

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE
POLÍMERO EN LAS CARACTERÍSTICAS DE
NANOPARTÍCULAS**

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica

Noelia Delgado Ramos
Tutora Carmen María Évora García
Grado en Farmacia
Curso 2018/2019

1. Abstract	3
2. Resumen	3
3. Introducción	4
4. Objetivo	6
5. Material y métodos	
5.1 Materiales	7
5.2 Método de elaboración	7
5.3 Caracterización de las nanopartículas	8
5.4 Determinación de la estabilidad	9
6. Resultados y Discusión	
6.1 Efecto de la concentración de PLGA sobre las características de las nanopartículas	9
6.2 Influencia de la temperatura a lo largo del tiempo sobre las características de las nanopartículas	12
7. Conclusiones	17
8. Anexo	18
9. Referencias	24

1. ABSTRACT

Nanotechnology presents promising therapeutic applications in the directed administration of drugs, with all the advantages that it implies. In this sense, the study of the characteristics of the nanoparticles and the factors that influence their elaboration is fundamental because it will condition the size, shape, surface load, route of administration, biodistribution, stability, efficacy of encapsulation and the type of drug being capsuled.

The objective of the present study was the preparation of polymeric nanoparticles by double emulsion evaporation and modified nanoprecipitation to evaluate the influence of the polymer concentration on its characteristics (size, potential Z and index of polydispersion). To that end, two types of poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) (RESOMER® RG 502 and RG 503) were used, at three different concentrations (5, 20 and 40 mg/ml).

The results showed that the nanoparticles produced by both methods present monodisperse size distribution. Likewise, an increase in size was observed with the concentration of polymer and values of potential Z negative and practically neutral, independently of the molecular weight of the polymer used. In terms of stability, no significant changes were detected in any of the parameters within the time interval studied.

2. RESUMEN

La nanotecnología presenta prometedoras aplicaciones terapéuticas en la administración dirigida de fármacos, con todas las ventajas que ello supone. En este sentido, el estudio de las características de las nanopartículas y de los factores que influyen en su elaboración es fundamental dado que va a condicionar el tamaño, forma, carga superficial, vía de administración, biodistribución, estabilidad, eficacia de encapsulación y tipo de fármaco que se encapsule.

El objetivo del presente estudio fue la preparación de nanopartículas poliméricas por doble emulsión evaporación y nanoprecipitación modificada para evaluar la influencia de la concentración de polímero sobre sus características (tamaño, potencial Z e índice de polidispersidad). Para ello, se emplearon dos tipos de poli (D, L- ácido láctico-co-glicólico) (RESOMER® RG 502 y RG 503), a tres concentraciones distintas (5, 20 y 40 mg/ml).

Los resultados mostraron que las nanopartículas elaboradas por ambos métodos presentan distribución de tamaño monodispersa. Así mismo, se observó un aumento de tamaño con la concentración de polímero y valores de potencial Z negativos y prácticamente neutros, independientemente del peso molecular del polímero utilizado. En lo relativo a la estabilidad, no se detectaron cambios importantes en ninguno de los parámetros dentro del intervalo de tiempo estudiado.

3. INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas son sistemas de transporte de fármacos con un tamaño comprendido entre los 10 y 1000 nm (1), que posibilitan una administración dirigida. Su pequeño tamaño permite aumentar la solubilidad y biodisponibilidad de los principios activos, incrementar la penetración celular y el tiempo de permanencia en el organismo. Con todo ello, la eficacia y tolerabilidad de los fármacos aumenta y, como consecuencia, el índice terapéutico (2). Sin embargo, no es fácil alcanzar estos objetivos y, actualmente, se trabaja intensamente en la dirección específica al órgano/células diana modificando la composición y características superficiales. Evidentemente la presencia de partículas extrañas al organismo activa el sistema fagocítico mononuclear y, como consecuencia, se produce su desaparición del torrente sanguíneo. Una de las estrategias más utilizadas para enmascarar a las nanopartículas y evitar su fagocitosis es la funcionalización de su superficie con cadenas de polietilenglicol. Este recurso sólo es un primer paso puesto que lo único que facilitaría es una mayor permanencia de las partículas en sangre y una mayor probabilidad de que alcancen su objetivo terapéutico (3). No obstante, en la mayoría de los casos esto no es suficiente y resulta necesario añadir un componente más a su superficie para aumentar el reconocimiento de las partículas por parte de la diana. En este sentido, cabe desatacar la incorporación de anticuerpos y, más recientemente, de aptámeros (4). Con estas palabras lo único que se ha intentado es poner en evidencia la dificultad que conlleva elaborar unas nanopartículas que resulten realmente eficaces, por lo que en este trabajo sólo se pretende empezar a familiarizarse con las técnicas de elaboración.

Existen distintos tipos de nanopartículas, liposomas, nanopartículas de polímeros, dendrímeros, nanotubos de carbono, nanopartículas de sílice, nanopartículas metálicas, nanopartículas magnéticas, etc. (5) Centrándonos en las nanopartículas poliméricas, que son el objetivo del presente estudio, estas pueden elaborarse a partir de polímeros naturales o sintéticos. En cuanto a los primeros, cabe citar como ejemplo de su potencialidad terapéutica el medicamento Abraxane[®]. Es una formulación ya comercializada de nanopartículas de albúmina de unos 130 nm, que ha permitido reducir los efectos adversos del paclitaxel, lo cual posibilita una perfusión intravenosa más rápida y un considerable aumento de la eficacia del tratamiento convencional (6). Por otro lado, dentro de los polímeros sintéticos el poli (D, L- ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) es el biopolímero aprobado por la FDA más comúnmente empleado en la elaboración de este tipo de nanotransportadores, gracias a que es un material seguro, biocompatible y biodegradable, al descomponerse en ácido láctico y glicólico, para eliminarse como CO₂ y H₂O (7).

Las nanopartículas se pueden diseñar en función del principio activo y la vía de administración, considerando como características más relevantes la forma, el tamaño y la carga superficial, que van a determinar en parte su incorporación celular, biodistribución, estabilidad, etc. En cuanto a la forma, se ha demostrado que las

nanopartículas esféricas son las que permiten una mayor incorporación. El tamaño tiene especial importancia en la penetración celular y la tendencia a la agregación, además, un tamaño menor implica mayor aclaramiento renal. Por su parte, la carga superficial va a condicionar la estabilidad, al oponerse a la agregación, y puede tener relevancia en la penetración dado que la membrana celular está cargada negativamente (5).

El método de elaboración de las nanopartículas depende de la solubilidad y estabilidad del fármaco, así como, de su posterior aplicación. De este modo, se puede recurrir a nanoprecipitación, emulsión-evaporación, doble emulsión-evaporación, doble emulsión-difusión, microfluidica, etc. (8) De todos ellos, uno de los más utilizados para sustancias hidrosolubles, y el aplicado en este estudio, es la doble emulsión-evaporación. Por su parte, la nanoprecipitación es la técnica de elaboración más sencilla y de elección para fármacos hidrofóbicos, que no requiere emplear ultrasonido. Además, recientemente se ha estudiado su aplicación en fármacos hidrosolubles gracias a las modificaciones propuestas por Zhu X et al. 2017 (9).

El método de elaboración puede influir en el tamaño de las nanopartículas, en la eficiencia de la encapsulación de los fármacos, en su carga superficial, etc. Por ejemplo, se ha observado una menor eficiencia de encapsulación utilizando nanoprecipitación que doble emulsión evaporación. No obstante, existen otros aspectos como la cantidad de polímero empleada, el peso molecular de este, el tiempo de sonicación o la relación de fases, que también tienen importancia en la formulación. Es el caso de la doble emulsión evaporación, que da lugar a diferentes tamaños de partícula al modificar el tiempo e intensidad de la sonicación o la cantidad de polímero empleada (8). Otro factor que tiene gran importancia es el punto isoeléctrico del disolvente orgánico empleado para disolver el polímero. De este modo, aquellos disolventes de menor punto isoeléctrico al ser menos miscibles con el agua tienen dificultad para dispersarse eficientemente en la fase acuosa y consecuentemente existe un mayor riesgo de agregación de las nanopartículas, dando lugar a partículas de mayor tamaño y distribución poco uniforme (9).

Actualmente, la nanotecnología es objeto de numerosas investigaciones, dadas sus prometedoras aplicaciones terapéuticas. Entre ellas, es de destacar, por ejemplo, la posibilidad de desarrollar una quimioterapia dirigida empleando nanopartículas (5). No obstante, aún es necesaria una mayor investigación en cuanto a toxicidad, incorporación inespecífica de partículas, control del microentorno tumoral, etc. Otro campo de investigación es la antibioterapia, dado que las nanopartículas se presentan como una posible solución a la baja solubilidad, sensibilidad a la temperatura o degradación enzimática de los antibióticos (10).

4. OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es analizar la influencia de la concentración de polímero en la fase orgánica sobre las características de las nanopartículas. Más concretamente, sobre el tamaño y potencial Z de nanopartículas elaboradas con PLGA de 2 pesos moleculares diferentes, utilizando la técnica de doble emulsión evaporación. Paralelamente, se estudia la influencia de la temperatura a lo largo del tiempo sobre estas mismas propiedades de las nanopartículas.

Por otra parte, una vez establecidas las condiciones óptimas de elaboración mediante doble emulsión evaporación, se compara el tamaño y potencial Z de nanopartículas elaboradas por el método de nanoprecipitación propuesto por Zhu X et al. 2017 (7) (nanoprecipitación modificada), para sustancias hidrofílicas, con las características obtenidas por el primer método. En este caso, también se valora la estabilidad frente a la temperatura y el tiempo.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Materiales

Se utilizaron los siguientes productos: poli (D, L- ácido láctico-co-glicólico) (50:50) (PLGA, Resomer® RG 502 y Resomer® RG 503; Evonik) cuyas características se recogen en la *tabla 1*, alcohol polivinílico (PVA) (PM 30.000-70.000; Sigma Aldrich), diclorometano (DCM; Sigma Aldrich®) y N, N-dimetilformamida (DMF; Acofarma®).

Tabla 1. Características de los polímeros.

PLGA	MASA MOLAR (Da)	VISCOSIDAD INTRÍNSECA (g/dL)
Resomer® RG 502	12.000	0.22
Resomer® RG 503	35.000	0.41

5.2 Método de elaboración

Las nanopartículas de PLGA se elaboraron mediante dos técnicas, doble emulsión evaporación y nanoprecipitación modificada, utilizando tres concentraciones distintas de cada polímero (5, 20 y 40 mg/ml). Además, cada concentración se elaboró por triplicado.

En la técnica de doble emulsión evaporación (*figura 1*), una cantidad adecuada de PLGA (RG 502 o RG 503) fue disuelta en 2 ml de diclorometano (fase orgánica) en un tubo Corning de 50 ml. A continuación, se añadieron 200 µl de una disolución acuosa de PVA 1% (fase acuosa interna) y la mezcla se sometió a sonicación durante 1 minuto (potencia 4, Branson S-150D), manteniendo el tubo inmerso en hielo. Sobre la primera emulsión se adicionaron 5 ml de disolución acuosa de PVA 1% (fase acuosa externa) y se repitió el proceso de sonicación. Por último, la emulsión w/o /w se vertió sobre 100 ml de disolución acuosa de PVA 0.05 % y se dejó en agitación magnética, en campana de extracción, durante 1 hora para garantizar la total evaporación del disolvente orgánico y el endurecimiento de las partículas.

En cuanto a la elaboración mediante nanoprecipitación modificada (*figura 2*), una cantidad adecuada de PLGA RG 502 fue disuelta en 1 ml de dimetilformamida. A continuación, se añadieron 50 µl de una disolución acuosa de PVA al 1% que se mezclaron por pipeteo con la disolución orgánica, durante aproximadamente 1 minuto. Por último, la emulsión se vertió sobre 20 ml de una disolución acuosa de PVA al 0.5% y se dejó en agitación magnética, en campana de extracción, durante 1 hora para favorecer la evaporación del disolvente.

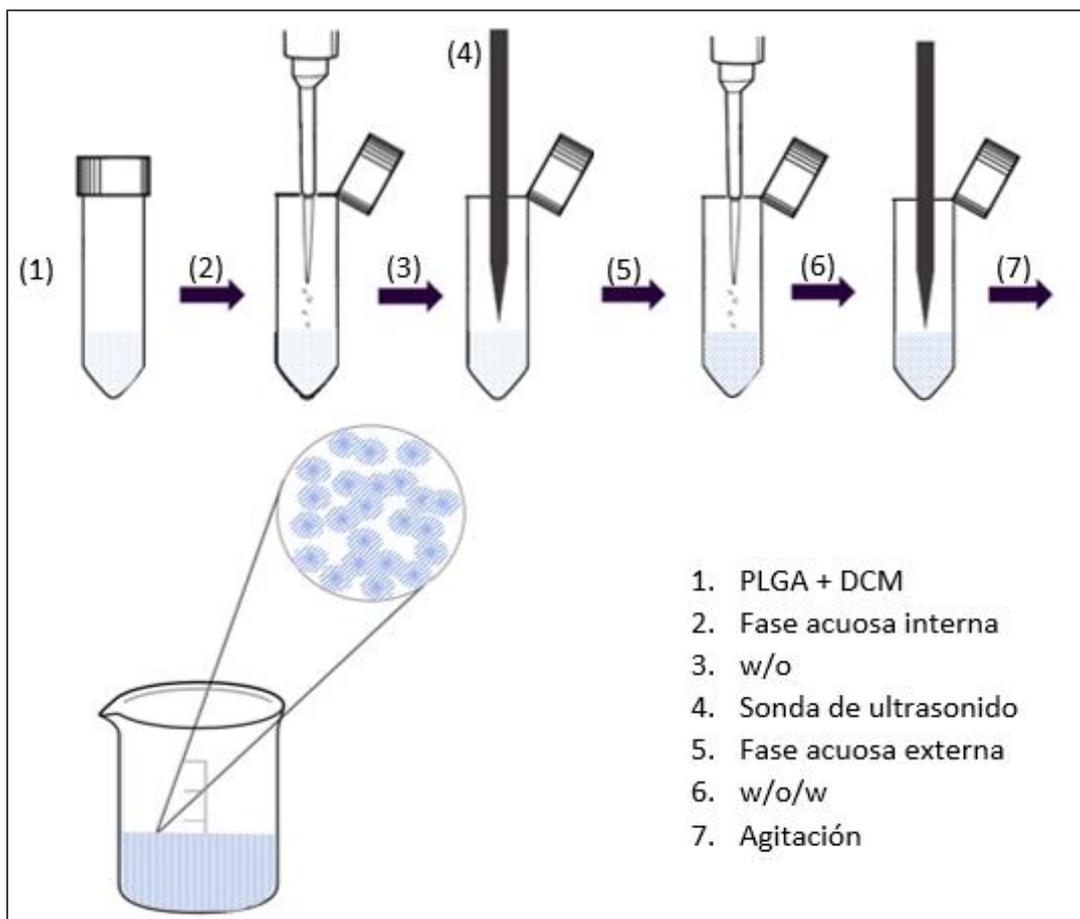


Figura 1. Representación esquemática de la elaboración de nanopartículas de PLGA por doble emulsión- evaporación.

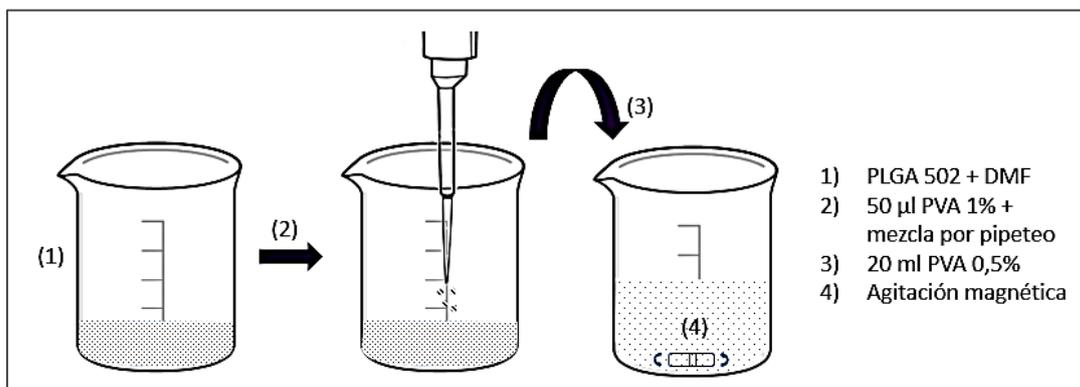


Figura 2. Representación esquemática de la elaboración de nanopartículas de PLGA por nanoprecipitación modificada.

5.3 Caracterización de las nanopartículas

Para la caracterización de las nanopartículas se utilizó el equipo Malvern Instruments, zetasizer Nano ZS. Una muestra de cada lote se sumergió en un baño de ultrasonido durante 2 minutos. A continuación, empleando una microcubeta se obtuvo el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (PDI), gracias a la técnica de dispersión de luz dinámica. Esta técnica se basa en detectar la velocidad de difusión de las partículas, cuyo movimiento Browniano es mayor cuanto menor es su tamaño, mediante la irradiación de la muestra con un láser. La intensidad de la dispersión lumínica se mide

con un fotodiodo de avalancha cuya sensibilidad permite detectar los cambios que se producen en la intensidad de la dispersión con el tiempo, debido al movimiento browniano, y estimar el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (11).

Por otro lado, con el mismo equipo se determinó el potencial Z mediante microelectroforesis de láser Doppler, empleando una cubeta estándar de poliestireno y una celda de inmersión. La técnica se fundamenta en medir la velocidad a la que se mueven las partículas hacia el electrodo, conociendo la fuerza del campo eléctrico aplicado, que será proporcional a su potencial Z. Este no es más que el potencial eléctrico generado por las partículas, que al estar cargadas modifican la distribución interfacial de iones circulantes, en el límite de deslizamiento.

5.4 Determinación de la estabilidad

Para valorar la estabilidad de las nanopartículas elaboradas por doble emulsión evaporación, una parte de cada lote se conservó a 4 °C y otra en estufa a 37 °C, con agitación orbital (150 rpm). Las muestras fueron tomadas a 1, 3 y 6 semanas desde su elaboración y, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, se procedió a la determinación de tamaño y potencial Z. En el caso de las nanopartículas obtenidas por nanoprecipitación modificada, la determinación de la estabilidad se realizó de forma idéntica, tomando muestras hasta 3 semanas después de su elaboración.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Efecto de la concentración de PLGA sobre las características de las nanopartículas

Las características de las nanopartículas elaboradas con las diferentes concentraciones de polímero se resumen en las figuras 3 y 4. Para su interpretación se ha realizado un análisis estadístico (ANOVA $p < 0,05$) y el test Tukey de comparaciones múltiples. Todo ello, utilizando el programa estadístico SPSS.

En primer lugar, se observa que el tamaño de partícula aumenta ligeramente con la concentración de polímero, con independencia del polímero empleado (*figura 3A*). En general, no se obtienen diferencias de tamaño entre el PLGA 502 y el 503, para cada concentración. No obstante, hay que indicar que, aunque para la concentración de 20 mg/ml las diferencias resulten estadísticamente significativas, esta pequeña diferencia de tamaño no tendría ninguna repercusión en las características de la formulación. En este aspecto, podría cuestionarse el estrecho intervalo de pesos moleculares estudiado, sin embargo, en la elaboración de las nanopartículas no se suelen emplear polímeros de pesos moleculares muy elevados ya que prolongarían su biodegradación y dificultarían su eliminación.

En lo referente al potencial Z (*figura 3B*), en general, es ligeramente negativo y no presenta un patrón de variación, independientemente de la concentración o el peso molecular del polímero utilizado. Sin embargo, a pesar de las diferencias estadísticamente significativas que se han detectado, como puede observarse en la

figura 3B, a la hora de interpretar estos resultados se debe hacer hincapié en que el intervalo de variación es muy estrecho, entre -3 y -9 mV aproximadamente. Desde un punto de vista tecnológico, estas diferencias no tienen repercusión, de hecho, estos valores de potencial Z tienden a la neutralidad y no se esperan diferencias en el comportamiento de las nanopartículas elaboradas con estos dos polímeros, en el intervalo de concentraciones estudiado.

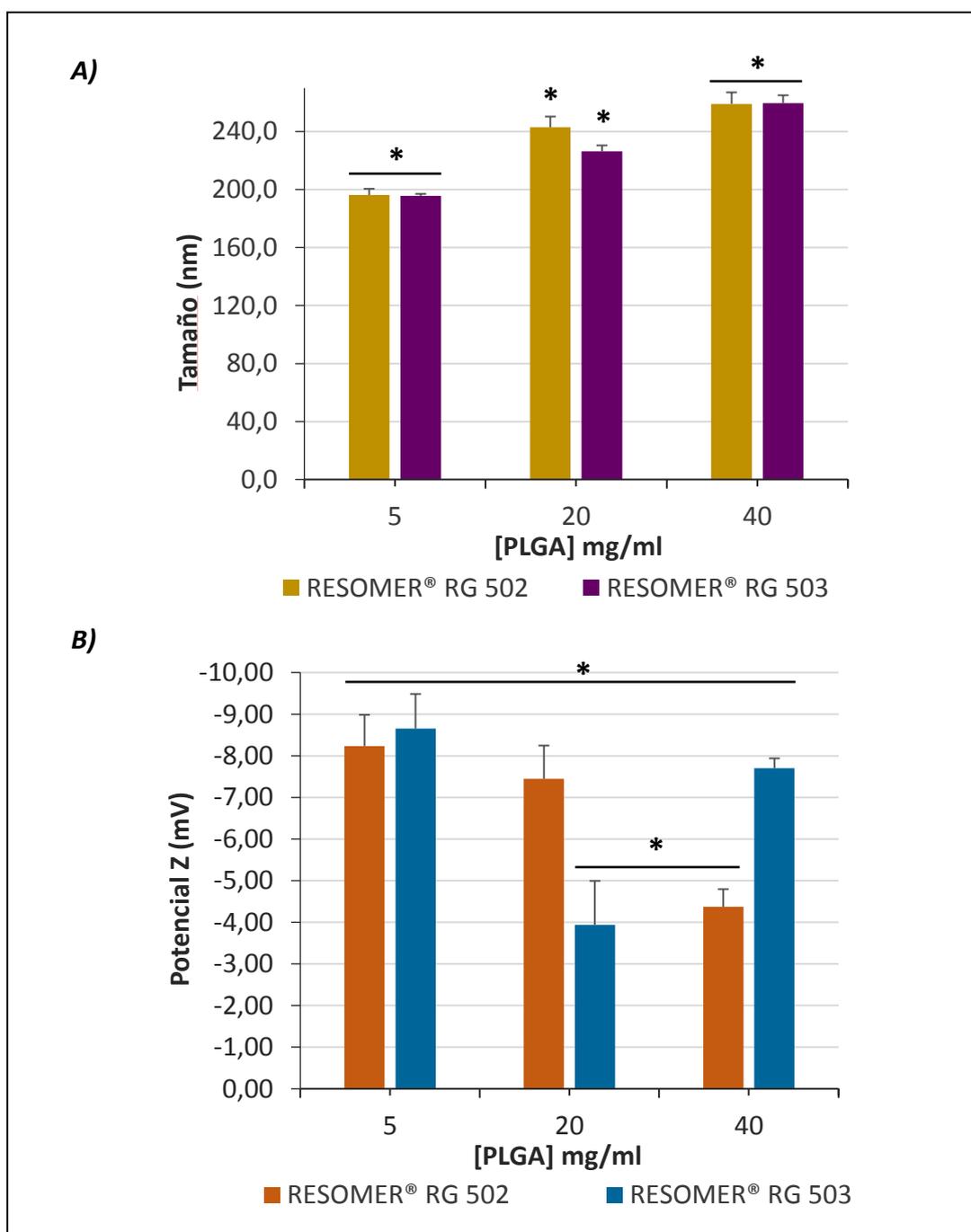


Figura 3. Efecto de la concentración de polímero sobre el tamaño (A) y potencial Z (B) de nanopartículas elaboradas por doble emulsión evaporación (* $p < 0,05$).

Por otro lado, al comparar los métodos de elaboración se observa que el tamaño de partícula obtenido mediante nanoprecipitación modificada (figura 4A) es significativamente menor en comparación al obtenido por doble emulsión evaporación. Además, se mantiene la tendencia de aumento de tamaño con la concentración de polímero. Con todo ello, cabe mencionar que el potencial Z (figura 4 B) aun siendo negativo, con la nanoprecipitación modificada es prácticamente neutro, probablemente debido a la menor cantidad de PVA utilizada a lo largo del proceso de elaboración. De acuerdo con la literatura consultada, el análisis de la superficie de las partículas revela que el surfactante empleado predomina en su composición (12).

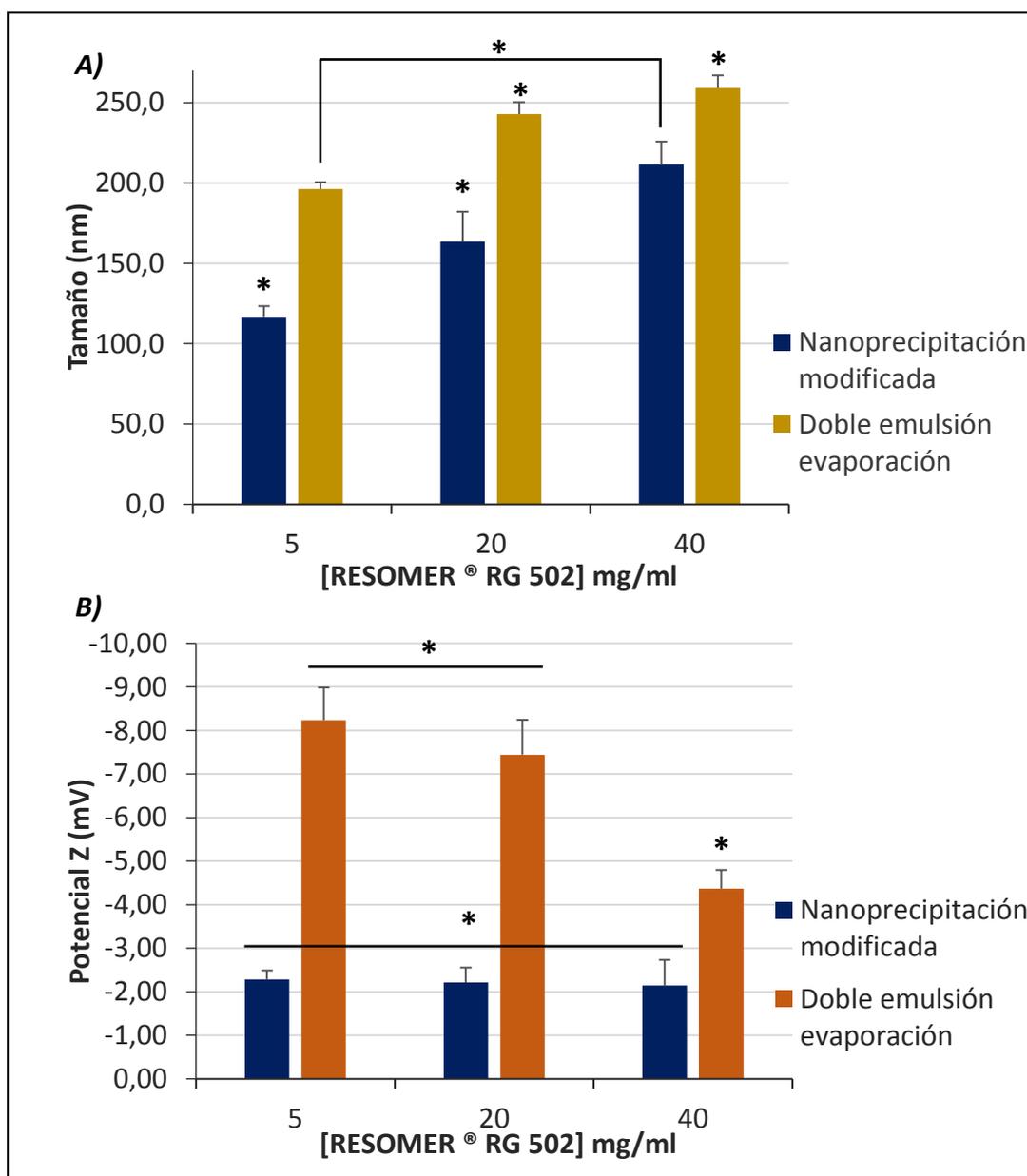


Figura 4. Comparación del efecto de la concentración de polímero sobre el tamaño (A) y potencial Z (B) de nanopartículas elaboradas por nanoprecipitación modificada y doble emulsión evaporación (* $p < 0,05$).

Por último, los valores del índice de polidispersidad son inferiores a 0,2, manteniéndose por debajo de 0,1 en la mayoría de los casos (*figura 5*). La distribución de tamaños se ajusta a muestras monodispersas, por lo que el método de elaboración permite obtener uniformidad de tamaño en todos los casos. Este aspecto es importante de cara a la seguridad de las formulaciones de administración parenteral.

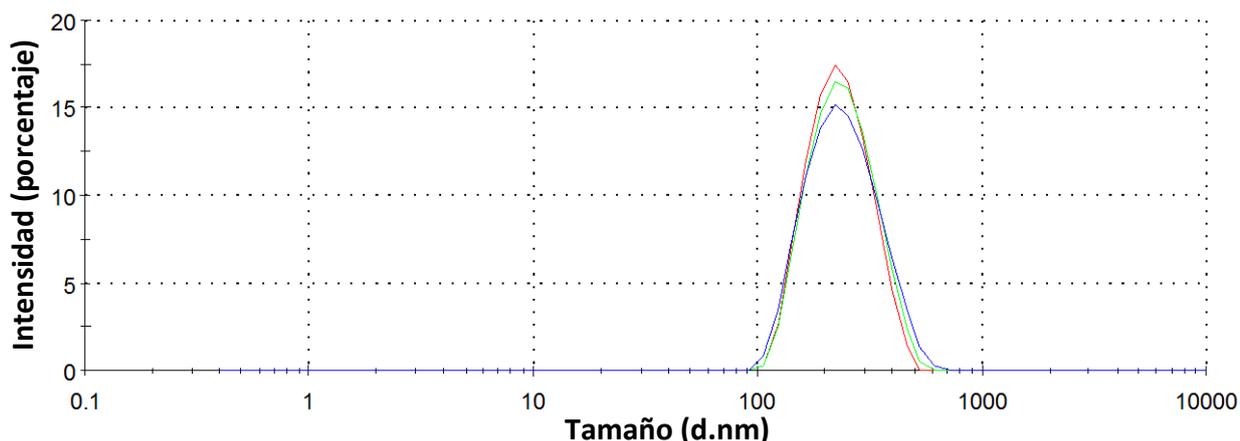


Figura 5. Gráfica de distribución de tamaños por intensidad, de una muestra de nanopartículas elaboradas por doble emulsión evaporación con 20 mg/ml de PLGA 503.

6.2 Influencia de la temperatura a lo largo del tiempo sobre las características de las nanopartículas.

Para el análisis de la influencia de la temperatura a lo largo del tiempo sobre las características de las nanopartículas, se ha realizado un ANOVA de la regresión lineal del tamaño de partícula frente al tiempo y del potencial Z frente al tiempo, tanto para las muestras conservadas a 4°C como a 37°C. Sin embargo, el número de datos no es lo suficientemente amplio como para obtener conclusiones estadísticamente significativas (*ejemplo en ANEXO, figura 10*).

En cualquier caso, los resultados obtenidos para las nanopartículas elaboradas por doble emulsión evaporación apuntan a que hay una tendencia a la disminución del tamaño de partícula con el tiempo (*figura 6*), que es ligeramente más acusada para las muestras conservadas a 37°C. Paralelamente, es importante puntualizar que el periodo de tiempo estudiado ha sido corto y únicamente permite deducir que las nanopartículas serán estables en formulaciones extemporáneas de preparación previa a su administración. No obstante, la tendencia a la disminución del tamaño se deberá estudiar en periodos más largos, en ensayos dirigidos a predecir la estabilidad de almacenamiento de las formulaciones.

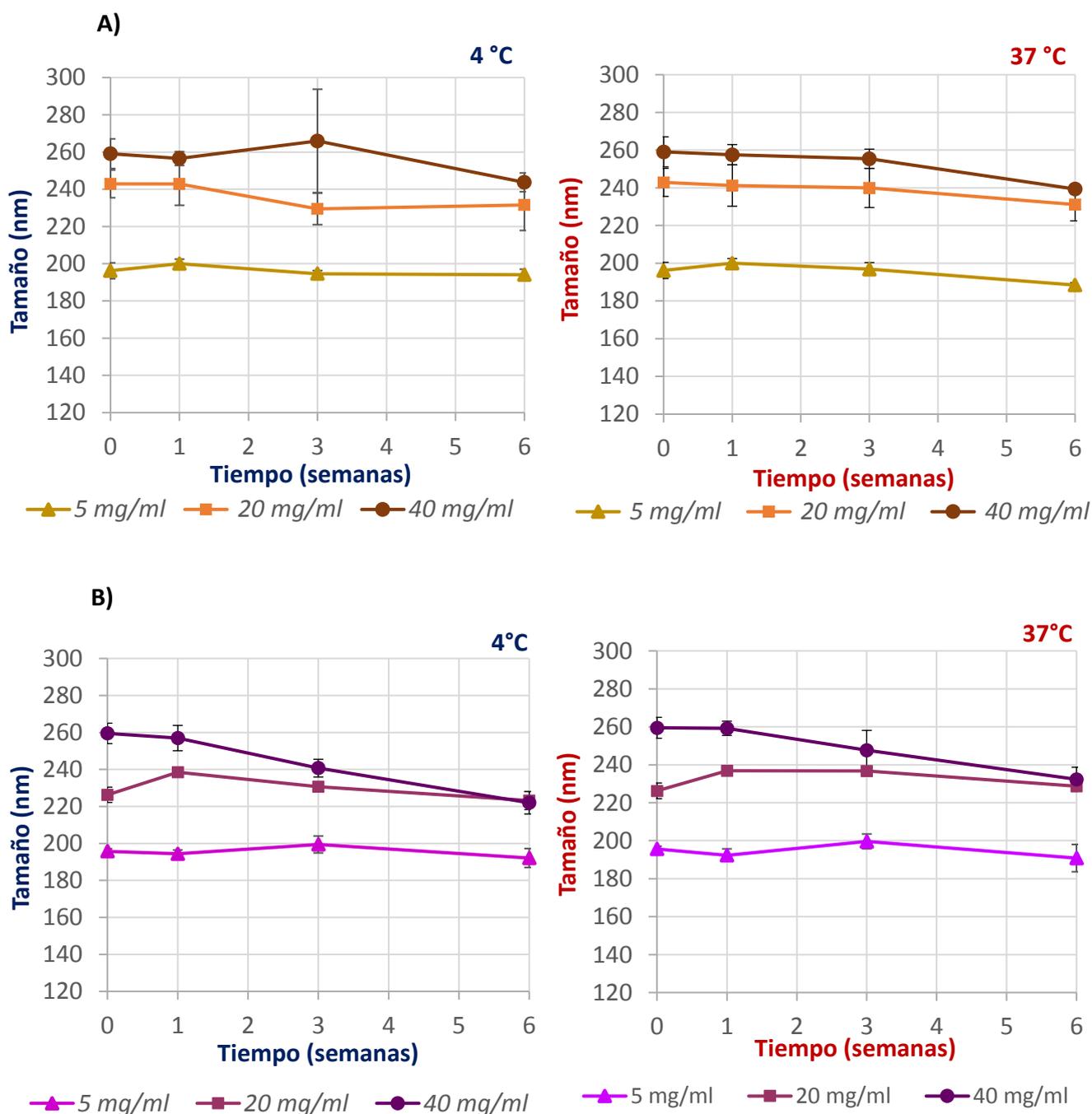


Figura 6. Efecto de la temperatura a lo largo del tiempo sobre el tamaño de nanopartículas elaboradas por doble emulsión evaporación con PLGA 502 (A) y 503 (B).

En cuanto al potencial Z (figura 7) presenta una gran estabilidad a lo largo del tiempo en las muestras conservadas a 4 °C, pero en el caso de las que se han conservado a 37 °C hay una tendencia a adoptar valores más próximos a cero, fundamentalmente a partir de la tercera semana de conservación. Aunque sería conveniente analizar la superficie de las partículas con otras técnicas, como puede ser la espectroscopía

fotoelectrónica de rayos X (XPS), esta pequeña variación del potencial Z, sin importancia en las características de las nanopartículas, se debe posiblemente a procesos de desorción del PVA. Por tanto, estos resultados aportan importante información en lo relativo a la conservación de las nanopartículas a largo plazo dado que, entre otros aspectos, el potencial Z juega un papel relevante en el paso a través de membranas.

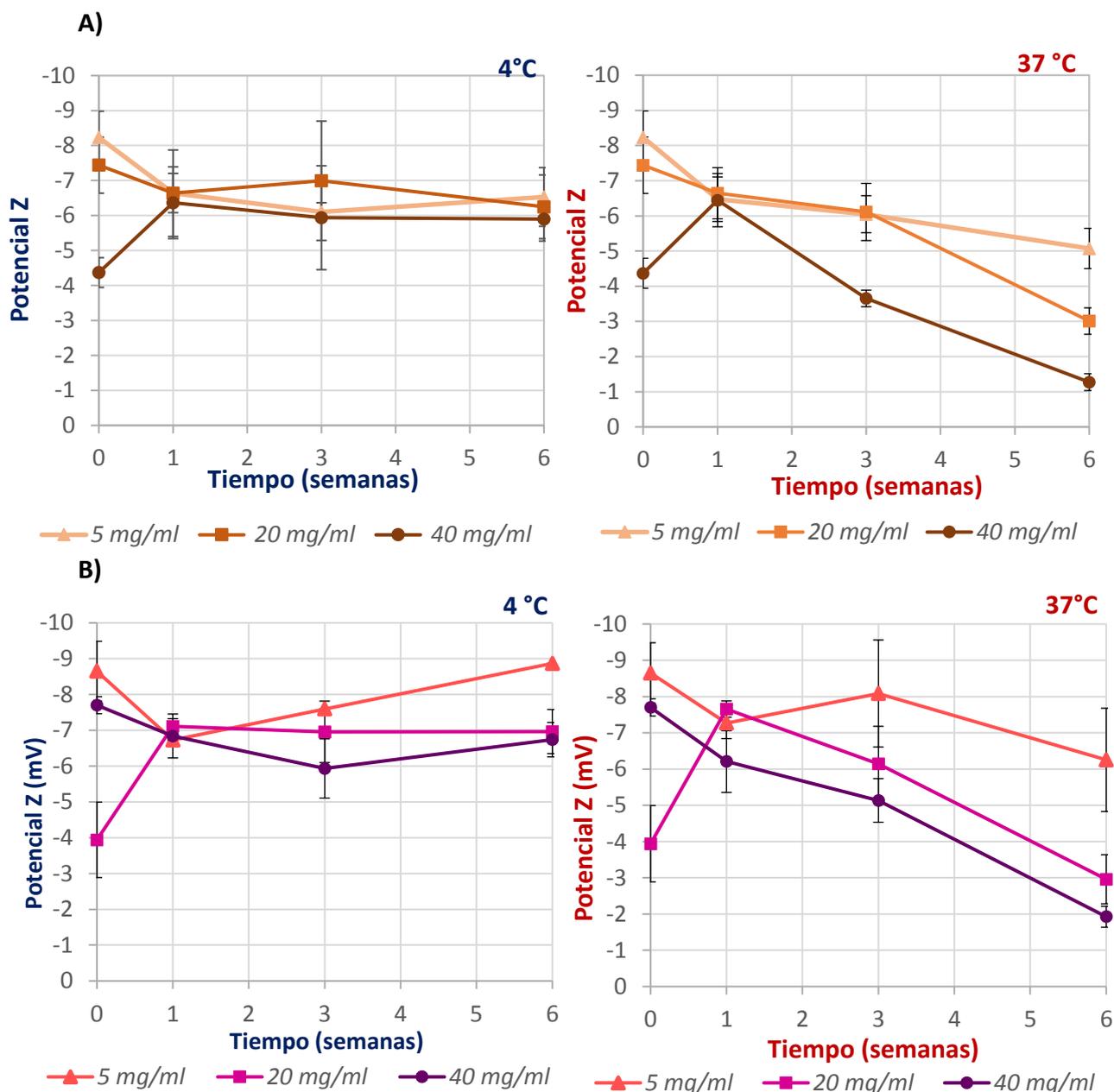


Figura 7. Efecto de la temperatura a lo largo del tiempo sobre el potencial Z de nanopartículas elaboradas por doble emulsión evaporación con PLGA 502 (A) y 503 (B).

La estabilidad de las nanopartículas elaboradas por nanoprecipitación modificada (figura 8) parece seguir la tendencia de las elaboradas por doble emulsión evaporación, es decir, existe cierta disminución del tamaño con el tiempo que en este caso es aún menos evidente pues el periodo de estudio fue más corto, 3 semanas. En cuanto al potencial Z (figura 9), si bien existe una mayor variación en las nanopartículas conservadas a 37°C, los valores se mantienen prácticamente igual al cabo de 3 semanas. En general, no se aprecian diferencias entre las muestras conservadas a 4 o a 37°C, aunque sería conveniente extender el periodo experimental para afirmar que se mantiene la estabilidad a largo plazo.

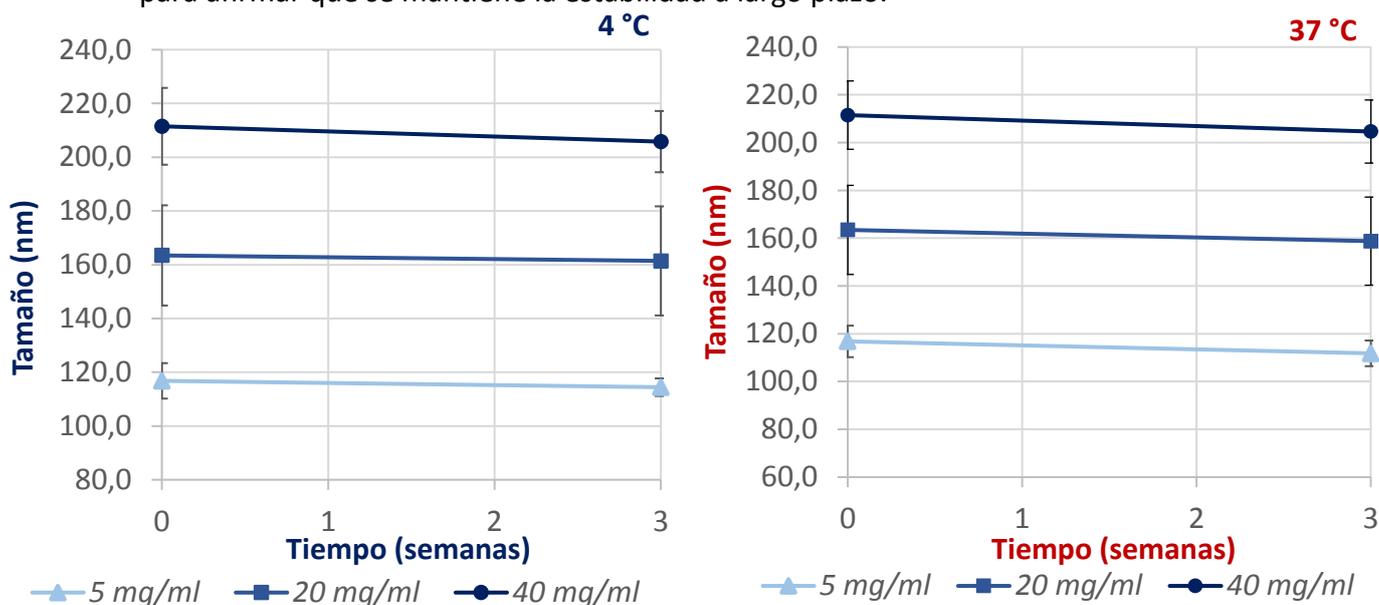


Figura 8. Efecto de la temperatura a lo largo del tiempo sobre el tamaño de nanopartículas elaboradas por nanoprecipitación modificada con PLGA 502.

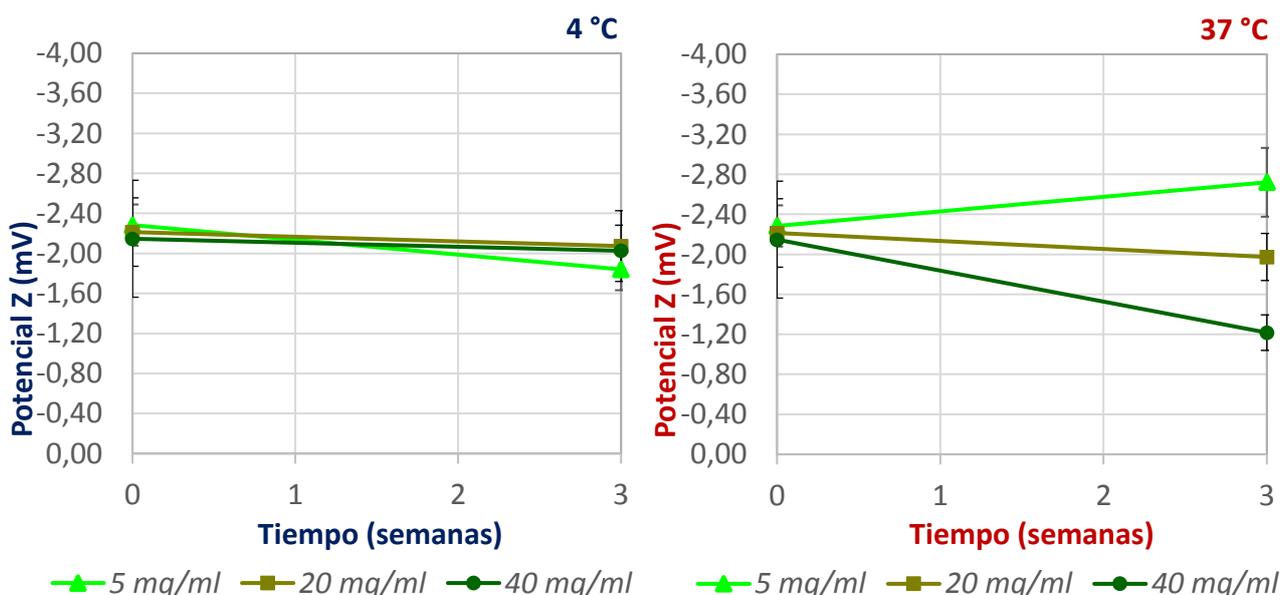


Figura 9. Efecto de la temperatura a lo largo del tiempo sobre el potencial Z de nanopartículas elaboradas por nanoprecipitación modificada con PLGA 502

En resumen, las características de las nanopartículas están íntimamente relacionadas con el método de elaboración, así como, con la concentración de polímero empleada. Estos aspectos serán fundamentales a la hora de formular, teniendo en cuenta el objetivo y el tipo de fármaco con el que se trabaje.

7. CONCLUSIONES

- 1.- En el intervalo de concentraciones estudiado el tamaño de partícula aumenta con la concentración de polímero de forma significativa.
- 2.- El método de nanoprecipitación modificada, empleando el mismo tipo de polímero y las mismas concentraciones, permite la elaboración de nanopartículas de menor tamaño.
- 3.- Las nanopartículas fabricadas, tanto por el método de doble emulsión evaporación como por nanoprecipitación modificada, presentan un perfil de distribución de tamaños monodisperso y potencial Z negativo, prácticamente neutro.
- 4.- El análisis de la estabilidad revela que no hay cambios importantes en las características de las nanopartículas en el periodo de tiempo estudiado.

8. ANEXO

Tabla 2. Efecto de la concentración de PLGA sobre el tamaño, índice de polidispersidad y potencial Z de nanopartículas elaboradas por doble emulsión evaporación.

PLGA	LOTE	TAMAÑO MEDIO (nm)	PDI	POTENCIAL Z (mV)
RESOMER® RG 502				
[5 mg/ml]	1	199,6 ± 5,500	0,092 ± 0,015	-7,39 ± 0,040
	2	197,7 ± 1,589	0,094 ± 0,006	-8,48 ± 0,257
	3	191,4 ± 0,451	0,116 ± 0,019	-8,83 ± 0,944
[20 mg/ml]	1	250,8 ± 0,125	0,125 ± 0,014	-7,49 ± 0,136
	2	241,9 ± 3,247	0,090 ± 0,014	-8,22 ± 0,212
	3	236,0 ± 1,662	0,059 ± 0,012	-6,62 ± 0,254
[40 mg/ml]	1	257,5 ± 0,902	0,115 ± 0,009	-3,91 ± 0,295
	2	252,0 ± 3,510	0,093 ± 0,014	-4,45 ± 0,335
	3	267,7 ± 1,450	0,125 ± 0,023	-4,75 ± 0,221
RESOMER® RG 503				
[5 mg/ml]	1	194,1 ± 0,551	0,069 ± 0,020	-7,82 ± 0,558
	2	196,2 ± 2,551	0,113 ± 0,022	-9,49 ± 0,686
	3	196,7 ± 1,986	0,098 ± 0,043	-8,64 ± 0,295
[20 mg/ml]	1	221,8 ± 2,916	0,097 ± 0,024	-3,84 ± 0,214
	2	227,3 ± 0,924	0,088 ± 0,019	-2,94 ± 0,365
	3	229,9 ± 0,985	0,082 ± 0,029	-5,04 ± 0,084
[40 mg/ml]	1	257,4 ± 1,779	0,095 ± 0,041	-7,43 ± 0,129
	2	255,4 ± 1,450	0,140 ± 0,014	-7,79 ± 0,118
	3	265,8 ± 2,329	0,140 ± 0,023	-7,88 ± 0,350

*. Se expresa cada resultado ± SD. La SD corresponde a la desviación que proporciona el zetasizer Nano ZS consecuencia de las tres medidas que realiza automáticamente sobre la misma muestra.

Tabla 3. Efecto de la concentración de PLGA Resomer® RG 502 sobre el tamaño, índice de polidispersidad y potencial Z de nanopartículas elaboradas por nanoprecipitación modificada.

RESOMER® RG 502	LOTE	TAMAÑO (nm)	PDI	POTENCIAL Z (mV)
5 mg/ml	1	120,1 ± 0,854	0,175 ± 0,007	-2,09 ± 0,456
	2	109,2 ± 0,961	0,184 ± 0,010	-2,26 ± 0,511
	3	121,1 ± 0,577	0,188 ± 0,003	-2,50 ± 0,528
20 mg/ml	1	184,0 ± 4,179	0,056 ± 0,026	-2,38 ± 0,149
	2	158,8 ± 1,986	0,082 ± 0,011	-1,82 ± 0,337
	3	147,6 ± 2,003	0,086 ± 0,010	-2,44 ± 0,466
40 mg/ml	1	219,4 ± 7,351	0,096 ± 0,040	-1,85 ± 0,281
	2	220,1 ± 2,627	0,074 ± 0,027	-1,77 ± 0,197
	3	195,0 ± 2,646	0,060 ± 0,018	-2,82 ± 0,885

*. Se expresa cada resultado ± SD. La SD corresponde a la desviación que proporciona el zetasizer Nano ZS consecuencia de las tres medidas que realiza automáticamente sobre la misma muestra.

Tabla 4. Estabilidad de nanopartículas elaboradas por doble emulsión evaporación, tras su conservación a 4°C y 37 °C durante una semana.

PLGA	T ^a	LOTE	TAMAÑO MEDIO (nm)	PDI	POTENCIAL Z (mV)
RESOMER® RG 502					
[5 mg/ml]	4°C	1	201,4 ± 7,422	0,093 ± 0,008	-6,00 ± 0,452
		2	201,4 ± 4,723	0,101 ± 0,025	-6,90 ± 0,348
		3	197,2 ± 3,732	0,076 ± 0,014	-7,03 ± 0,311
	37 °C	1	198,7 ± 2,601	0,084 ± 0,012	-5,77 ± 0,255
		2	202,9 ± 4,770	0,095 ± 0,013	-7,00 ± 0,702
		3	198,6 ± 0,265	0,117 ± 0,024	-6,65 ± 0,080
[20 mg/ml]	4°C	1	255,7 ± 4,431	0,119 ± 0,033	-7,74 ± 0,511
		2	239,0 ± 5,565	0,115 ± 0,018	-5,30 ± 0,564
		3	233,8 ± 4,015	0,073 ± 0,020	-6,87 ± 0,287
	37 °C	1	253,1 ± 3,828	0,132 ± 0,027	-6,53 ± 0,346
		2	239,2 ± 2,458	0,079 ± 0,024	-7,42 ± 0,363
		3	231,4 ± 1,562	0,073 ± 0,030	-5,98 ± 0,442
[40 mg/ml]	4°C	1	258,7 ± 3,265	0,101 ± 0,005	-5,21 ± 0,275
		2	252,2 ± 3,676	0,074 ± 0,014	-6,73 ± 0,091
		3	258,6 ± 1,692	0,114 ± 0,012	-7,16 ± 0,448
	37 °C	1	260,1 ± 4,158	0,103 ± 0,009	-6,51 ± 0,131
		2	251,4 ± 3,002	0,095 ± 0,019	-7,17 ± 0,070
		3	261,2 ± 2,597	0,123 ± 0,013	-5,66 ± 0,035
RESOMER® RG 503					
[5 mg/ml]	4°C	1	196,0 ± 2,060	0,113 ± 0,009	-5,54 ± 0,646
		2	195,1 ± 0,985	0,095 ± 0,024	-7,46 ± 0,195
		3	192,0 ± 3,101	0,095 ± 0,010	-7,18 ± 0,609
	37°C	1	189,7 ± 0,252	0,104 ± 0,009	-6,78 ± 0,229
		2	196,1 ± 2,030	0,105 ± 0,010	-7,59 ± 0,662
		3	191,3 ± 2,021	0,076 ± 0,026	-7,44 ± 0,156
[20 mg/ml]	4°C	1	236,0 ± 6,930	0,085 ± 0,020	-7,28 ± 0,042
		2	238,2 ± 6,030	0,092 ± 0,007	-6,87 ± 0,286
		3	241,3 ± 5,408	0,094 ± 0,009	-7,18 ± 0,086
	37 °C	1	236,7 ± 4,895	0,110 ± 0,006	-7,49 ± 0,228
		2	237,9 ± 7,573	0,094 ± 0,022	-7,91 ± 1,230
		3	236,0 ± 3,700	0,083 ± 0,013	-7,56 ± 0,058
[40 mg/ml]	4°C	1	256,4 ± 3,676	0,120 ± 0,019	-6,16 ± 0,240
		2	250,4 ± 0,954	0,094 ± 0,036	-7,01 ± 0,206
		3	264,1 ± 2,352	0,112 ± 0,025	-7,35 ± 0,532
	37 °C	1	256,2 ± 1,856	0,106 ± 0,013	-5,67 ± 0,106
		2	258,1 ± 3,398	0,110 ± 0,014	-5,76 ± 0,392
		3	263,4 ± 2,696	0,122 ± 0,028	-7,19 ± 0,165

*. Se expresa cada resultado ± SD. La SD corresponde a la desviación que proporciona el zetasizer Nano ZS consecuencia de las tres medidas que realiza automáticamente sobre la misma muestra.

Tabla 5. Estabilidad de nanopartículas elaboradas por doble emulsión evaporación, tras su conservación a 4°C y 37 °C durante tres semanas.

PLGA	T ^a	LOTE	TAMAÑO MEDIO (nm)	PDI	POTENCIAL Z (mV)
RESOMER® RG 502					
[5 mg/ml]	4°C	1	196,1 ± 4,509	0,091 ± 0,021	-5,91 ± 0,352
		2	194,9 ± 3,985	0,075 ± 0,017	-6,00 ± 0,330
		3	192,7 ± 4,140	0,107 ± 0,020	-6,40 ± 0,247
	37 °C	1	197,4 ± 1,457	0,103 ± 0,001	-5,44 ± 0,174
		2	200,1 ± 2,201	0,107 ± 0,018	-6,35 ± 0,203
		3	193,2 ± 2,601	0,087 ± 0,012	-6,35 ± 0,855
[20 mg/ml]	4°C	1	238,9 ± 2,237	0,094 ± 0,015	-8,69 ± 0,229
		2	227,1 ± 2,610	0,075 ± 0,008	-5,28 ± 0,484
		3	222,4 ± 2,433	0,054 ± 0,011	-7,01 ± 0,331
	37 °C	1	251,3 ± 2,658	0,130 ± 0,017	-5,81 ± 0,285
		2	237,7 ± 2,055	0,092 ± 0,014	-7,03 ± 0,321
		3	230,9 ± 1,365	0,088 ± 0,009	-5,49 ± 0,407
[40 mg/ml]	4°C	1	246,2 ± 5,163	0,065 ± 0,013	-5,06 ± 0,455
		2	253,9 ± 4,105	0,096 ± 0,007	-7,65 ± 0,787
		3	297,7 ± 2,120	0,123 ± 0,035	-5,10 ± 0,416
	37 °C	1	254,6 ± 2,343	0,082 ± 0,009	-3,43 ± 0,231
		2	250,8 ± 5,336	0,068 ± 0,008	-3,90 ± 0,314
		3	260,9 ± 6,938	0,101 ± 0,036	-3,63 ± 0,035
RESOMER® RG 503					
[5 mg/ml]	4°C	1	194,4 ± 5,260	0,106 ± 0,011	-7,15 ± 0,516
		2	203,4 ± 3,851	0,129 ± 0,018	-7,51 ± 0,547
		3	200,5 ± 2,515	0,115 ± 0,027	-8,12 ± 0,336
	37°C	1	202,5 ± 4,002	0,118 ± 0,006	-8,96 ± 0,558
		2	201,2 ± 6,108	0,106 ± 0,013	-6,38 ± 0,652
		3	195,2 ± 0,794	0,104 ± 0,014	-8,91 ± 0,420
[20 mg/ml]	4°C	1	231,3 ± 7,163	0,070 ± 0,034	-6,56 ± 0,184
		2	232,8 ± 4,588	0,084 ± 0,021	-7,94 ± 0,462
		3	227,9 ± 6,174	0,087 ± 0,019	-6,37 ± 0,090
	37 °C	1	236,0 ± 4,290	0,071 ± 0,006	-7,31 ± 0,399
		2	238,3 ± 4,148	0,079 ± 0,024	-5,32 ± 0,419
		3	236,0 ± 2,594	0,093 ± 0,024	-5,79 ± 0,114
[40 mg/ml]	4°C	1	240,7 ± 4,251	0,106 ± 0,031	-6,15 ± 1,020
		2	235,9 ± 0,907	0,104 ± 0,010	-6,63 ± 0,311
		3	245,5 ± 1,747	0,099 ± 0,014	-5,02 ± 0,232
	37 °C	1	242,5 ± 2,685	0,133 ± 0,058	-4,44 ± 0,360
		2	241,0 ± 3,669	0,105 ± 0,023	-5,45 ± 0,367
		3	259,7 ± 1,626	0,109 ± 0,023	-5,51 ± 0,731

*. Se expresa cada resultado ± SD. La SD corresponde a la desviación que proporciona el zetasizer Nano ZS consecuencia de las tres medidas que realiza automáticamente sobre la misma muestra.

Tabla 6. Estabilidad de nanopartículas elaboradas por doble emulsión evaporación, tras su conservación a 4°C y 37 °C durante seis semanas.

PLGA	T ^a	LOTE	TAMAÑO MEDIO (nm)	PDI	POTENCIAL Z (mV)
RESOMER® RG 502					
[5 mg/ml]	4°C	1	197,4 ± 3,051	0,078 ± 0,024	-6,67 ± 0,202
		2	191,7 ± 2,022	0,074 ± 0,020	-5,63 ± 0,376
		3	193,1 ± 1,868	0,079 ± 0,019	-7,29 ± 0,994
	37 °C	1	189,2 ± 3,669	0,089 ± 0,027	-4,68 ± 0,252
		2	189,1 ± 0,971	0,100 ± 0,018	-4,81 ± 0,685
		3	187,0 ± 0,231	0,079 ± 0,023	-5,73 ± 0,272
[20 mg/ml]	4°C	1	247,3 ± 1,762	0,122 ± 0,016	-7,16 ± 0,367
		2	225,8 ± 2,272	0,073 ± 0,007	-5,34 ± 0,182
		3	221,7 ± 1,724	0,076 ± 0,013	-6,25 ± 0,371
	37 °C	1	240,4 ± 2,312	0,090 ± 0,032	-3,40 ± 0,055
		2	229,7 ± 2,050	0,078 ± 0,002	-2,65 ± 0,243
		3	223,3 ± 1,931	0,075 ± 0,020	-2,98 ± 0,454
[40 mg/ml]	4°C	1	249,5 ± 8,116	0,071 ± 0,040	-6,57 ± 0,988
		2	240,3 ± 3,661	0,066 ± 0,019	-5,31 ± 0,462
		3	241,3 ± 5,401	0,084 ± 0,016	-5,83 ± 0,116
	37 °C	1	242,0 ± 2,551	0,048 ± 0,017	-1,00 ± 0,211
		2	236,8 ± 1,735	0,069 ± 0,031	-1,44 ± 0,346
		3	239,3 ± 1,039	0,075 ± 0,004	-1,38 ± 0,174
RESOMER® RG 503					
[5 mg/ml]	4°C	1	186,5 ± 1,422	0,077 ± 0,010	-7,74 ± 0,454
		2	196,5 ± 2,969	0,099 ± 0,018	-8,86 ± 0,062
		3	193,3 ± 2,577	0,097 ± 0,021	-10,0 ± 0,306
	37°C	1	196,4 ± 1,480	0,123 ± 0,022	-4,90 ± 0,584
		2	193,4 ± 2,376	0,107 ± 0,004	-6,12 ± 0,104
		3	182,7 ± 0,723	0,091 ± 0,022	-7,74 ± 0,184
[20 mg/ml]	4°C	1	224,1 ± 5,212	0,077 ± 0,043	-7,22 ± 0,081
		2	227,6 ± 4,159	0,089 ± 0,003	-6,26 ± 0,467
		3	217,9 ± 1,747	0,072 ± 0,003	-7,41 ± 0,123
	37 °C	1	230,1 ± 4,616	0,067 ± 0,012	-3,70 ± 0,444
		2	229,1 ± 2,801	0,076 ± 0,021	-2,37 ± 0,329
		3	227,0 ± 2,787	0,092 ± 0,029	-2,81 ± 0,151
[40 mg/ml]	4°C	1	228,7 ± 4,165	0,064 ± 0,027	-6,21 ± 0,570
		2	216,9 ± 4,924	0,070 ± 0,004	-6,85 ± 0,952
		3	220,3 ± 4,382	0,084 ± 0,022	-7,15 ± 0,372
	37 °C	1	236,6 ± 2,511	0,074 ± 0,022	-2,18 ± 0,366
		2	225,0 ± 4,419	0,075 ± 0,031	-1,61 ± 0,297
		3	235,4 ± 3,711	0,093 ± 0,009	-1,99 ± 0,095

*. Se expresa cada resultado ± SD. La SD corresponde a la desviación que proporciona el zetasizer Nano ZS consecuencia de las tres medidas que realiza automáticamente sobre la misma muestra.

Tabla 7. Estabilidad de nanopartículas elaboradas con PLGA Resomer® RG 502 por nanoprecipitación modificada, tras su conservación a 4°C y 37 °C durante tres semanas.

RESOMER® RG 502	LOTE	TAMAÑO MEDIO (nm)	PDI	POTENCIAL Z (mV)	
[5 mg/ml]	4°C	1	115,8 ± 1,185	0,139 ± 0,007	-1,96 ± 0,446
		2	110,7 ± 0,781	0,205 ± 0,013	-1,96 ± 1,160
		3	116,8 ± 0,954	0,157 ± 0,013	-1,60 ± 0,618
	37 °C	1	115,2 ± 1,290	0,139 ± 0,008	-2,33 ± 0,206
		2	105,6 ± 0,721	0,184 ± 0,007	-2,98 ± 0,358
		3	114,6 ± 0,777	0,185 ± 0,013	-2,85 ± 0,185
[20 mg/ml]	4°C	1	183,3 ± 1,007	0,065 ± 0,017	-2,22 ± 0,373
		2	157,8 ± 0,458	0,075 ± 0,028	-1,67 ± 0,232
		3	143,2 ± 0,710	0,079 ± 0,040	-2,33 ± 0,411
	37 °C	1	178,2 ± 1,531	0,084 ± 0,030	-1,73 ± 0,189
		2	156,6 ± 1,457	0,060 ± 0,017	-1,99 ± 0,307
		3	141,5 ± 1,136	0,074 ± 0,009	-2,20 ± 0,536
[40 mg/ml]	4°C	1	193,9 ± 1,595	0,047 ± 0,013	-2,05 ± 0,536
		2	206,9 ± 1,159	0,073 ± 0,012	-2,27 ± 0,237
		3	216,6 ± 1,442	0,051 ± 0,033	-1,76 ± 0,122
	37 °C	1	190,6 ± 1,700	0,053 ± 0,016	-1,18 ± 0,503
		2	216,8 ± 0,153	0,065 ± 0,015	-1,41 ± 0,150
		3	206,5 ± 0,064	0,064 ± 0,006	-1,06 ± 0,305

*. Se expresa cada resultado ± SD. La SD corresponde a la desviación que proporciona el zetasizer Nano ZS consecuencia de las tres medidas que realiza automáticamente sobre la misma muestra.

Semanas	Tamaño medio (nm)	X*Y	Y predichos	Residual	Regresión	Total	Cuadrados del error
0	250,8	0	242,1960317	8,6039683	13,721032	22,325	111,02
1	255,7	255,7	239,997619	15,702381	11,522619	27,225	261,84667
3	238,9	716,7	235,6007937	3,2992063	7,1257937	10,425	144,52667
6	247,3	1483,8	229,0055556	18,294444	0,5305556	18,825	378,14
0	241,9	0	242,1960317	-0,2960317	13,721032	13,425	
1	239	239	239,997619	-0,997619	11,522619	10,525	
3	227,1	681,3	235,6007937	-8,5007937	7,1257937	-1,375	
6	225,8	1354,8	229,0055556	-3,2055556	0,5305556	-2,675	
0	236	0	242,1960317	-6,1960317	13,721032	7,525	
1	233,8	233,8	239,997619	-6,197619	11,522619	5,325	
3	222,4	667,2	235,6007937	-13,200794	7,1257937	-6,075	
6	221,7	1330,2	229,0055556	-7,3055556	0,5305556	-6,775	

Suma X	Suma Y	Suma X*Y
30	2840,4	6962,5
Suma X ²	Suma Y ²	
138	673681,38	
(sumaX) ²	(sumaY) ²	
900	806782,16	
X media	Y media	
2,5	228,475	
Pendiente	O. Origen	Coef. correl.
-2,1984127	242,1960317	-0,4733885

Origen de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F calculadas
TOTAL	2170,50750	11	1116,28766	10,58876
REGRESIÓN	1116,28766	1	1116,28766	10,58876
RESIDUAL	1054,21984	10	105,42198	
D.L.	158,68651	2	79,34325	0,70879
ERROR	895,53333	8	111,94167	

Análisis de la varianza de la regresión lineal

Comprobación de hipótesis

1) H0: b0=0; tcal = 55,21064043 t tab = 2,2281389
2) H0: b1=0; Fcal = 10,58875592 F tab = 4,9646027
3) H0: No existe D.L.; Fcal = 0,708791072 F tab = 4,4589701

Pendiente reestimada 50,452899

C.V. (%) 4,49393625

L.D. -15,4124013
L.C. -46,7042464

Figura 10. Análisis de la varianza de la regresión lineal de nanopartículas elaboradas con 20 mg/ml de PLGA 502 por doble emulsión evaporación, conservadas a 4°C.

9. REFERENCIAS

1. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog Polym Sci.* 2011;36:887–913.
2. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010;75:1–18.
3. Dou S, Yang XZ, Xiong MH, Sun CY, Yao YD, Zhu YH, et al. ScFv-Decorated PEG-PLA-Based Nanoparticles for Enhanced siRNA Delivery to Her2+ Breast Cancer. *Adv Healthc Mater.* 2014;3:1792–1803.
4. Jiao J, Zou Q, H. Zou M, M. Guo R, Zhu S, Zhang Y. Aptamer-modified PLGA nanoparticle delivery of triplex forming oligonucleotide for targeted prostate cancer therapy. *Neoplasma.* 2016;63:569-575.
5. Zhang J, Tang H, Liu Z, Chen B. Effects of major parameters of nanoparticles on their physical and chemical properties and recent application of nanodrug delivery system in targeted chemotherapy. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:8483-8493.
6. Irache Garreta JM, Espuelas Millán S. Formas de administración parenteral. En: Martínez Pacheco R, editor. *Tratado de tecnología farmacéutica Vol. 3.* Madrid: Síntesis; 2016.p. 157-197.
7. Xu J, Zhang S, Machado A, Lecommandoux S, Sandre O, Gu F, et al. Controllable Microfluidic Production of Drug-Loaded PLGA Nanoparticles Using Partially Water-Miscible Mixed Solvent Microdroplets as a Precursor. *Sci Rep.* 2017;7:4794.
8. Cohen-Sela E, Chorny M, Koroukhov N, Danenberg HD, Golomb G. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J Control Release.* 2009;133:90–95.
9. Zhu X, Tao W, Liu D, Wu J, Guo Z, Ji X, et al. Surface de-PEGylation controls nanoparticle-mediated siRNA delivery in vitro and in vivo. *Theranostics.* 2017;7:1990-2002.
10. López-López M, Fernández-Delgado A, Moyá ML, Blanco-Arévalo D, Carrera C, de la Haba RR, et al. Optimized preparation of levofloxacin loaded polymeric nanoparticles. *Pharmaceutics.* 2019;11:1–13.
11. Malvern Instruments Limited. Zetasizer Nano Series Performance, Simplicity, Versatility. En: https://www.malvernpanalytical.com/es/Assets/MRK1839_tcm61-17228.pdf [Consultado el 15 de abril de 2019].

12. Shakesheff KM, Evora C, Soriano I, Langer R. The adsorption of poly(vinyl alcohol) to biodegradable microparticles studied by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). *J Colloid Interface Sci.* 1997;185:538–547.



 **Facultad de Farmacia**
Universidad de La Laguna