



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA
Y METALURGIA

**ANÁLISIS DE LAS ETAPAS DE
EVAPORACIÓN, PURIFICACIÓN Y
LIOFILIZACIÓN EN LA PREPARACIÓN DE
NANOPARTÍCULAS DE PLGA POR LA
TÉCNICA DE EMULSIFICACIÓN –
EVAPORACIÓN DE SOLVENTE**

Tesis

Que para obtener el título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presenta

OMAR DANIEL GONZÁLEZ ORTEGA

Hermosillo, Sonora

Marzo de 2018

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

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi esposa Andrea, por todo el apoyo en todo momento, en mis propositos y carrera de vida, aguantarme en el proceso y darme ese animo, amor, paciencia, cariño y fuerzas en querer ser mejor dia con dia.

A mi madre Mercedes, por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi padre Ramiro, Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mis familiares, a mis hermanos Diana, Anya y Alan por ser el ejemplo de hermandad, por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

A mis maestros, Dra. Cindy Alejandra Gutierrez Valenzuela por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis; al Dr. Jesus Armando Lucero Acuña por su apoyo ofrecido a lo largo de este trabajo y por impulsar el desarrollo de nuestra formacion profesional; a la Dra. Patricia Guerrero German por su tiempo compartido y consejos para el desarrollo de mi formación profesional, al M. C. Gilberto Garcia Navarrete por apoyarnos y darnos su tiempo en su momento.

Y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis,

¡Gracias a ustedes!

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|------|
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| Índice DE FIGURAS | vi |
| Índice DE TABLAS | vii |
| RESUMEN..... | viii |
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS..... | 9 |
| 1.1. Objetivo General..... | 13 |
| 1.2. Objetivos Específicos | 13 |
| CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES | 15 |
| 2.1 Nanotecnología..... | 15 |
| 2.2 Concéptos Básicos en Nanotecnología | 17 |
| 2.2.1 Dispersiones coloidales..... | 17 |
| 2.2.2 Emulsiones..... | 18 |
| 2.2.3 Estabilidad de los sistemas coloidales..... | 20 |
| 2.2.4 Fuerzas Electrostáticas y de Dispersión | 22 |
| 2.2.5 Potencial Zeta | 24 |
| 2.2.6 Teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) | 25 |
| CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL..... | 27 |
| 3.1 Materiales..... | 27 |
| 3.2 Preparación de nanopartículas de PLGA | 27 |
| 3.3 Caracterización de NP | 28 |

| | | |
|--|--|----|
| 3.4 | Efecto de la velocidad de agitación durante la preparación de NP | 29 |
| 3.5 | Estudio del proceso de purificación de NP | 30 |
| 3.6 | Evaluación del uso de crioprotectores en el proceso de secado de NP | 30 |
| 3.7 | Morfología superficial de las NP | 31 |
| CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | | 32 |
| 4.1 | Efecto de la velocidad de agitación durante la preparación de NP | 32 |
| 4.2 | Estudio del proceso de purificación de NP | 34 |
| 4.3 | Evaluación del uso de crioprotectores en el proceso de secado de NP | 37 |
| 4.4 | Morfología superficial de las NP | 41 |
| CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | | 43 |
| 5.1 | Conclusiones | 43 |
| 5.2 | Recomendaciones | 44 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 2-1. Esquema de las emulsiones a) aceite en agua (O/W) y b) agua en aceite (W/O). | 19 |
| Figura 2-2. Ilustración de sedimentación, agregación y coalescencia en una emulsión, espuma o suspensión. Adaptada de Schramm, 2006. | 22 |
| Figura 2-3. Momento dipolar (μ) de dos cargas eléctricas $+q$ y $-q$ se encuentran separadas por una distancia r | 23 |
| Figura 2-4. Ilustración de la capa eléctrica doble y la teoría clásica de DLVO, adaptada de Wu et al., 2011 | 26 |
| Figura 3-1. Esquema de síntesis de nanopartículas poliméricas usando la técnica de emulsificación – evaporación del solvente. | 28 |
| Figura 4-1. Tamaño y PDI de NP en función de la velocidad de agitación magnética durante la evaporación de solvente ($n=3$). | 33 |
| Figura 4-2. Características de las nanopartículas de PLGA en el proceso de purificación a 10,000 rpm (■), 15,000 rpm (■) y 20,000 rpm (■). Los datos representan el promedio \pm DE ($n = 3$). | 36 |
| Figura 4-3. Características de las NP previo al tratamiento de crioprotectores (■) y al añadir diferentes porporciones de sucrosa (■), glucosa (■) and lactosa (■) con respecto a la masa inicial de PLGA. Los datos representan el promedio \pm DE ($n = 3$). | 39 |
| Figura 4-4. Micrografía de las NP obtenida mediante SEM. | 42 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 2-1. Tipos de sistemas coloidales..... | 18 |
| Tabla 3-1. Matriz de experimentos para estudiar el efecto de la velocidad de agitación en la evaporación del solvente orgánico en la formulación de las NP ($n=3$)..... | 29 |
| Tabla 3-2. Matriz de experimentos para estudiar el efecto de la velocidad de agitación en la evaporación del solvente orgánico en la formulación de las NP ($n=3$)..... | 30 |
| Tabla 3-3. Experimentos para evaluar el efecto del uso de crioprotectores durante el proceso de liofilización de NP ($n=3$)..... | 31 |
| Tabla 4-1. Variación de tamaño y PDI de las NP en función de la velocidad de agitación, manteniendo la concentración de PVA, PLGA y la proporción entre la fase acuosa y orgánica ($n=3$)..... | 33 |
| Tabla 4-2. Características de las nanopartículas de PLGA a través del proceso de purificación por ultracentrifugación. Los datos representan el promedio \pm DE ($n = 3$)..... | 37 |
| Tabla 4-3. Características de las nanopartículas de PLGA al utilizar agentes crioprotectores durante el proceso de secado. Los datos representan el promedio \pm DE ($n = 3$)..... | 40 |

RESUMEN

La administración de fármacos utilizando nanopartículas poliméricas (NP) presenta ventajas significativas con respecto a la administración libre de fármacos. En este estudio, se evaluaron parámetros utilizados durante la preparación de NP utilizando la técnica de emulsificación - evaporación de solvente, la cual puede ser utilizada para la encapsulación de fármacos. Los parámetros que se estudiaron incluyen, variaciones en la velocidad de agitación durante la evaporación de solvente; la velocidad de centrifugación durante la purificación; y el uso de crioprotectores durante el secado de las mismas. La caracterización de nanopartículas se realizó mediante dispersión dinámica de luz (DLS), láser Doppler electroforesis y microscopio electrónico de barrido (SEM). En la purificación de nanopartículas, una velocidad de centrifugación de 20,000 rpm dio como resultado un tamaño de NP más pequeño y una desviación estándar y cargas superficiales más negativas, con un mejor rendimiento en comparación con las otras velocidades consideradas. Cuando la glucosa se usó como crioprotector en proporción de 1:1 con respecto a la cantidad inicial de PLGA, el tamaño de NP y el cambio de los potenciales zeta fue despreciable. Estos parámetros darían como resultado nanopartículas monodispersas de tamaño inferior a 200 nm y experimentos reproducibles.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El uso de nanodispositivos para aplicaciones médicas es una de las tecnologías más prometedoras de los últimos 50 años (Kreuter 2007). A través del tiempo, los objetivos de estos sistemas siguen siendo consistentes: se busca lograr la liberación de fármacos de forma controlada a partir de partículas que sean biocompatibles con tejido y células; alcanzar una mayor internalización celular que otros sistemas de partículas; así como, mejorar la estabilidad de las sustancias activas; y tener la capacidad de dirigir estos sistemas a tejidos específicos (Mora-Huertas *et al.* 2010, Kreuter 2007, Shi *et al.* 2010, Peer *et al.* 2007). Un factor importante en el diseño de estos sistemas es el tamaño, el cual debe ser lo suficientemente grande como para evitar la rápida incorporación a los vasos sanguíneos, pero lo suficientemente pequeño como para evitar su eliminación por el sistema inmune (Cho *et al.* 2008).

Además los nanosistemas deben cumplir con varias características, como: estar hechos de materiales biocompatibles y biodegradables y ser fáciles de reproducir experimentalmente (Peer *et al.* 2007, Mu & Feng 2003). Para la preparación de estos nanosistemas, se han utilizado distintos materiales tales como nanopartículas metálicas y magnéticas, nanoestructuras basadas en cerámica y en sílice, puntos cuánticos, materiales de carbono; y también materiales orgánicos que incluyen liposomas, micelas, polisacáridos, dendrímeros y polímeros (Vivero-Escoto & Elnagheeb 2015, Paszko *et al.* 2011).

Entre los materiales poliméricos más exitosos utilizados en la administración de fármacos, está el ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) el cual muestra un inmenso potencial como vehículo de administración de fármacos y como estructura para la ingeniería de tejidos (Makadia & Siegel 2011, Danhier *et al.* 2012). En el cuerpo humano, el PLGA sufre hidrólisis para producir los monómeros de metabolitos biodegradables: ácido láctico y ácido glicólico, los cuales se biodegradan más a CO₂ y agua (Danhier *et al.* 2012, Jain 2000, Kumari *et al.* 2010). Además, el PLGA está aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para su uso en sistemas terapéuticos (Danhier *et al.* 2012, Parveen & Sahoo 2008).

En la literatura, se han reportado gran variedad de técnicas para la preparación de nanopartículas de PLGA. Algunas de las técnicas más comunes son: difusión de solvente, nanoprecipitación, polimerización, precipitación salina (salting-out), emulsión-evaporación de solvente, entre otras (Murakami *et al.* 2000, Sahana *et al.* 2008, Dhar *et al.* 2008, Chorny *et al.* 2002, Cohen-Sela *et al.* 2009, Vauthier & Bouchemal 2009, Park *et al.* 2009, Mora-Huertas *et al.* 2010, Danhier *et al.* 2012, Jain 2000, Yang *et al.* 2007, Grazia Cascone *et al.* 2002). De los anteriores, el método de emulsión-evaporación de solvente es uno de los más utilizados, y consiste en el uso de un solvente volátil no miscible, agua y la aplicación de una gran fuerza de corte inducida por ondas ultrasónicas, que da como resultado la formación de una emulsión. Durante este proceso, se utiliza un agente estabilizador para evitar la desintegración de la emulsión. Algunas de las

ventajas de esta técnica son que puede utilizarse para encapsular compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos, presenta una buena reproducibilidad, y aunque tiene un alto consumo de energía, el tiempo del proceso de evaporación puede ser reducido (Nava-Arzaluz *et al.* 2012, Astete *et al.* 2007). Algunos autores han estudiado ampliamente las variables del proceso, modificando variables como solventes, estabilizadores, proporción orgánica a acuosa, diferentes polímeros y otros (Iqbal *et al.* 2015, Budhian *et al.* 2007, Sahoo *et al.* 2002, Astete & Sabliov 2006).

Después de la emulsificación y la evaporación de solvente, es necesario eliminar el exceso de agente estabilizante (surfactante) y también impurezas potencialmente tóxicas, como disolventes orgánicos, monómeros residuales y grandes agregados de polímeros. Algunos de los métodos más comúnmente utilizados para la purificación de partículas a escala de laboratorio incluyen diálisis, filtración de flujo cruzado, filtración en gel, evaporación a presión reducida y ultracentrifugación (Limayem *et al.* 2004). Durante la purificación de suspensiones de nanopartículas poliméricas, el uso de centrifugación a baja fuerza de gravedad puede ser utilizado para eliminar agregados y partículas grandes. En modo semejante, el uso de centrifugaciones de muy alta velocidad (método de ultracentrifugación) puede ser utilizado para separar las nanopartículas que tengan una densidad ligeramente más alta que la del agua, sedimentándose y concentrándose en un precipitado, el cual se puede separar

del medio de dispersión que se encuentra en el sobrenadante (Vauthier & Bouchemal 2009).

La parte final de la preparación de nanopartículas es la liofilización. Durante este proceso, la congelación induce tensiones desestabilizadoras para las nanopartículas, con esto se incrementa la concentración de nanopartículas, por lo tanto la interacción entre ellas, esto conduce a su agregación o fusión. La inmovilización de nanopartículas dentro de una matriz vítrea puede prevenir su agregación y protegerlas del estrés mecánico de los cristales de hielo. En la literatura, los crioprotectores más reportados para liofilización de nanopartículas son los azúcares: tetralosa, sacarosa, glucosa y manitol (Abdelwahed *et al.* 2006).

En este trabajo, se busca preparar nanopartículas poliméricas mediante la técnica de emulsificación- evaporación de solvente, estudiando el efecto de la velocidad de agitación durante la evaporación de solvente, el proceso de purificación por el método de ultracentrifugación y el uso de crioprotectores durante el proceso de secado. Las nanopartículas se caracterizarán por tamaño, potencial zeta y morfología utilizando las técnicas de DLS, láser Doppler electroforesis y microscopio electrónico de barrido (SEM), respectivamente.

1.1. Objetivo General

Analizar el efecto y las condiciones óptimas de la velocidad de agitación durante la evaporación del solvente orgánico; el proceso de purificación y la etapa final de liofilización en la preparación de nanopartículas poliméricas de PLGA utilizando la técnica de emulsificación – evaporación del solvente.

Análisis de las Etapas de Evaporación, Purificación y Liofilización en la Preparación de Nanopartículas de PLGA por la Técnica de Emulsificación – Evaporación de Solvente.

1.2. Objetivos Específicos

- 1.3.1 Sintetizar nanopartículas poliméricas variando la velocidad de agitación, mientras se mantienen los demás parámetros de formulación constantes.
- 1.3.2 Analizar el comportamiento de las características de las nanopartículas a través del proceso de purificación por el método de ultracentrifugación.
- 1.3.3 Estudiar el efecto del uso de crioprotectores en las características de las nanopartículas antes y después del proceso de liofilización.
- 1.3.4 Caracterizar las nanopartículas por dispersión de luz para el tamaño, polidispersidad y potencial zeta. Estudiar la morfología de las nanopartículas mediante el microscopio electrónico de barrido (SEM).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Nanotecnología

En los últimos años, el campo de estudio de la nanotecnología se ha convertido en una de las áreas de investigación más activas en la ciencia de los materiales modernos (Ganapathy Selvam & Sivakumar 2015). La nanotecnología involucra sistemas o materiales que muestran propiedades inusuales, las cuales están ausentes en escalas mayores de longitud (materiales a granel) o menores (átomos o moléculas) (Noury & López 2017). Estas propiedades incluyen magnetismo, conducción de calor o electricidad, reactividad química, reflexión de la luz, entre otros; y pueden atribuirse a los efectos de la ciencia cuántica mecánica y de superficie (Noury & López 2017, National Nanotechnology Initiative 2017). Dentro de la nanotecnología, se encuentra la nanomedicina, la cual se define como la aplicación de la nanotecnología a la salud y se centra en el monitoreo, control, construcción, reparación, defensa y mejora integral de todo el sistema biológico humano con el objetivo de obtener beneficios médicos (Boisseau & Loubaton 2011, European Technology Platform on NanoMedicine 2005). Se busca que la nanomedicina cambie drásticamente la práctica del cuidado de la salud desde el diagnóstico hasta la terapéutica, con la promesa de que el diagnóstico y los tratamientos serán personalizados, lo que significa que se adaptarán a las necesidades individuales del paciente (Noury & López 2017).

El uso de nuevos métodos para la administración de medicamentos y otros compuestos terapéuticos es un tema de gran interés debido a la variedad de aplicaciones contra diferentes enfermedades. El uso de nanosistemas ha sido ampliamente estudiado mostrando una gran capacidad para administrar compuestos y fármacos (Shi *et al.* 2010, Peer *et al.* 2007). Estos nanosistemas podrían ofrecer varias ventajas sobre los fármacos libres, por ejemplo, proteger el medicamento de interacciones no deseadas con otros tejidos orgánicos o dirigidas a tejidos específicos con el fin de aumentar las interacciones deseadas. Además, la liberación del fármaco se podría controlar de manera más eficaz (Peer *et al.* 2007, Mu & Feng 2003, Makadia & Siegel 2011, Danhier *et al.* 2012). Un ejemplo de un uso potencial de estos sistemas es la administración de tratamientos contra el cáncer. Las opciones de tratamiento para cánceres localizados, como tumores, por lo general incluyen la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. La administración de medicamentos contra tumores cancerosos a menudo están relacionados con efectos secundarios causados por la acción de los fármacos en diferentes sitios, los cuales son diferentes a las células cancerosas y los tumores (Maeda *et al.* 2009). En relación a esto los nanosistemas cargados de fármacos contra cáncer son una clase prometedora de nuevos tratamientos que tienen el potencial de proporcionar una mayor eficacia y menor toxicidad en relación con la terapéutica convencional (Bartlett *et al.* 2007, Petros & DeSimone 2010). Entre todos los materiales utilizados como nanodispositivos, las nanopartículas poliméricas han demostrado mayor

integridad estructural y estabilidad que otros dispositivos; también son capaces de controlar el perfil de liberación del fármaco y se pueden sintetizar y funcionalizar fácilmente (Ghitman *et al.* 2017). Gran variedad de fármacos han sido encapsulados en nanopartículas poliméricas, entre ellos se encuentran fármacos contra el cáncer, como el paclitaxel, la doxorubicina, el 5-fluorouracilo, el 9-nitrocamptotecina, el cisplatino, la triptorelina, la dexametasona, entre otros (Kumari *et al.* 2010).

2.2 Concéptos Básicos en Nanotecnología

2.2.1 Dispersiones coloidales

Un sistema coloidal es un sistema formado por dos o más fases: una fase dispersa, que puede estar formada por pequeñas partículas, gotas o burbujas y otra que actúa como dispersante de la primera. Los sistemas coloidales han sido investigados desde 1843, el científico inglés Thomas Graham es considerado generalmente como el fundador del estudio coloidal experimental. Graham estudiaba la velocidad de difusión de diferentes sustancias en diferentes medios. Graham dividió los coloides como liofóbicos y liofílicos. Donde la estabilidad de los coloides liofóbicos está gobernada solamente por la carga eléctrica de las partículas, y la de los coloides liofílicos se gobierna por la carga y la solvatación (Castro Román 1994). Algunos ejemplos de soluciones coloidales liofóbicas son: surfactantes, micelas, soluciones de proteínas y virus (Schramm 2006), las

cuales se pueden formar mediante agitación utilizando energía mecánica en algún mezclador estilo hélice, molino coloidal, o un generador de ultrasonidos (Sennett & Olivier 1965, Schramm 2006). Entre las soluciones coloidales liofilicas se encuentran las emulsiones, espumas y suspensiones de partículas (Schramm 2006, Sennett & Olivier 1965). En la Tabla 2-1 se muestran los diferentes tipos de soluciones coloides que se pueden encontrar dependiendo de las características de las fases que la componen:

Tabla 2-1. Tipos de sistemas coloidales

| Fase dispersa | Medio de dispersión | Nombre | Ejemplos |
|----------------|---------------------|----------------------|-----------------|
| Líquido | Gas | Aerosol líquido | Niebla |
| Sólido | Gas | Aerosol sólido | Humo, polvo |
| Gas | Líquido | Espuma | |
| Líquido | Líquido | Emulsión | Leche |
| Sólido | Líquido | Sol (suspensión) | Sol de oro |
| Gas | Sólido | Espuma sólida | Sólidos porosos |
| Líquido | Sólido | Emulsión sólida | Mantequilla |
| Sólido | Sólido | Suspensión sólida | Vidrio colorado |

2.2.2 Emulsiones

Las emulsiones son dispersiones coloidales en la cuales un líquido es disperso en una fase líquida continua de diferente composición. 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.

Dependiendo de cuál de los líquidos sea la fase continua, se puede formar emulsiones de aceite en agua (O/W) donde las gotas de aceite se encuentran dispersas en agua; y emulsiones de agua en aceite (W/O) donde las gotas de agua se encuentran dispersas en aceite (Figura 2.1). También, se pueden encontrar las llamadas emulsiones dobles, como: emulsión aceite en agua en aceite (O/W/O) la cual contiene gotas de aceite dispersas en gotas de agua, que a su vez están en una fase continua de aceite; o emulsión agua en aceite en agua (W/O/W) donde se forman gotas de agua dispersas en gotas de aceite que a su vez se encuentran dispersas en agua. Las gotas formadas durante las emulsiones tienen generalmente un tamaño de 1 a 1000 nm, sin embargo pueden alcanzar tamaños de decenas de micrometros (Sonneville-Aubrun *et al.* 2004, Schramm 2006).

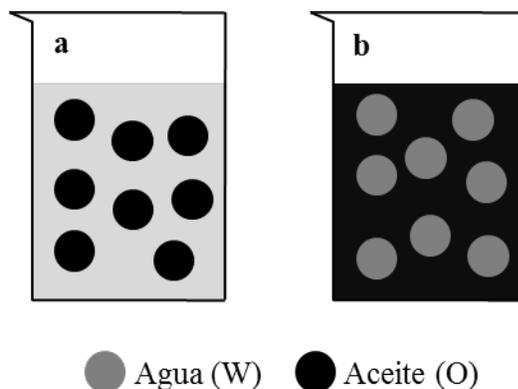


Figura 2-1. Esquema de las emulsiones a) aceite en agua (O/W) y b) agua en aceite (W/O). Adaptada de Schramm, 2006.

El tipo de emulsión que se forme, generalmente depende de factores como la relación de volúmenes de fase, ya que el que tiene volumen más pequeño es frecuentemente la fase dispersa (Schramm 2006). Para la formación de emulsiones, se combinan las fases mediante mezclado a una alta velocidad. Este mezclado requiere altas fuerzas mecánicas de corte ya sea por una hélice, mezclado de turbina, molino o generador ultrasónico para producir gotas suficientemente pequeñas (Russel *et al.* 1989, Schramm 2006). Para que una emulsión sea estable, se pueden utilizar agentes estabilizantes, los cuales forman una película protectora para evitar que la emulsión se rompa. El agente estabilizante puede reducir la tensión superficial del medio, haciendo posible la creación de gotas pequeñas y puede estabilizar estas gotas para que no coalezcan formando gotas más grandes. Los agentes estabilizantes para emulsiones pueden estar formados de macromoléculas, electrolitos inorgánicos, surfactantes, o sólidos finamente divididos, (como carbono, sulfatos, hidróxidos, o revestimientos de partículas de arcilla) (Sennett & Olivier 1965).

2.2.3 Estabilidad de los sistemas coloidales

La estabilidad de una dispersión coloidal depende de las interacciones que ocurren entre las partículas dispersas y las partículas del solvente (Islam *et al.* 1995, Russel *et al.* 1989). En un sistema coloidal, existen diferentes procesos por los cuales, según su grado de estabilidad, las especies pueden dispersarse:

sedimentación, agregación y coalescencia (Solans *et al.* 2005, Sonneville-Aubrun *et al.* 2004, Schramm 2006). La Figura 2.2 muestra estos procesos:

- La sedimentación ocurre debido a una diferencia de densidad entre las fases del sistema coloidal. Donde una de las fases contiene una concentración muy elevada de la fase dispersa, produciendo agregados.
- La agregación ocurre cuando debido a la formación de especies dispersas por movimiento browniano, sedimentación o agitación, promoviendo el aglutinamiento de las partículas que se tocan en uno o varios puntos. Donde aunque mantienen su identidad, pierden su independencia cinética y se mueven como un conjunto (Tadros *et al.* 2004, Schramm 2006).
- Durante la coalescencia, la capa estabilizante delgada se rompe, y al unirse dos o más gotas o partículas forman una gran unidad reduciendo el área superficial (Schramm 2006, Sennett & Olivier 1965).

Algunos factores que favorecen la estabilidad de la emulsión se puede resumir como: una baja tensión interfacial, la cual mantendrá una energía libre interfacial baja; y una alta viscosidad de la superficie o la película interfacial, que actuará como barrera para la coalescencia y puede ser mejorada por la adsorción de los sólidos finos (Schramm 2006, Solans *et al.* 2005). Otro factor que puede aumentar la estabilidad de los coloides es la ampliación de la doble capa

eléctrica y/o repulsiones estéricas que influyen también para prevenir las colisiones y la agregación, y por lo tanto, la coalescencia (Schramm 2006).

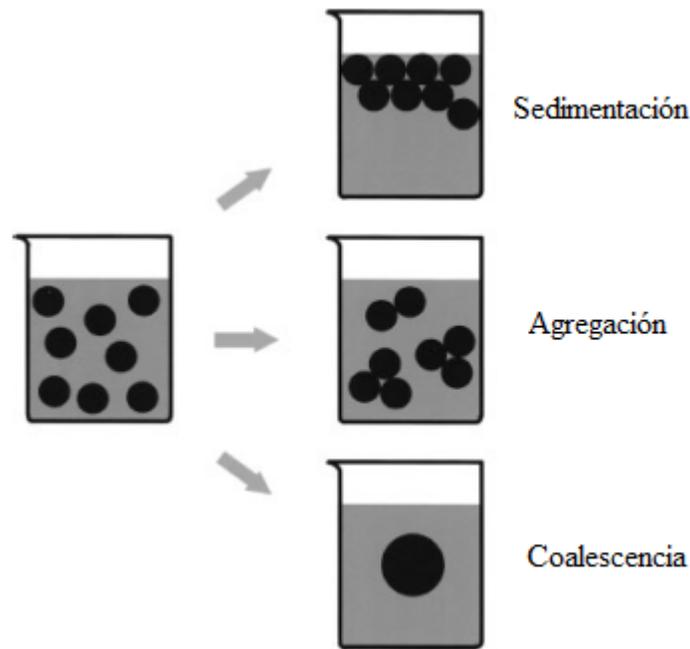


Figura 2-2. Ilustración de sedimentación, agregación y coalescencia en una emulsión, espuma o suspensión. Adaptada de Schramm, 2006.

2.2.4 Fuerzas Electrostáticas y de Dispersión

Cuando dos partículas cargadas se aproximan unas a otras en una solución, dos tipos de fuerzas interactúan entre estas dos partículas: las fuerzas de Van Der Waals y las fuerzas electrostáticas de la doble capa eléctrica. Dependiendo de la magnitud de cada una de estas dos fuerzas, la fuerza neta resultante puede ser de repulsión o atracción (Ohshima 2006).

Fuerzas de Van Der Waals - se dan entre los átomos y las moléculas, son de carácter atómico. Cuando dos cargas eléctricas $+q$ y $-q$ se encuentran separadas por una distancia r , el momento dipolar está definido como $q \times r$ (Figura 2.3), lo cual supone que el átomo es eléctricamente neutro (Askeland 1996).

Considerando que la carga positiva del núcleo atómico y la carga negativa de los electrones coinciden, entonces, un átomo neutro no cuenta con momento dipolar. Cuando un átomo neutro es expuesto a un campo eléctrico, el átomo se polariza (los centros de carga positiva y negativa se separan) creando un momento dipolar. En algunas moléculas, llamadas moléculas polarizadas, el momento dipolar no tiene que ser inducido, existe debido a la dirección de los enlaces y a la naturaleza de los átomos. Por ejemplo: el agua, constituida con un momento dipolar permanentemente.

Las Fuerzas de Van Der Waals 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.

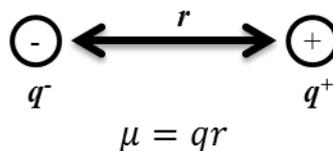


Figura 2-3. Momento dipolar (μ) de dos cargas eléctricas $+q$ y $-q$ se encuentran separadas por una distancia r .

Fuerzas electroestáticas de la doble capa eléctrica (EDL). 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. Esta carga superficial es dinámica y se puede modificar cambiando las características del solvente, como la fuerza iónica o el pH.

2.2.5 Potencial Zeta

El potencial zeta (ζ) es una medida de la carga eléctrica desarrollada cuando una superficie sólida es puesta en contacto con una solución acuosa. En la Figura 2.4 se muestra la EDL, donde los iones que se encuentran libres en la solución tienden a reorganizarse formando varias capas en la interfase sólido líquido. En la superficie de la partícula sólida, se forma una región delgada donde se produce cierta densidad de carga, ésta región es conocida como capa compacta. En la capa compacta, los iones experimentan grandes fuerzas electroestáticas de atracción, por lo tanto son inmóviles. La región fuera de la capa compacta se le llama capa difusa, en ella, los iones son móviles, y crean una concentración de iones máxima en la superficie, la cual disminuye gradualmente conforme la distancia aumenta hasta alcanzar el equilibrio (Dongqing Li 2008).

2.2.6 Teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO)

Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek desarrollaron una teoría cuantitativa para describir las fuerzas de atracción y repulsión entre coloides liofóbicos, es conocida como la teoría del DVLO (Hiemenz & Rajagopalan 1997, Israelachvili 2011). En la Figura 2.4 se puede observar cómo mediante la teoría del DVLO se pueden estimar el cambio de las energías potenciales de atracción (dispersión de Van der Waals de London, V_A) y repulsión (electrostáticas incluyendo Born, V_R) con respecto a la distancia entre-partículas. Donde la energía de interacción total (V_T) será igual a la suma de todas las fuerzas (Islam *et al.* 1995, Schramm 2006).

Esta teoría muestra que la contribución de las fuerzas de atracción de Van Der Waals prevalecen si las distancias son pequeñas. Para un sistema dado, las fuerzas de Van Der Waals pueden ser consideradas constantes ya que sólo dependen de la naturaleza de las especies que interactúan, mientras que las variaciones electrostáticas pueden ser modificadas por las condiciones del sistema (Garbassi *et al.* 1998).

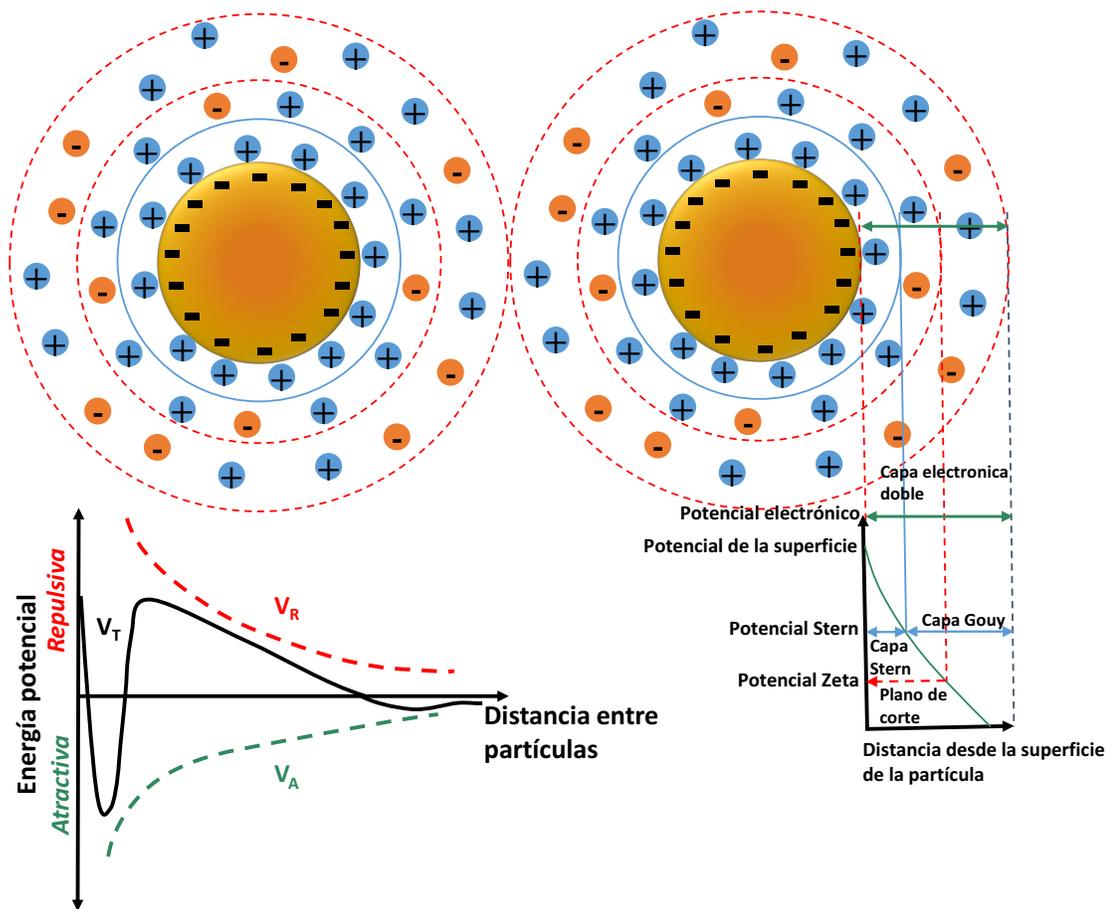


Figura 2-4. Ilustración de la capa eléctrica doble y la teoría clásica de DLVO, adaptada de Wu et al., 2011

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 Materiales

El polímero PLGA con terminación en ácido (copolímero 50/50 de DL-láctico/glicólico, 0.2 dl/g) fue obtenido como regalo de Purac Biomaterials (Gorinchem, Netherlands). Diclorometano o DCM (CH_2Cl_2) fue adquirido de Fisher Scientific Inc. (Fair Lawn, EU). El alcohol polivinílico (PVA) con un peso molecular promedio de ~31,000 a.m.u. y con 86.7-88.7 porcentaje en mol de hidrolisis fue obtenido de Sigma Aldrich, Inc. (St. Louis, EU). Los agentes crioprotectores: sucrosa, lactosa y glucosa se obtuvieron de Reactivos Meyer (Ciudad de México, MX)

3.2 Preparación de nanopartículas de PLGA

Las nanopartículas de PLGA (NP) se preparan utilizando la técnica de emulsificación-evaporación de solvente. En la Figura 3.1 se presenta un esquema de la preparación de nanopartículas. En resumen, se añaden 25 ml de una solución acuosa de PVA al 5% p/v a una solución de 5 ml de DCM que contiene 50 mg de PLGA. La mezcla se emulsiona durante 1 minuto al 75% de amplitud (90 μm) en baño de hielo utilizando el equipo QSonica 500 sonicator (QSonica LLC, Newtown, Connecticut, EE. UU.). Después de la emulsificación, el solvente se evapora bajo agitación magnética, a temperatura ambiente por 8

Worcestershire, Reino Unido). Las mediciones de los tamaños se realizan por dispersión dinámica de la luz (DLS). Cada muestra se mide tres veces con 10 ejecuciones, respectivamente. Además, cada muestra para el potencial zeta se realiza por duplicado con al menos 10 ciclos a temperatura constante (25°C) mediante electroforesis Doppler láser.

3.4 Efecto de la velocidad de agitación durante la preparación de NP

Durante la etapa de evaporación de solvente, se realizaron diferentes experimentos variando las velocidades de agitación mientras se mantienen los demás parámetros constantes. La tabla 3.1 muestra la matriz de experimentos considerados.

Tabla 3-1. Matriz de experimentos para estudiar el efecto de la velocidad de agitación en la evaporación del solvente orgánico en la formulación de las NP ($n=3$).

| Muestra | Agitación (rpm) |
|---------|-----------------|
| 1 | 200 |
| 2 | 300 |
| 3 | 400 |

3.5 Estudio del proceso de purificación de NP

Una vez que el solvente ha sido evaporado, el siguiente paso es la purificación de las nanopartículas, durante la cual, se elimina gran cantidad del PVA utilizado para estabilizar la emulsión. La Tabla 3.2 muestra el diseño de experimentos realizados para la purificación de nanopartículas por el método de ultracentrifugación.

Tabla 3-2. Matriz de experimentos para estudiar el efecto de la velocidad de agitación en la evaporación del solvente orgánico en la formulación de las NP ($n=3$).

| Muestra | Velocidad de centrifugación | |
|---------|-----------------------------|--------|
| | rpm | * g |
| 1 | 10 000 | 12,096 |
| 2 | 15 000 | 27,216 |
| 3 | 20 000 | 48,384 |

3.6 Evaluación del uso de crioprotectores en el proceso de secado de NP

Una vez terminados los lavados de NP se procede al proceso de secado o liofilización. Se utilizan diferentes crioprotectores en varias proporciones con respecto a la cantidad inicial de polímero utilizado. En la Tabla 3.3 se indican los experimentos contemplados en este estudio. Durante la caracterización de NP, las mediciones de tamaño y potencial zeta se llevan a cabo antes y después de aplicar el agente crioprotector. De igual manera, una vez concluido el proceso de

liofilización, se resuspende una cantidad de nanopartículas en agua desionizada y se procede a la lectura de tamaño y potencial zeta.

Tabla 3-3. Experimentos para evaluar el efecto del uso de crioprotectores durante el proceso de liofilización de NP ($n=3$).

| Muestra | Crioprotector | Proporción |
|---------|---------------|----------------|
| 1 | Blanco | 0 |
| 2 | Sucrosa | 0.25, 0.5, 1.0 |
| 3 | Glucosa | 0.25, 0.5, 1.0 |
| 4 | Lactosa | 0.25, 0.5, 1.0 |

3.7 Morfología superficial de las NP

La morfología superficial de las NP se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) a través de un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (JSM-7800F, JEOL, EE. UU.). Se preparan las muestras depositando una gota de solución de nanopartículas sobre una cinta conductiva adhesiva de carbón y se permite su secado al aire libre durante varios minutos.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las nanopartículas se caracterizaron midiendo su tamaño de partícula, índice de polidispersidad (PDI) y potencial zeta en todos los experimentos.

4.1 Efecto de la velocidad de agitación durante la preparación de NP

Una vez formulada la emulsión, se varió la velocidad de agitación magnética durante la evaporación de solvente. En la Figura 4.1 se presenta el tamaño y PDI de las NP utilizaron diferentes velocidades: 200 rpm, 300 rpm y 400 rpm. Cuando la velocidad de agitación fue de 200 rpm, el tamaño obtenido fue de 193 nm, sin embargo, para la agitación de 300 rpm y 400 rpm, los valores disminuyeron a 177 nm para los dos casos. El valor de PDI para disminuyó de 0.108 y 0.111 para 200 rpm y 300 rpm respectivamente a 0.055 al mantener una agitación de 400 rpm.

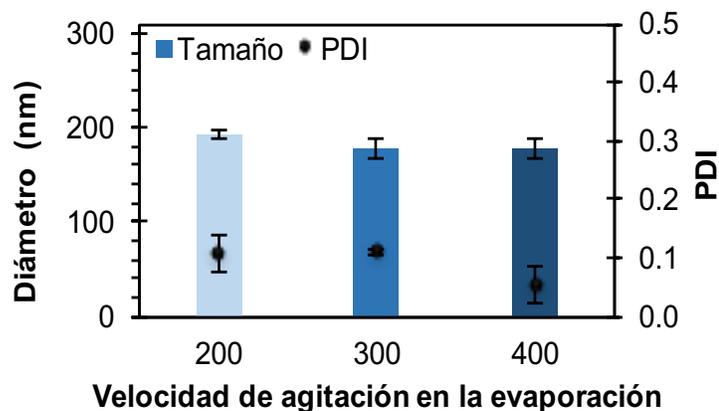


Figura 4-1. Tamaño y PDI de NP en función de la velocidad de agitación magnética durante la evaporación de solvente ($n=3$).

La carga superficial de las nanopartículas obtenidas para la agitación de 200 rpm fue de -23 mV, mientras que para 300 rpm y 400 rpm de agitación fue de -27 mV y -26 mV respectivamente como se muestra en la Tabla 4.1.

Tabla 4-1. Variación de tamaño y PDI de las NP en función de la velocidad de agitación, manteniendo la concentración de PVA, PLGA y la proporción entre la fase acuosa y orgánica ($n=3$).

| Agitación | Tamaño (nm) | PDI | ζ (mV) |
|-----------|--------------|---------------|---------------|
| 200 rpm | 193.4 ± 5.4 | 0.108 ± 0.030 | -23.25 ± 6.03 |
| 300 rpm | 177.7 ± 10.6 | 0.111 ± 0.004 | -26.80 ± 4.95 |
| 400 rpm | 177.4 ± 10.0 | 0.055 ± 0.033 | -26.10 ± 6.18 |

4.2 Estudio del proceso de purificación de NP

Entre los varios métodos de purificación de NP, el método de ultracentrifugación es ampliamente utilizado por su practicidad al realizar experimentos a pequeña escala (Vauthier & Bouchemal 2009).

Se utilizaron tres diferentes velocidades de centrifugación: 10,000 rpm, 15,000 rpm y 20,000 rpm, que corresponden a 12,096 *g, 27,216 *g y 48,384 *g. En cada etapa del proceso de purificación, se midieron los tamaños y el potencial zeta. Durante dicho proceso, el aumento en el tamaño fue constante (Figura 4.2). Al purificar a una velocidad de centrifugación de 10,000 rpm, se midió un aumento en el tamaño de las NP de 56 nm, mientras que al realizar la purificación a 15,000 rpm, el aumento registrado fue de 30 nm y 16 nm al purificar a 20,000 rpm. Estos valores representan un aumento del 54%, 29% y 15% en el tamaño de las NP, respectivamente. Las variaciones en el PDI durante el proceso de purificación indican la presencia de una población no uniforme de NP. Para los experimentos realizados a 10,000 rpm y 15,000 rpm, los valores de PDI comienzan en 0.150 en la medición de prelavado, disminuyendo a lo largo del proceso y concluyendo en un PDI de 0.221 y 0.266 respectivamente. Sin embargo, cuando la purificación se realizó a 20,000 rpm, el valor de PDI disminuyó de 0.147 a 0.042 a través del proceso, lo que representa una población más uniforme de NP. El potencial de zeta durante el proceso de purificación disminuyó en todas las preparaciones. De -16 mV a -28 mV al purificar a 10.000 rpm, de -15 mV a -31 mV al purificar a 15,000 rpm y de -15 mV

a -34 mV al purificar a 20,000 rpm. Este efecto podría atribuirse a la eliminación de la capa de PVA en la superficie de las nanopartículas a medida que se realiza el proceso de purificación. Al eliminar la capa de PVA, los grupos carboxílicos del PLGA quedan expuestos y la carga de la superficie cambia (Sahoo *et al.* 2002). Otros métodos disponibles para purificación de nanopartículas son diálisis, filtración en gel, y filtración cruzada (Vauthier & Bouchemal 2009). La Tabla 4.2 contiene los valores de tamaño, PDI y potencial zeta para cada etapa del proceso de purificación.

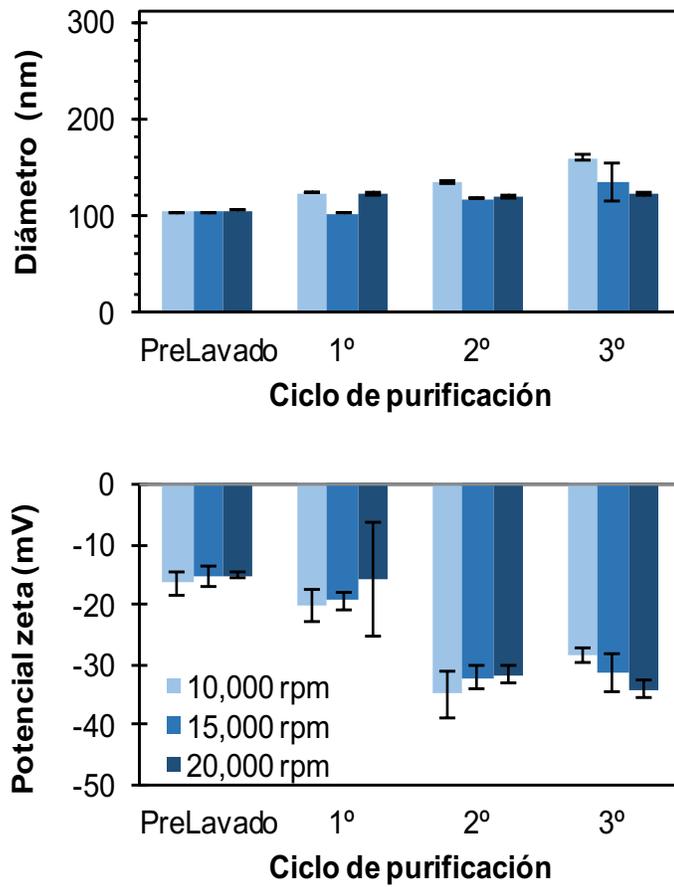


Figura 4-2. Características de las nanopartículas de PLGA en el proceso de purificación a 10,000 rpm (■), 15,000 rpm (■) y 20,000 rpm (■). Los datos representan el promedio \pm DE ($n = 3$).

Tabla 4-2. Características de las nanopartículas de PLGA a través del proceso de purificación por ultracentrifugación. Los datos representan el promedio \pm DE ($n = 3$).

| 10,000 rpm | | | |
|------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Parámetro | Tamaño (nm) | PDI | ζ (mV) |
| PreLavado | 103.63 \pm 0.38 | 0.160 \pm 0.008 | -16.47 \pm 1.94 |
| 1° | 123.83 \pm 0.92 | 0.101 \pm 0.011 | -20.13 \pm 2.65 |
| 2° | 135.80 \pm 1.27 | 0.090 \pm 0.030 | -34.90 \pm 3.94 |
| 3° | 159.47 \pm 3.51 | 0.221 \pm 0.050 | -28.33 \pm 1.28 |
| 15,000 rpm | | | |
| Parámetro | Tamaño (nm) | PDI | ζ (mV) |
| PreLavado | 103.63 \pm 1.08 | 0.150 \pm 0.008 | -15.37 \pm 1.59 |
| 1° | 103.03 \pm 0.21 | 0.160 \pm 0.014 | -19.30 \pm 1.34 |
| 2° | 118.03 \pm 1.23 | 0.093 \pm 0.016 | -32.23 \pm 1.94 |
| 3° | 133.93 \pm 20.00 | 0.266 \pm 0.092 | -31.37 \pm 3.14 |
| 20,000 rpm | | | |
| Parámetro | Tamaño (nm) | PDI | ζ (mV) |
| PreLavado | 106.10 \pm 0.28 | 0.147 \pm 0.005 | -15.07 \pm 0.68 |
| 1° | 123.13 \pm 1.70 | 0.034 \pm 0.011 | -15.70 \pm 9.57 |
| 2° | 120.57 \pm 0.85 | 0.039 \pm 0.017 | -31.60 \pm 1.34 |
| 3° | 121.83 \pm 1.19 | 0.042 \pm 1.392 | -33.97 \pm 1.49 |

4.3 Evaluación del uso de crioprotectores en el proceso de secado de NP

Durante la última parte de la preparación de NP, el uso de crioprotectores es comúnmente utilizado para evitar la agregación de las NP. Antes de la liofilización, se añade el crioprotector a la solución de NP y se mide el tamaño y

el potencial zeta. Para los tres casos, el tamaño de las nanopartículas no se vio afectado por la adición de los crioprotectores, sin embargo, el potencial zeta sí cambió. Para la sacarosa, de -25 mV a -18 mV, la glucosa cambió de -25 mV a -22 mV y la lactosa de -25 mV a -19 mV (Figura 4.3). En la literatura, se explica este efecto como el resultado de enlaces de hidrógeno entre los grupos OH del crioprotector y la superficie de la nanopartícula (Abdelwahed *et al.* 2006). Después de la liofilización, las muestras fueron resuspendidas en agua desionizada y se caracterizaron nuevamente.

En ausencia de un agente crioprotector, el tamaño de la NP aumenta de 180 nm a 242 nm. Las características de las NP en el proceso de liofilización se encuentran en la Tabla 4.3. Cuando se utiliza sucrosa, en las diferentes proporciones, el tamaño de la NP después de resuspender es de 190 nm para la proporción de 0.25 y de 183 nm y 178 nm para las proporciones de 0.5 y 1.0 respectivamente. Cuando se utiliza glucosa, el tamaño obtenido es de 193 nm, 184 nm y 182 nm para las mismas proporciones de crioprotector.

En el caso de la lactosa, el tamaño disminuye de 200 nm a 193 nm y 189 nm para las proporciones de 0.25, 0.5 y 1.0 respectivamente. Dentro de estos valores, podemos observar, que al utilizar sucrosa como crioprotector, el tamaño se mantiene a través del proceso. Sin embargo, el potencial zeta resultante al utilizar este crioprotector aumenta a -14 mV. En cambio, al utilizar glucosa en proporción 1.0 con respecto a la cantidad de PLGA utilizado en la formulación,

resulta en tamaños muy semejantes al original y mantiene un potencial zeta más cercano al original.

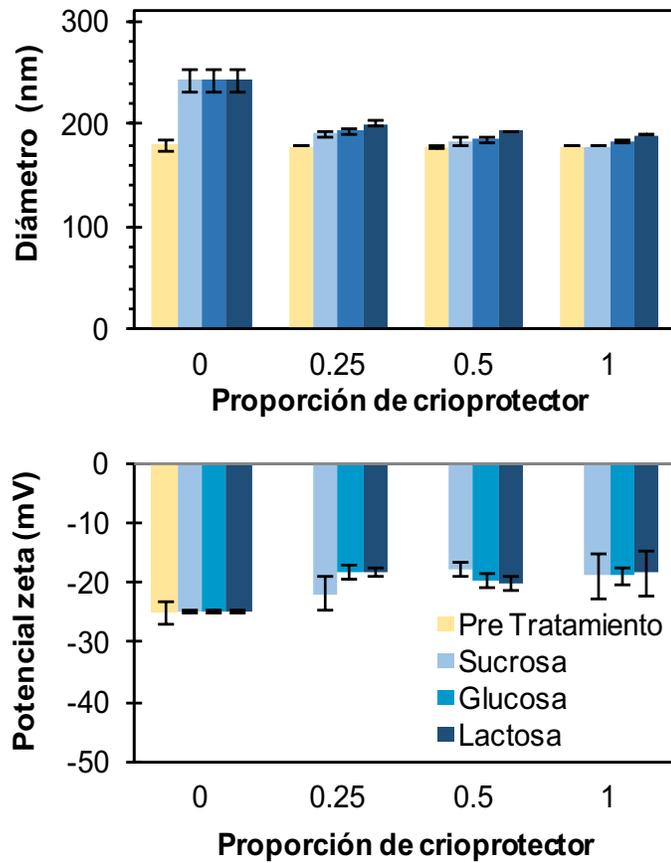


Figura 4-3. Características de las NP previo al tratamiento de crioprotectores (■) y al añadir diferentes proporciones de sucrosa (■), glucosa (■) and lactosa (■) con respecto a la masa inicial de PLGA. Los datos representan el promedio \pm DE ($n = 3$).

Tabla 4-3. Características de las nanopartículas de PLGA al utilizar agentes crioprotectores durante el proceso de secado. Los datos representan el promedio \pm DE ($n = 3$).

| Sucrosa - Antes | | | |
|------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------------|
| Proporción | Tamaño (nm) | PDI | ζ (mV) |
| 0 | 179.45 \pm 5.19 | 0.041 \pm 0.024 | -25.06 \pm 3.09 |
| 0.25 | 177.70 \pm 0.20 | 0.034 \pm 0.009 | -21.88 \pm 3.25 |
| 0.5 | 176.70 \pm 1.20 | 0.041 \pm 0.007 | -17.81 \pm 2.55 |
| 1 | 178.45 \pm 0.95 | 0.021 \pm 0.009 | -18.80 \pm 0.17 |
| Sucrosa | | | |
| Proporción | Tamaño (nm) | PDI | ζ (mV) |
| 0 | 242.05 \pm 10.75 | 0.214 \pm 0.037 | -24.80 \pm 0.20 |
| 0.25 | 190.45 \pm 2.45 | 0.109 \pm 0.015 | -17.91 \pm 2.65 |
| 0.5 | 183.30 \pm 3.70 | 0.067 \pm 0.014 | -11.21 \pm 1.09 |
| 1 | 178.35 \pm 0.75 | 0.044 \pm 0.006 | -14.30 \pm 3.73 |
| Glucosa - Antes | | | |
| Proporción | Tamaño (nm) | PDI | ζ (mV) |
| 0 | 179.45 \pm 5.19 | 0.041 \pm 0.024 | -25.06 \pm 3.09 |
| 0.25 | 177.50 \pm 0.80 | 0.022 \pm 0.001 | -21.02 \pm 1.82 |
| 0.5 | 177.80 \pm 0.40 | 0.024 \pm 0.002 | -21.95 \pm 1.72 |
| 1 | 177.90 \pm 0.00 | 0.025 \pm 0.005 | -21.82 \pm 2.28 |
| Glucosa | | | |
| Proporción | Tamaño (nm) | PDI | ζ (mV) |
| 0 | 242.05 \pm 10.75 | 0.214 \pm 0.037 | -24.80 \pm 0.20 |
| 0.25 | 192.55 \pm 1.95 | 0.085 \pm 0.032 | -18.20 \pm 1.10 |
| 0.5 | 184.25 \pm 1.75 | 0.061 \pm 0.004 | -19.75 \pm 1.35 |
| 1 | 182.05 \pm 1.05 | 0.043 \pm 0.001 | -18.95 \pm 1.35 |

Tabla 4-3 Continuación. Características de las nanopartículas de PLGA al utilizar agentes crioprotectores durante el proceso de secado. Los datos representan el promedio \pm DE ($n = 3$).

| Lactosa - Antes | | | |
|------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------------|
| Proporción | Tamaño (nm) | PDI | ζ (mV) |
| 0 | 179.45 \pm 5.19 | 0.041 \pm 0.024 | -25.06 \pm 3.09 |
| 0.25 | 177.30 \pm 0.90 | 0.038 \pm 0.004 | -23.50 \pm 2.37 |
| 0.5 | 178.10 \pm 1.20 | 0.025 \pm 0.006 | -22.97 \pm 0.36 |
| 1 | 178.35 \pm 0.65 | 0.027 \pm 0.007 | -19.48 \pm 1.42 |
| Lactosa | | | |
| Proporción | Tamaño (nm) | PDI | ζ (mV) |
| 0 | 242.05 \pm 10.75 | 0.214 \pm 0.037 | -24.80 \pm 0.20 |
| 0.25 | 200.00 \pm 2.10 | 0.122 \pm 0.014 | -18.45 \pm 0.75 |
| 0.5 | 192.50 \pm 0.00 | 0.075 \pm 0.014 | -20.10 \pm 1.20 |
| 1 | 188.55 \pm 0.15 | 0.065 \pm 0.014 | -18.40 \pm 3.70 |

4.4 Morfología superficial de las NP

La morfología superficial de las nanopartículas se puede observar en la Figura 4.4, donde se observan nanopartículas esféricas con superficie lisa y tamaños promedio menores de 200 nm, que corresponden a los valores obtenidos por DLS.

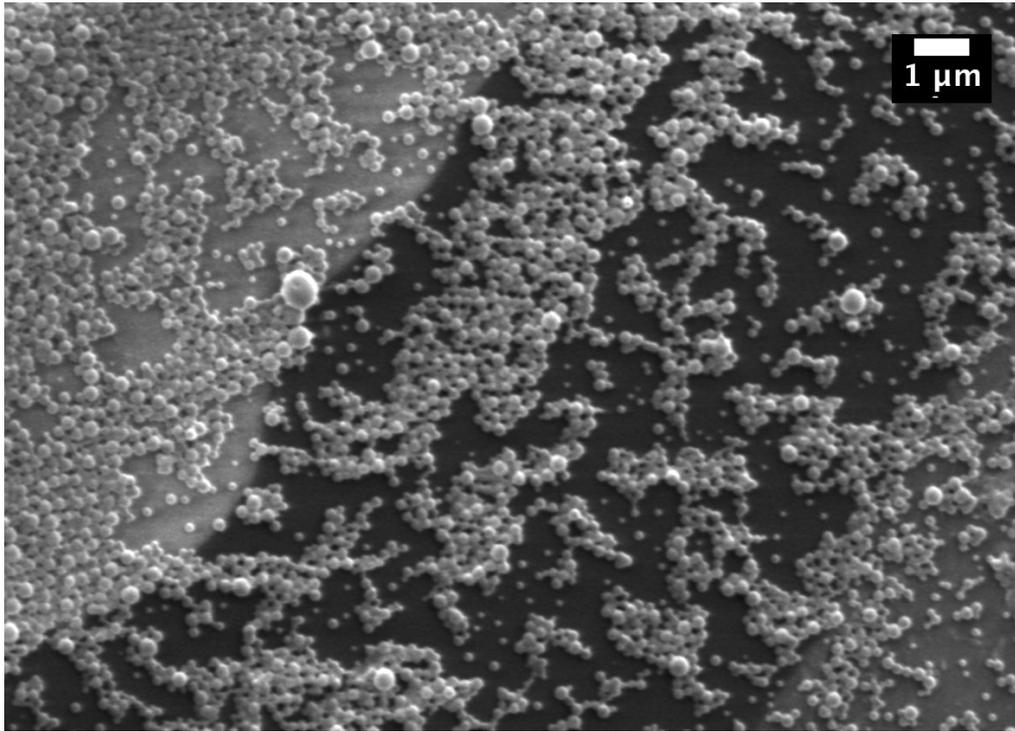


Figura 4-4. Micrografía de las NP obtenida mediante SEM.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La variación de la velocidad de agitación durante la evaporación de solvente influye en el tamaño resultante de NP, sin embargo, el efecto en la polidispersidad es mas significativo, resultando en menor polidispersidad al agitar a 400 rpm.

El proceso de ultracentrifugación para la purificación de nanopartículas describe indirectamente la interaccion entre la NP y el agente estabilizante.

Al utilizar 20,000rpm para los lavados, el tamaño de la NP presenta el menor aumento através del proceso de lavado y resulta en NP uniformes.

El uso de crioprotectores facilita la conservación de las características de las NP al ser liofilizadas. Al utilizar sucrosa, el tamaño se mantiene constante, pero la carga superficial cambia significativamente. Al agregar glucosa, el tamaño de la NP aumenta ligeramente y la variación en carga superficial es menor que en el caso de la sucrosa.

5.2 Recomendaciones

Se recomienda utilizar 400 rpm para la evaporación de solvente y 20,000 rpm para el lavado de NP. Se sugiere el uso de glucosa en proporción de 1.0 con respecto a la cantidad de polímero utilizado.

Se recomienda investigar el uso de técnicas de purificación alternativas con el fin de aumentar los rendimientos del sistema. Se sugiere explorar la técnica de purificación por ultrafiltración tangencial.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., & Fessi, H., 2006 Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 1688–1713, doi: 10.1016/j.addr.2006.09.017.
- Askeland, D.R., 1996 *The Science and Engineering of Materials*. Webster, B., ed. Chapman and Hall, doi: 10.1016/j.msea.2008.04.012.
- Astete, C.E., Kumar, C.S.S.R., & Sabliov, C.M., 2007 Size control of poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly(d,l-lactide-co-glycolide)-magnetite nanoparticles synthesized by emulsion evaporation technique *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, **299**, 209–216, doi: 10.1016/j.colsurfa.2006.11.055.
- Astete, C.E.F., & Sabliov, C.M., 2006 Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **17**, 247–289, doi: 10.1163/156856206775997322.
- Bartlett, D.W., Su, H., Hildebrandt, I.J., Weber, W.A., & Davis, M.E., 2007 Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 15549–15554.
- Boisseau, P., & Loubaton, B., 2011 Nanomedicine, nanotechnology in medicine *Comptes Rendus Phys.*, **12**, 620–636, doi: 10.1016/j.crhy.2011.06.001.
- Budhian, A., Siegel, S.J., & Winey, K.I., 2007 Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content *Int. J. Pharm.*, **336**, 367–375, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.11.061.
- Castro Román, F., 1994 *Estructura y Movimiento Browniano en Suspensiones Coloidales Cuasibidimensionales*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 74 pp. Available at: <http://ninive.uaslp.mx/jspui/bitstream/i/1984/3/MCF1EMB00901.pdf> [Accessed March 16, 2018].
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z.G., & Shin, D.M., 2008 Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin. Cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, **14**, 1310–1316, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1441.
- 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, doi: 10.1016/S0168-3659(02)00211-0.

- Cohen-Sela, E., Chorny, M., Koroukhov, N., Danenberg, H.D., & Golomb, G., 2009 A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J. Control. Release*, **133**, 90–95, doi: 10.1016/j.jconrel.2008.09.073.
- 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**, 505–522, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
- 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. U. S. A.*, **105**, 17356–17361.
- Dongqing Li 2008 *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, 2242 pp, doi: 10.1007/978-0-387-48998-8.
- European Technology Platform on NanoMedicine 2005 Vision Paper and Basis for a Strategic Research Agenda for NanoMedicine Available at: http://cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/nanomedicine_visionpaper.pdf [Accessed December 2, 2017].
- Ganapathy Selvam, G., & Sivakumar, K., 2015 Phycosynthesis of silver nanoparticles and photocatalytic degradation of methyl orange dye using silver (Ag) nanoparticles synthesized from *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux *Appl. Nanosci.*, **5**, 617–622, doi: 10.1007/s13204-014-0356-8.
- Garbassi, F., Morra, M., & Occhiello, E., 1998 *Polymer Surfaces: From Physics to Technology*.
- Ghitman, J., Stan, R., & Iovu, H., 2017 Experimental contributions in the synthesis of plga nanoparticles with excellent properties for drug delivery: Investigation of key parameters *UPB Sci. Bull. Ser. B Chem. Mater. Sci.*, **79**, 101–112.
- Grazia Cascone, M., 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, doi: 10.1023/A:1013674200141.
- Hiemenz, P.C., & Rajagopalan, R., 1997 *Principles of colloid and surface chemistry*. 3rd ed.
- Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A., 2015 Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation *Int. J. Pharm.*, **496**, 173–190, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.10.057.
- Islam, A.M., Chowdhry, B.Z., & Snowden, M.J., 1995 Heteroaggregation in colloidal dispersions. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **62**, 109–136, doi:

10.1016/0001-8686(95)00276-V.

- Israelachvili, J.N., 2011 Intermolecular and Surface Forces: Revised Third Edition.
- Jain, R.A., 2000 The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, **21**, 2475–2490, doi: 10.1016/S0142-9612(00)00115-0.
- Kreuter, J., 2007 Nanoparticles—a historical perspective *Int. J. Pharm.*, **331**, 1–10.
- Kumari, A.,Yadav, S.K.,& Yadav, S.C., 2010 Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, **75**, 1–18, doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.09.001.
- Limayem, I.,Charcosset, C.,& Fessi, H., 2004 Purification of nanoparticle suspensions by a concentration/diafiltration process *Sep. Purif. Technol.*, **38**, 1–9, doi: 10.1016/j.seppur.2003.10.002.
- Maeda, H.,Bharate, G.Y.,& Daruwalla, J., 2009 Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **71**, 409–419, doi: 10.1016/j.ejpb.2008.11.010.
- Makadia, H.K., & Siegel, S.J., 2011 Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier *Polymers (Basel)*, **3**, 1377–1397, doi: 10.3390/polym3031377.
- Mora-Huertas, C.E.,Fessi, H.,& Elaissari, A., 2010 Polymer-based nanocapsules for drug delivery *Int. J. Pharm.*, **385**, 113–142, doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.10.018.
- 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, doi: 10.1016/S0168-3659(02)00320-6.
- 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, doi: 10.1016/S0032-5910(99)00182-5.
- National Nanotechnology Initiative 2017 What It Is and How It Works | Nano.
- Nava-Arzaluz, M.G.,Piñón-Segundo, E.,Ganem-Rondero, A.,& Lechuga-Ballesteros, D., 2012 Single emulsion-solvent evaporation technique and modifications for the preparation of pharmaceutical polymeric nanoparticles. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, **6**, 209–223.
- Noury, M., & López, J., 2017 Nanomedicine and personalised medicine:

- understanding the personalisation of health care in the molecular era *Sociol. Heal. Illn.*, **39**, 547–565, doi: 10.1111/1467-9566.12502.
- Ohshima, H., 2006 *Theory of colloid and interfacial electric phenomena*, xvi, 473 pp.
- Park, H., Yang, J., Lee, J., Haam, S., Choi, I.H., & Yoo, K.H., 2009 Multifunctional nanoparticles for combined doxorubicin and photothermal treatments *ACS Nano*, **3**, 2919–2926, doi: 10.1021/nn900215k.
- Parveen, S., & Sahoo, S.K., 2008 Polymeric nanoparticles for cancer therapy *J. Drug Target.*, **16**, 108–123, doi: 10.1080/10611860701794353.
- Paszko, E., Ehrhardt, C., Senge, M.O., Kelleher, D.P., & Reynolds, J. V., 2011 Nanodrug applications in photodynamic therapy *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, **8**, 14–29, doi: 10.1016/j.pdpdt.2010.12.001.
- 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**, 751–760, doi: 10.1038/nnano.2007.387.
- Petros, R.A., & DeSimone, J.M., 2010 Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 615–627, doi: 10.1038/nrd2591.
- Russel, W.B., Saville, D.A., & Schowalter, W.R., 1989 *Colloidal Dispersions*.
- 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, doi: 10.1002/jps.21158.
- Sahoo, S.K., Panyam, J., Prabha, S., & Labhsetwar, V., 2002 Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D , L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D , L -lactide-co- glycolide) nanoparticles affects thei *J. Control. Release*, **82**, 105–114, doi: 10.1016/S0168-3659(02)00127-X.
- Schramm, L.L., 2006 *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*, 1-448 pp, doi: 10.1002/3527606750.
- Sennett, P., & Olivier, J.P., 1965 Colloidal Dispersions Electrokinetic Effects and the concept of Zeta Potential *Ind. Eng. Chem.*, **57**, 32–50, doi: 10.1021/ie50668a007.
- 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.

- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., & Garcia-Celma, M.J., 2005 Nano-emulsions *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **10**, 102–110, doi: 10.1016/j.cocis.2005.06.004.
- Sonneville-Aubrun, O., Simonnet, J.T., & L'Alloret, F., 2004 Nanoemulsions: A new vehicle for skincare products. *Adv. Colloid Interface Sci.*, **108–109**, 145–149, doi: 10.1016/j.cis.2003.10.026.
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C., 2004 Formation and stability of nano-emulsions *Adv. Colloid Interface Sci.*, **108–109**, 303–318, doi: 10.1016/j.cis.2003.10.023.
- Vauthier, C., & Bouchemal, K., 2009 Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles *Pharm. Res.*, **26**, 1025–1058, doi: 10.1007/s11095-008-9800-3.
- Vivero-Escoto, J., & Elnagheeb, M., 2015 Mesoporous Silica Nanoparticles Loaded with Cisplatin and Phthalocyanine for Combination Chemotherapy and Photodynamic Therapy in vitro **5**, 2302–2316, doi: 10.3390/nano5042302.
- 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, doi: 10.1039/b702538f.