.
- Chan, H. C. (2007). Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Current Opinion in Biotechnology* , 565-571.

Chávez, M. (2002). Estudio de la Liberación de Sustancias Lipofílicas en Sistemas Nanoparticulados. *TESIS* . QFB, FES Cuautitlán. UNAM.

CICUAE. (s.f.). Reglamento intero para el cuidado y uso de los animales de experimentación en investigación y docencia en la facultad de estudio superiores cuautitlan UNAM. FESC. UNAM. SECRETARÍA GENERAL.

Couvreur P, D. C. (1995). Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. *The European Journal of Pharmaceutical and biopharmaceutics* , 2-13.

Creative Commons Attribution-ShareAlike License. (s.f.). *The Medical News*. Recuperado el 01 de 02 de 2011, de <http://www.news-medical.net/health/Nanoparticles-What-are-Nanoparticles-%28Spanish%29.aspx>

De la Cruz Medina, M. (2010). Preparación, caracterización y uso de nanopartículas farmacéuticas. Investigación Bibliográfica. *tesis de Licenciatura para obtener el título de QFB* . Tesis: FES Cuautitlán. UNAM.

De la Cruz Medina, M. (2010). Preparación, Caracterización y uso de nanopartículas farmacéuticas: Investigación bibliográfica. *Tesis de licenciatura para obtener el título de QFB* .

Díaz Torres, R. (2007). Producción y estudio de nanopartículas de etilcianoacrilato: su transporte a través de la piel. *Tesis doctoral* .

Donaldson, K., Stone, V., Clouter, A., Renwick, L., & Macnee, W. (2001). Ultrafine Particles. *OCCUP ENVIRON MED* 58 , 211-216.

Eisenbrand, G., Pool-Zobel, B., Baker, V., Balls, M., Blaauboer, B., Boobis, A., y otros. (2002). Methods of in Vitro Toxicology. *Food and Chemical Toxicology* , 193-236.

Ela Céspedes Miranda, J. C. (2008). La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso. *Revista Cubana de Investigación Biomédica* , 1-13.

Estepa, V., Ródenas, S., & M.C., M. (2001). Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal. Real Academia de Farmacia* , 17.

Fattal, E., & Vauthier, C. (2002). Nanoparticles as Drug Delivery Systems. En J. Swarbrick, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (págs. 1864-1877). New York: Marcel Decker.

Federica Lince, D. L. (2008). Strategies to control the particle size distribution of poly-ε-caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *Journal of Colloid and Interface Science* , 505–515.

Feynman, R. P. (1992). There's plenty of room at the bottom. *Journal of Microelectromechanical Systems* , 60-66.

Fischer HC, C. W. (2007). Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. *Curr Opin Biotechnol* , 565-571.

Gil Hernández, F. (2000). El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. *Departamento de Medicina Legal y Toxicología, Facultad de Medicina de la Universidad de Granada* , 26.

Gimenez, I. F., Almeida, L. E., & Barreto, L. S. (2007). PHarmaceutical Developments Based on Cytotoxicity of Nanoparticles: Supramolecular, Strategies and Study of Biological Interactions. En Y. Zhao, & H. Singh Nalwa, *Nanotoxicology. Interactions of Nanomaterials with Biological Systems* (pág. 295). USA: American Scientific Publishers.

Goycoolea, F. M., Remuñan-López, C., & Alonso, M. J. (2007). Nanoparticulas a base de polisacarido: Quitosano. 103-106.

Gutierrez-Praena, D., Jos, A., Pichardo, S., Puerto, M., Sanchez-Granados, E., Grilo, A., y otros. (2009). Nuevos riesgos tóxicos por exposicion a nanopartículas. *Revista de Toxicología Vol. 26 Asociación Española de Toxicología* , 87-92.

H. Fessi, F. P. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* , R1–R4.

Haliza Katas, H. O. (2006). Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery. *Journal of Controlled Release* , 216–225.

Hammond, J. (1988). The Bradford for Protein Quantitation. En W. J. M., *Methods in Molecular Biology Vol. 3* (págs. 25-31). Clifton, New Jersey: Human Press.

Henry Jay Forman, H. Z. (2009). Glutathione: Overview of its protective roles, measurement,. *Molecular Aspects of Medicine* , 1-12.

Heuts, H. P., & Muñoz-Bonilla, A. (2010). Diseño macromolecular por transferencia de cadena. *Anales de la Real Sociedad Española de Química* , 30-36.

Hillegass, J., Shukla, A., Lathrop, S., MacPherson, M., Fukagawa, N., & Mossman, B. (2010). Assessing nanotoxicity in cells in vitro. *NIH Public Access* , 219–231.

Hirano, S. (2009). A current overview of health effect research on nanoparticles. *Environ Health Prev Med* , 223-225.

J. Prasad Rao, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science* , 887–913.

J. Prasad Raoa, K. E. (2011). Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control. *Progress in Polymer Science* , 887–913.

Jedd M. Hillegass, A. S. (2010). Assessing nanotoxicity in cells in vitro. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* , 219–231.

- Kelty, C. (2006). *The Ethics and Politics of Nanotechnology*. Francia: UNESCO.
- Klaine, S. K., Alvarez, P., Batley, G., Fernandez, T. F., Handy, R., Lyon, D., y otros. (2008). Nanomaterials in the Environment: Behavior, Fate, Bioavailability and effects. *Environ Toxicol Chem* 27 (9) , 1825-1851.
- Kumares S. Soppimatha, T. M. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* , 1-20.
- Leroueil-Le, M. V. (1998). Preparation and characterization of nanoparticles containing and antihypertensive agent. *European Journal Pharm. Biopharm* (46), 137-145.
- Leroux, J.-C. (1996). Biodegradable nanoparticles from sustainer release formulations to improved site specific drug delivery. *Journal of Controlled Release* (39), 339-350.
- Leslie-Pelecky, D. L. (2007). Nanotoxicology. En L. V., *Biomedical Applications of Nanotechnology* (págs. 227-241). New Jersey: John Wiley & Son, Inc., Publication.
- López, J. A. (2007). Pautas básicas para el manejo de animales de experimentación en investigación biomédica. *Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Cauca*.
- Lynne Bennington, J. (2000). *Diccionario Enciclopedico del Laboratorio Clínico*. España: Panamericana.
- M. Frias, M. P. (1988). Diffraction spectrometry by laser beams. *Materiales de construcción* , 37-52.
- Mäki-Paakkanen. (1998). Association Between the Clastogenic effect in Peripheral Lymphocytes and Human exposure To Arsenic Through Grinkin Water. *Environmental And Molecular Mutagenesis* , 32:301-313.
- Manahan, S. E. (2002). *Toxicological chemistry and biochemistry*. US: LEWIS PUBLISHERS.
- Manoj Singh, S. M. (2010). Nanoparticles: A New Technology with Wide Applications. *Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology* , 10.
- Manuel L., J. (2008). Nanopartículas Poliméricas Sólidas. *Farmacotecnia. Nuestra Farmacia* , 40-47.
- Martínez Pérez, A. (2010). Sistemas Nanoparticulados de Aplicaciones Farmacéuticas (Revisión Bibliográfica). Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México: Tesis de Licenciatura para obtener el título de QFB. FES Cuautitlan.
- Medicina, A. N. (1999). *Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio*. Recuperado el 15 de 1 de 2012, de <http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/noawicpubs/careuse.htm#chap2>
- Mohanraj and Y Chen. (2006). Nanoparticles – A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* , 561-573.

- Mohanraj, V. J., & Y Chen. (June 2006), Nanoparticles- A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* , 561-573.
- Montoya. A. (Mayo de 2008). Efecto de Aheidos alifáticos Productos de Lipoperoxidacion, sobre la Estructura Química y Función de la Insulina. México, D.F.
- Montuenga, L., Esteban, F., & Calvo, A. (2009). *Técnicas en Histología y Biología Celular*. España: Elsevier.
- Paul J. Hissin, R. H. (1976). A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Analytical Biochemistry* , 214-226.
- Pinto, C., & Ronald, J. (December de 2005). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoprticles. Coimbra, Portugal: Laboratorio Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia. Universidad de Coimbra.
- Ramos D, G. M. (2007). Microesferas biodegradables de liberación controlada para la administración parenteral. *Revista Cubana de Farmacia* , 1-34.
- Reed, D. J. (2008). Glutathione-dependent Mechanisms in Chemically Induced Cell Injury and Cellular Protection Mechanisms. En E. H. Robert C. Smart, *Molecular and Biochemical Toxicology* (págs. 333-410). John Wiley & Sons, Inc.
- Riddick, T. (1968). *Control of colloid stability through Zeta-Potential*. Livingston Publishing Co.
- RIKI, K. J. (1997). Natural and Modified Poliaccharides. En A. J. Domb, J. Kost, & D. M. Wiseman, *Handbook of biodegradable polymers*. Amsterdam: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Rocha Formiga, F. (2009). *Monografías De La Real Academia Nacional De Farmacia*. Recuperado el 15 de mayo de 2012, de Nanosistemas a base de poliésteres:
<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/989/1023>
- Rocio Fernandez-Urrusuno, E. F. (1995). Evaluation of liver Toxicological Effects Induced by Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* , 272-279.
- Rodriguez-Arnaiz, R. (2005). *Manual de Prácticas de Genética y Cuaderno de trabajo*. México: UNAM Facultad de Ciencias.
- Rojas Wastavino, G. E. (1994). Ensayo de la proliferación celular en cultivo de linfocitos de cerdo. *Revista mexicana de patología clínica* , 60-64.
- S.C. Yang, H. G. (2000). Formation of positively charged poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles stabilized with chitosan. *Colloid & Polymer Science* , 285-292.
- Salamanca Gómez, F. (1988). Metodologías Citogenéticas y sus Fundamentos. En F. Salamanca Gómez, *Citogenética Humana. Fundamentos y Aplicaciones Clínicas* . Panamericana.

- Sandoval, L., Montellano, L., & Piña, M. (2005). Potencial Zeta como una Herramienta para Determinar la Aglomeración de las Partículas en la Reducción del volumen del Lodo a Disponer. Juitepec, Morelos: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Segretín, M. E. (s.f.). Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). *INGEBI-CONICET Dpto. FBMyC, FCEyN-UBA* , 6.
- Sishmitha, S., Joydip, K., & Subhas, C. K. (2010). Biopolymeric Nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials* , 13pp.
- Stuart C Thickett, R. G. (2007). Emulsion polymerization: State of the art in kinetics and mechanisms. *Polymer* , 6965-6991.
- Sushmitha Sundar, J. K. (2010). Biopolymeric nanoparticles. *Science and technology of advanced materials* , 13.
- T. Kean, M. T. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews* , 3-11.
- Thassu, D., Deleers, M., & Pathak, Y. (2007). Nanoparticulate Drug-Delivery Systems: An Overview. En D. Thassu, M. Deleers, & Y. Pathak, *Nanoparticulate Drug Delivery Systems* (pág. 382). New York: Informa Healthcare USA, Inc.
- Timothy M. Potter, B. W. (2011). Assay to Detect Lipid Peroxidation upon Exposure to Nanoparticles. En *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery, Methods in Molecular Biology* (págs. 181-189). Scott E. McNeil.
- Ugartondo Casadevall, V. (2009). Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. *Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona* .
- UNAM, D. (2009). *Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación CICUAE FESC*. Recuperado el 9 de enero de 2012, de <http://www.cuautitlan.unam.mx/sitios/cicuae/index.html>
- Vanda-Canton, B. (2003). La experimentación biomédica en animales en los códigos bioéticos. *humanidades y ciencia* , 69-73.
- Wallace Hayes A. (2007). *Principles and Methods of Toxicology*. US: CRC Press.
- Williams III, R. O., & Vaughn, J. M. (2007). Nanoparticle Engineering. En S. James, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (pág. 4372). Pinehurst, North Carolina, USA.: PharmaceTech, Inc.
- Yuliang Zhao, H. S. (2007). *Nanotoxicology: Interactions of materials with biological Systems*. California, USA: American Scientific Publishers.

Zeta-MeterInc. (2010). *Potencial Zeta. Un curso completo en 5 minutos*. Recuperado el 16 de diciembre de 2011, de http://depa.pquim.unam.mx/amyd/archivero/PotencialZetaDLVO_3882.pdf

ANEXO I. ANALISIS ESTADÍSTICO

1. ANALISIS PARA DATOS EXPERIMENTALES DE CUANTIFICACION DE TBARS

ANÁLISIS DE ANOVA PARA TBARS POR TEJIDO EN DOSIS BAJA

ANOVA Simple RIÑON - % TBARS REFERIDO AL CONTROL

Variable dependiente: % REFERIDO AL CONTROL

Factor: TRATAMIENTO

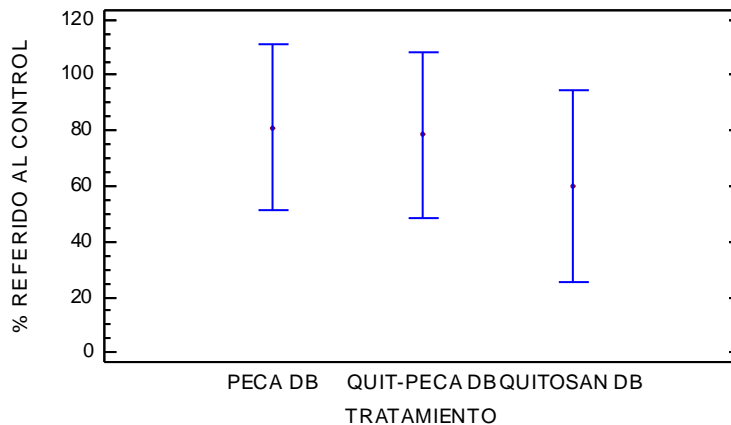
Número de observaciones: 11

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	886.937	2	443.469	0.33	0.7284
Intra grupos	10758.3	8	1344.79		
Total (Corr.)	11645.2	10			

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
QUITOSAN DB	3	59.8797	X
QUIT-PECA DB	4	78.6772	X
PECA DB	4	81.1317	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
PECA DB - QUIT-PECA DB		2.45448	59.7961
PECA DB - QUITOSAN DB		21.252	64.5872
QUIT-PECA DB - QUITOSAN DB		18.7975	64.5872

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple HIGADO - % TBARS REFERIDO AL CONTROL

Variable dependiente: % REFERIDO AL CONTROL

Factor: TRATAMIENTO

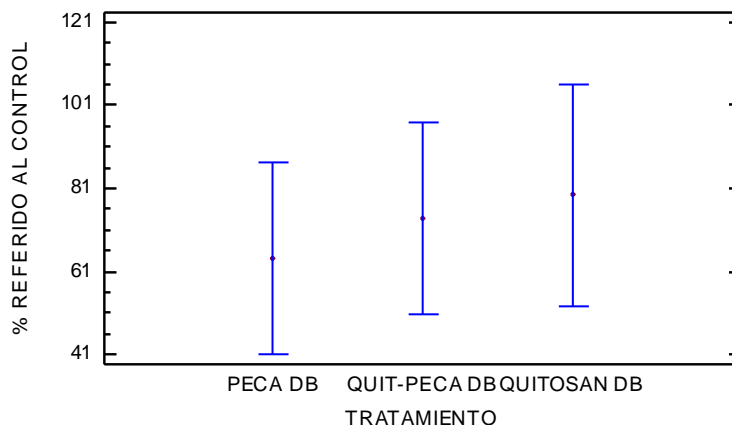
Número de observaciones: 11

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	416.401	2	208.201	0.26	0.7787
Intra grupos	6453.13	8	806.641		
Total (Corr.)	6869.53	10			

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PECA DB	4	64.2816	X
QUIT-PECA DB	4	73.6867	X
QUITOSAN DB	3	79.4611	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
PECA DB - QUIT-PECA DB		-9.40513	46.3112
PECA DB - QUITOSAN DB		-15.1795	50.0218
QUIT-PECA DB - QUITOSAN DB		-5.77433	50.0218

* indica una diferencia significativa.

ANÁLISIS DE ANOVA PARA TBARS POR TEJIDO A DOSIS ALTA

ANOVA Simple RIÑON - % TBARS REFERIDO AL CONTROL

Variable dependiente: % REFERIDO AL CONTROL

Factor: TRATAMIENTO

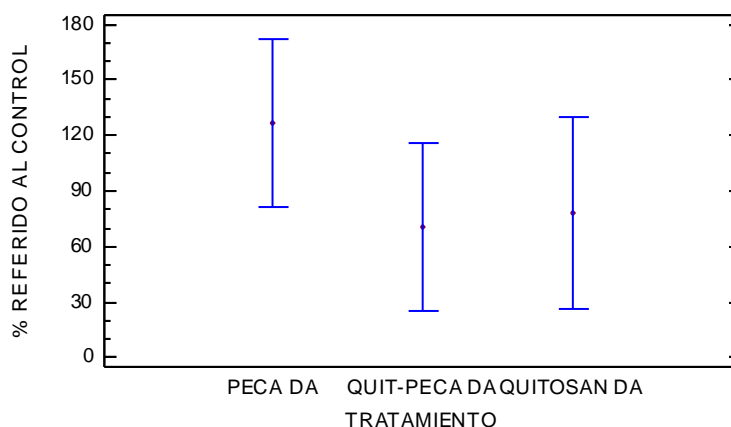
Número de observaciones: 11

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7224.69	2	3612.35	1.18	0.3566
Intra grupos	24569.2	8	3071.15		
Total (Corr.)	31793.9	10			

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
QUIT-PECA DA	4	70.7298	X
QUITOSAN DA	3	78.1078	X
PECA DA	4	126.822	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
PECA DA - QUIT-PECA DA		56.0922	90.3643
PECA DA - QUITOSAN DA		48.7143	97.6045
QUIT-PECA DA - QUITOSAN DA		-7.37797	97.6045

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple HIGADO - % TBARS REFERIDO AL CONTROL

Variable dependiente: % REFERIDO AL CONTROL

Factor: TRATAMIENTO

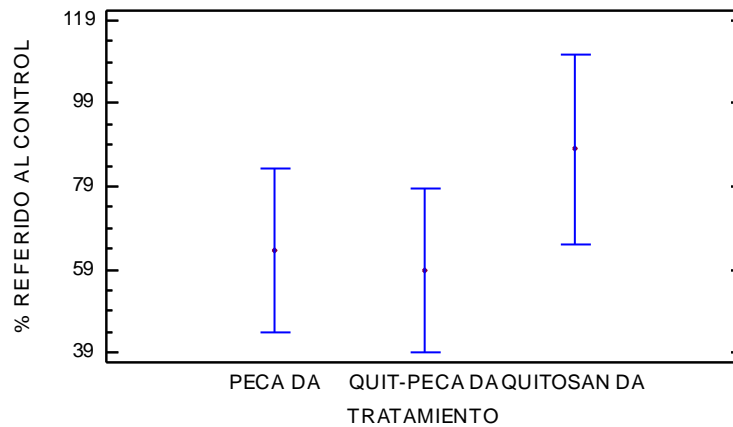
Número de observaciones: 11

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1600.52	2	800.259	1.35	0.3116
Intra grupos	4728.59	8	591.074		
Total (Corr.)	6329.11	10			

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
QUIT-PECA DA	4	58.8816	X
PECA DA	4	63.5636	X
QUITOSAN DA	3	87.9336	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
PECA DA - QUIT-PECA DA		4.68203	39.6431
PECA DA - QUITOSAN DA		-24.37	42.8194
QUIT-PECA DA - QUITOSAN DA		-29.052	42.8194

* indica una diferencia significativa.

ANALISIS ANOVA SIMPLE DE SISTEMAS A DIFERENTES DOSIS FRENTE A UN CONTROL

QUITOSAN

ANOVA Simple. Sistema QUITOSAN en RIÑÓN

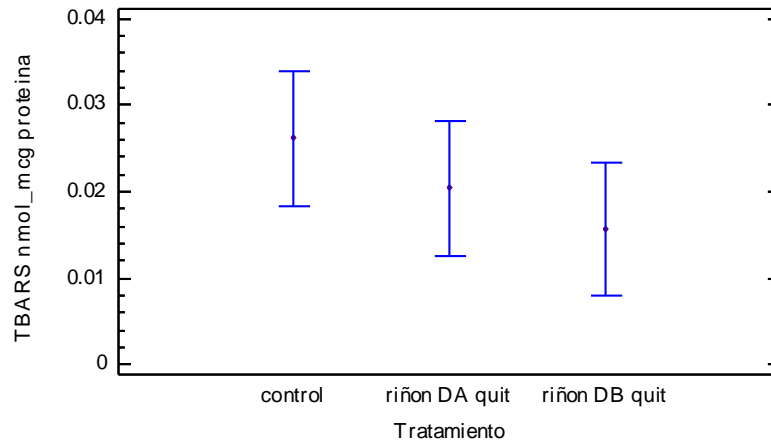
Variable dependiente: TBARS nmol_mcg proteína
Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9
Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para TBARS nmol_mcg proteína por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.000165261	2	0.0000826303	1.37	0.3239
Intra grupos	0.000362327	6	0.0000603878		
Total (Corr.)	0.000527588	8			

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para TBARS nmol_mcg proteína por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
riñón DB quit	3	0.0156441	X
riñón DA quit	3	0.0204064	X
control	3	0.0261259	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
control - riñón DA quit		0.00571954	0.0155256
control - riñón DB quit		0.0104818	0.0155256
riñón DA quit - riñón DB quit		0.00476227	0.0155256

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple SISTEMA QUITOSAN en HIGADO

Variable dependiente: TBARS nmol_mcg proteina

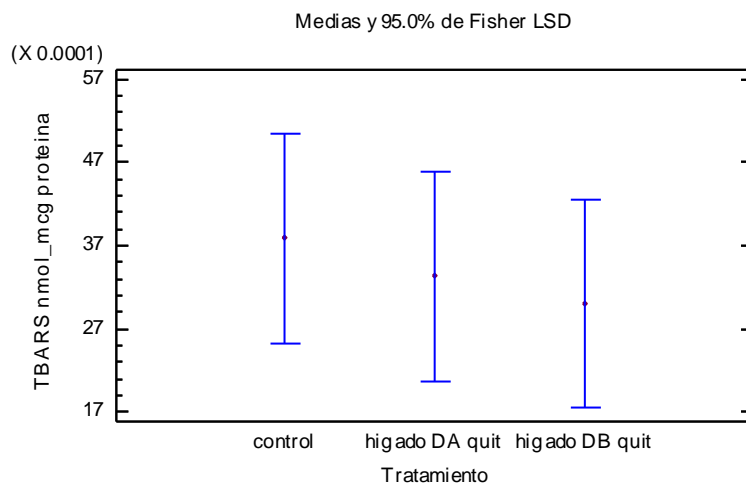
Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para TBARS nmol_mcg proteina por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9.15764E-7	2	4.57882E-7	0.29	0.7577
Intra grupos	0.00000945235	6	0.00000157539		
Total (Corr.)	0.0000103681	8			



Pruebas de Múltiple Rangos para TBARS nmol_mcg proteina por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
higado DB quit	3	0.00300759	X
higado DA quit	3	0.00332827	X
control	3	0.00378498	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
control - higado DA quit		0.000456712	0.00250766
control - higado DB quit		0.000777394	0.00250766
higado DA quit - higado DB quit		0.000320682	0.00250766

* indica una diferencia significativa.

PECA

ANOVA Simple PECA en RIÑÓN

Variable dependiente: TBARS nmol_mcg proteina

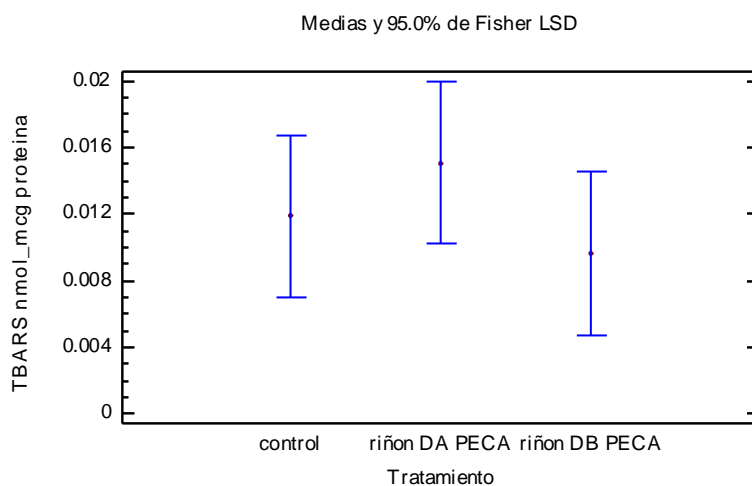
Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para TBARS nmol_mcg proteina por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00005947	2	0.000029735	0.80	0.4777
Intra grupos	0.000333336	9	0.0000370373		
Total (Corr.)	0.000392806	11			



Pruebas de Múltiple Rangos para TBARS nmol_mcg proteina por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
riñón DB PECA	4	0.00963422	X
control	4	0.0118748	X
riñón DA PECA	4	0.0150599	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
control - riñón DA PECA		-0.00318507	0.00973484
control - riñón DB PECA		0.00224058	0.00973484
riñón DA PECA - riñón DB PECA		0.00542565	0.00973484

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple PECA en HIGADO

Variable dependiente: TBARS nmol_mcg proteína

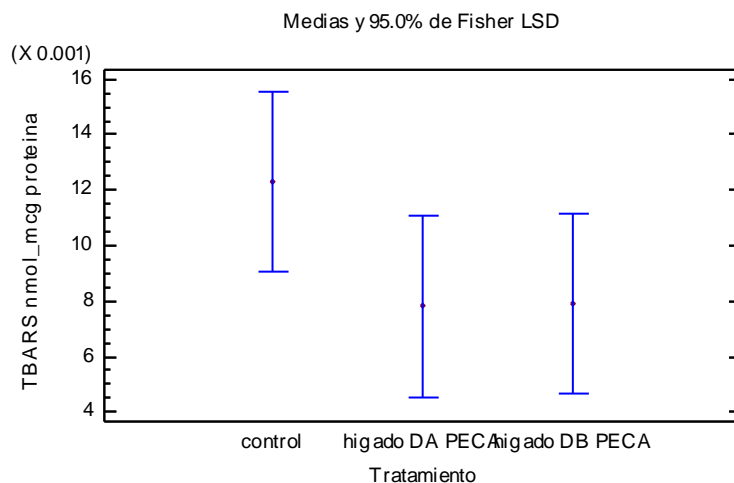
Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para TBARS nmol_mcg proteína por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0000526325	2	0.0000263163	1.58	0.2579
Intra grupos	0.000149798	9	0.0000166442		
Total (Corr.)	0.00020243	11			



Pruebas de Múltiple Rangos para TBARS nmol_mcg proteína por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
hígado DA PECA	4	0.00782621	x
hígado DB PECA	4	0.00791462	x
control	4	0.0123124	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
control - hígado DA PECA		0.0044862	0.0065259
control - hígado DB PECA		0.0043978	0.0065259
hígado DA PECA - hígado DB PECA		-0.0000884025	0.0065259

* indica una diferencia significativa.

QUITOSAN/PECA

ANOVA Simple QUIT/PECA en RIÑÓN

Variable dependiente: TBARS nmol_mcg proteina

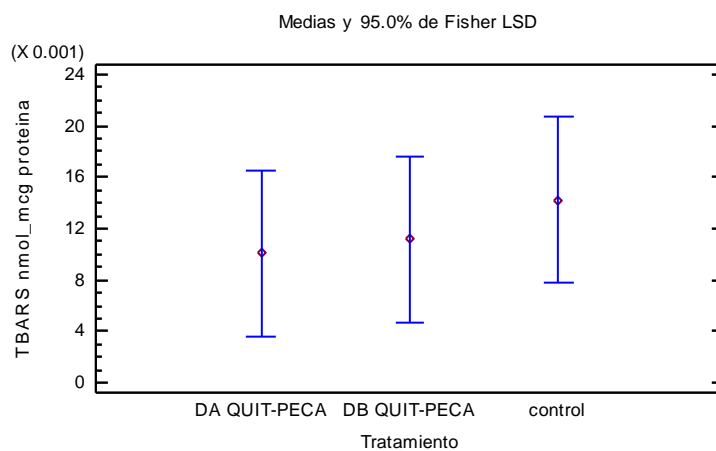
Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para TBARS nmol_mcg proteina por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0000370969	2	0.0000185484	0.28	0.7586
Intra grupos	0.00058596	9	0.0000651067		
Total (Corr.)	0.000623057	11			



Pruebas de Múltiple Rangos para TBARS nmol_mcg proteina por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
riñón DA QUIT-PECA	4	0.0100628	X
riñón DB QUIT-PECA	4	0.0111935	X
control	4	0.0142271	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
control - riñón DA QUIT-PECA		0.0041643	0.0129069
control - riñón DB QUIT-PECA		0.00303362	0.0129069
riñón DA QUIT-PECA - riñón DB QUIT-PECA		-0.00113068	0.0129069

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple QUIT/PECA- TBARS en Tratamiento HIGADO

Variable dependiente: TBARS nmol_mcg proteína

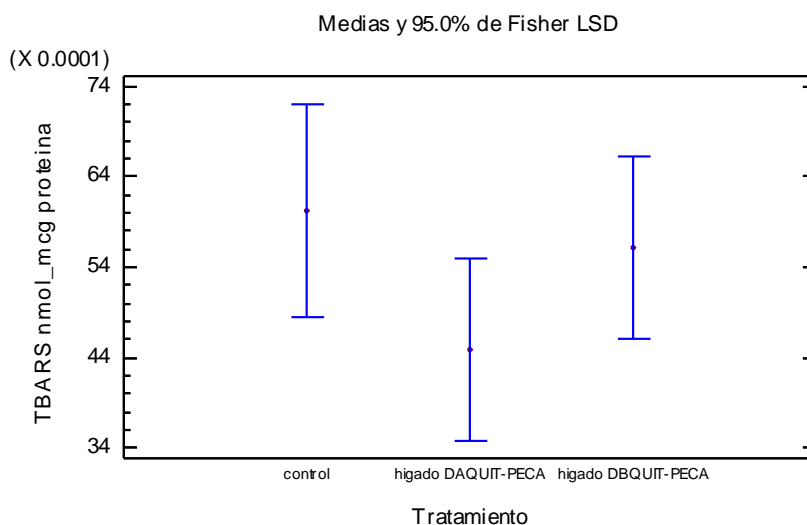
Factor: Tratamiento

Número de observaciones: 11

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para TBARS nmol_mcg proteína por Tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.00000459231	2	0.00000229616	1.47	0.2860
Intra grupos	0.0000125001	8	0.00000156251		
Total (Corr.)	0.0000170924	10			



Pruebas de Múltiple Rangos para TBARS nmol_mcg proteína por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
hígado DA QUIT-PECA	4	0.00448781	X
hígado DB QUIT-PECA	4	0.00561623	X
control	3	0.00602032	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
control - hígado DA QUIT-PECA		0.00153251	0.00220156
control - hígado DB QUIT-PECA		0.000404091	0.00220156
hígado DA QUIT-PECA - hígado DB QUIT-PECA		-0.00112841	0.00203825

* indica una diferencia significativa.

2. ANALISIS PARA DATOS EXPERIMENTALES DE CUANTIFICACION DE GSH

ANÁLISIS DE ANOVA PARA TBARS POR TEJIDO EN DOSIS BAJA

ANOVA Simple PLASMA - % GSH REFERIDO AL CONTROL

Variable dependiente: % REFERIDO AL CONTROL

Factor: TRATAMIENTO

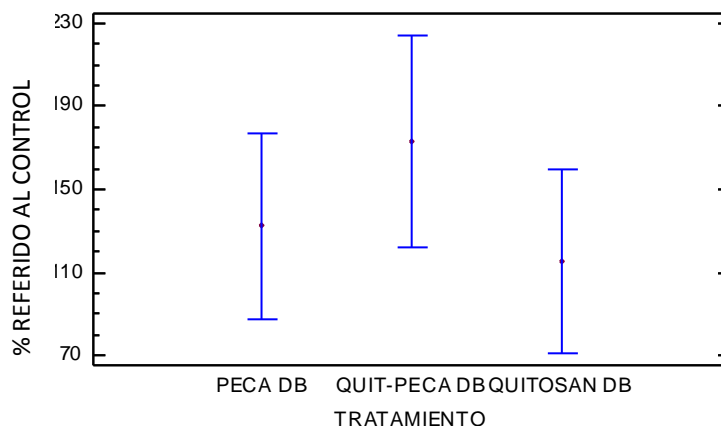
Número de observaciones: 11

Número de niveles:

Tabla ANOVA para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5867.82	2	2933.91	1.00	0.4110
Intra grupos	23569.6	8	2946.2		
Total (Corr.)	29437.4	10			

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
QUITOSAN DB	4	115.406	X
PECA DB	4	132.29	X
QUIT-PECA DB	3	173.124	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
PECA DB - QUIT-PECA DB		-40.834	95.5984
PECA DB - QUITOSAN DB		16.8838	88.5069
QUIT-PECA DB - QUITOSAN DB		57.7178	95.5984

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple RIÑON - %GSH REFERIDO AL CONTROL

Variable dependiente: % REFERIDO AL CONTROL

Factor: TRATAMIENTO

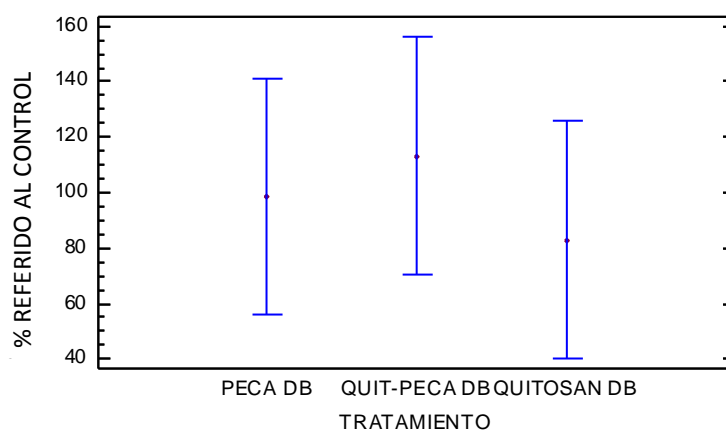
Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1828.59	2	914.293	0.32	0.7328
Intra grupos	25570.6	9	2841.18		
Total (Corr.)	27399.2	11			

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
QUITOSAN DB	4	83.0241	X
PECA DB	4	98.3641	X
QUIT-PECA DB	4	113.26	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
PECA DB - QUIT-PECA DB		-14.8961	85.2625
PECA DB - QUITOSAN DB		15.3401	85.2625
QUIT-PECA DB - QUITOSAN DB		30.2362	85.2625

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple HIGADO - % GSH REFERIDO AL CONTROL

Variable dependiente: % REFERIDO AL CONTROL

Factor: TRATAMIENTO

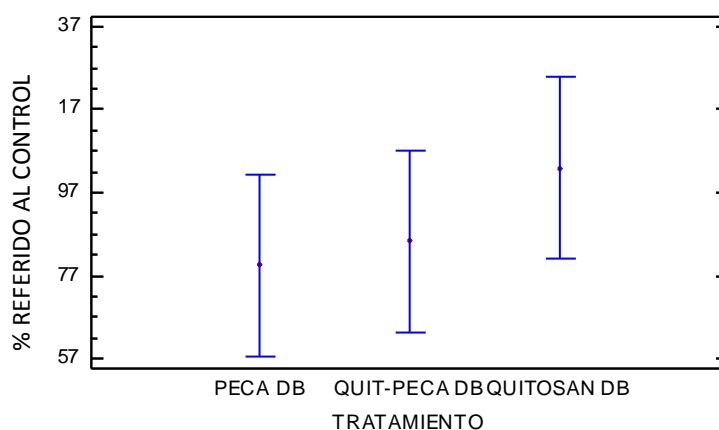
Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1159.87	2	579.934	0.78	0.4880
Intra grupos	6710.81	9	745.646		
Total (Corr.)	7870.68	11			

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PECA DB	4	79.7085	X
QUIT-PECA DB	4	85.3094	X
QUITOSAN DB	4	102.793	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
PECA DB - QUIT-PECA DB		-5.60093	43.6792
PECA DB - QUITOSAN DB		-23.084	43.6792
QUIT-PECA DB - QUITOSAN DB		-17.4831	43.6792

* indica una diferencia significativa.

ANÁLISIS DE ANOVA PARA GSH POR TEJIDO A DOSIS ALTA

ANOVA Simple PLASMA - % GSH REFERIDO AL CONTROL

Variable dependiente: % REFERIDO AL CONTROL

Factor: TRATAMIENTO

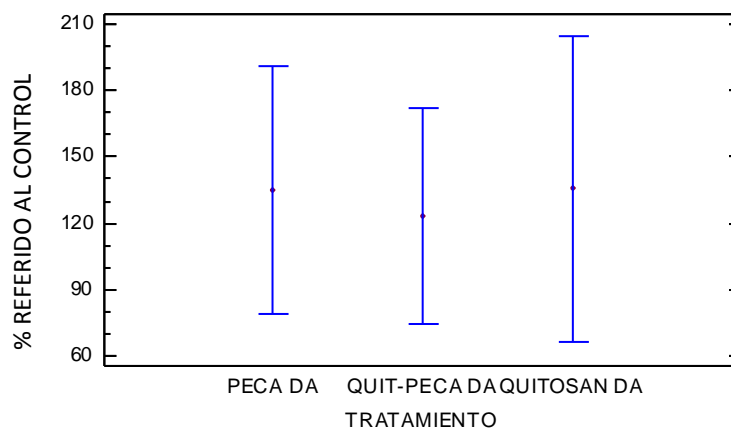
Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	315.51	2	157.755	0.05	0.9517
Intra grupos	18963.6	6	3160.61		
Total (Corr.)	19279.2	8			

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
QUIT-PECA DA	4	123.375	X
PECA DA	3	135.068	X
QUITOSAN DA	2	135.606	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
PECA DA - QUIT-PECA DA		11.6938	105.066
PECA DA - QUITOSAN DA		-0.53792	125.578
QUIT-PECA DA - QUITOSAN DA		-12.2317	119.134

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple RIÑON - % GSH REFERIDO AL CONTROL

Variable dependiente: % REFERIDO AL CONTROL

Factor: TRATAMIENTO

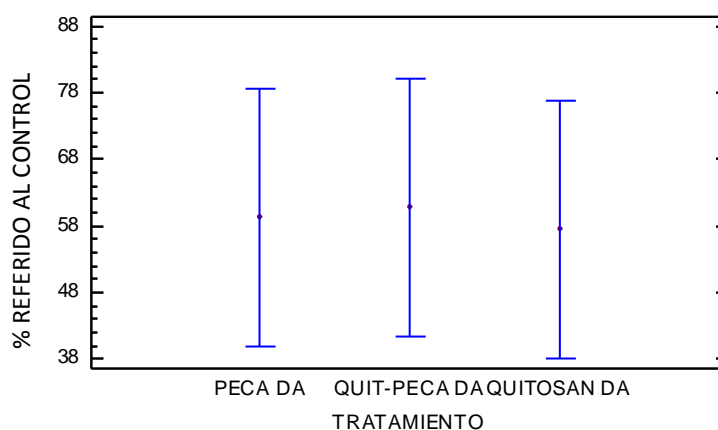
Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	22.2996	2	11.1498	0.02	0.9812
Intra grupos	5269.21	9	585.468		
Total (Corr.)	5291.51	11			

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
QUITOSAN DA	4	57.4685	X
PECA DA	4	59.3286	X
QUIT-PECA DA	4	60.8001	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
PECA DA - QUIT-PECA DA		-1.47154	38.7044
PECA DA - QUITOSAN DA		1.86004	38.7044
QUIT-PECA DA - QUITOSAN DA		3.33159	38.7044

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple HIGADO - % GSH REFERIDO AL CONTROL

Variable dependiente: % REFERIDO AL CONTROL

Factor: TRATAMIENTO

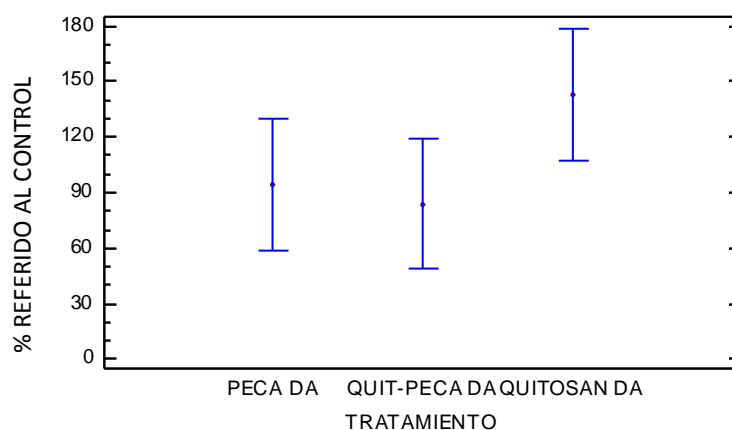
Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7978.43	2	3989.21	2.04	0.1857
Intra grupos	17585.5	9	1953.94		
Total (Corr.)	25563.9	11			

Medias y 95.0% de Fisher LSD



Pruebas de Múltiple Rangos para % REFERIDO AL CONTROL por TRATAMIENTO

Método: 95.0 porcentaje LSD

TRATAMIENTO	Casos	Media	Grupos Homogéneos
QUIT-PECA DA	4	83.8105	X
PECA DA	4	94.317	X
QUITOSAN DA	4	143.0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
PECA DA - QUIT-PECA DA		10.5065	70.7074
PECA DA - QUITOSAN DA		-48.683	70.7074
QUIT-PECA DA - QUITOSAN DA		-59.1895	70.7074

* indica una diferencia significativa.

ANALISIS ANOVA SIMPLE DE SISTEMAS A DIFERENTES DOSIS FRENTE A UN CONTROL

QUITOSAN

ANOVA Simple. Sistema QUITOSAN en PLASMA

Variable dependiente: GSH nmol_mcg prot

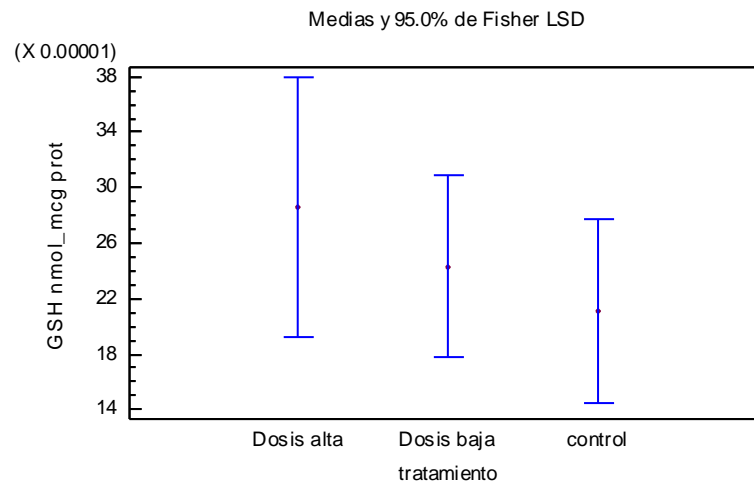
Factor: tratamiento

Número de observaciones: 10

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7.64238E-9	2	3.82119E-9	0.62	0.5669
Intra grupos	4.34168E-8	7	6.2024E-9		
Total (Corr.)	5.10592E-8	9			



Pruebas de Múltiple Rangos para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
control	4	0.000210764	X
Dosis baja	4	0.000243233	X
Dosis alta	2	0.000285808	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Dosis alta - Dosis baja		0.0000425753	0.000161277
Dosis alta - control		0.000075045	0.000161277
Dosis baja - control		0.0000324697	0.000131683

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple. Sistema QUITOSAN en RIÑÓN

Variable dependiente: GSH nmol_mcg prot

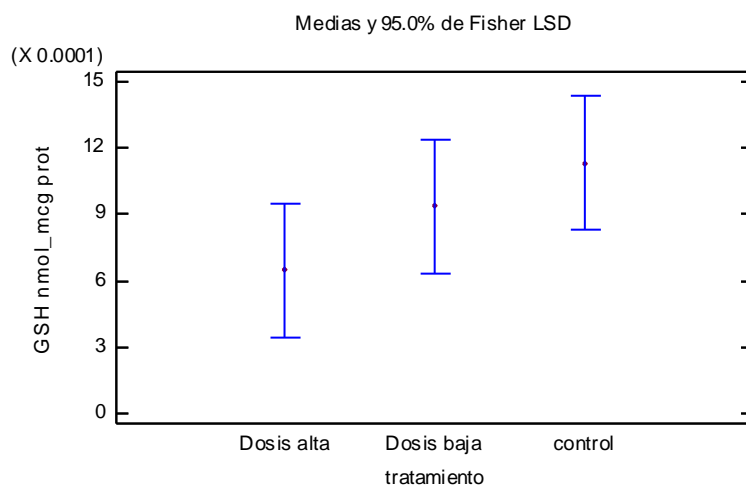
Factor: tratamiento

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4.67757E-7	2	2.33879E-7	1.65	0.2445
Intra grupos	0.00000127255	9	1.41395E-7		
Total (Corr.)	0.00000174031	11			



Pruebas de Múltiple Rangos para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Dosis alta	4	0.000649066	X
Dosis baja	4	0.000937698	X
control	4	0.00112943	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Dosis alta - Dosis baja		-0.000288632	0.000601486
Dosis alta - control		-0.000480363	0.000601486
Dosis baja - control		-0.000191731	0.000601486

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple. Sistema QUITOSAN en HIGADO

Variable dependiente: GSH nmol_mcg prot

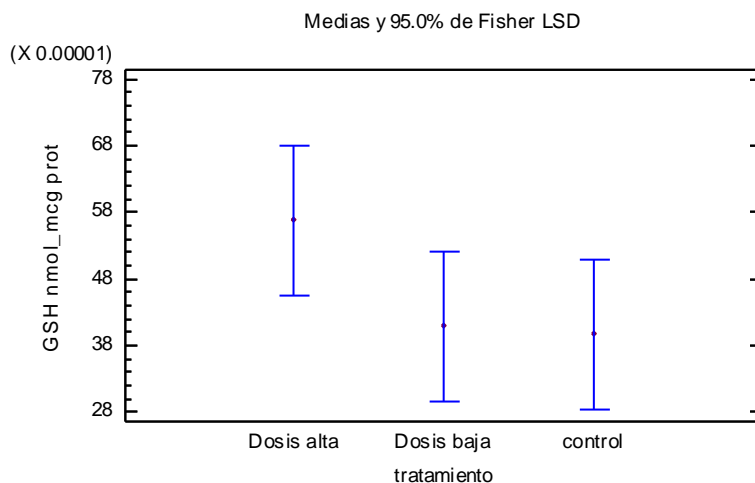
Factor: tratamiento

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7.31921E-8	2	3.6596E-8	1.85	0.2125
Intra grupos	1.78133E-7	9	1.97926E-8		
Total (Corr.)	2.51325E-7	11			



Pruebas de Múltiple Rangos para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
control	4	0.000397542	×
Dosis baja	4	0.000408644	×
Dosis alta	4	0.000568485	×

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Dosis alta - Dosis baja		0.000159841	0.00022504
Dosis alta - control		0.000170943	0.00022504
Dosis baja - control		0.0000111015	0.00022504

* indica una diferencia significativa.

PECA

ANOVA Simple. Sistema PECA en PLASMA

Variable dependiente: GSH nmol_mcg prot

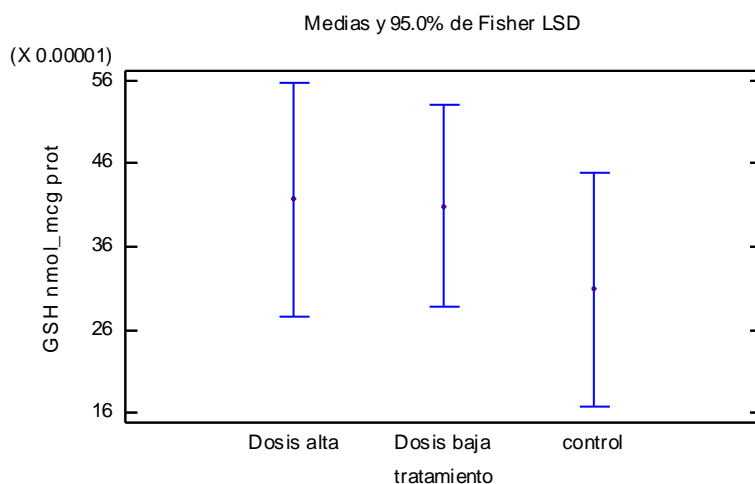
Factor: tratamiento

Número de observaciones: 10

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.25853E-8	2	1.12926E-8	0.54	0.6076
Intra grupos	1.47637E-7	7	2.1091E-8		
Total (Corr.)	1.70223E-7	9			



Pruebas de Múltiple Rangos para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
control	3	0.000308883	X
Dosis baja	4	0.00040862	X
Dosis alta	3	0.000417203	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Dosis alta - Dosis baja		0.000008583	0.000262283
Dosis alta - control		0.00010832	0.000280393
Dosis baja - control		0.000099737	0.000262283

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple. Sistema PECA en RIÑON

Variable dependiente: GSH nmol_mcg prot

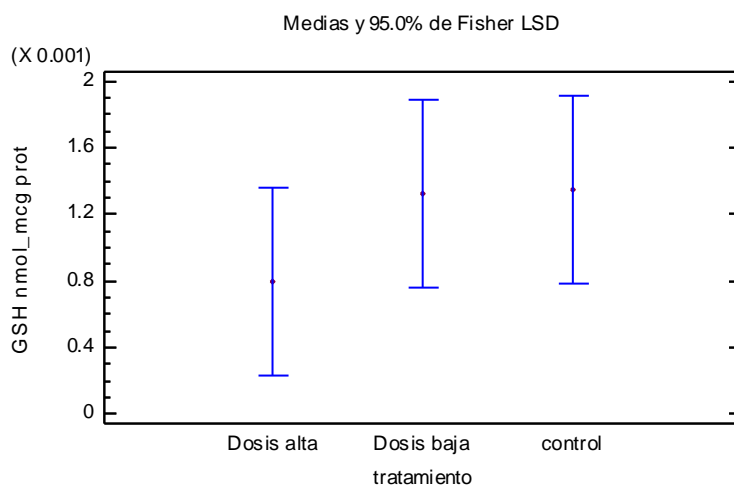
Factor: tratamiento

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7.66581E-7	2	3.8329E-7	0.78	0.4882
Intra grupos	0.00000443737	9	4.93041E-7		
Total (Corr.)	0.00000520395	11			



Pruebas de Múltiple Rangos para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Dosis alta	4	0.000797661	X
Dosis baja	4	0.00132249	X
control	4	0.00134448	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Dosis alta - Dosis baja		-0.000524825	0.00112318
Dosis alta - control		-0.000546819	0.00112318
Dosis baja - control		-0.000021994	0.00112318

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple. Sistema PECA en HIGADO

Variable dependiente: GSH nmol_mcg prot

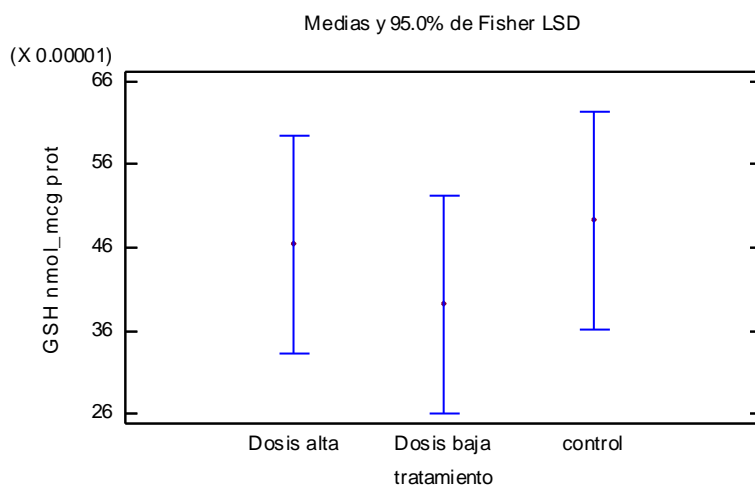
Factor: tratamiento

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.12797E-8	2	1.06398E-8	0.40	0.6830
Intra grupos	2.40708E-7	9	2.67454E-8		
Total (Corr.)	2.61988E-7	11			



Pruebas de Múltiple Rangos para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Dosis baja	4	0.000392724	X
Dosis alta	4	0.0004647	X
control	4	0.0004927	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Dosis alta - Dosis baja		0.000071976	0.000261597
Dosis alta - control		-0.000028	0.000261597
Dosis baja - control		-0.000099976	0.000261597

* indica una diferencia significativa.

QUIT/PECA

ANOVA Simple. Sistema QUIT/PECA en PLASMA

Variable dependiente: GSH nmol_mcg prot

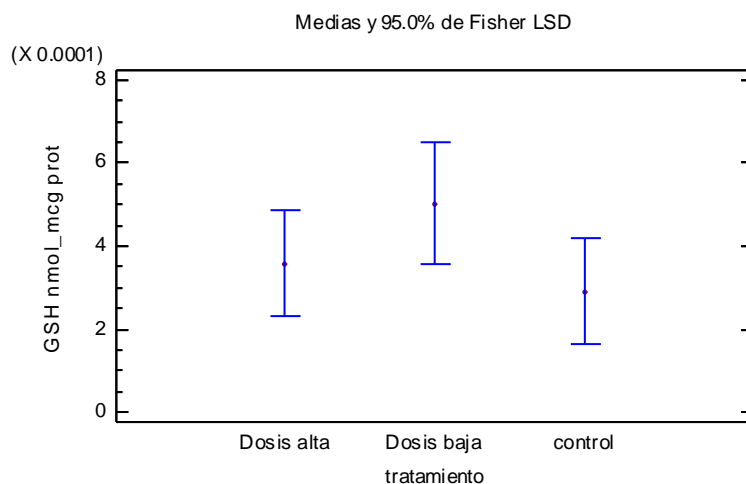
Factor: tratamiento

Número de observaciones: 11

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7.87579E-8	2	3.93789E-8	1.64	0.2527
Intra grupos	1.91917E-7	8	2.39897E-8		
Total (Corr.)	2.70675E-7	10			



Pruebas de Múltiple Rangos para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
control	4	0.000290573	x
Dosis alta	4	0.000358493	x
Dosis baja	3	0.000503051	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Dosis alta - Dosis baja		-0.000144558	0.000272792
Dosis alta - control		0.0000679202	0.000252556
Dosis baja - control		0.000212478	0.000272792

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple. Sistema QUIT/PECA en RIÑÓN

Variable dependiente: GSH nmol_mcg prot

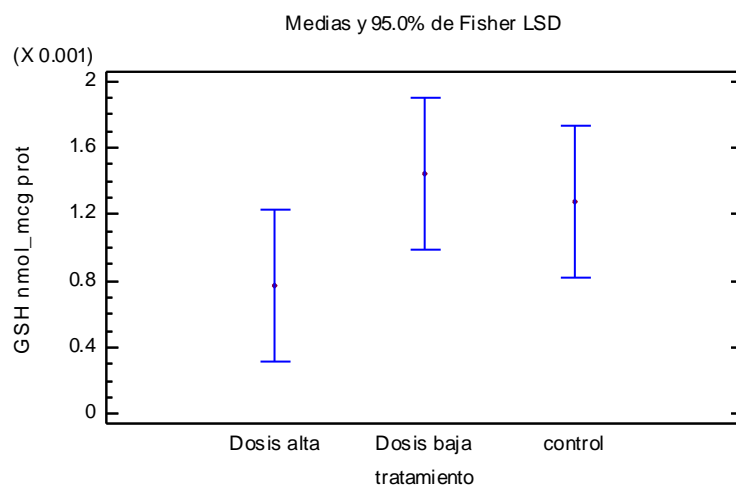
Factor: tratamiento

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	9.64154E-7	2	4.82077E-7	1.49	0.2770
Intra grupos	0.0000029207	9	3.24522E-7		
Total (Corr.)	0.00000388485	11			



Pruebas de Múltiple Rangos para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Dosis alta	4	0.000773785	X
control	4	0.00127267	X
Dosis baja	4	0.00144143	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Dosis alta - Dosis baja		-0.000667645	0.000911236
Dosis alta - control		-0.000498885	0.000911236
Dosis baja - control		0.000168759	0.000911236

* indica una diferencia significativa.

ANOVA Simple. Sistema QUIT/PECA en HIGADO

Variable dependiente: GSH nmol_mcg prot

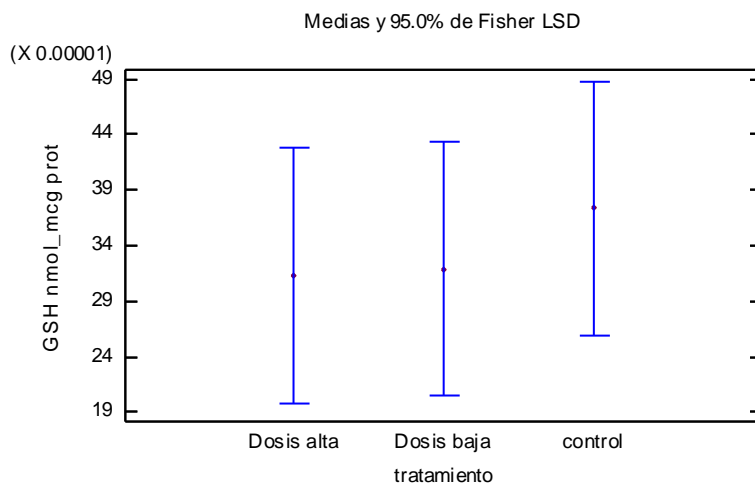
Factor: tratamiento

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 3

Tabla ANOVA para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8.9323E-9	2	4.46615E-9	0.22	0.8081
Intra grupos	1.84231E-7	9	2.04701E-8		
Total (Corr.)	1.93163E-7	11			



Pruebas de Múltiple Rangos para GSH nmol_mcg prot por tratamiento

Método: 95.0 porcentaje LSD

tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Dosis alta	4	0.000313054	X
Dosis baja	4	0.000318652	X
control	4	0.000373525	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Dosis alta - Dosis baja		-0.00000559875	0.00022886
Dosis alta - control		-0.0000604717	0.00022886
Dosis baja - control		-0.000054873	0.00022886

* indica una diferencia significativa.

Zeta Potential Report

Sample Details

Sample Name: Quitosan 1
SOP Name: mansettings.dat
General Notes: ph5, 0.2mm

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 6	Dispersant RI: 1.330
Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 03...	Viscosity (cP): 0.8872
Dispersant Dielectric Constant: 78.5	

System

Temperature (°C): 25.0	Zeta Runs: 20
Count Rate (kcps): 2390.0	Measurement Position (mm): 2.00
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 11

Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 16.5	Peak 1: 0.00	0.0	0.00
Zeta Deviation (mV): 0.00	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 9.03	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality : Good			

Zeta Potential Distribution

— Record 6: Quitosan 1



Zeta Quality Report

Sample Name: Quitosan 1

SOP Name: mansettings.dat

File Name: Angel 250311.dts

Record Number: 6

Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 03:41:48 p.m.

RESULT MEETS QUALITY CRITERIA

Phase Plot

Sample Details

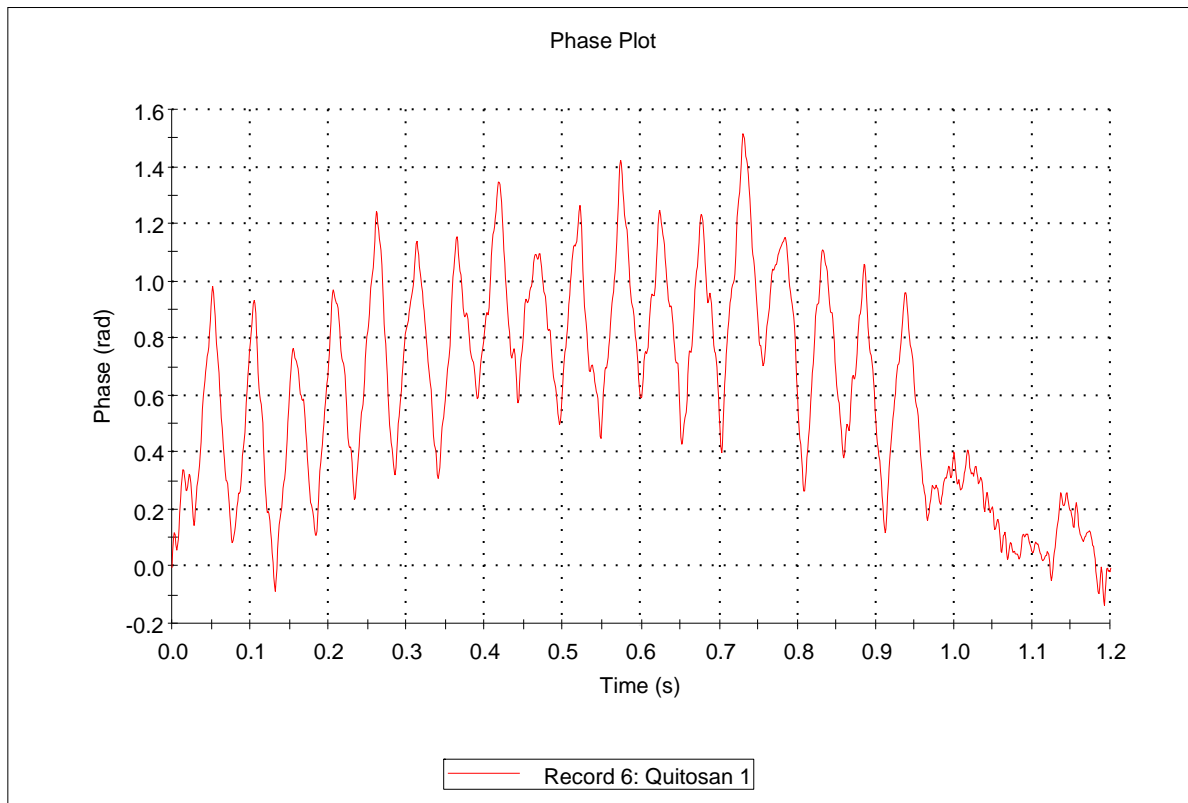
Sample Name: Quitosan 1
SOP Name: mansettings.dat
General Notes: ph5, 0.2mm

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 6	Dispersant RI: 1.330
Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 03:	Viscosity (cP): 0.8872
Dispersant Dielectric Constant: 78.5	

System

Temperature (°C): 25.0	Zeta Runs: 20
Count Rate (kcps): 2390.0	Measurement Position (mm): 2.00
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 11

Results





Expert Advice

Zeta potential measurements

Low count rate (< 20 kcps), increase sample concentration

Zeta Potential Report

Sample Details

Sample Name: Control Quitosan 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 7	Dispersant RI: 1.330
Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 03...	Viscosity (cP): 0.8872
Dispersant Dielectric Constant: 78.5	

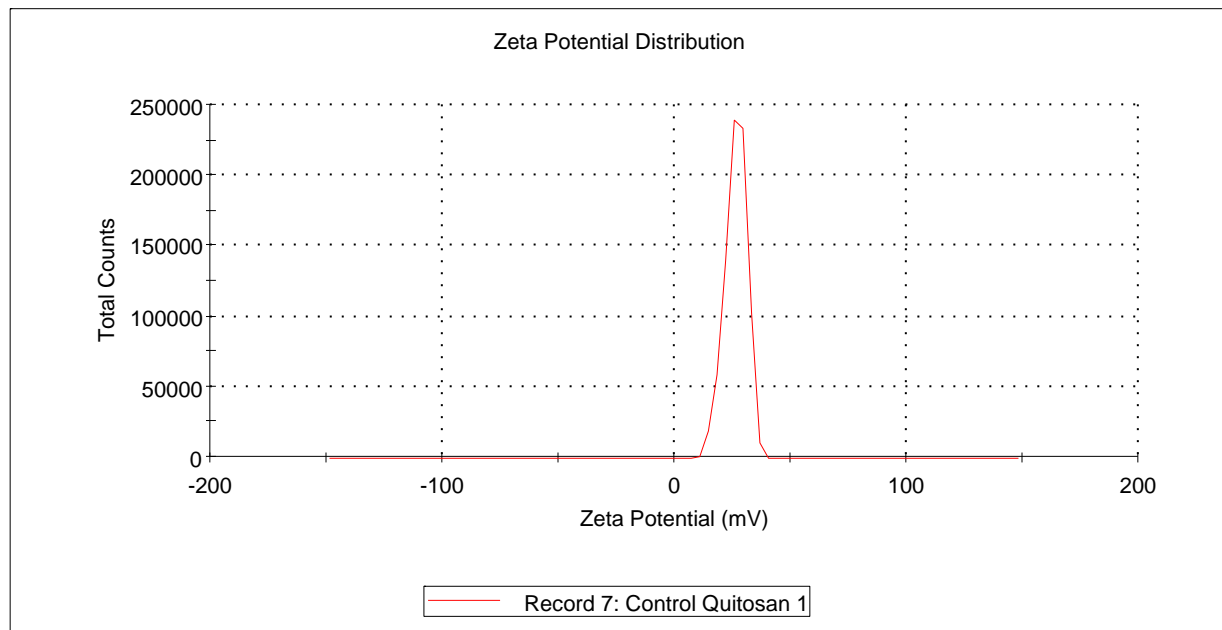
System

Temperature (°C): 25.0	Zeta Runs: 13
Count Rate (kcps): 2420.0	Measurement Position (mm): 2.00
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 10

Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 26.2	Peak 1: 26.2	100.0	4.67
Zeta Deviation (mV): 4.67	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 1.24	Peak 3: 0.00	0.0	0.00

Result quality : Good





Zeta Quality Report

Sample Name: Control Quitosan 1
SOP Name: mansettings.dat
File Name: Angel 250311.dts
Record Number: 7
Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 03:54:50 p.m.

RESULT MEETS QUALITY CRITERIA

Phase Plot

Sample Details

Sample Name: Control Quitosan 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: Angel 250311.dts

Dispersant Name: Water

Record Number: 7

Dispersant RI: 1.330

Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 03:

Viscosity (cP): 0.8872

Dispersant Dielectric Constant: 78.5

System

Temperature (°C): 25.0

Zeta Runs: 13

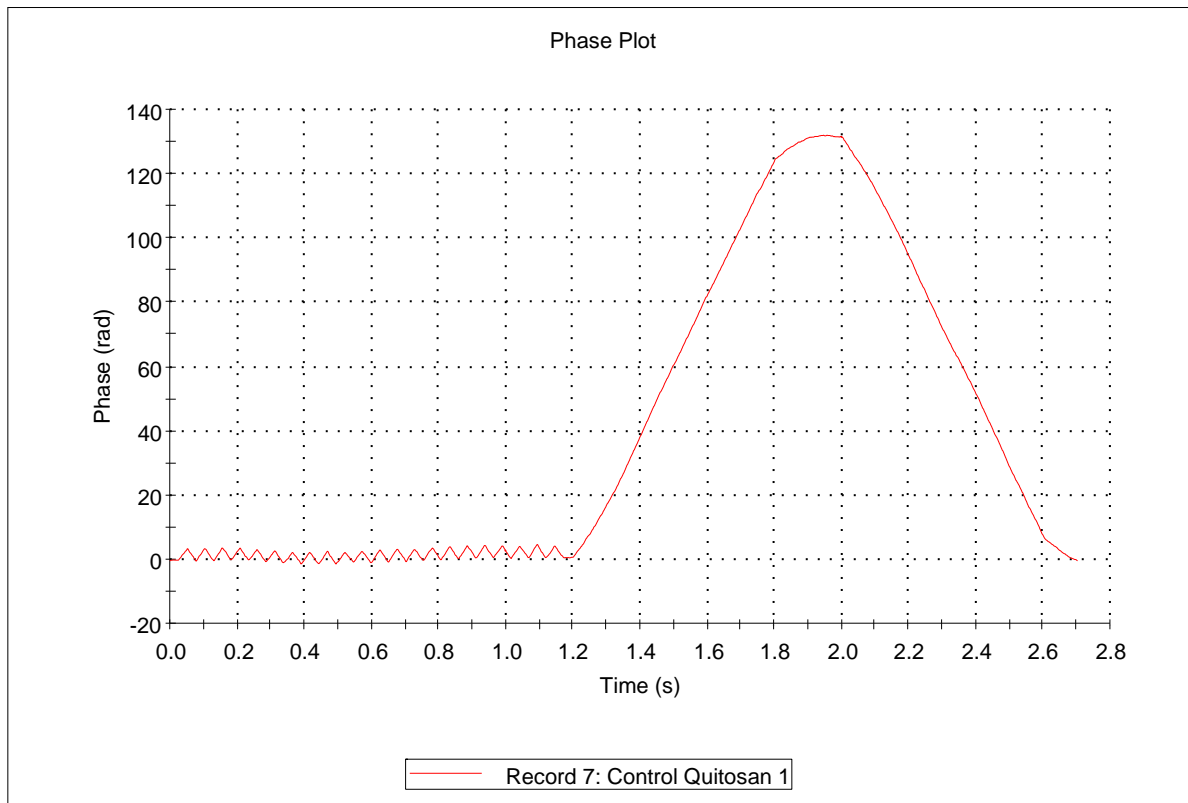
Count Rate (kcps): 2420.0

Measurement Position (mm): 2.00

Cell Description: Clear disposable zeta cell

Attenuator: 10

Results





Expert Advice

Zeta potential measurements

Distribution data good.

Zeta Potential Report

Sample Details

Sample Name: Sistema quitosan/peca 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

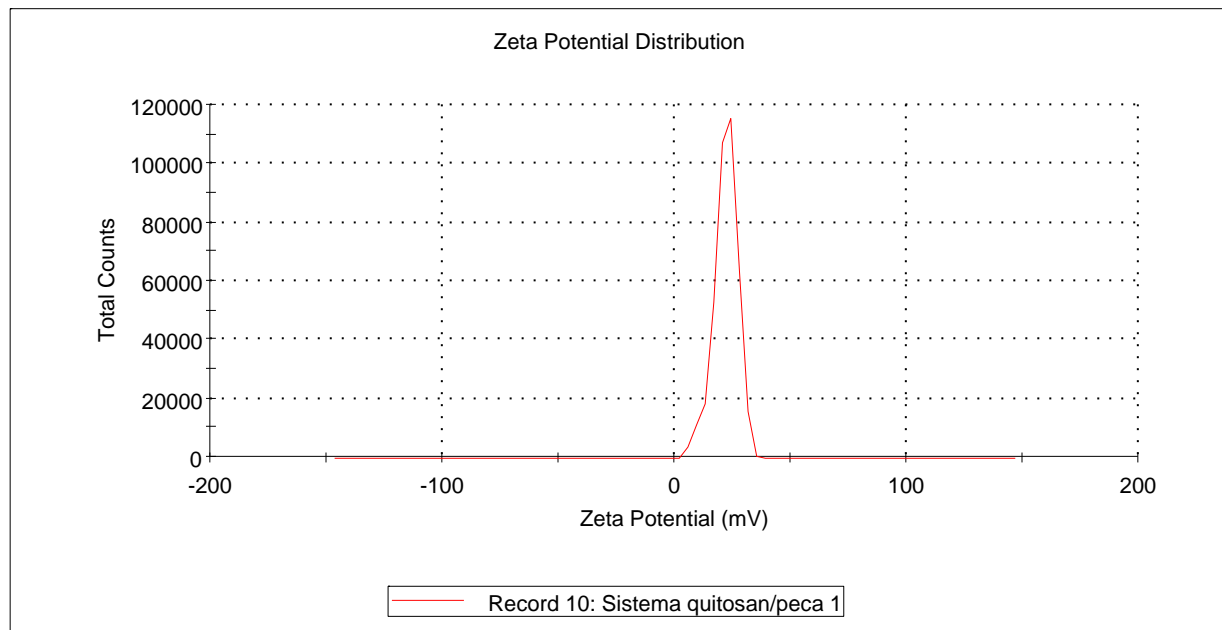
File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 10	Dispersant RI: 1.330
Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 04...	Viscosity (cP): 0.8872
Dispersant Dielectric Constant: 78.5	

System

Temperature (°C): 25.0	Zeta Runs: 13
Count Rate (kcps): 2439.8	Measurement Position (mm): 2.00
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 11

Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): 21.9	Peak 1: 21.9	100.0	5.15
Zeta Deviation (mV): 5.15	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.882	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality : Good			





Zeta Quality Report

Sample Name: Sistema quitosan/peca 1
SOP Name: mansettings.dat
File Name: Angel 250311.dts
Record Number: 10
Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 04:24:55 p.m.

RESULT MEETS QUALITY CRITERIA

Phase Plot

Sample Details

Sample Name: Sistema quitosan/peca 1

SOP Name: mansettings.dat

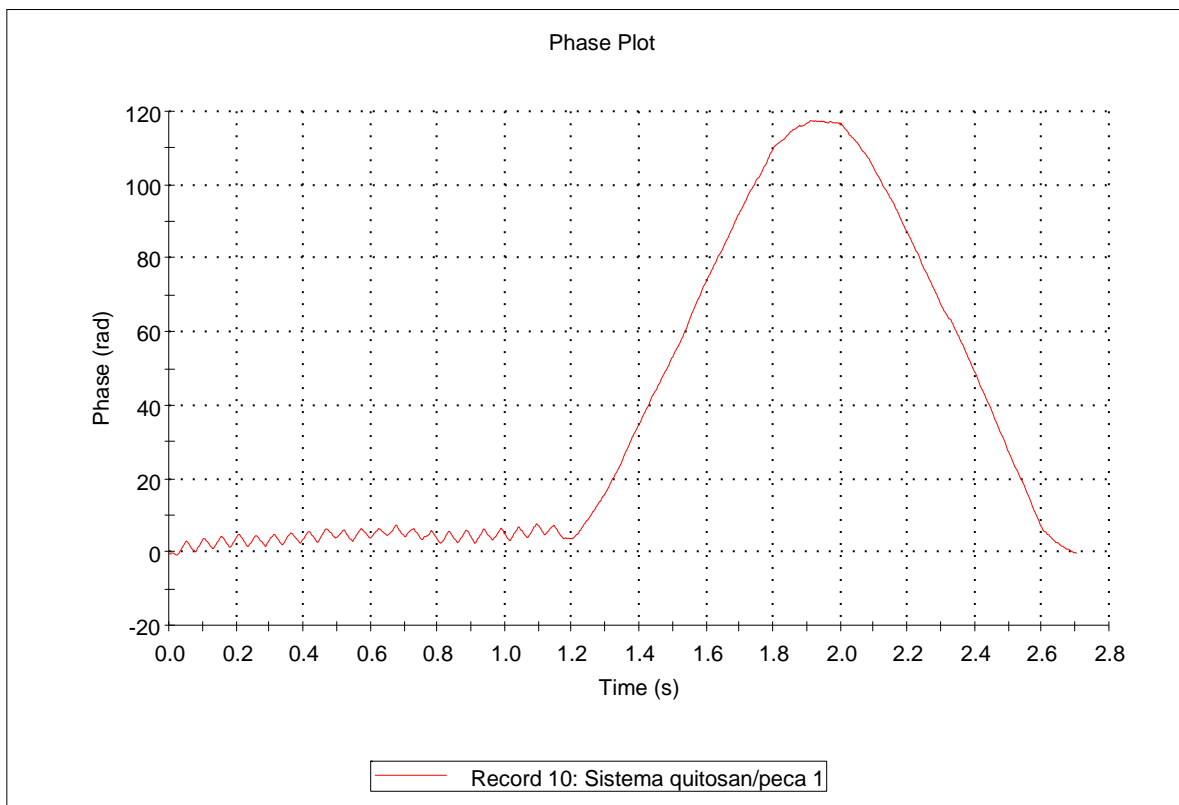
General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 10	Dispersant RI: 1.330
Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 04:	Viscosity (cP): 0.8872
Dispersant Dielectric Constant: 78.5	

System

Temperature (°C): 25.0	Zeta Runs: 13
Count Rate (kcps): 2439.8	Measurement Position (mm): 2.00
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 11

Results





Expert Advice

Zeta potential measurements

Low count rate (< 20 kcps), increase sample concentration

Distribution data good.

Zeta Potential Report

Sample Details

Sample Name: Control peca 1 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

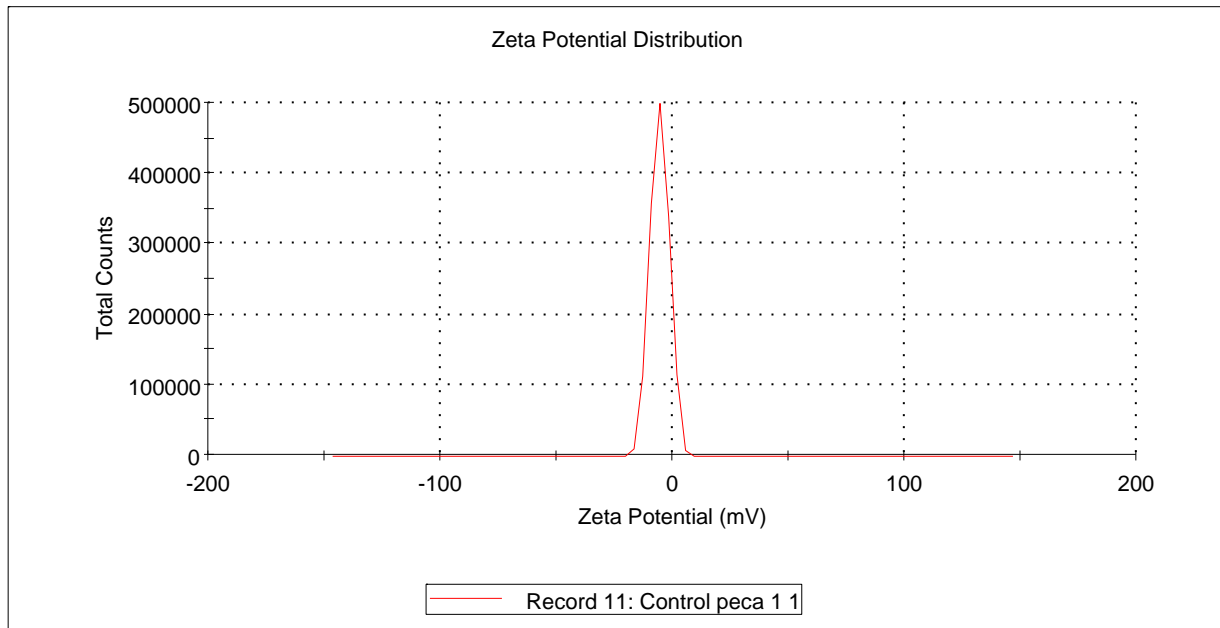
File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 11	Dispersant RI: 1.330
Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 04...	Viscosity (cP): 0.8872
Dispersant Dielectric Constant: 78.5	

System

Temperature (°C): 25.0	Zeta Runs: 12
Count Rate (kcps): 2467.5	Measurement Position (mm): 2.00
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 9

Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -5.68	Peak 1: -5.68	100.0	4.11
Zeta Deviation (mV): 4.11	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.704	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality : Good			





Zeta Quality Report

Sample Name: Control peca 1 1
SOP Name: mansettings.dat
File Name: Angel 250311.dts
Record Number: 11
Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 04:36:10 p.m.

RESULT MEETS QUALITY CRITERIA

Phase Plot

Sample Details

Sample Name: Control peca 1 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: Angel 250311.dts

Dispersant Name: Water

Record Number: 11

Dispersant RI: 1.330

Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 04:

Viscosity (cP): 0.8872

Dispersant Dielectric Constant: 78.5

System

Temperature (°C): 25.0

Zeta Runs: 12

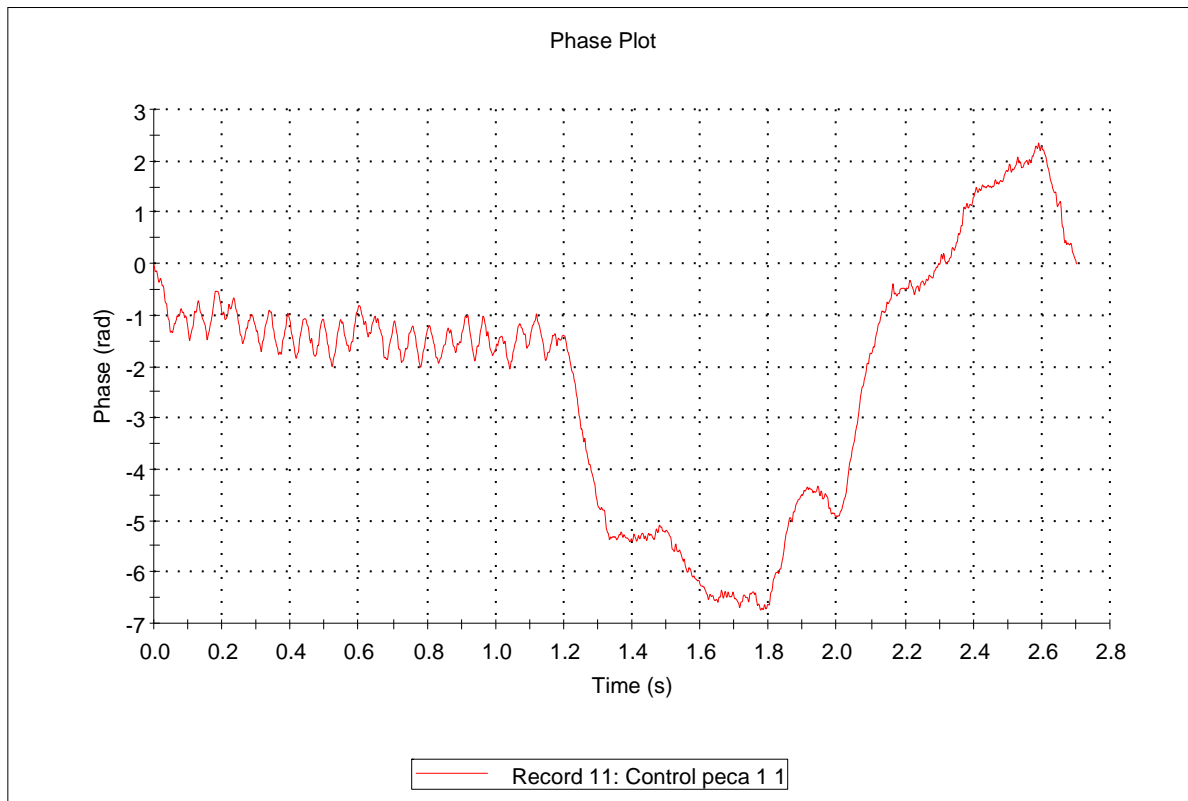
Count Rate (kcps): 2467.5

Measurement Position (mm): 2.00

Cell Description: Clear disposable zeta cell

Attenuator: 9

Results





Expert Advice

Zeta potential measurements

Distribution data good.

Zeta Potential Report

Sample Details

Sample Name: Control peca 2 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

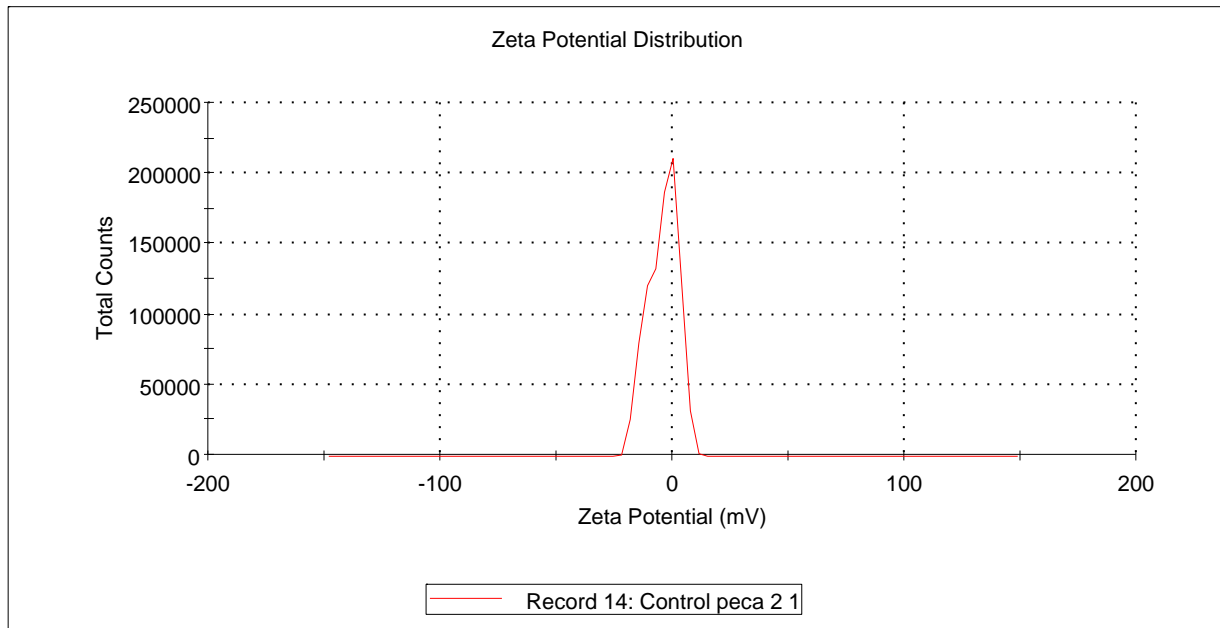
File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 14	Dispersant RI: 1.330
Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 05...	Viscosity (cP): 0.8872
Dispersant Dielectric Constant: 78.5	

System

Temperature (°C): 25.0	Zeta Runs: 12
Count Rate (kcps): 2663.7	Measurement Position (mm): 2.00
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 11

Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -4.27	Peak 1: -4.27	100.0	6.44
Zeta Deviation (mV): 6.44	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.693	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality : Good			





Zeta Quality Report

Sample Name: Control peca 2 1
SOP Name: mansettings.dat
File Name: Angel 250311.dts
Record Number: 14
Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 05:13:17 p.m.

RESULT MEETS QUALITY CRITERIA

Phase Plot

Sample Details

Sample Name: Control peca 2 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: Angel 250311.dts

Dispersant Name: Water

Record Number: 14

Dispersant RI: 1.330

Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 05:

Viscosity (cP): 0.8872

Dispersant Dielectric Constant: 78.5

System

Temperature (°C): 25.0

Zeta Runs: 12

Count Rate (kcps): 2663.7

Measurement Position (mm): 2.00

Cell Description: Clear disposable zeta cell

Attenuator: 11

Results





Expert Advice

Zeta potential measurements

Low count rate (< 20 kcps), increase sample concentration

Distribution data good.

Size Distribution Report by Intensity

Sample Details

Sample Name: Quitosan 1
SOP Name: mansettings.dat
General Notes: ph5, 0.2mm

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 1	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 201...

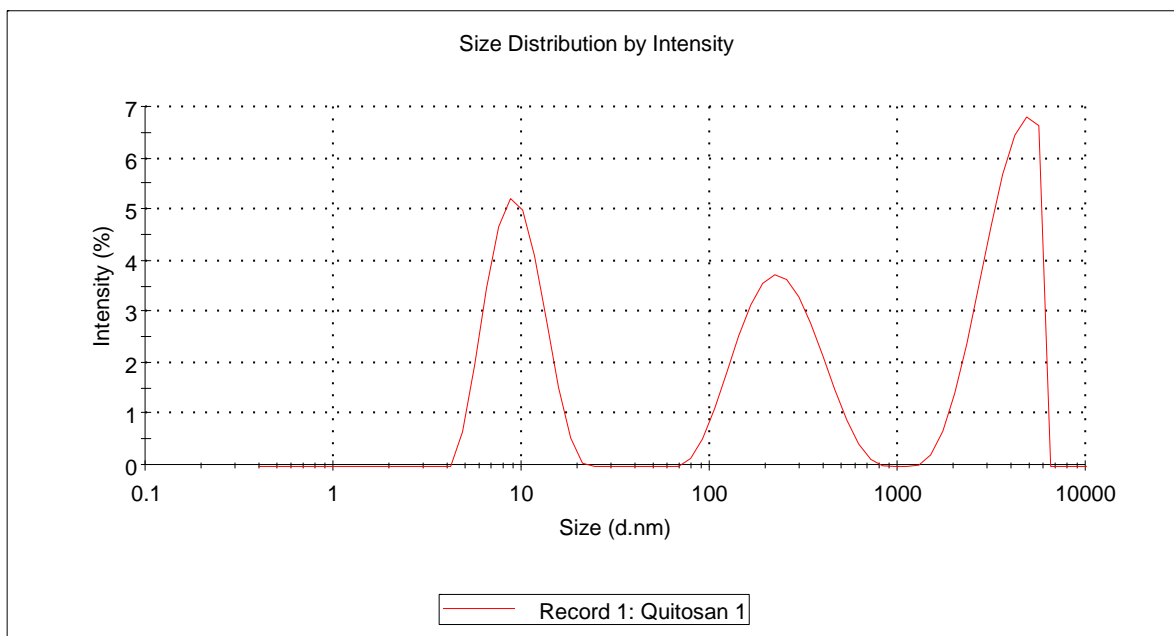
System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 239.4	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 8

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 328.3	Peak 1: 3905	38.5	1130
Pdl: 0.472	Peak 2: 255.0	31.5	118.6
Intercept: 0.163	Peak 3: 9.635	30.1	3.013

Result quality : POOR - see result quality report



Size Distribution Report by Volume

Sample Details

Sample Name: Quitosan 1
SOP Name: mansettings.dat
General Notes: ph5, 0.2mm

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 1	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 20...

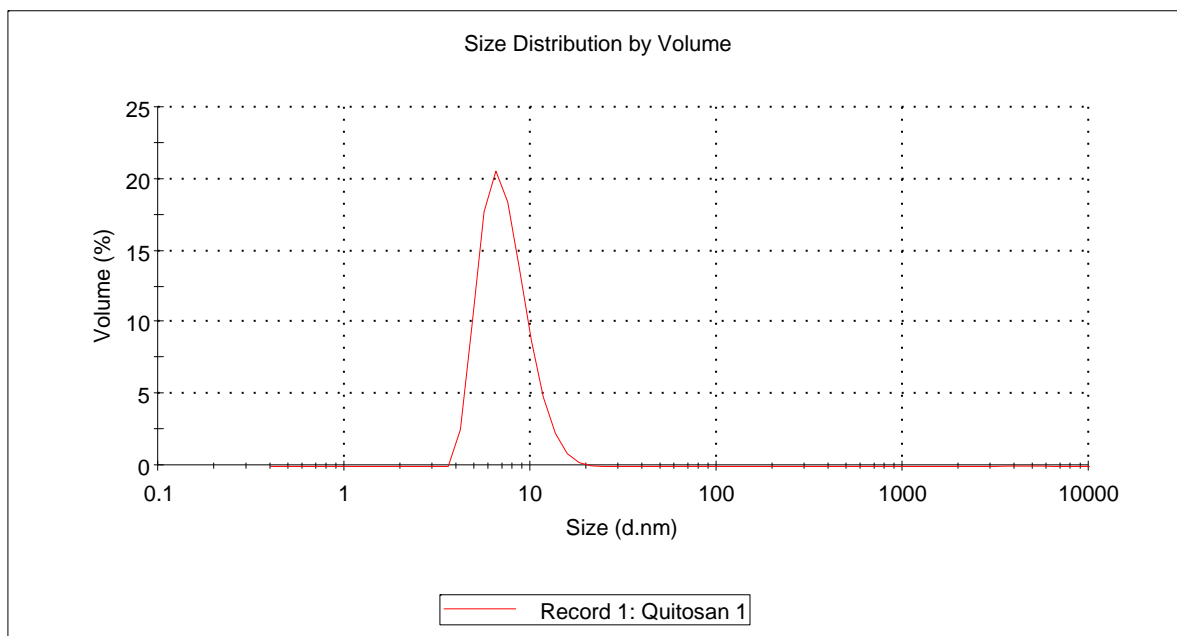
System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 239.4	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 8

Results

	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 328.3	Peak 1: 4299	0.1	1337
Pdl: 0.472	Peak 2: 262.6	0.0	141.6
Intercept: 0.163	Peak 3: 7.460	99.8	2.298

Result quality : POOR - see result quality report



Expanded Size Quality Report

Sample Name: Quitosan 1
SOP Name: mansettings.dat
File Name: Angel 250311.dts
Record Number: 1

Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 02:59:33 p.m.

Temperature (°C): 25.0

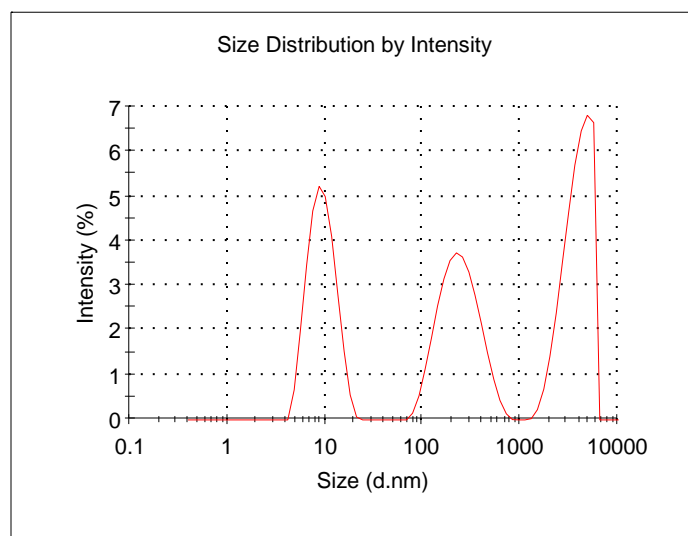
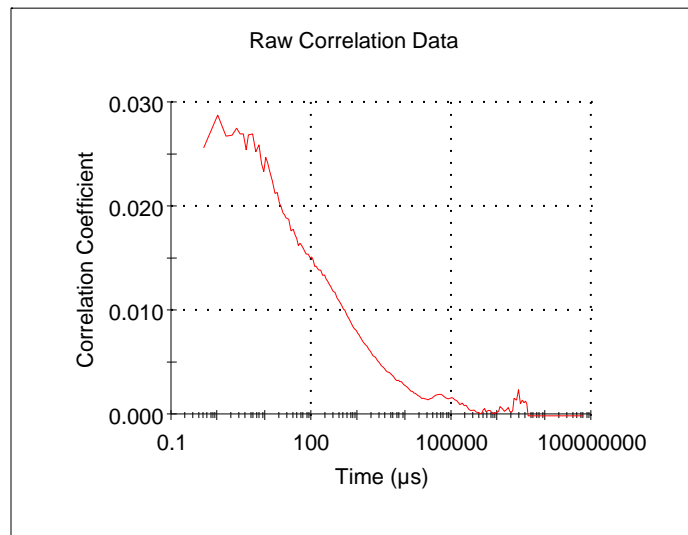
RESULT DOES NOT MEET QUALITY CRITERIA

Cumulant fit error high

- * Data quality too poor for cumulant analysis
- * Sample too polydisperse for cumulant analysis

In range figure is low (84%)

- * Presence of large or sedimenting particles
- * Sample fluorescence
- * Sample absorbance (coloured samples)



Correlogram

Sample Details

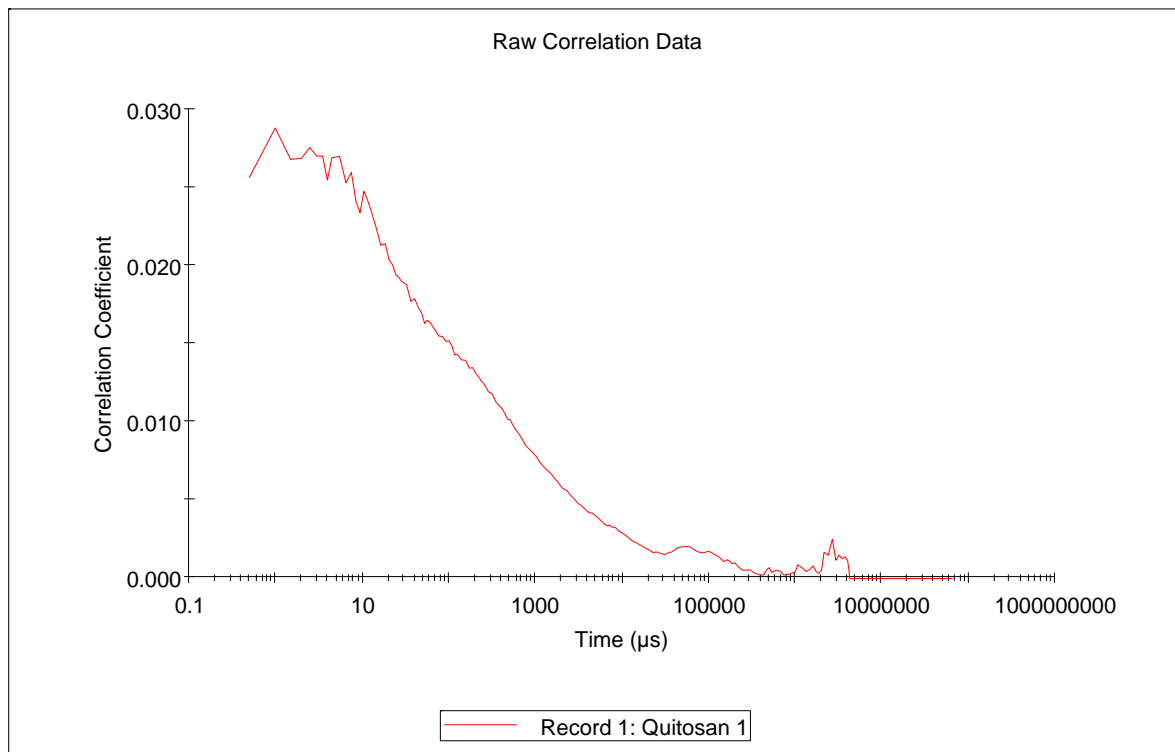
Sample Name: Quitosan 1
SOP Name: mansettings.dat
General Notes: ph5, 0.2mm

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 1	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 239.4	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 8

Results



Cumulants Fit

Sample Details

Sample Name: Quitosan 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes: ph5, 0.2mm

File Name: Angel 250311.dts

Dispersant Name: Water

Record Number: 1

Dispersant RI: 1.330

Material RI: 1.59

Viscosity (cP): 0.8872

Material Absorbtion: 0.01

Measurement Date: Viernes, 25 de Marzo de ...

System

Temperature (°C): 25.0

Duration Used (s): 60

Count Rate (kcps): 239.4

Measurement Position (mm): 5.50

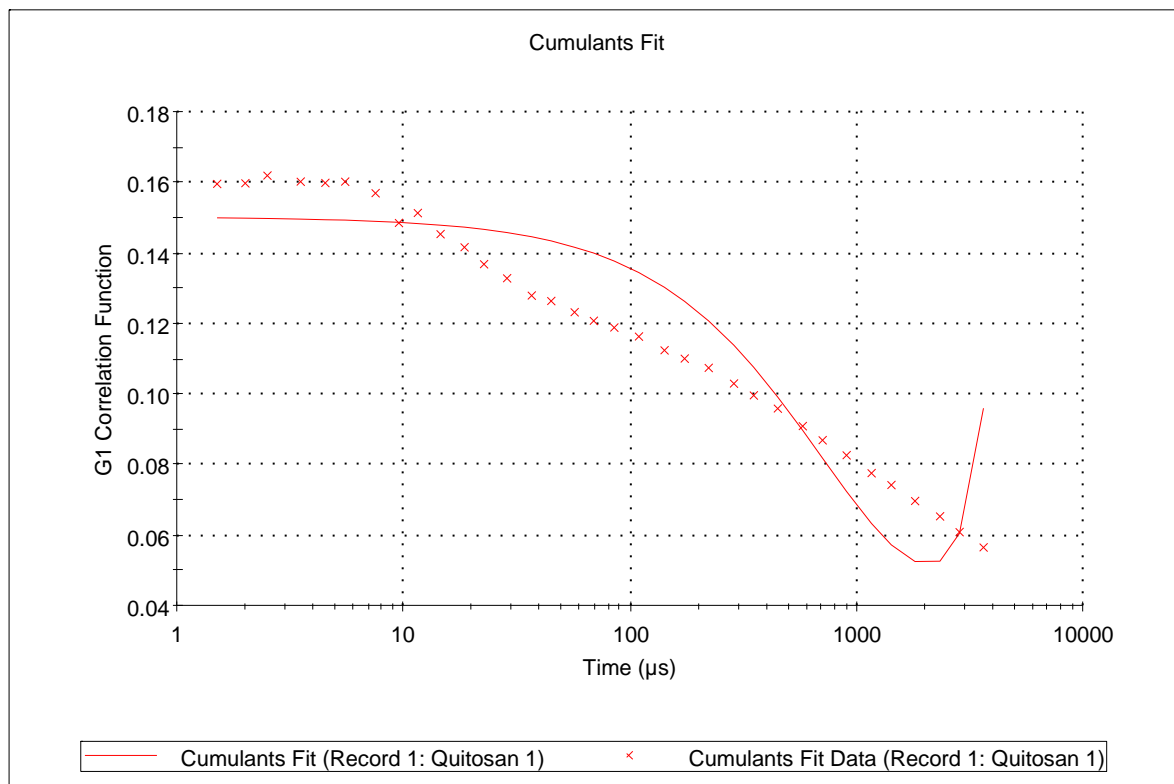
Derived Count Rate (kcps): 5441.2

Attenuator: 8

Cell Description: Clear disposable zeta cell

Results

Cumulants Fit Error: 0.0122



Distribution Fit

Sample Details

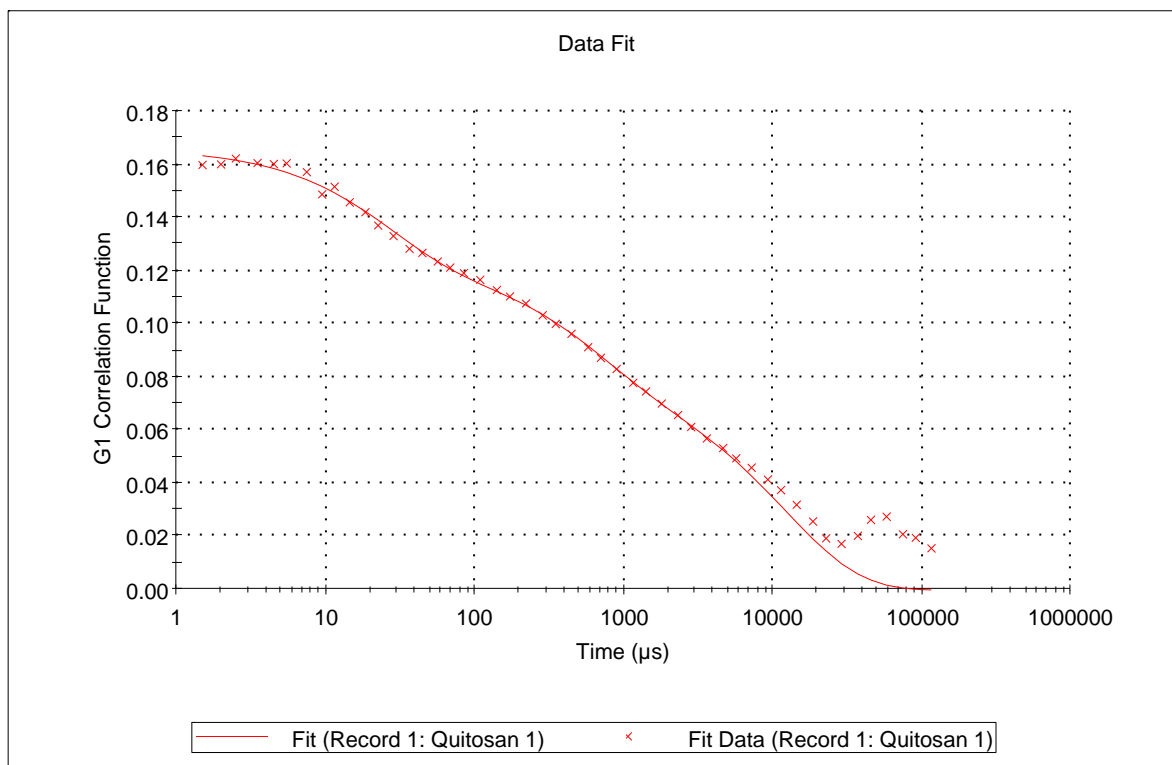
Sample Name: Quitosan 1
SOP Name: mansettings.dat
General Notes: ph5, 0.2mm

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 1	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de ...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 239.4	Measurement Position (mm): 5.50
Derived Count Rate (kcps): 5441.2	Attenuator: 8
Cell Description: Clear disposable zeta cell	

Results





Expert Advice

Size measurements

In range figure is low (84%).

- Presence of large or sedimenting particles.
- Sample fluorescence.
- Sample absorbance (coloured samples).

Cumulant fit error high.

- Data quality too poor for cumulant analysis.
- Sample too polydisperse for cumulant analysis.

Size Distribution Report by Intensity

Sample Details

Sample Name: Quitosan Control 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 8	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 201...

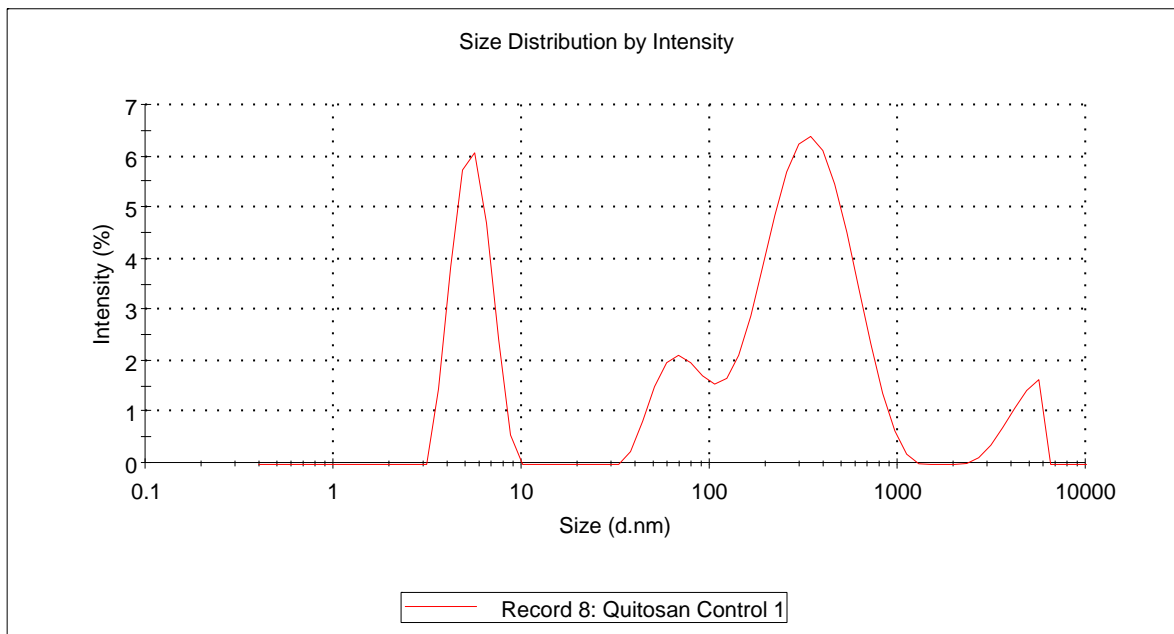
System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 183.3	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 10

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 53.19	Peak 1: 362.7	58.5	186.5
Pdl: 0.988	Peak 2: 5.525	24.4	1.188
Intercept: 0.897	Peak 3: 72.03	11.8	19.46

Result quality : **POOR - see result quality report**



Size Distribution Report by Volume

Sample Details

Sample Name: Quitosan Control 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 8	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 20...

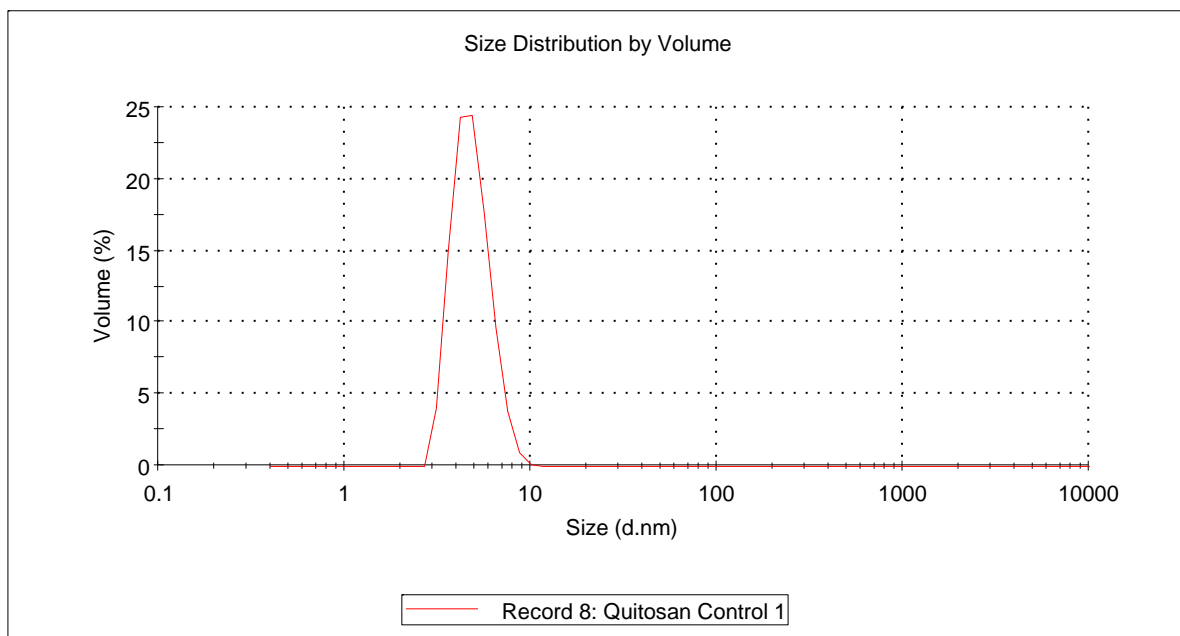
System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 183.3	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 10

Results

	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 53.19	Peak 1: 4.875	99.9	1.129
Pdl: 0.988	Peak 2: 60.77	0.0	20.07
Intercept: 0.897	Peak 3: 464.5	0.0	251.4

Result quality : **POOR - see result quality report**



Expanded Size Quality Report

Sample Name: Quitosan Control 1

SOP Name: mansettings.dat

File Name: Angel 250311.dts

Record Number: 8

Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 04:06:09 p.m.

Temperature (°C): 25.0

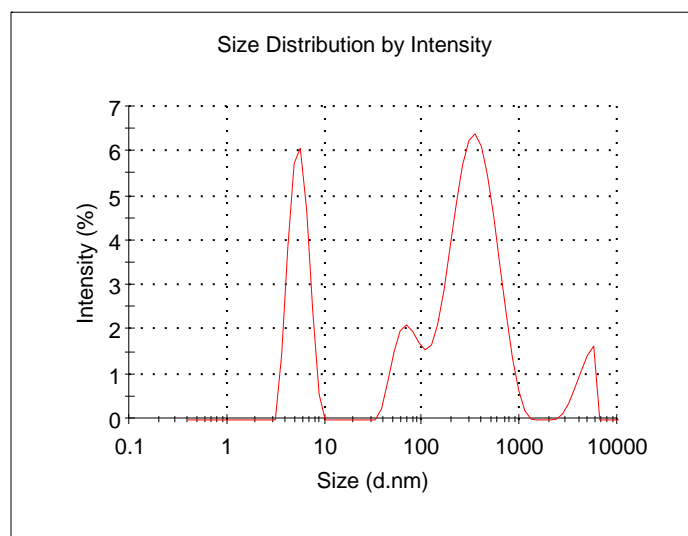
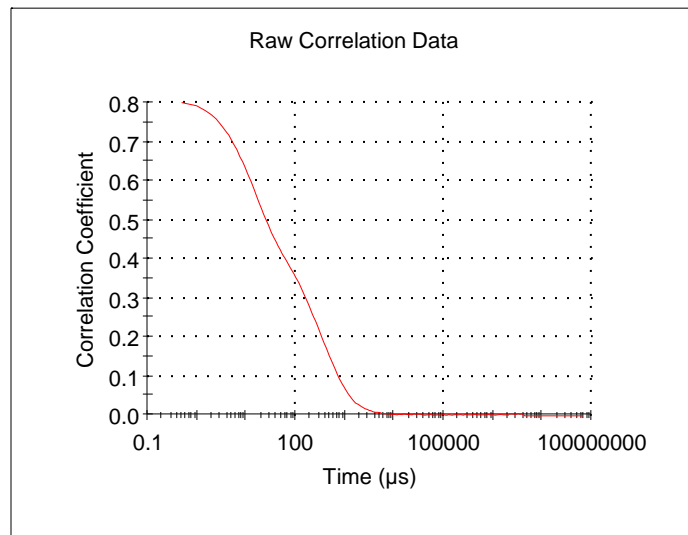
RESULT DOES NOT MEET QUALITY CRITERIA

Cumulant fit error high

- * Data quality too poor for cumulant analysis
- * Sample too polydisperse for cumulant analysis

Polydispersity index is very high (.988)

- * Sample is very polydisperse and may not be suitable for DLS measurements
- * Sample contains large particles/aggregates/dust
- * Wrong measurement position selected



Correlogram

Sample Details

Sample Name: Quitosan Control 1

SOP Name: mansettings.dat

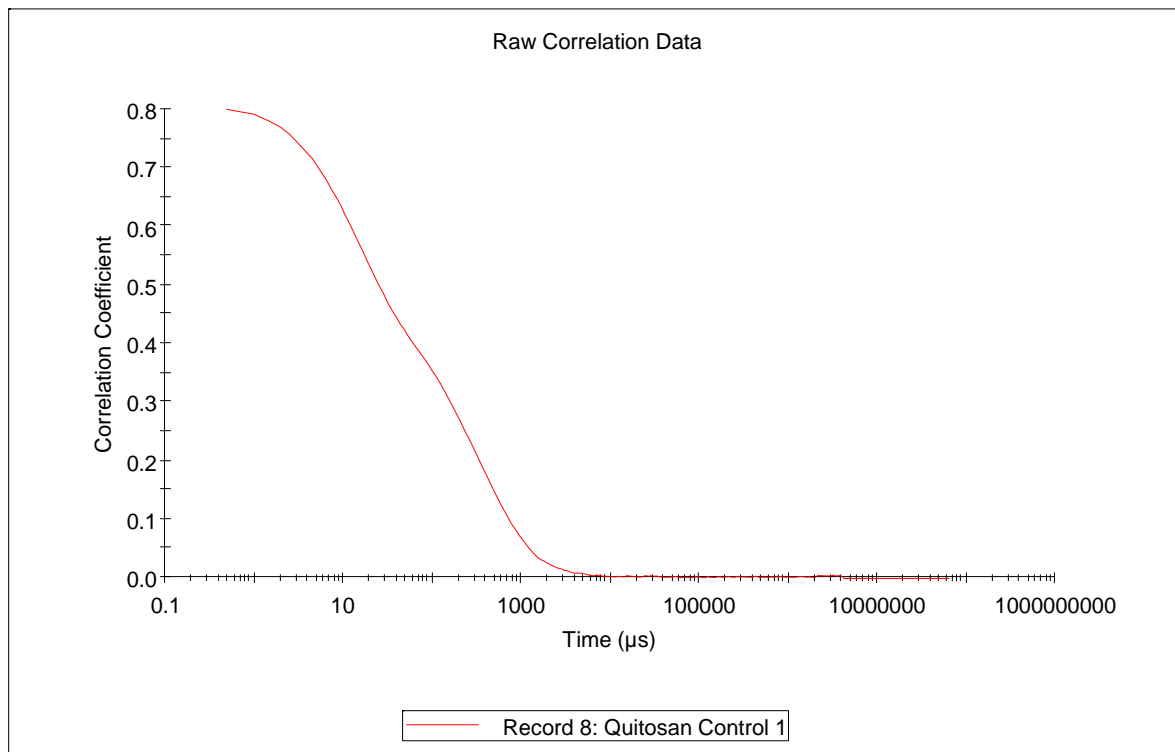
General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 8	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 183.3	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 10

Results



Cumulants Fit

Sample Details

Sample Name: Quitosan Control 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

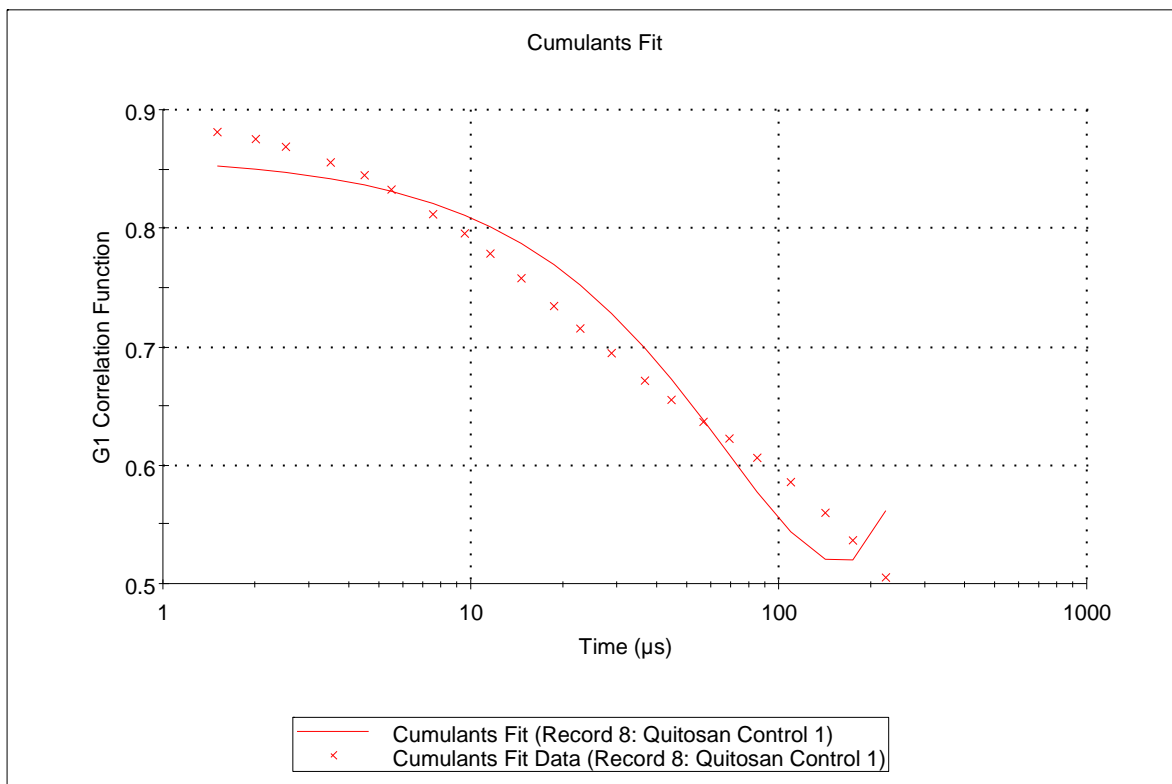
File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 8	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date: Viernes, 25 de Marzo de ...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 183.3	Measurement Position (mm): 5.50
Derived Count Rate (kcps): 652.4	Attenuator: 10
Cell Description: Clear disposable zeta cell	

Results

Cumulants Fit Error: 0.0251



Distribution Fit

Sample Details

Sample Name: Quitosan Control 1

SOP Name: mansettings.dat

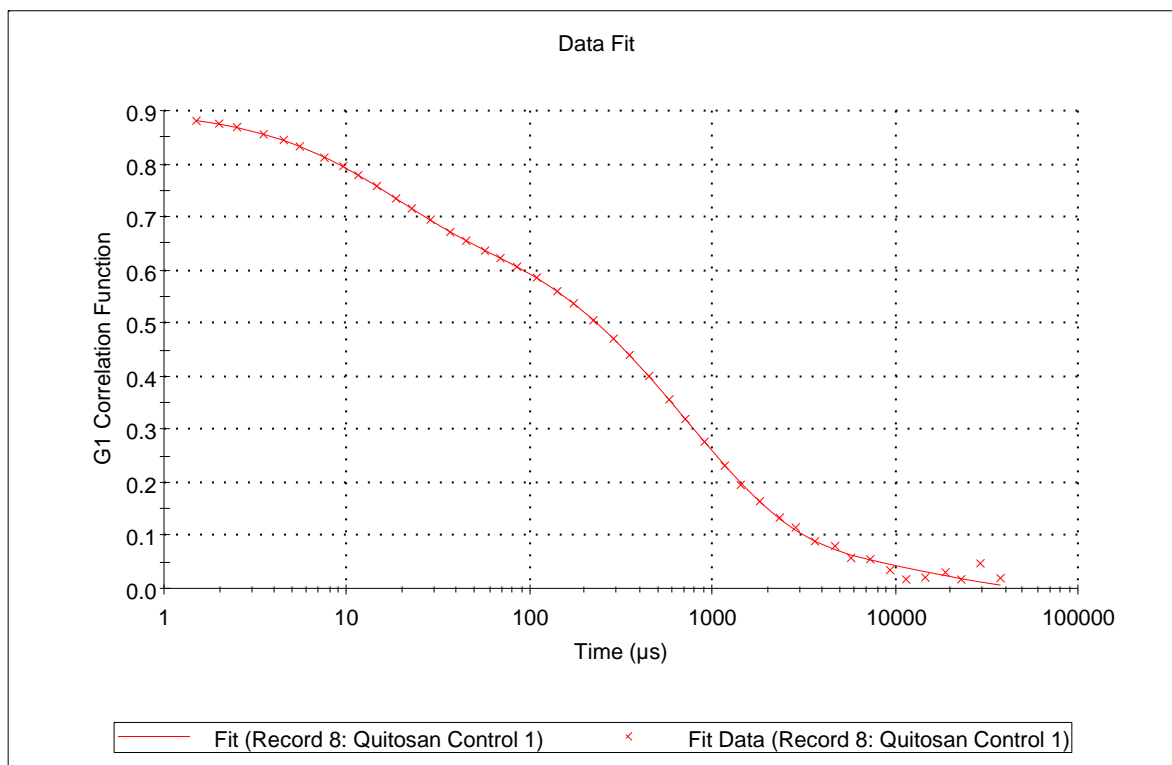
General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 8	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de ...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 183.3	Measurement Position (mm): 5.50
Derived Count Rate (kcps): 652.4	Attenuator: 10
Cell Description: Clear disposable zeta cell	

Results





Expert Advice

Size measurements

Polydispersity index is very high (0.988).

Sample is very polydisperse and may not be suitable for DLS measurements.
Sample contains large particles/aggregates/dust.
Wrong measurement position selected.

Cumulant fit error high.

Data quality too poor for cumulant analysis.
Sample too polydisperse for cumulant analysis.

Size Distribution Report by Intensity

Sample Details

Sample Name: Sistema quitosan/peca 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 9	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 201...

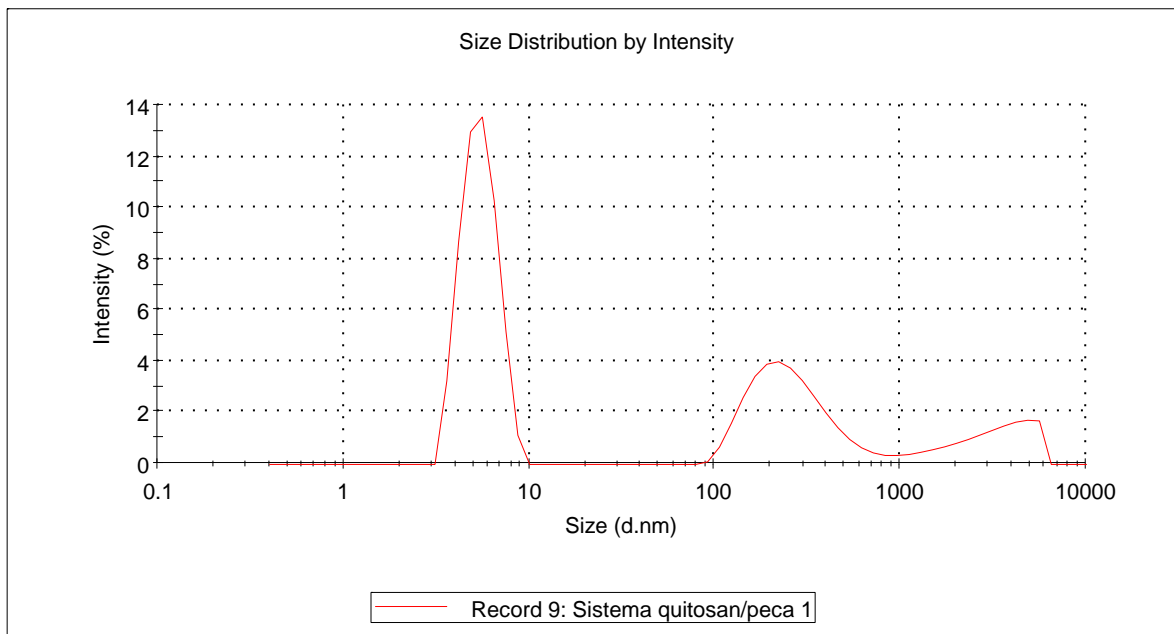
System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 274.9	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 11

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 24.20	Peak 1: 5.500	54.8	1.172
Pdl: 0.436	Peak 2: 278.4	32.0	154.7
Intercept: 0.823	Peak 3: 3337	13.2	1399

Result quality : **POOR - see result quality report**



Size Distribution Report by Volume

Sample Details

Sample Name: Sistema quitosan/peca 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 9	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 20...

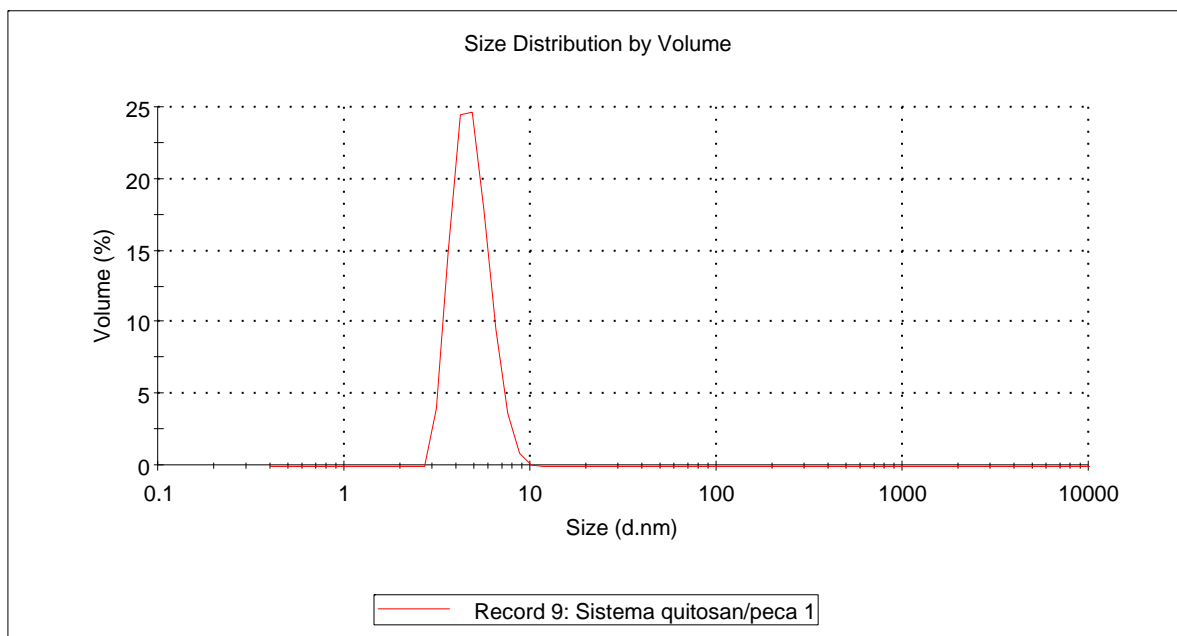
System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 274.9	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 11

Results

	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 24.20	Peak 1: 4.866	100.0	1.117
Pdl: 0.436	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.823	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : **POOR - see result quality report**



Expanded Size Quality Report

Sample Name: Sistema quitosan/peca 1

SOP Name: mansettings.dat

File Name: Angel 250311.dts

Record Number: 9

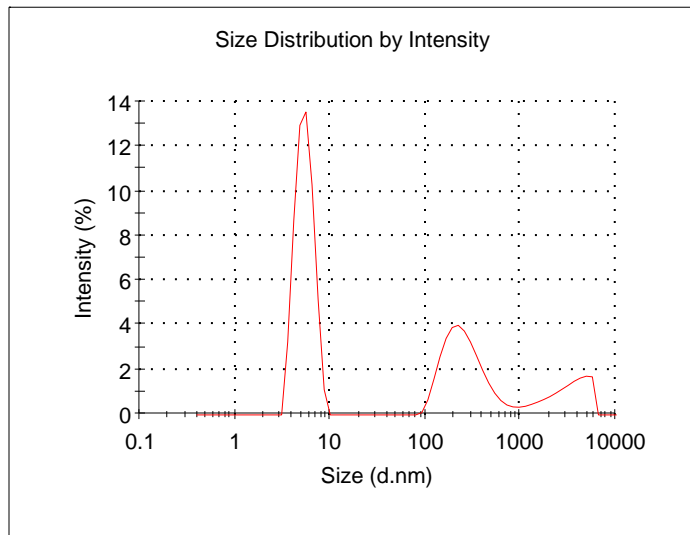
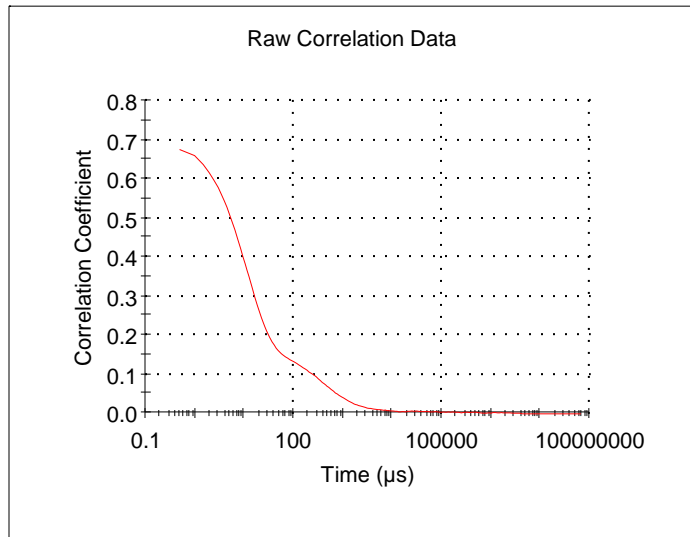
Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 04:17:24 p.m.

Temperature (°C): 25.0

RESULT DOES NOT MEET QUALITY CRITERIA

Cumulant fit error high

- * Data quality too poor for cumulant analysis
- * Sample too polydisperse for cumulant analysis



Correlogram

Sample Details

Sample Name: Sistema quitosan/peca 1

SOP Name: mansettings.dat

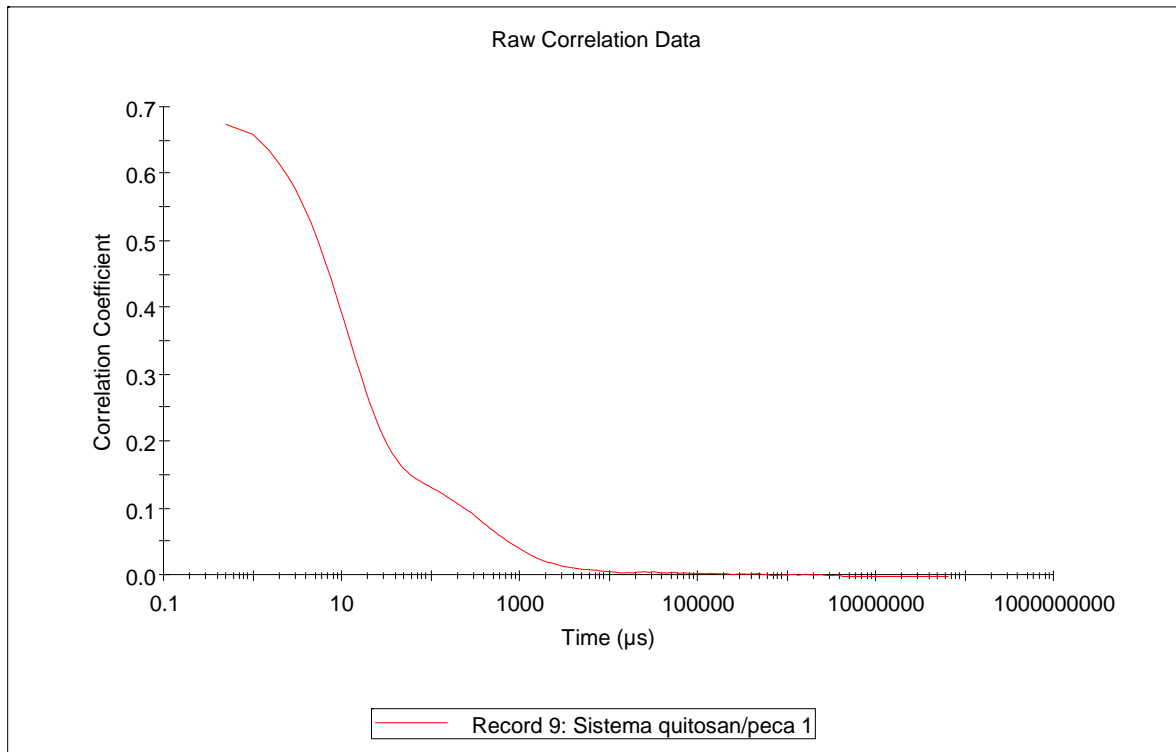
General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 9	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 274.9	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 11

Results



Cumulants Fit

Sample Details

Sample Name: Sistema quitosan/peca 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

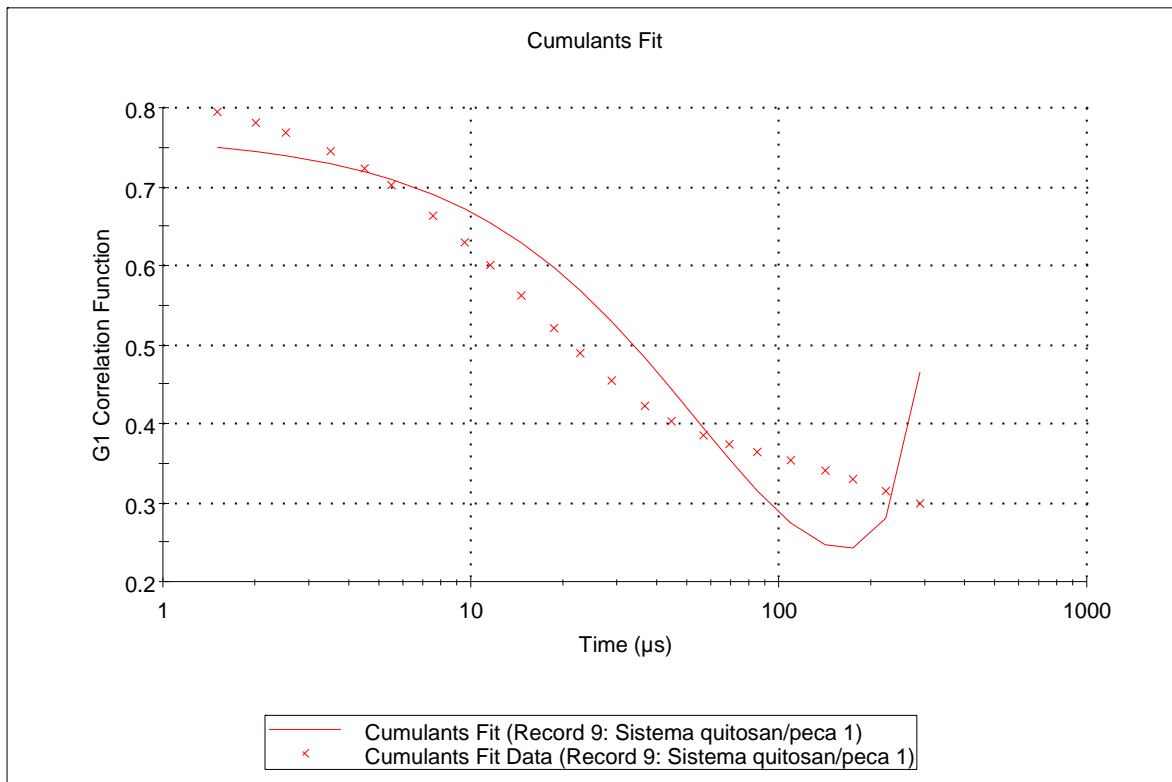
File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 9	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date: Viernes, 25 de Marzo de ...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 274.9	Measurement Position (mm): 5.50
Derived Count Rate (kcps): 274.9	Attenuator: 11
Cell Description: Clear disposable zeta cell	

Results

Cumulants Fit Error: 0.0496



Distribution Fit

Sample Details

Sample Name: Sistema quitosan/peca 1

SOP Name: mansettings.dat

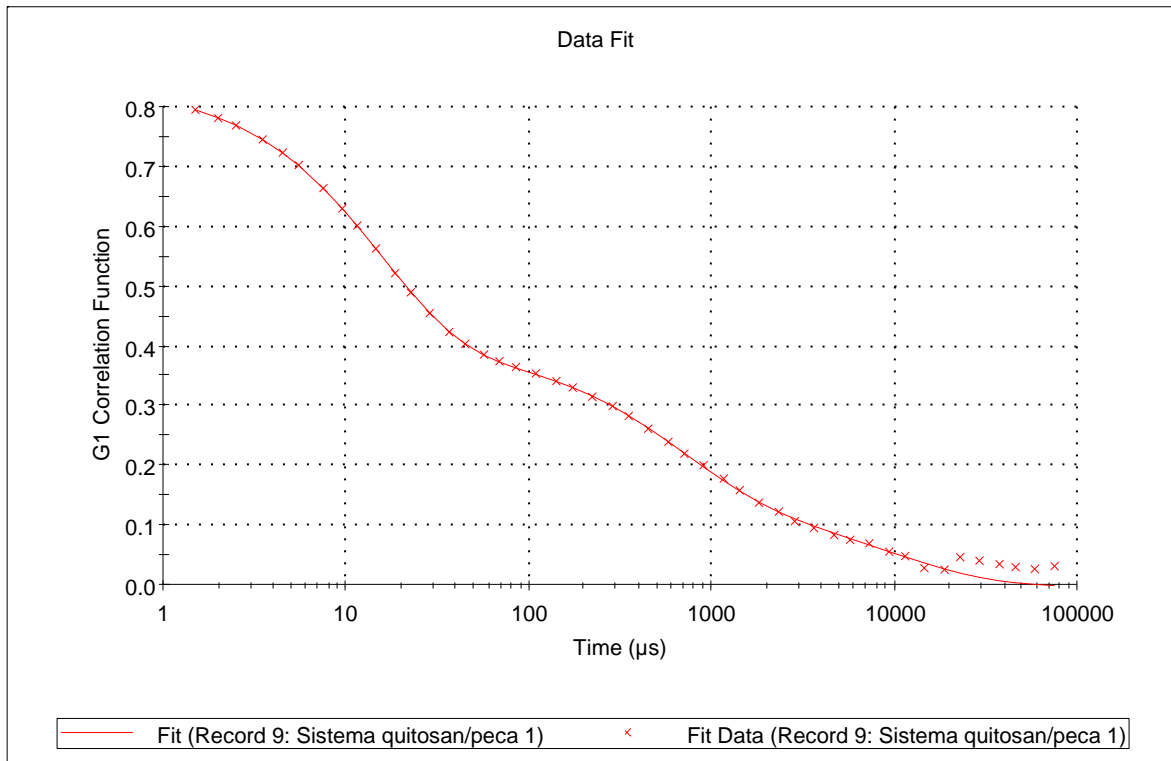
General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 9	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de ...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 274.9	Measurement Position (mm): 5.50
Derived Count Rate (kcps): 274.9	Attenuator: 11
Cell Description: Clear disposable zeta cell	

Results





Expert Advice

Size measurements

Cumulant fit error high.

Data quality too poor for cumulant analysis.

Sample too polydisperse for cumulant analysis.

Size Distribution Report by Intensity

Sample Details

Sample Name: Control peca 1 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 12	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 201...

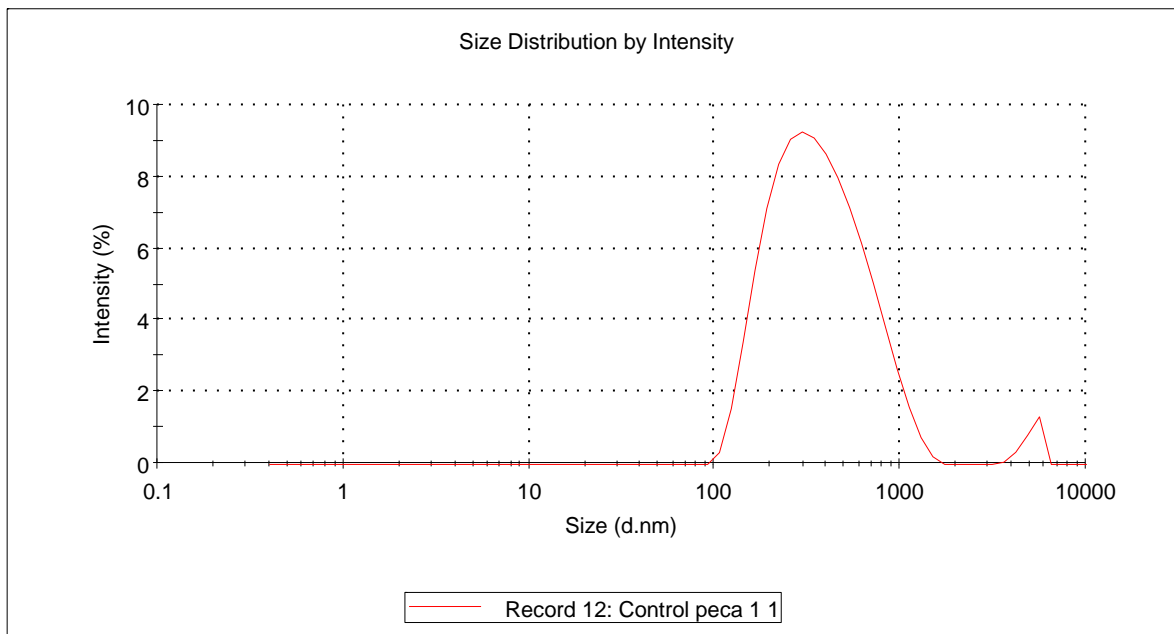
System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 191.1	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 8

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 298.2	Peak 1: 409.4	97.5	240.6
Pdl: 0.410	Peak 2: 5076	2.5	566.7
Intercept: 0.935	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : **POOR - see result quality report**



Size Distribution Report by Volume

Sample Details

Sample Name: Control peca 1 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

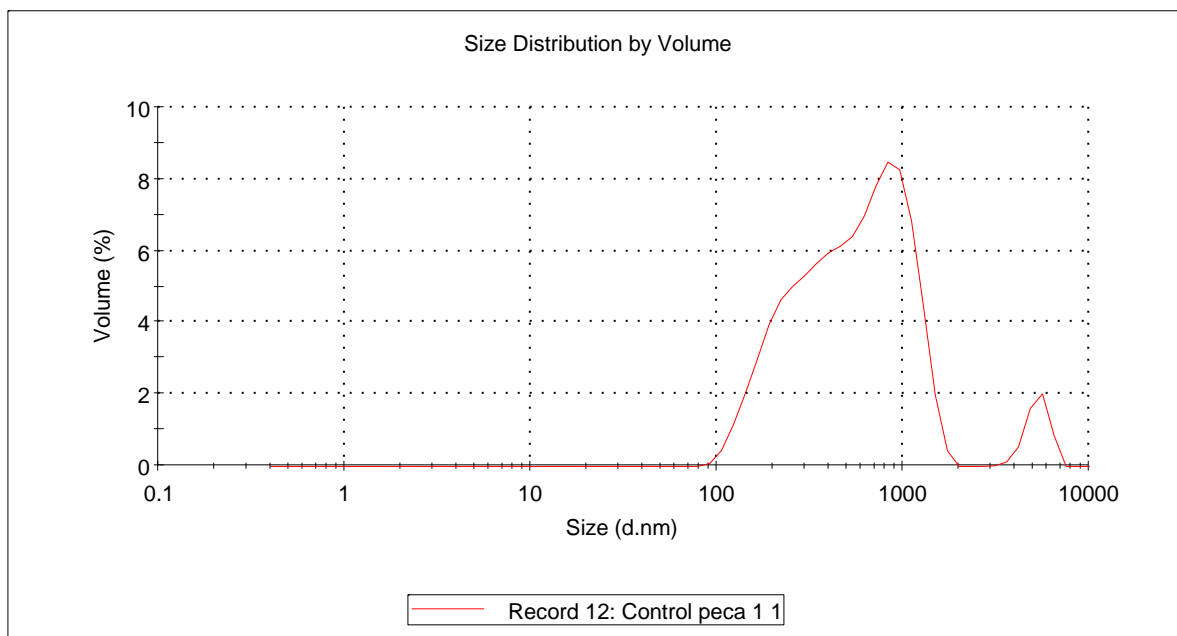
File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 12	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 20...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 191.1	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 8

Results

	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 298.2	Peak 1: 608.6	94.8	356.7
Pdl: 0.410	Peak 2: 5263	5.2	736.1
Intercept: 0.935	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality : POOR - see result quality report			



Expanded Size Quality Report

Sample Name: Control peca 1 1

SOP Name: mansettings.dat

File Name: Angel 250311.dts

Record Number: 12

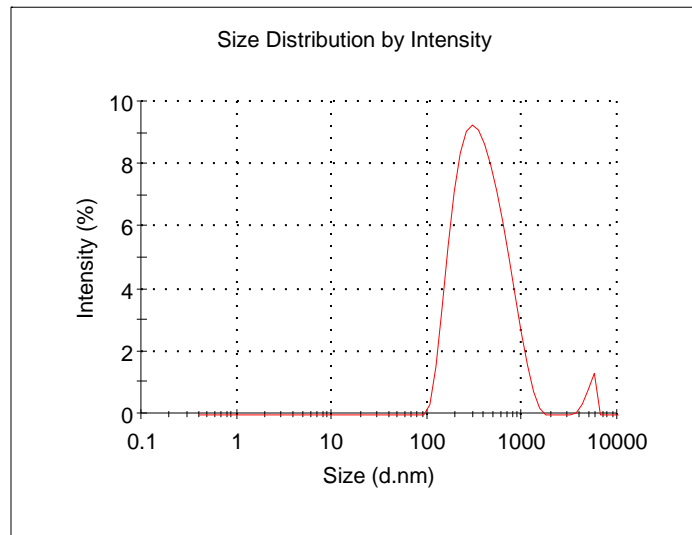
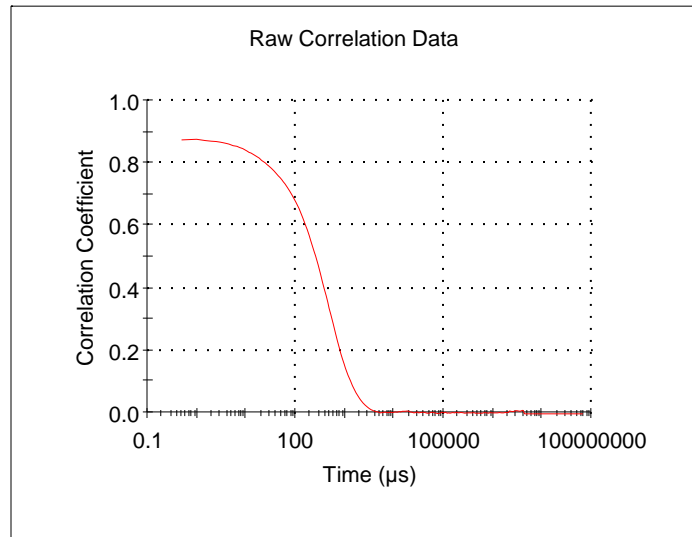
Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 04:49:49 p.m.

Temperature (°C): 25.0

RESULT DOES NOT MEET QUALITY CRITERIA

Cumulant fit error high

- * Data quality too poor for cumulant analysis
- * Sample too polydisperse for cumulant analysis



Correlogram

Sample Details

Sample Name: Control peca 1 1

SOP Name: mansettings.dat

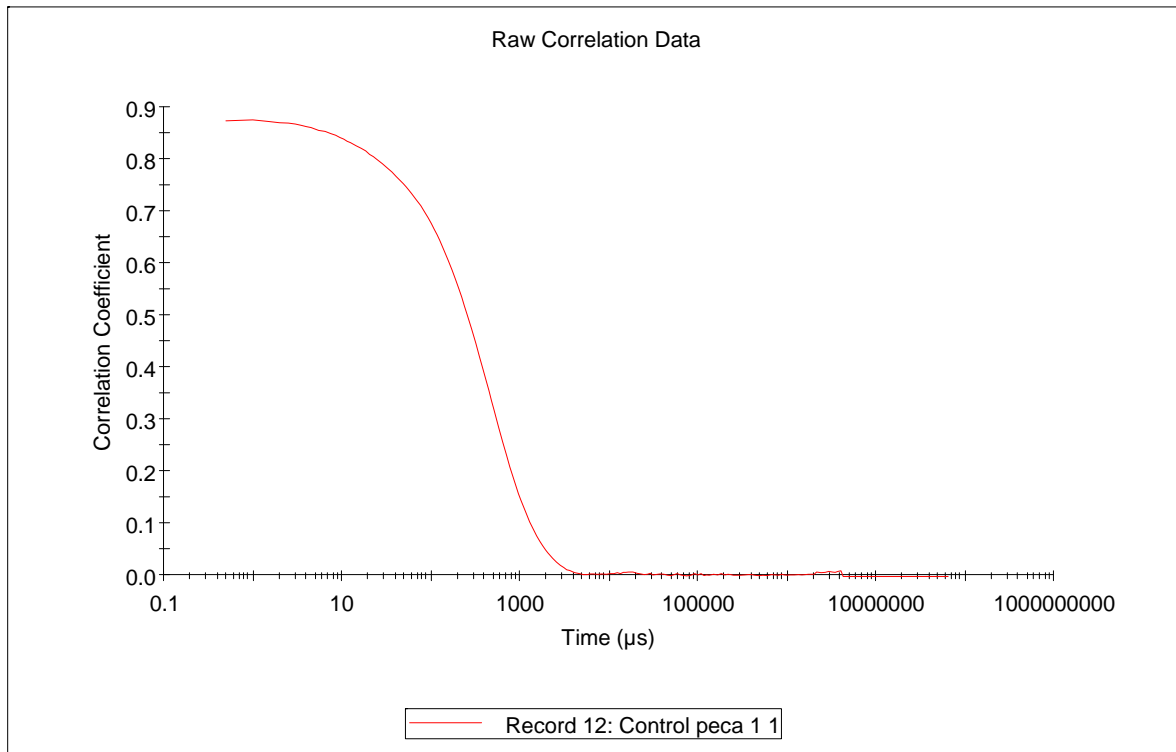
General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 12	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 191.1	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 8

Results



Cumulants Fit

Sample Details

Sample Name: Control peca 1 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

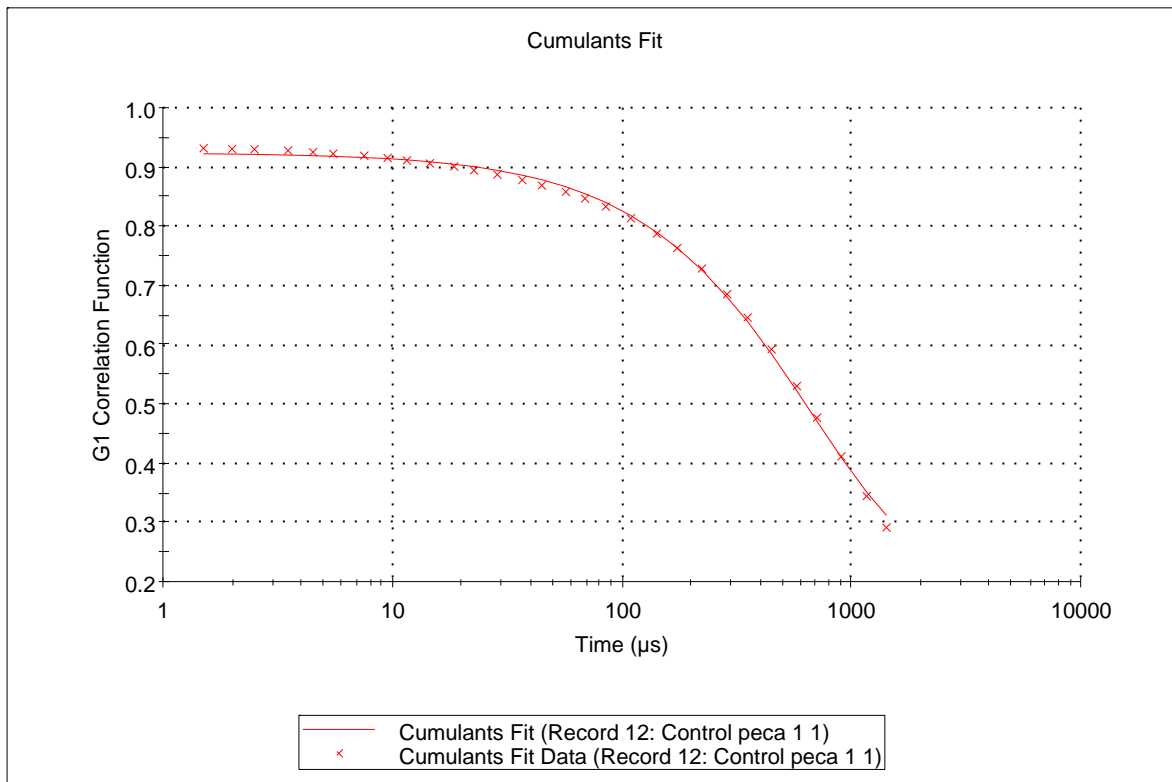
File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 12	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date: Viernes, 25 de Marzo de ...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 191.1	Measurement Position (mm): 5.50
Derived Count Rate (kcps): 4343.8	Attenuator: 8
Cell Description: Clear disposable zeta cell	

Results

Cumulants Fit Error: 0.00643



Distribution Fit

Sample Details

Sample Name: Control peca 1 1

SOP Name: mansettings.dat

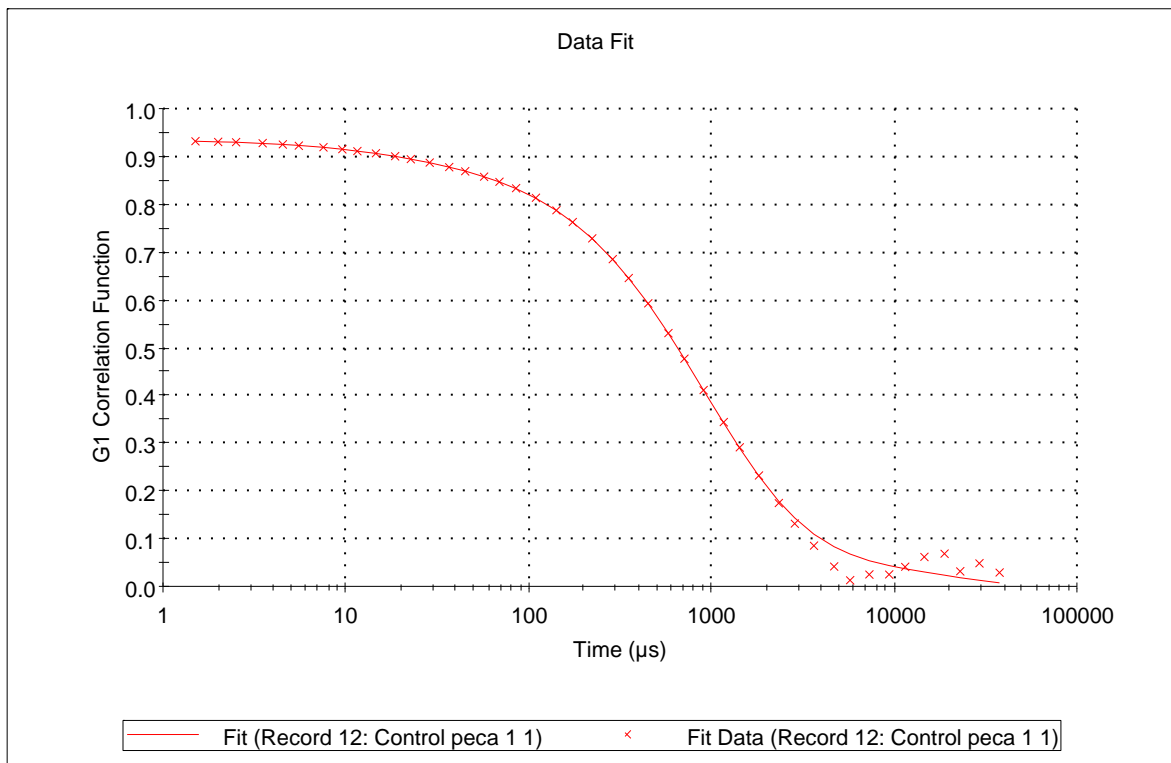
General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 12	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de ...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 191.1	Measurement Position (mm): 5.50
Derived Count Rate (kcps): 4343.8	Attenuator: 8
Cell Description: Clear disposable zeta cell	

Results





Expert Advice

Size measurements

Cumulant fit error high.

Data quality too poor for cumulant analysis.
Sample too polydisperse for cumulant analysis.

Size Distribution Report by Intensity

Sample Details

Sample Name: Control peca 2 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 13	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 201...

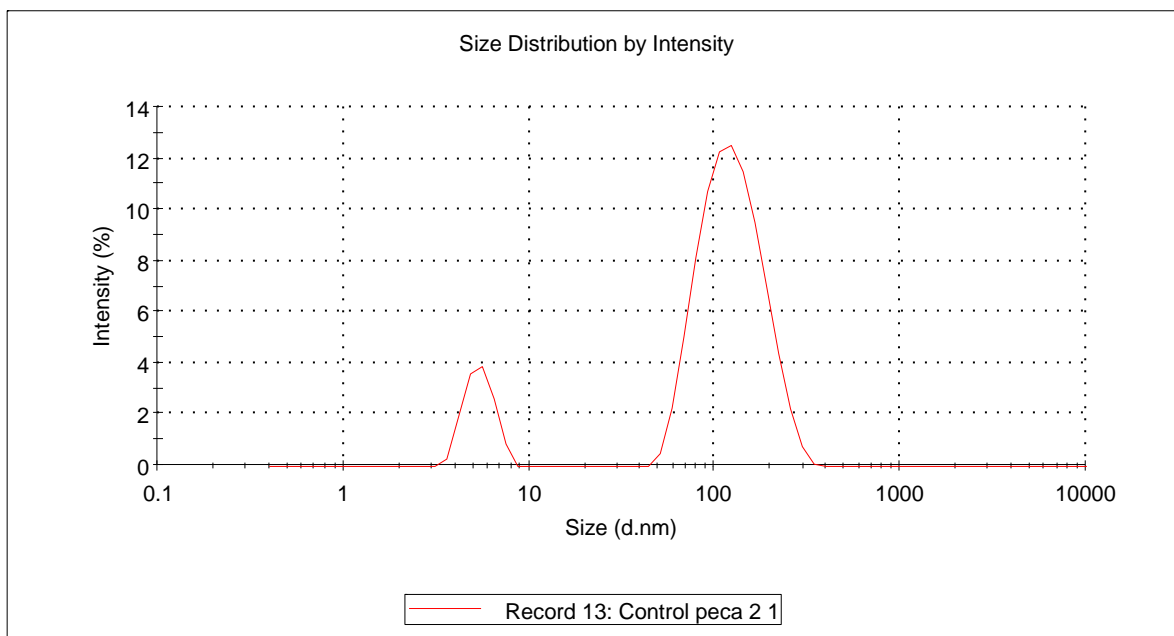
System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 356.4	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 10

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 63.95	Peak 1: 129.6	86.8	49.54
Pdl: 0.639	Peak 2: 5.457	13.2	0.9592
Intercept: 0.889	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : **POOR - see result quality report**



Size Distribution Report by Volume

Sample Details

Sample Name: Control peca 2 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 13	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 20...

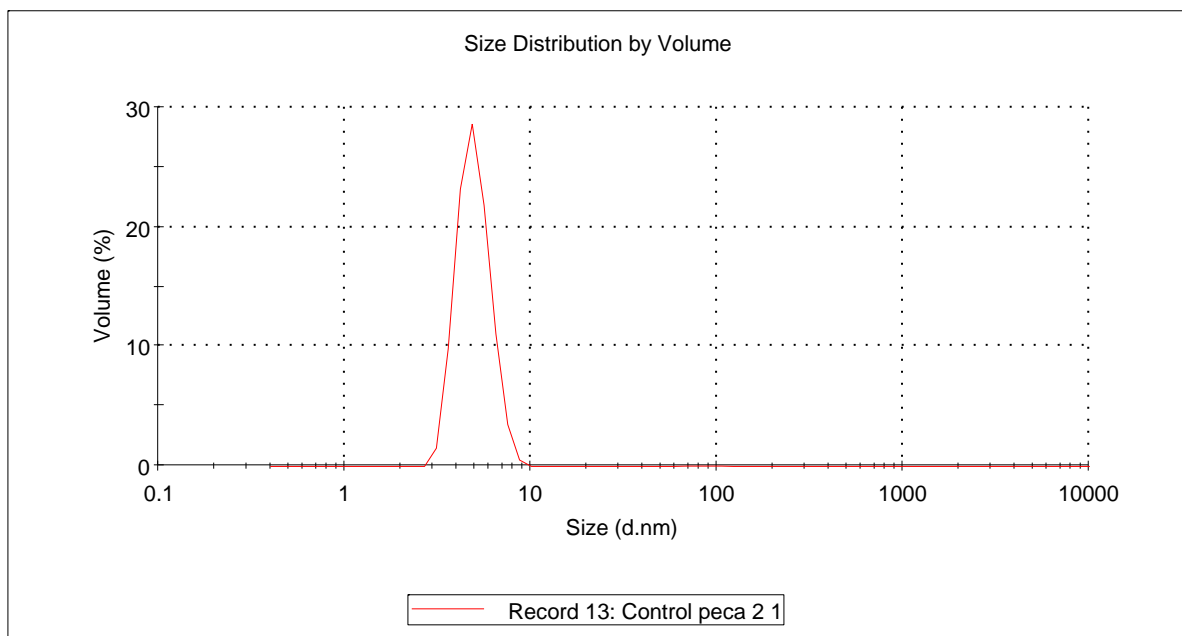
System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 356.4	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 10

Results

	Diam. (nm)	% Volume	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 63.95	Peak 1: 104.1	0.1	46.89
Pdl: 0.639	Peak 2: 5.012	99.9	1.016
Intercept: 0.889	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : **POOR - see result quality report**



Expanded Size Quality Report

Sample Name: Control peca 2 1

SOP Name: mansettings.dat

File Name: Angel 250311.dts

Record Number: 13

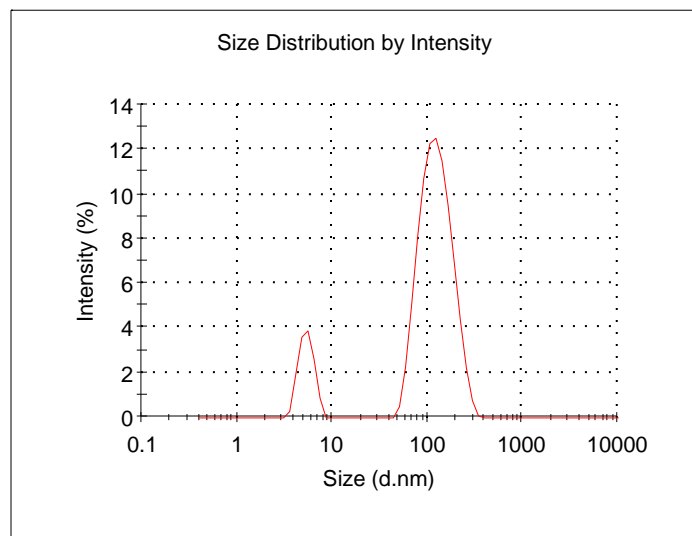
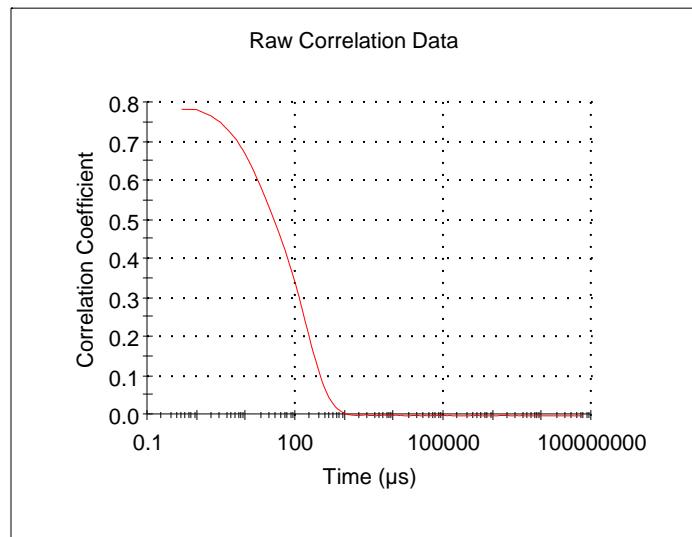
Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2011 05:11:25 p.m.

Temperature (°C): 25.0

RESULT DOES NOT MEET QUALITY CRITERIA

Cumulant fit error high

- * Data quality too poor for cumulant analysis
- * Sample too polydisperse for cumulant analysis



Correlogram

Sample Details

Sample Name: Control peca 2 1

SOP Name: mansettings.dat

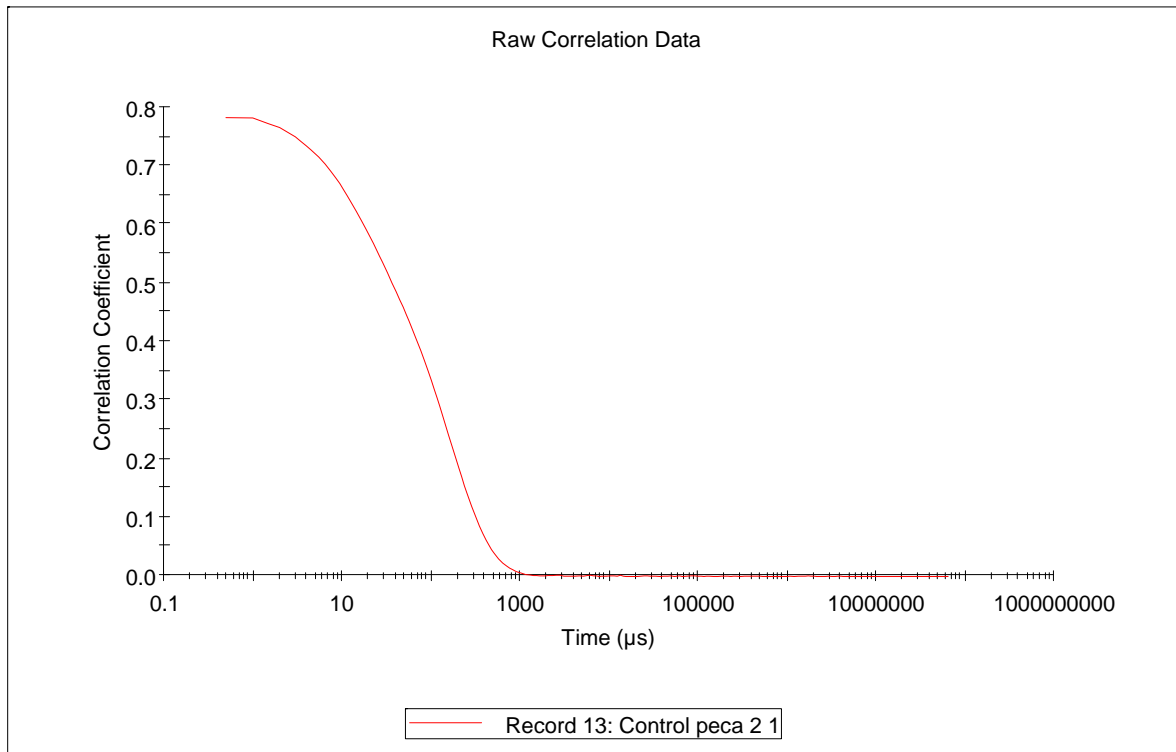
General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 13	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de 2...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 356.4	Measurement Position (mm): 5.50
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 10

Results



Cumulants Fit

Sample Details

Sample Name: Control peca 2 1

SOP Name: mansettings.dat

General Notes:

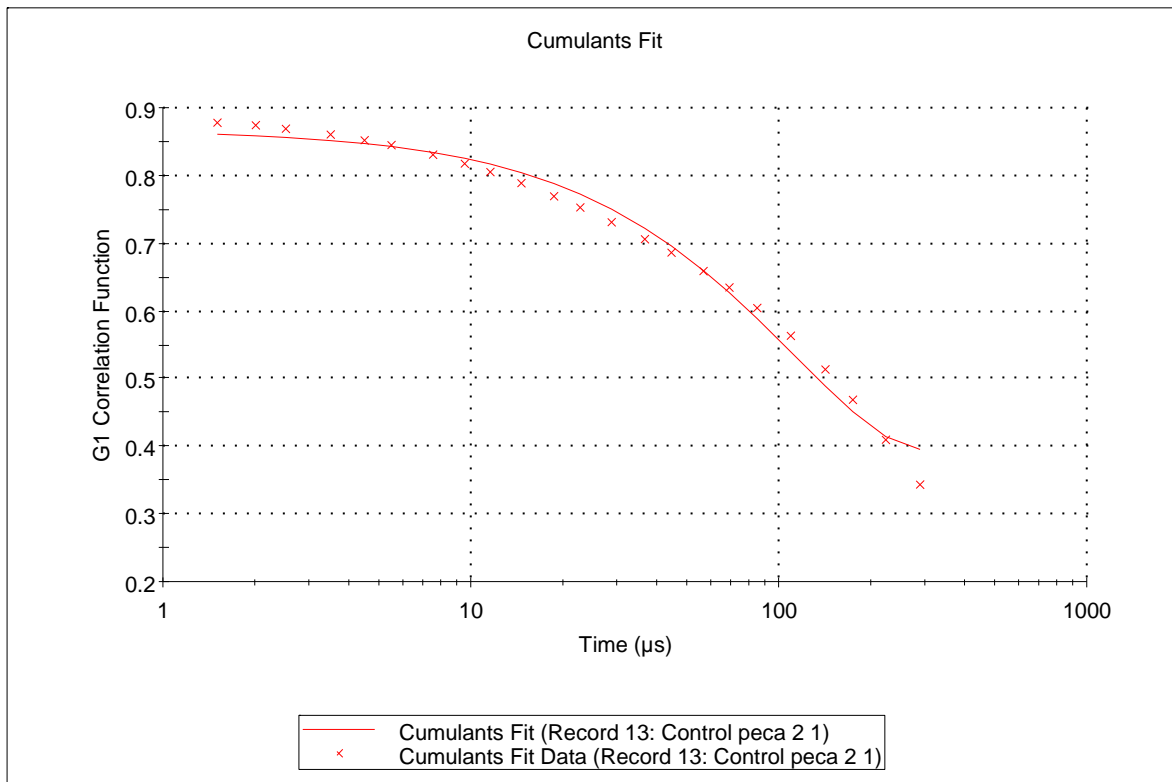
File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 13	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date: Viernes, 25 de Marzo de ...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 356.4	Measurement Position (mm): 5.50
Derived Count Rate (kcps): 1268.3	Attenuator: 10
Cell Description: Clear disposable zeta cell	

Results

Cumulants Fit Error: 0.0145



Distribution Fit

Sample Details

Sample Name: Control peca 2 1

SOP Name: mansettings.dat

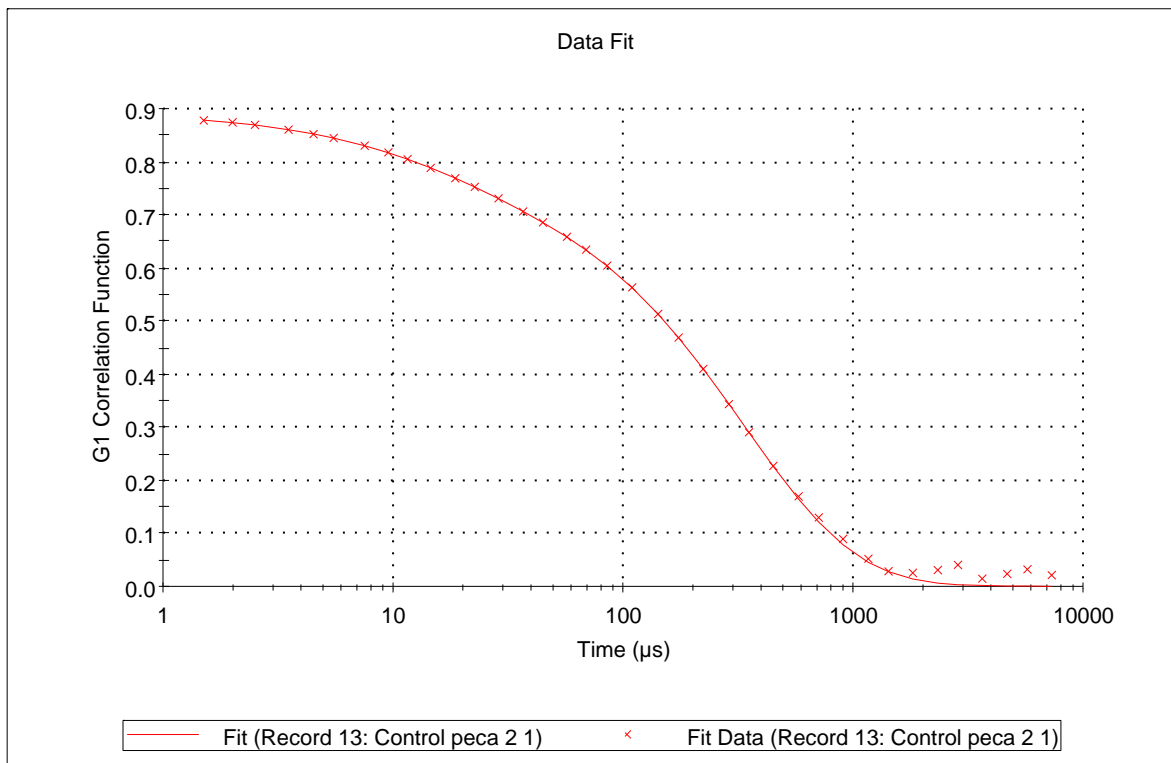
General Notes:

File Name: Angel 250311.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 13	Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59	Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbtion: 0.01	Measurement Date and Time: Viernes, 25 de Marzo de ...

System

Temperature (°C): 25.0	Duration Used (s): 60
Count Rate (kcps): 356.4	Measurement Position (mm): 5.50
Derived Count Rate (kcps): 1268.3	Attenuator: 10
Cell Description: Clear disposable zeta cell	

Results





Expert Advice

Size measurements

Cumulant fit error high.

Data quality too poor for cumulant analysis.

Sample too polydisperse for cumulant analysis.