



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Y METALURGIA**

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS DE PLGA POR
EL MÉTODO DE EMULSIFICACIÓN –
EVAPORACIÓN PARA SU UTILIZACIÓN EN
NANOMEDICINA**

Tesis

Que para obtener el título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presenta

Ana Ruth Valenzuela Loroña

Hermosillo, Sonora

Julio de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

UNIVERSIDAD DE SONORA
VOTOS APROBATORIOS

Hermosillo, Sonora, a 4 de Julio de 2014

DR. MARTÍN ANTONIO ENCINAS ROMERO

Jefe del Departamento

Ingeniería Química y Metalurgia

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional: “**Síntesis y Caracterización De Nanopartículas Poliméricas**”, presentada por:

ANA RUTH VALENZUELA LOROÑA

La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos parciales para la obtención del Título de:

INGENIERO QUÍMICO

_____ Fecha	_____ DR. JESÚS ARMANDO LUCERO ACUÑA
_____ Fecha	_____ DRA. PATRICIA GUERRERO GERMÁN
_____ Fecha	_____ DRA. SANDRA LUZ PRECIADO FLORES
_____ Fecha	_____ DR. MARTÍN ANTONIO ENCINAS ROMERO

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Alejandro y Elena, por haberme apoyado en mi trayectoria académica así como haberme formado como persona enseñándome el valor de la responsabilidad. Por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

A mis Hermanos Alejandro y Eduardo por ser mis compañeros de vida. Alejandro por ser mi ejemplo a seguir tanto en el ámbito personal como en el profesional, y a Eduardo por ser mi cómplice en mi vida y próximamente colega laboral. A mi tía Berta por ser un pilar familiar, su ayuda en todo lo que me propongo en mi vida.

Agradezco a mi maestro Dr. Armando Lucero por haberme dado la oportunidad de colaborar en sus proyectos de investigación, por transmitirme el conocimiento experimental y guiarme en la búsqueda del teórico, así como por su paciencia durante todos estos meses.

A mis sinodales, Dr. Patricia Guerrero, Dra. Sandra Preciado y Dr. Martín Encinas por haber participado en este proyecto de investigación al contribuir con su experiencia y conocimiento dentro del campo de aplicación.

A todos mis Amigos que estuvieron a lo largo de todos mis años de estudio, en especial a Ana Laura, Diana, Deyanira, Lupita, Israel, Pedro, Jaime, Raúl por haber compartido durante 5 años de la carrera tantos momentos de alegría, diversión y estudio juntos. Por haber estado en las buenas y en las no tan buenas.

A mis maestros, que sin duda alguna dejaron una huella en mi corazón, M. C. Agustín Montiel, Ing. Juan Jiménez, Dr. Abraham Martín, Dr. Víctor Sánchez, Dr. Manuel Pérez Tello, Ing. Manuel Balcázar, M.C. Jaime Varela, Dr. Teresa Certucha, M.C. Marco Antonio Núñez, Dr. Gilberto Navarrete.

A goal without a plan is just a wish

Antoine de Saint-Exupery

INDICE DE CONTENIDO

	Pág
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1. Introducción	1
1.2. Objetivo General	4
1.3. Objetivos Específicos.....	4
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	6
2.1. Nanotecnología y Nanomedicina	6
2.2. Conceptos Básicos en Nanotecnología	7
2.2.1. Dispersiones coloidales.....	7
2.2.2. Estabilidad.....	11
2.2.3. Fuerzas de Van Der Waals y fuerzas electroestáticas.....	13
2.2.4. Teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO)	15
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Materiales	18
3.2. Preparación de las Nanopartículas Poliméricas	18

3.3. Caracterización de las Nanopartículas	21
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	34
5.1. Conclusiones	34
5.2. Recomendaciones.....	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Tipos principales de emulsificaciones: a) aceite en agua (O/W) y b) agua en aceite (W/O).....	9
Figura 2. Desestabilización de una especie dispersa a sedimentación, agregación, o coalescencia.....	11
Figura 3. Momento dipolar (μ) de dos cargas eléctricas $+q$ y $-q$ se encuentran separadas por una distancia r	13
Figura 4. Fuerzas electrostáticas debido a la desprotonación de ácidos carboxílicos.....	15
Figura 5. Ilustración de la teoría clásica de DLVO y de la capa eléctrica doble, adaptada de Wu et al., 2011.....	17
Figura 6. Esquema de síntesis de nanopartículas poliméricas usando la técnica de emulsificación – evaporación del solvente.....	19
Figura 7. Variación del tamaño e índice de polidispersidad de las nanopartículas poliméricas en función de la amplitud de sonicación ($n=3$).....	24
Figura 8. Variaciones en el potencial zeta debido a los parámetros de formulación de las nanopartículas poliméricas ($n=3$).....	25

Figura 9. Variación del tamaño e índice de polidispersidad de las nanopartículas poliméricas en función de la concentración de PVA (n=3).....	27
Figura 10. Variación del tamaño e índice de polidispersidad de las nanopartículas poliméricas en función de la concentración de PLGA (n=3).....	29
Figura 11. Variación del tamaño e índice de polidispersidad de las nanopartículas poliméricas en función de la relación de solvente orgánico (diclorometano) y agua (n=3).	31
Figura 12. Micrografía electrónica de barrido (SEM) de las nanopartículas poliméricas preparadas con un 50% de amplitud de sonicación, una concentración de PVA de 3%, una concentración de polímero PLGA de 10 mg/mL y una relación volumétrica de solventes orgánico:agua de 1:2.	33

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla I. Matriz de experimentos para estudiar los efectos de las variables más importantes en la formulación de las nanopartículas poliméricas (n=3).....	20
Tabla II. Variaciones del potencial zeta, tamaño e índice de polidispersidad de las nanopartículas poliméricas en función de la amplitud de sonicación, la concentración de PVA y PLGA y la relación volumétrica entre solventes (n=3).....	23

RESUMEN

Actualmente la administración de fármacos cuenta con gran interés debido a sus aplicaciones relacionadas con problemas de la salud. El objetivo de la administración de fármacos es llevar la dosis específica del fármaco al lugar adecuado, en el tiempo adecuado y con la duración adecuada. De todos los métodos de administración de fármacos, las nanoformulaciones han ganado interés en las últimas décadas, diseñándose algunas que pueden aumentar la exposición de células/tejidos/tumores a los agentes terapéuticos, dando como resultado una mejoría dentro de los tratamientos. En este trabajo se estudió la síntesis de nanopartículas poliméricas considerando los efectos que tienen los parámetros más importantes del proceso de formulación. Las nanopartículas poliméricas se sintetizaron usando el polímero: poli-d-l-láctico-co-glicólico (PLGA) y la técnica de emulsificación- evaporación del solvente. Los resultados muestran que el tamaño de las nanopartículas, en el rango de estudio, disminuye cuando se aumenta la amplitud de sonicación, la concentración de PVA y la relación de solvente orgánico:agua.

ABSTRACT

Nowadays, the delivery of drugs is a subject of great interest due to the different applications in health-related problems. The goal of drug delivery is to get the right amount of drug in the right place at the right time for the right length. From all the methods of drug delivery, nanoformulations are the ones that received more attention in the last decades. Properly engineered nanoformulations as drug carriers can increase the exposure of cells/tissues/tumors to therapeutic agents and result in improved treatment effects. In this work the synthesis of polymeric nanoparticles considering the effects of the main variables of the formulation process was studied. Nanoparticles were synthesized by using the polymer: poly-d,l-lactide-co-glycolide (PLGA), and the emulsification–solvent evaporation technique. Results shown that in the range of study, nanoparticle size decreases when increase the sonication amplitude, the PVA concentration and the solvent:water ratio.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

Actualmente la administración de fármacos y genes recibe un gran interés debido a las diferentes aplicaciones en problemas relacionados a salud. El mercado mundial para sistemas de administración de fármacos y genes está proyectado para alcanzar \$175600 millones de dólares para el 2016, esto representa un incremento de \$44000 millones de dólares sobre el mercado del 2010 (Santini, 2013). El objetivo de la administración de fármacos es llevar la dosis específica del fármaco al lugar adecuado, en el tiempo adecuado y con la duración adecuada. Los métodos para la administración de fármacos varían de oral, pulmonar, implantes, etc. De todos los métodos de administración de fármacos, las nanoformulaciones son las que han recibido mayor atención en las últimas décadas. Cuando se diseñan nanoformulaciones como vehículos para la administración de fármacos se puede incrementar la exposición de células/tejidos/tumores a los agentes terapéuticos, resultando en el mejoramiento de los tratamientos, esto debido al incremento en los tiempos de circulación, a la protección contra degradación que la matriz les confiere a los componentes atrapados y a la ayuda proporcionada para penetrar en las células a través del mejoramiento en la permeabilidad y efectos de retención, así como a la endocitosis mediada por receptores. Varios agentes terapéuticos como fármacos anticáncer y DNA plasmídico pueden ser simultáneamente encapsulados y administrados por nanovehículos a sitios específicos para mejorar la efectividad de la terapia (Peer et al., 2007; Shi et al., 2010). Estos nanosistemas pueden ser modulados

para ofrecer muchas ventajas sobre los fármacos y genes puros, por ejemplo, ellos pueden proteger al DNA plasmídico de interacciones no deseadas con otros tejidos orgánicos, asimismo pueden reconocer tejidos específicos incrementando las interacciones deseadas. En adición, el uso de nanosistemas para la administración de fármacos y genes puede permitir el control efectivo de la liberación de estos componentes en la cantidad necesaria (Danhier et al., 2012; Makadia and Siegel, 2011; Mu and Feng, 2003; Peer et al., 2007). Estos nanosistemas pueden ser estructurados como nanopartículas con características específicas y capaces de realizar varias actividades. Las nanopartículas deben de cumplir muchas regulaciones, por ejemplo, deben de ser diseñadas con materiales biocompatibles y biodegradables y el procesamiento no debe de ser una tarea demasiado compleja (Mu and Feng, 2003; Peer et al., 2007). Dentro de los materiales usados para formar nanopartículas se encuentran los poliméricos, que entre otros se derivan en polímeros biodegradables, dendrímeros y micelas, los cuales son comúnmente utilizados para desarrollar plataformas para la administración de fármacos y genes (Zolnik et al., 2010). Dentro de todos los materiales usados en la administración de fármacos, uno de los más exitosos es el poli(éster): poli-d-l-láctico-co-glicólico (PLGA), el cual presenta un inmenso potencial como vehículo para la administración de fármacos y como plataforma en ingeniería de tejidos (Danhier et al., 2012; Makadia and Siegel, 2011). PLGA es uno de los polímeros biodegradables más usados en el desarrollo de nanomedicinas porque se hidroliza en el cuerpo produciendo los monómeros ácido láctico y ácido glicólico, que al mismo tiempo son degradados a CO₂ y agua (Danhier et al., 2012; Jain, 2000; Kumari et al., 2010). Dependiendo de la proporción de los monómeros que forman PLGA, serán las

velocidades de degradación y las propiedades estructurales y mecánicas (Danhier et al., 2012; Jain, 2000). Otra ventaja de PLGA es que contiene ácidos carboxílicos, los cuales pueden ser funcionalizados con otras moléculas antes o después de la preparación de las nanopartículas. Adicionalmente, PLGA es un polímero aprobado por la administración de fármacos y alimentos de Estados Unidos (FDA) y por la Agencia de Medicina Europea (EMA) y ya ha sido utilizado en dispositivos terapéuticos debido a su biodegradación y biocompatibilidad (Danhier et al., 2012; Parveen and Sahoo, 2008). Las nanopartículas de PLGA se han preparado utilizando diferentes métodos, pero el más común es la técnica de emulsificación – evaporación del solvente (Cascone et al., 2002; Danhier et al., 2012; Jain, 2000; Yang et al., 2007). Asimismo, también otros métodos han sido utilizados para preparar nanopartículas de PLGA, tal es el caso de emulsificación – difusión del solvente (Murakami et al., 2000; Sahana et al., 2008), nanoprecipitación (Chorny et al., 2002; Dhar et al., 2008), etc. Prácticamente cualquier componente hidrófobo o hidrófilo puede ser considerado para encapsularse dentro de nanopartículas de PLGA, mostrando ventajas sobre otros sistemas de administración como liposomas (Park et al., 2009). En esta investigación se estudió el efecto de las variables más importantes involucradas en el proceso de producción de nanopartículas poliméricas cuando se utiliza la técnica de emulsificación – evaporación del solvente. Las nanopartículas se sintetizaron usando el polímero: poli-d-l-láctico-co-glicólico (PLGA). Para estandarizar el proceso de síntesis de las nanopartículas poliméricas se desarrolló una matriz de experimentos considerando la concentración del polímero PVA, la concentración del polímero PLGA, la potencia de sonicación y la proporción de solvente

orgánico en relación con la fase acuosa en la fase de emulsificación. Los resultados muestran algunas tendencias que ayudan a entender mejor los efectos de las variables estudiadas en el proceso de formación de nanopartículas. Asimismo, estos resultados también permiten seleccionar los parámetros de formulación adecuados, dependiendo de las características finales de las nanopartículas que se requieran.

1.2. Objetivo General

Estudiar el efecto de la amplitud de sonicación, concentración de PLGA, concentración de PVA y relación volumétrica de solvente orgánico: agua, en el proceso de producción de nanopartículas poliméricas cuando se usa la técnica de emulsificación – evaporación del solvente.

1.3. Objetivos Específicos

- 1.3.1. Sintetizar nanopartículas poliméricas variando la amplitud de sonicación, mientras se mantienen los demás parámetros de formulación constantes.
- 1.3.2. Sintetizar nanopartículas poliméricas variando la concentración de alcohol polivinílico (PVA), mientras se mantienen los demás parámetros de formulación constantes.
- 1.3.3. Sintetizar nanopartículas poliméricas variando la concentración de PLGA, mientras se mantienen los demás parámetros de formulación constantes.

- 1.3.4. Sintetizar nanopartículas poliméricas variando la relación volumétrica de solventes en la emulsificación, mientras se mantienen los demás parámetros de formulación constantes.
- 1.3.5. Caracterizar todos los nanosistemas analizados por dispersión de luz, midiendo el tamaño y el potencial Z y estudiar la morfología de las nanopartículas usando SEM.

CAPÍTULO II. ANTECEDENTES

2.1. Nanotecnología y Nanomedicina

El término Nanotecnología hace referencia a la ciencia de las cosas pequeñas, en específico a un tamaño menor a los 500 nm. Un nanómetro equivale a 1×10^{-9} m. La nanotecnología es un campo multidisciplinario que consta del diseño ingenieril de nano-objetos y nano-herramientas con un tamaño no mayor al de 500nm (Cuenca et al., 2006). El uso de la nanotecnología ha demostrado que un mismo material a escala nano cuenta con características totalmente distintas al mismo material a mayor escala. La nanotecnología cuenta con un sinnúmero de aplicaciones ya sea para innovar equipos, estructuras o nuevos materiales.

En lo que refiere a Nanomedicina, es el término empleado para describir la nanotecnología empleada en el ámbito de la medicina. La nanomedicina surge de la idea de crear pequeños robots o pequeñas estructuras las cuales pudieran ser diseñadas, manufacturadas e introducidas en el cuerpo humano para reparar daños celulares (Freitas, 2005).

La nanomedicina recientemente ha cambiado la escala y los métodos para la liberación de fármacos. Hoy en día tanto los agentes terapéuticos como los de diagnóstico pueden ser encapsulados o bien, absorbidos en una nanopartícula que funciona como vehículo. Estos nuevos métodos pueden resolver problemas de solubilidad, ya que el 40% de sustancias activas que hasta ahora han sido identificadas son muy poco solubles en agua (Nie et al., 2007). El material del cuál puede estar hecho una nanopartícula con el fin de contener un

fármaco puede ser ya sea un polímero, metal o cerámico el cual debe ser biocompatible con el cuerpo humano (Wang et al., 2008).

Las nanopartículas son enormemente consideradas como potenciales para encapsular agentes terapéuticos y llevarlo ya sea al órgano, célula o tejido en específico. Estas son unidades que pueden detener los problemas referentes a la liberación y retención de fármacos en el cuerpo humano, en dichas nanopartículas el fármaco puede ser confinado dentro de una matriz polimérica o bien en su superficie (Parveen and Sahoo, 2008).

El tamaño de la nanopartícula es sin duda el parámetro más importante que dictamina la eficacia de la liberación del fármaco, además que la habilidad de remover las nanopartículas por funciones biológicas de los órganos depende enormemente de su tamaño.

2.2. Conceptos Básicos en Nanotecnología

2.2.1. Dispersiones coloidales

Una dispersión coloidal comprende a un repertorio entre partículas pequeñas, gotas, o burbujas de una fase que tienen al menos una dimensión entre 1 y 1000 nm, y están dispersas en una segunda fase (Schramm, 2006). Si el medio de dispersión es acuoso, entonces los términos hidrofóbico e hidrofílico son usados. Coloides liofílicos son formados espontáneamente cuando dos fases son puestas en contacto porque la dispersión es termodinámicamente más estable que los estados originales por separado.

Coloides liofóbicos no son formados espontáneamente cuando se ponen en contacto las fases, esto porque son termodinámicamente inestables comparados con los estados por separado. Estas dispersiones de coloides liofóbicos se pueden formar con la aplicación de energía mecánica en forma de agitación, ultrasónica u otras, resultando en suspensiones que pueden presentar cierto grado de estabilidad. Ejemplos de dispersiones coloidales liofóbicas son emulsiones, espumas y suspensiones de partículas.

Las emulsiones son dispersiones coloidales en la cuales un líquido es disperso en una fase líquida continua de diferente composición. La fase dispersa es algunas veces referida como la fase interna y la fase continua como la fase externa. En la mayoría de las emulsiones, uno de los líquidos es acuoso (W) mientras que el otro es un hidrocarburo (O) y es referido como aceite. La Figura 1 presenta a los dos tipos de emulsiones que se consideran principalmente, esto dependiendo de cuál de las formas líquidas es la fase continua, siendo la primera de aceite en agua (O/W) para gotas de aceite dispersas en agua y la segunda de agua en aceite (W/O) para gotas de agua dispersas en aceite.

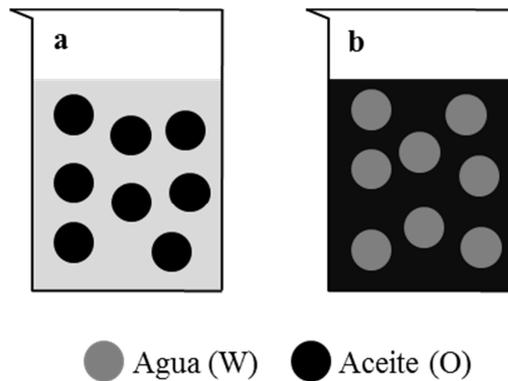


Figura 1. Tipos principales de emulsificaciones: a) aceite en agua (O/W) y b) agua en aceite (W/O).

La mayoría de las emulsiones estables en la práctica contienen un agente emulsificante (o estabilizador) que usualmente es un surfactante. El emulsificante puede ser necesario para facilitar la forma o para proteger a la película y que ayuda a que la emulsión no se rompa. El agente emulsificador puede reducir la tensión interfacial haciendo posible la creación de gotas pequeñas o puede ser necesario para estabilizar gotas pequeñas para que estas no coalezcan para formar gotas más grandes.

Una suspensión es una dispersión coloidal en la cual un sólido es disperso en una fase líquida continua. La fase sólida dispersa es referida algunas veces como la fase interna y la fase continua es la fase externa. Las suspensiones pueden ser acuosas o no acuosas. El rango de tamaño clásico para las dispersiones coloidales es de 1 a 1000 nm, asumiendo que las especies dispersas tienen una forma esférica. Cuando otras formas son consideradas, partículas con diámetro de hasta 2 mm pueden ser consideradas como coloides.

La estabilidad de dispersiones liofóbicas (no estables termodinámicamente) es muy importante, y existe un grado de cinética de estabilidad que se debe considerar. Existen diferentes procesos a través de los cuales las especies dispersas pueden desestabilizarse, como sedimentación, agregación y coalescencia, como se muestra en la Figura 2. La sedimentación resulta de la diferencia de densidades entre la fase dispersa y la fase continua y produce dos capas separadas de dispersión que contienen diferentes concentraciones de la fase dispersa. La agregación es cuando algo de movimiento browniano, sedimentación, o agitación causa que dos o más especies dispersas se agrupen entre ellas, manteniendo su identidad pero perdiendo independencia cinética debido a que el agregado se mueve como una sola unidad. La agregación de gotas puede conducir a la coalescencia y a la formación de gotas más grandes hasta que las fases se separen.

La estabilidad cinética puede entonces tener dos significados diferentes, una dispersión coloidal puede ser cinéticamente estable con respecto a coalescencia pero inestable con respecto a agregación, o puede ser cinéticamente estable con respecto a agregación pero inestable con respecto a sedimentación. En resumen, a pesar de que los colides liofóbicos son termodinámicamente inestables estos pueden ser relativamente estables en un sentido cinético.

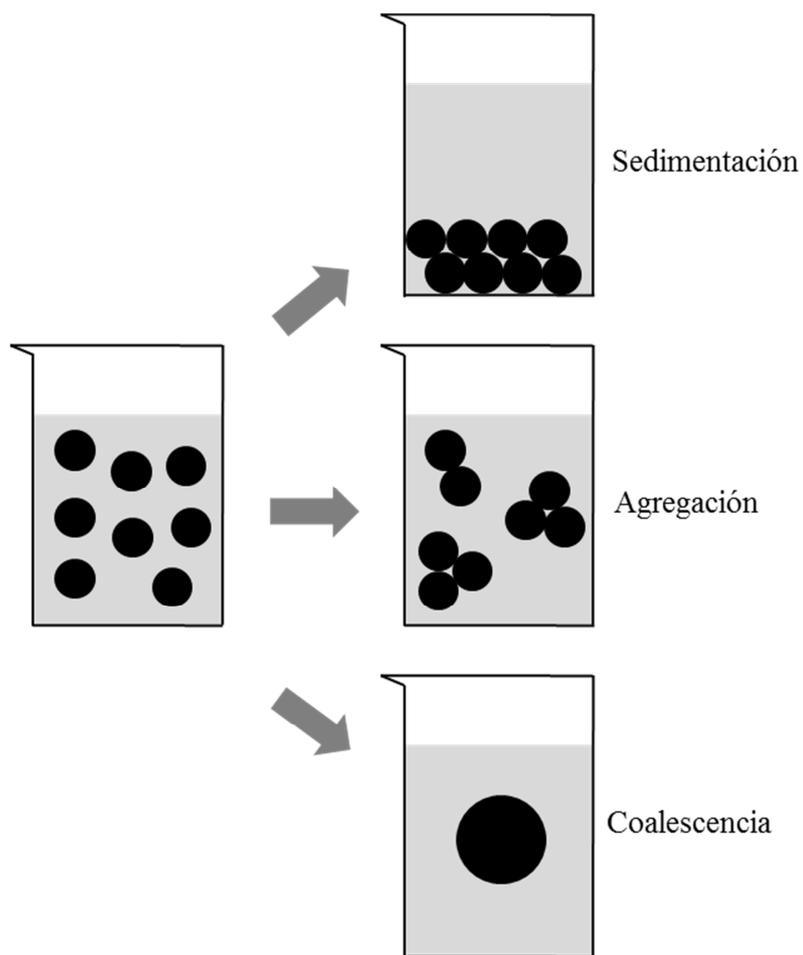


Figura 2. Desestabilización de una especie dispersa a sedimentación, agregación, o coalescencia.

2.2.2. Estabilidad

El término de estabilidad asociado a dispersiones coloidales ha sido extensamente investigado y se relaciona con términos como la energía libre y la tensión superficial. El origen físico de la tensión superficial es el estado no favorable de la materia en las interfaces. Cuando los átomos o moléculas están expuestos a una interface, ellos no están rodeados por todos los lados por moléculas afines, ellos deben perder alguna de la

energía de interacción en el caso de una superficie ideal en contra de vacío o compartir algo de la energía de interacción con las moléculas del medio que las rodea. De ahí la confianza de los líquidos para minimizar el área superficial o en general, el efecto de capilaridad (Garbassi et al., 1998).

Los nanosistemas tienen área superficial muy grande lo cual crea una energía superficial total alta, lo cual no es termodinámicamente favorable, debido a esto, los sistemas tienden a minimizar la energía superficial para favorecer el estado termodinámico. El resultado de esta disminución de energía superficial se ve reflejado en sedimentaciones, aglomeraciones y coalescencias, las cuales se pueden de alguna manera prevenir usando estabilizadores, los cuales incrementan la habilidad para proveer una superficie o barrera entre los coloides. Existen dos mecanismos principales a través de los cuales las suspensiones pueden ser estabilizadas en ambos medios acuosos y medios no acuosos, que son repulsión electrostática y estabilización estérica (Wu et al., 2011). Estos dos mecanismos pueden llevarse a cabo por la adición de estabilizantes iónicos y no iónicos en el medio. La repulsión electrostática se debe a cargas superficiales e interacciones con el medio y se discutirá más ampliamente en los siguientes puntos. La estabilización estérica se lleva a cabo agregando moléculas grandes (ej. Polímeros), las cuales pueden o no estar adheridas químicamente a los sistemas y actúan como brazos espaciadores que previenen que los coloides entren en contacto físico, esto significa que las fuerzas de interacción electrostáticas se ven minimizadas por la distancia que existe entre coloide y coloide.

2.2.3. Fuerzas de Van Der Waals y fuerzas electroestáticas

El origen de las fuerzas de Van Der Waals entre los átomos y las moléculas es de carácter atómico. Si dos cargas eléctricas $+q$ y $-q$ se encuentran separadas por una distancia r , el momento dipolar está definido como $q \times r$ (Figura 3), lo cual supone que el átomo es eléctricamente neutro (Askeland, 1996). Adicionalmente, la carga positiva del centro del átomo (núcleo) y la carga negativa (nube de electrones) coinciden, entonces, un átomo neutro no cuenta con momento dipolar. Cuando un átomo neutro es expuesto tanto interna como externamente en un campo eléctrico, el átomo se polariza (los centros de carga positiva y negativa se separan) y eso crea o induce un momento dipolar. En algunas moléculas, el momento dipolar no tiene que ser inducido, existe dado la virtud de la dirección de los enlaces y de la naturaleza de los átomos, conociéndolas como moléculas polarizadas. Un ejemplo de una molécula polarizada que está construida con un momento dipolar permanentemente es el agua.

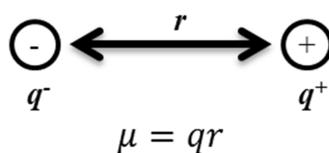


Figura 3. Momento dipolar (μ) de dos cargas eléctricas $+q$ y $-q$ se encuentran separadas por una distancia r .

Las moléculas o átomos se pueden atraer mutuamente, esto cuando el momento dipolar es inducido o permanente. La fuerza resultante es conocida como fuerza de Van Der Waals. Las fuerzas de Van Der Waals entre moléculas y átomos tienen su origen en interacciones entre dipolos que son inducidos o en algunos casos interacciones entre momentos dipolares permanentes que están presentes en ciertos tipos de moléculas polares. Lo que es único de estas fuerzas es que se presentan en todos los materiales (Askeland, 1996).

Existen 3 tipos de interacciones de Van Der Waals, llamadas fuerzas de London, fuerzas de Keesom y fuerzas de Debye. Si las interacciones son entre dos dipolos que son inducidos en átomos o moléculas, nos referimos entonces a ellos como las fuerzas de London. Cuando un dipolo inducido interactúa con una molécula que tiene momento dipolar permanente, nos referimos a esta interacción como las fuerzas de Debye. Si las interacciones son entre moléculas que están polarizadas permanentemente, se hace referencia a estas interacciones como fuerzas de Keesom.

La superficie de los materiales puede asumir una carga neta por diferentes mecanismos, entre los cuales se encuentran la adsorción de especies cargadas, como iones o surfactantes, la electrificación con el aire y la ionización de grupos superficiales, la cual es mostrada con el ejemplo la desprotonación de ácidos carboxílicos (Figura 4), donde el ácido carboxílico se muestra primeramente sin carga, es decir protonado y después se muestra sin el hidrogeno, lo cual introduce una carga superficial. Esta carga superficial es dinámica y se puede modificar cambiando las características del solvente, como la fuerza iónica o el pH.

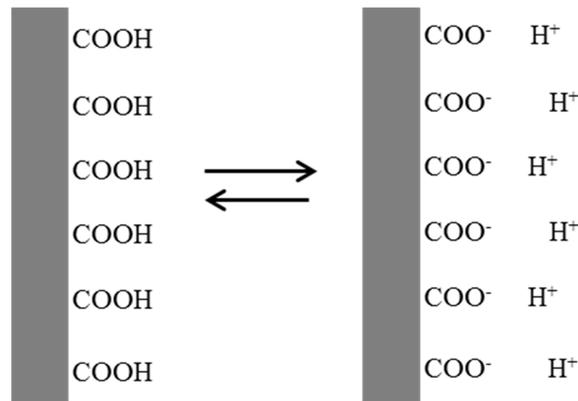


Figura 4. Fuerzas electrostáticas debido a la desprotonación de ácidos carboxílicos.

2.2.4. Teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO)

Esta teoría describe una relación de las fuerzas de atracción y repulsión entre coloides y fue primero descrita por Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO). Esta teoría aplica principalmente en suspensiones acuosas y asume que las fuerzas que actúan en las partículas coloidales en un medio incluyen a las fuerzas electrostáticas repulsivas y a las fuerzas de atracción de Van Der Waals. Las fuerzas repulsivas se originan de la sobreposición de la capa eléctrica doble (EDL) que rodea a las partículas en el medio y que previene de la aglomeración coloidal (Wu et al., 2011). La Figura 5, tomada de Wu et al., 2011 para la teoría DLVO muestra que las contribuciones de las fuerzas de atracción de Van Der Waals prevalecen siempre a distancias pequeñas. Los términos de la fuerza de Van Der Waals son insensibles a las variaciones electrostáticas, entonces para un sistema dado el término de Van Der Waals puede ser considerado como una constante que depende solamente de la naturaleza de las especies que interactúan, mientras que el

término electrostático puede ser afectado por las condiciones del sistema (Garbassi et al., 1998). La EDL que rodea a las partículas en el medio consiste en una primera capa de iones contrarios atraídos hacia la superficie de la partícula para mantener la neutralidad del sistema, llamada capa Stern, y una segunda capa que es esencial para la difusión de iones, llamada capa Gouy. La energía potencial total (V_T) de la interacción partícula-partícula es la suma del potencial de repulsión (V_R) generado de la doble capa eléctrica y el potencial de atracción (V_A) de las fuerzas de Van Der Waals.

El potencial zeta es el potencial eléctrico en el plano de corte el cual es la frontera entre la capa del líquido que lo rodea pegado a las partículas en movimiento en el medio. El potencial zeta es un parámetro ampliamente utilizado para predecir la estabilidad de suspensiones y entre más positivo (o negativo) es éste parámetro, más estable es la suspensión.

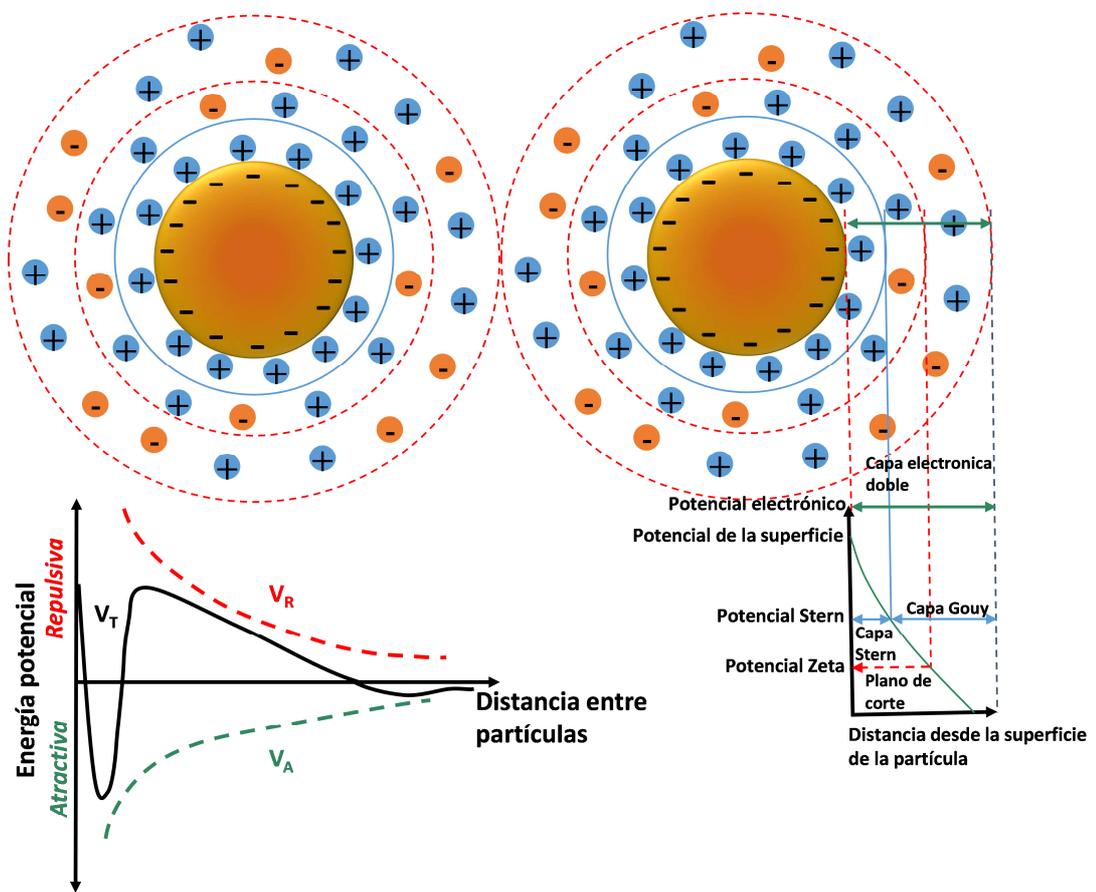


Figura 5. Ilustración de la teoría clásica de DLVO y de la capa eléctrica doble, adaptada de Wu et al., 2011.

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

El polímero PLGA con terminación en ácido (copolímero 50/50 de DL-láctico/glicólico, 0.2 dL/g) fue comprado de Purac Biomaterials, Gorinchem, The Netherlands. Diclorometano (CH_2Cl_2) fue adquirido de Fisher Scientific Inc. (Fair Lawn, NJ). El alcohol polivinílico (PVA) con un peso molecular promedio de ~31,000 a.m.u. y con 86.7-88.7 % en mol de hidrolisis fue obtenido de Sigma Aldrich, Inc. (St. Louis, MO).

3.2. Preparación de las Nanopartículas Poliméricas

La preparación de las nanopartículas poliméricas está basada en la técnica de emulsificación – evaporación del solvente, ilustrada en la Figura 6. Brevemente, PLGA fue disuelto en CH_2Cl_2 y luego gentilmente se agregó una solución acuosa de PVA como agente estabilizante. A continuación la mezcla se emulsificó en el ultrasonicador Qsonica 500 usando un baño de agua. Las cantidades de los químicos y las condiciones usadas en todas las preparaciones se presentan en la Tabla I, y cada experimento se realizó por triplicado. Después de la emulsificación, el solvente orgánico fue removido por evaporación durante mínimo 6 h en una campana de extracción, a temperatura ambiente y utilizando agitación magnética. Finalmente las nanopartículas fueron lavadas usando tres ciclos de centrifugación a 10000 rpm y 8°C por 15 min cada uno usando la centrifuga Beckman Coulter Allegra X-22R.

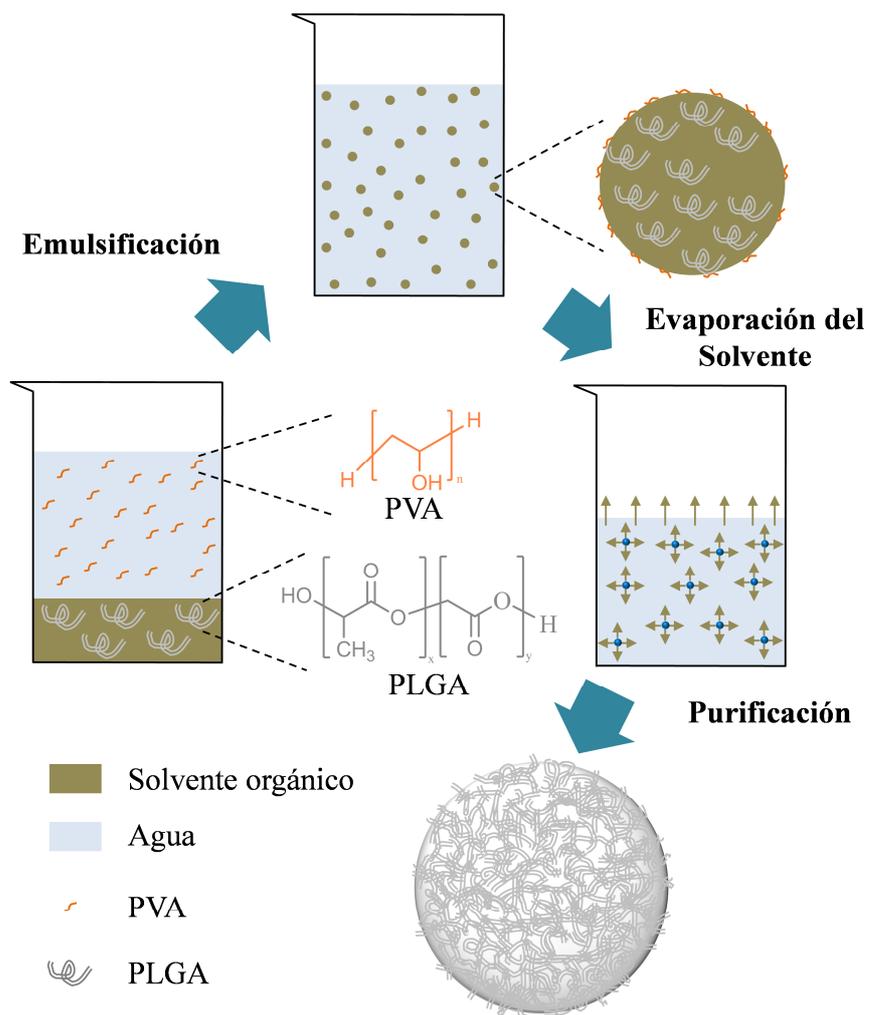


Figura 6. Esquema de síntesis de nanopartículas poliméricas usando la técnica de emulsificación – evaporación del solvente.

Tabla I. Matriz de experimentos para estudiar los efectos de las variables más importantes en la formulación de las nanopartículas poliméricas (n=3).

Muestra	Amplitud de Sonicación (%)	PVA (%)	PLGA (mg/ml)	Relación de solvente : agua
1	25	3	10	1 : 2
2	75	✓	✓	✓
3	50	✓	✓	✓
4	✓	1	✓	✓
5	✓	5	✓	✓
6	✓	3	5	✓
7	✓	✓	15	✓
8	✓	✓	10	1 : 1
9	✓	✓	✓	1 : 5

3.3. Caracterización de las Nanopartículas

Los tamaños de las nanopartículas fueron determinados por el equipo Zetasizer Nano ZEN. El índice de refracción que se empleó en los experimentos fue de 1.33 y el dispersante usado fue agua desionizada. El análisis de tamaño de cada muestra consistió en un promedio de 10 mediciones. Las características morfológicas de las nanopartículas se evaluaron usando microscopia electrónica de barrido (Hitachi S-4800 Field Emission Scanning Electron Microscope, Tokyo, Japan) ubicado en las instalaciones de Espectroscopia e Imágenes de la Universidad de Arizona. Las muestras se prepararon por inmovilización en celdas de cobre de 400-mesh recubiertas de carbono.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las propiedades de las nanopartículas poliméricas preparadas usando la técnica de emulsificación – evaporación del solvente se presentan en la Tabla II. Cuatro diferentes variables del proceso de síntesis de nanopartículas se estudiaron. Primero, se estudiaron los efectos de la amplitud de sonicación sobre las nanopartículas, considerando un 25%, 50% y 75% de amplitud. Se encontró que el tamaño promedio de las nanopartículas disminuye conforme aumenta la amplitud de sonicación, siendo más sensible éste para cambios menores al 50% de amplitud, lo que significa que la amplitud de sonicación juega un rol importante en el tamaño de las nanopartículas, como se muestra en la Figura 7. Asimismo, en esta Figura se muestra que el índice de polidispersidad promedio, en el rango de amplitud estudiado, varía inversamente proporcional a la amplitud de sonicación. Por otro lado, la amplitud de sonicación en el rango estudiado, no muestra un efecto considerable sobre el potencial Z promedio de las nanopartículas, como se puede observar en la Figura 8.

Tabla II. Variaciones del potencial zeta, tamaño e índice de polidispersidad de las nanopartículas poliméricas en función de la amplitud de sonicación, la concentración de PVA y PLGA y la relación volumétrica entre solventes (n=3).

Descripción	Zpot (mV)	Tamaño (d. nm)	PDI
Amplitud de sonicación de 25%	-23.25 ± 6.03	193.4 ± 5.4	0.108 ± 0.030
Amplitud de sonicación de 50%	-26.80 ± 4.95	177.7 ± 10.6	0.111 ± 0.004
Amplitud de sonicación de 75%	-26.10 ± 6.18	177.4 ± 10.0	0.055 ± 0.033
PVA (1%)	-29.40 ± 6.78	187.0 ± 8.5	0.074 ± 0.013
PVA (3%)	-26.80 ± 4.95	177.7 ± 10.6	0.111 ± 0.004
PVA (5%)	-26.60 ± 5.45	159.1 ± 2.0	0.097 ± 0.024
PLGA (5 mg/mL)	-30.05 ± 6.13	176.2 ± 8.2	0.144 ± 0.066
PLGA (10 mg/mL)	-26.80 ± 4.95	177.7 ± 10.6	0.111 ± 0.004
PLGA (15 mg/mL)	-27.65 ± 6.77	174.7 ± 3.4	0.078 ± 0.026
Solvente : Agua = 1:1	-31.00 ± 5.88	242.8 ± 30.0	0.272 ± 0.064
Solvente : Agua = 1:2	-26.80 ± 4.95	177.7 ± 10.6	0.111 ± 0.004
Solvente : Agua = 1:5	-26.55 ± 5.97	167.5 ± 7.8	0.138 ± 0.031

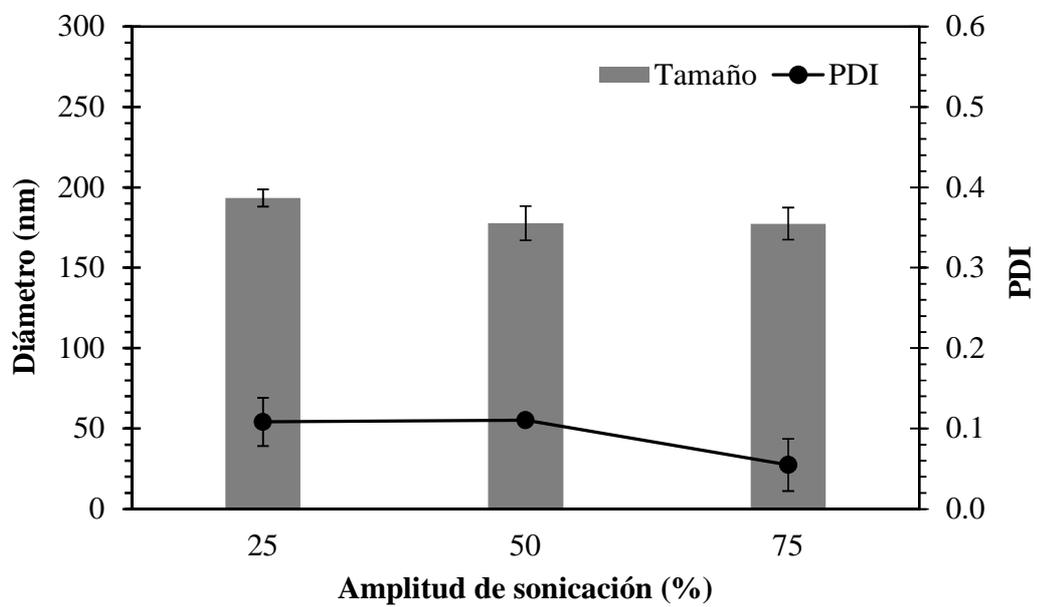


Figura 7. Variación del tamaño e índice de polidispersidad de las nanopartículas poliméricas en función de la amplitud de sonicación (n=3).

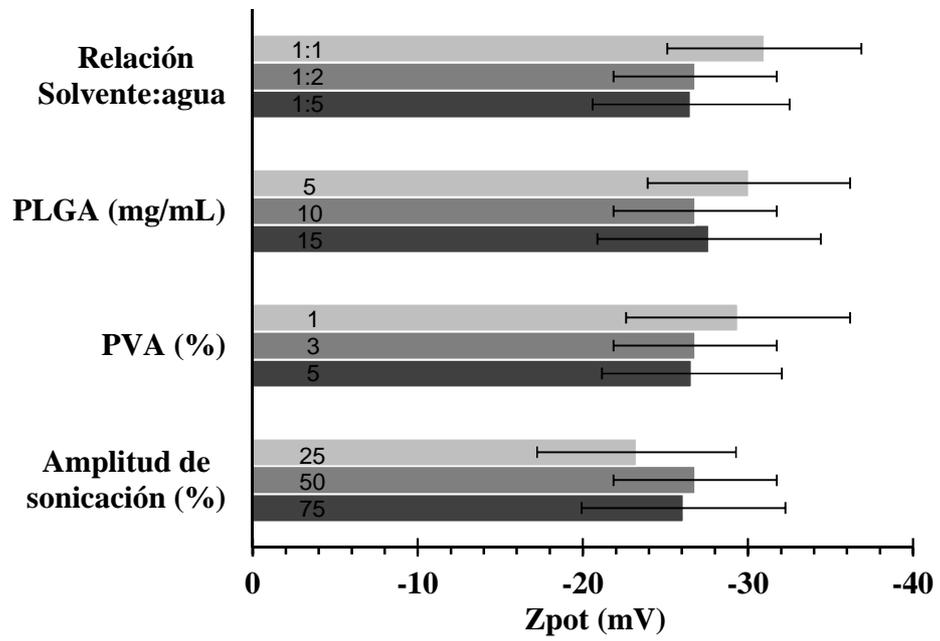


Figura 8. Variaciones en el potencial zeta debido a los parámetros de formulación de las nanopartículas poliméricas (n=3).

Tres diferentes concentraciones de PVA se consideraron en las formulaciones (25, 50 y 75%), encontrándose que el tamaño promedio de las nanopartículas poliméricas disminuye conforme se aumenta la concentración de PVA, como se puede observar en la Figura 4.3. Esto indica que en el rango estudiado las partículas son más estables conforme aumenta la concentración de PVA. Estos resultados corroboran que el PVA remanente que permanece asociado a las nanopartículas después de los lavados está ligado a la concentración de PVA usado en la formulación (Sahoo et al., 2002). Murakami et al. prepararon nanopartículas de PLGA usando PVA y encontraron que después de lavarlas varias veces, cierta cantidad de PVA permanecía fuertemente adsorbido en la superficie de éstas (Murakami et al., 1999). En la Figura 9 también se puede observar que la concentración de PVA no promueve una tendencia sobre el índice de polidispersidad, incrementando ligeramente éste cuando se aumenta la concentración de PVA de 1% a 3% y disminuyendo de nuevo cuando se incrementa la concentración de PVA de 3% a 5%, pero en las tres concentraciones de PVA experimentadas, el índice de polidispersidad se mantiene dentro de un pequeño rango. El potencial Z promedio de estas formulaciones presenta una pequeña tendencia a disminuir conforme se aumenta la concentración de PVA, siendo esta más significativa de -29.4 mV a -26.8 mV cuando se va de 1% a 3% de PVA, y luego permanece prácticamente constante de 3% a 5% de PVA, como se muestra en la Figura 8.

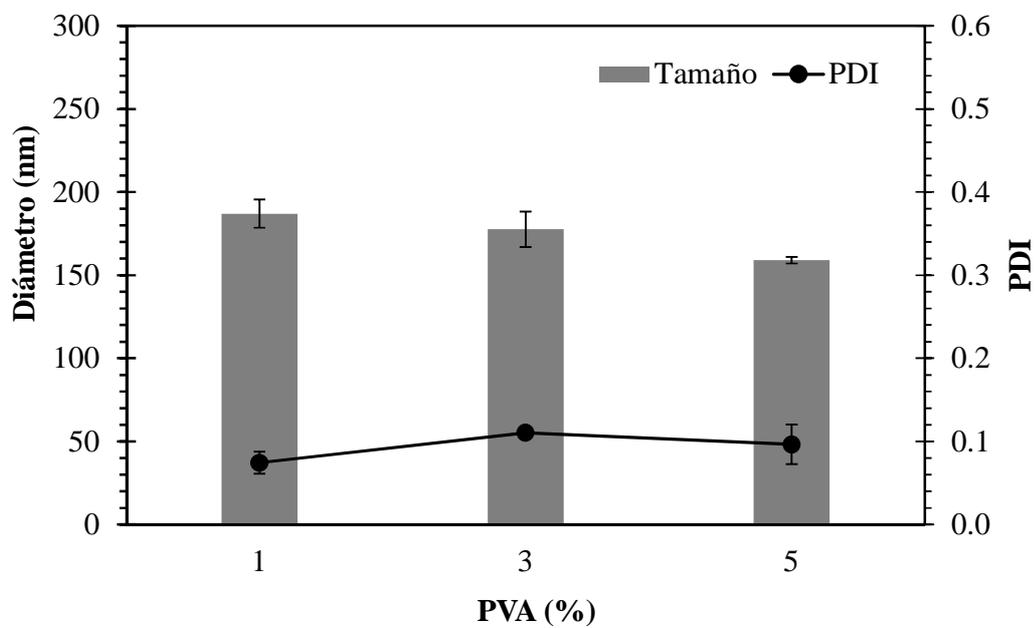


Figura 9. Variación del tamaño e índice de polidispersidad de las nanopartículas poliméricas en función de la concentración de PVA (n=3).

Los efectos de la concentración de PLGA en la formulación de las nanopartículas poliméricas fueron analizados considerando las concentraciones de 5 mg/mL, 10 mg/mL y 15 mg/mL. La Figura 10 muestra que estas tres formulaciones de nanopartículas se mantienen muy cercanas en tamaño, estando entre los promedios de 174.7 nm y 177.7 nm. Esto indica que en el rango de concentraciones de PLGA analizadas no existe un efecto considerable sobre el tamaño de las nanopartículas. En la misma Figura 10 se puede observar que en el rango de estudio, el índice de polidispersidad promedio disminuye considerablemente de 0.144 a 0.111 y finalmente a 0.078 cuando se preparan las nanopartículas usando concentraciones de PLGA de 5 mg/mL, 10 mg/mL y 15 mg/mL, respectivamente. En la literatura, cuando se prepararon nanopartículas de PLGA cargadas con docetaxel, usando la técnica de nanoprecipitación, ha sido reportada una correspondencia directa entre el tamaño de las nanopartículas y la cantidad de PLGA usado en la preparación, para diferentes solventes (Cheng et al., 2007). Con respecto al efecto de la concentración de PLGA sobre el potencial Z, se encontró un cambio de -30.05 mV a -26.8 mV de potencial Z promedio correspondiente a las formulaciones con 5 mg/mL y 10 mg/mL, respectivamente. Las formulaciones con concentraciones de 10 mg/mL y 15 mg/mL no presentan diferencia debido a la incertidumbre entre esos datos, pero en los tres casos el potencial Z se encontró siempre menor a -26 mV, como se puede observar en la Figura 8.

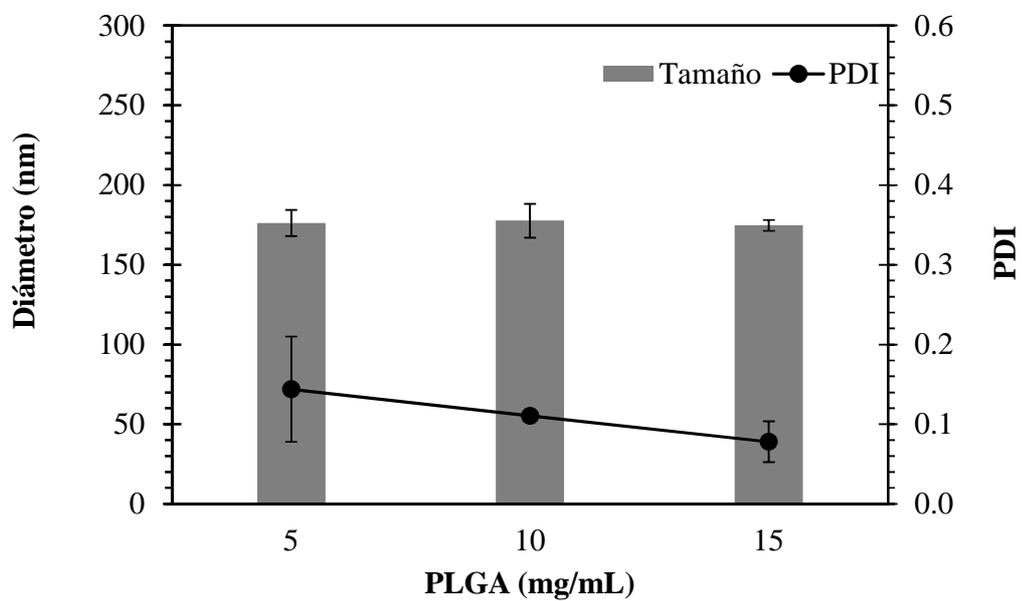


Figura 10. Variación del tamaño e índice de polidispersidad de las nanopartículas poliméricas en función de la concentración de PLGA (n=3).

La proporción entre el solvente orgánico y el agua en la formulación de las nanopartículas poliméricas se estudió utilizando las relaciones volumétricas (diclorometano:agua) de 1:1, 1:2 y 1:5. El análisis muestra que el tamaño promedio de las nanopartículas disminuye conforme aumenta la relación solvente:agua, dándose el cambio más considerable de 242.8 nm a 177.7 nm cuando la relación cambia de 1:1 a 1:2, respectivamente. Asimismo, el cambio del tamaño promedio de las nanopartículas se vuelve menos sensible cambiando de 177.7 nm a 167.5 nm cuando la relación cambia de 1:2 a 1:5, respectivamente, como se observa en la Figura 11. En esta figura también se presentan los cambios en el índice de polidispersidad debidos a la relación de solvente:agua y de igual manera que con el tamaño promedio de las nanopartículas, el índice de polidispersidad promedio disminuye considerablemente de 0.272 a 0.111 cuando la relación cambia de 1:1 a 1:2, respectivamente. Cuando la relación solvente:agua cambia de 1:2 a 1:5 se observa un incremento en la polidispersidad de 0.111 a 0.138, obteniéndose entonces el mejor índice de polidispersidad con la relación solvente:agua de 1:2. La Figura 8 presenta una ligera tendencia de aumento del potencial Z promedio conforme aumenta la relación solvente:agua, observándose el cambio más relevante en el potencial Z promedio de -31.0 mV a -26.8 mV cuando se va de la relación 1:1 a 1:2 y posteriormente un cambio menos considerable de -26.8 mV a -26.6 cuando se va de 1:2 a 1:5. La incertidumbre de los valores del potencial Z es alta, por lo que se considera que no existe un cambio en el potencial Z entre las relaciones 1:2 y 1:5.

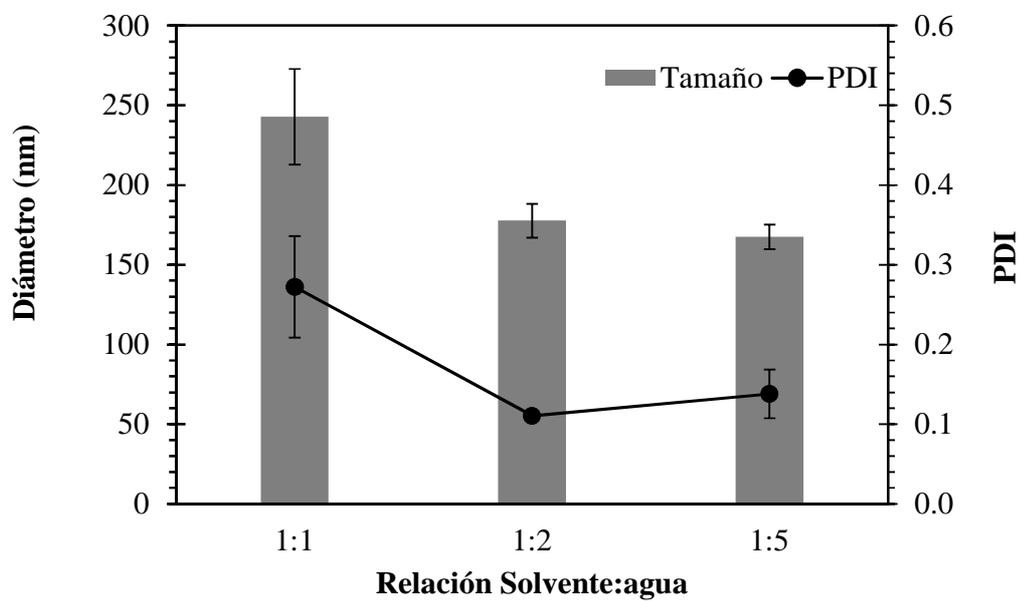


Figura 11. Variación del tamaño e índice de polidispersidad de las nanopartículas poliméricas en función de la relación de solvente orgánico (diclorometano) y agua (n=3).

La morfología de las nanopartículas fue analizada con el fin de corroborar el tamaño y ver el tipo de superficie que mostraban las partículas. Este estudio se realizó solamente para una preparación, escogiéndose a la muestra preparada con un 50% de amplitud de sonicación, una concentración de PVA de 3%, una concentración de polímero PLGA de 10 mg/mL y una relación volumétrica de solventes orgánico:agua de 1:2. La micrografía resultante de este análisis muestra que las nanopartículas tienen una superficie suave y son esféricas, como se muestra en la Figura 12. En esta figura también se puede observar que el tamaño de las nanopartículas es del orden de los 100 nm, lo cual corrobora los resultados obtenidos con dispersión de luz, donde resultó un tamaño promedio de 177.7 nm. Asimismo, se observa que a pesar de estar usando un haz de electrones relativamente bajo (1.5kV), la muestra se comienza a derretir, lo cual es apreciable en la misma Figura 12.

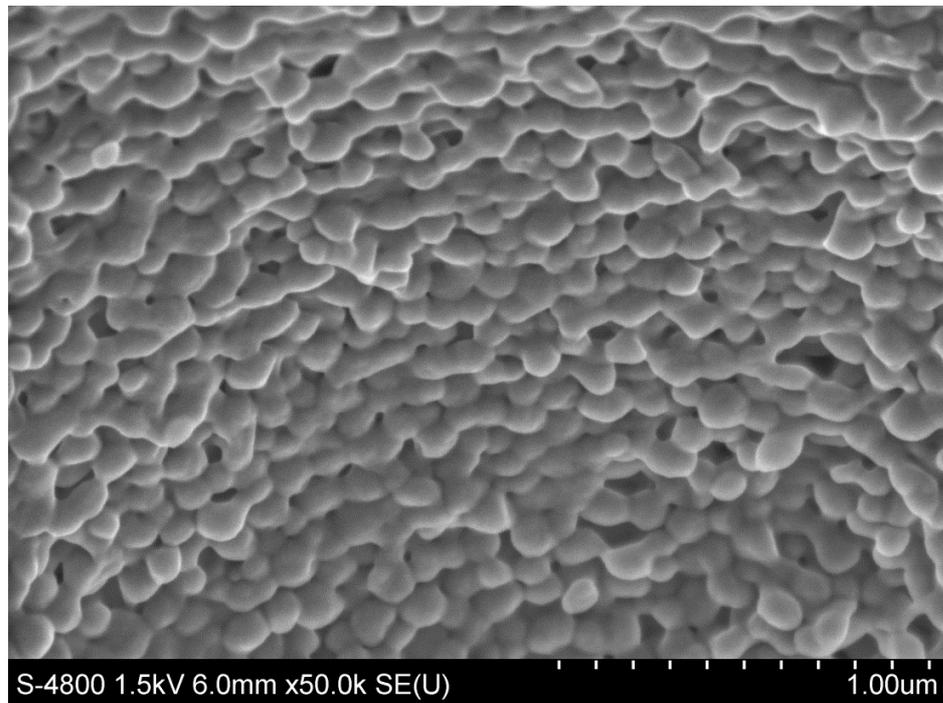


Figura 12. Micrografía electrónica de barrido (SEM) de las nanopartículas poliméricas preparadas con un 50% de amplitud de sonicación, una concentración de PVA de 3%, una concentración de polímero PLGA de 10 mg/mL y una relación volumétrica de solventes orgánico:agua de 1:2.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se prepararon nanopartículas poliméricas de PLGA usando la técnica de emulsificación-evaporación del solvente. Se investigó el efecto de la amplitud de sonicación, concentración de PLGA, concentración de PVA y relación volumétrica de solvente orgánico: agua sobre el tamaño, el índice de polidispersidad y el potencial Z de las nanopartículas poliméricas. Se encontró que el tamaño de las nanopartículas disminuye cuando se aumenta la amplitud de sonicación en el rango estudiado. Se encontró también el mismo efecto de disminución de tamaño de las nanopartículas cuando se incrementó la concentración de PVA en la formulación, lo cual sugiere que después de los lavados quedan remanentes de PVA asociados a la superficie de la nanopartícula. Además, el tamaño de las nanopartículas muestra una correspondencia con la relación de solventes en la emulsificación para este rango de estudio, disminuyendo el tamaño de las nanopartículas cuando aumenta la relación volumétrica de solvente orgánico:agua. Por otro lado, en este rango de estudio y con el número de muestras analizadas, no se encontró un efecto significativo de la concentración de PLGA sobre el tamaño de las nanopartículas, pero se encontró que el índice de polidispersidad promedio disminuye considerablemente al aumentar la concentración de PLGA. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el potencial Z para las diferentes formulaciones llevadas a cabo en este estudio.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda hacer más estudios para reducir la incertidumbre de todos resultados del potencial Z y de algunos resultados del índice de polidispersidad.
- Se recomienda estudiar la cinética de aglomeración después de que se formulan y lavan a las nanopartículas, para determinar su estabilidad.
- Se recomienda encapsular diferentes componentes para analizar los posibles efectos que podrían tener en las características de la nanopartícula.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Askeland, D.R., 1996. *The Science and Engineering of Materials*, Materials Science and Engineering A. Chapman and Hall.
- Cascone, M.G., Zhu, Z., Borselli, F., Lazzeri, L., 2002. Poly(vinyl alcohol) hydrogels as hydrophilic matrices for the release of lipophilic drugs loaded in PLGA nanoparticles. *J. Mater. Sci Mater. Med.* 13, 29–32.
- Cheng, J., Teply, B.A., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F.X., Levy-Nissenbaum, E., Radovic-Moreno, A.F., Langer, R., Farokhzad, O.C., 2007. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials* 28, 869–76.
- Chorny, M., Fishbein, I., Danenberg, H.D., Golomb, G., 2002. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *J. Control. Release* 83, 389–400.
- Cuenca, A.G., Jiang, H., Hochwald, S.N., Delano, M., Cance, W.G., Grobmyer, S.R., 2006. Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer* 107, 459–466.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J.M., Coco, R., Le Breton, A., Pr at, V., 2012. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *J. Control. Release* 161, 505–22.
- Dhar, S., Gu, F.X., Langer, R., Farokhzad, O.C., Lippard, S.J., 2008. Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 17356–61.
- Freitas, R.A., 2005. What is nanomedicine? *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* 1, 2–9.
- Garbassi, F., Morra, M., Occhiello, E., 1998. *Polymer Surfaces: From Physics to Technology*.
- Jain, R.A., 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21, 2475–90.
- Kumari, A., Yadav, S.K., Yadav, S.C., 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloid Surf. B* 75, 1–18.

- Makadia, H.K., Siegel, S.J., 2011. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)*. 3, 1377–1397.
- Mu, L., Feng, S.S., 2003. A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *J. Control. Release* 86, 33–48.
- Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H., Kawashima, Y., 1999. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int. J. Pharm.* 187, 143–52.
- Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H., Kawashima, Y., 2000. Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles. *Powder Technol.* 107, 137–143.
- Nie, S., Xing, Y., Kim, G.J., Simons, J.W., 2007. Nanotechnology applications in cancer. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 9, 257–88.
- Park, J., Fong, P.M., Lu, J., Russell, K.S., Booth, C.J., Saltzman, W.M., Fahmy, T.M., 2009. PEGylated PLGA nanoparticles for the improved delivery of doxorubicin. *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* 5, 410–8.
- Parveen, S., Sahoo, S.K., 2008. Polymeric nanoparticles for cancer therapy. *J. Drug Target.* 16, 108–23.
- Peer, D., Karp, J.M., Hong, S., Farokhzad, O.C., Margalit, R., Langer, R., 2007. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat. Nanotechnol.* 2, 751–60.
- Sahana, D.K., Mittal, G., Bhardwaj, V., Kumar, M.N.V.R., 2008. PLGA nanoparticles for oral delivery of hydrophobic drugs: influence of organic solvent on nanoparticle formation and release behavior in vitro and in vivo using estradiol as a model drug. *J. Pharm. Sci.* 97, 1530–1542.
- Sahoo, S.K., Panyam, J., Prabha, S., Labhasetwar, V., 2002. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J. Control. Release* 82, 105–14.
- Santini, J.T., 2013. Introduction to Drug Delivery Technology. *Chem. Eng. Pro.* 109, 19–23,39.

- Schramm, L.L., 2006. Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications, Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Shi, J., Votruba, A.R., Farokhzad, O.C., Langer, R., 2010. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett.* 10, 3223–3230.
- Wang, X., Yang, L., Chen, Z.G., Shin, D.M., 2008. Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging. *CA-Cancer J. Clin.* 58, 97–110.
- Wu, L., Zhang, J., Watanabe, W., 2011. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63, 456–69.
- Yang, J., Lee, C.-H., Park, J., Seo, S., Lim, E.-K., Song, Y.J., Suh, J.-S., Yoon, H.-G., Huh, Y.-M., Haam, S., 2007. Antibody conjugated magnetic PLGA nanoparticles for diagnosis and treatment of breast cancer. *J. Mater. Chem.* 17, 2695–2699.
- Zolnik, B.S., González-Fernández, A., Sadrieh, N., Dobrovolskaia, M.A., 2010. Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology* 151, 458–65.