



“Estudio de la influencia de la temperatura en la síntesis de nanopartículas de PLGA”

Gallegos Arévalo, Camila Paulette

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Dr. Debut, Alexis Patrice Martial

11 de enero del 2022

Resultado del análisis de Copyleaks



COPYLEAKS

Gallegos Camila_tesis urkund.docx
Scanned on: 20:8 January 11, 2022 UTC



Identical Words	125
Words with Minor Changes	56
Paraphrased Words	200
Omitted Words	0



Planned: 2022/01/11 20:08 UTC
ALEXIS PATRICE
MARTIAL DEBUT



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, denominado **"Estudio de la influencia de la temperatura en la síntesis de nanopartículas de PLGA"** fue realizado por la señorita **Gallegos Arévalo, Camila Paulette** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 11 de enero del 2022

Firma:



ALLENIS PATRICE
MARTIAL DEBUT

.....
Dr. Debut, Alexis Patrice Martial

C.C.: 1725238297



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo, Gallegos Arévalo, Camila Paulette, con C.C. 1723259931, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Estudio de la influencia de la temperatura en la síntesis de nanopartículas de PLGA"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 11 de enero del 2022

Firma:

Gallegos Arévalo, Camila Paulette

C.C. 1723259931



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Gallegos Arévalo, Camila Paulette**, con C.C. 1723259931, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **"Estudio de la influencia de la temperatura en la síntesis de nanopartículas de PLGA"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad

Sangolquí, 11 de enero del 2022

Firma:

Gallegos Arévalo, Camila Paulette

C.C. 1723259931

Dedicatoria

A mis padres, Martha Arévalo y Marcelo Gallegos, por su apoyo incondicional durante toda la carrera, a través de sus consejos, compañía, paciencia y tiempo; y a mi hermano Marcelo, por ser siempre mi ejemplo de superación, trabajo y constancia. Gran parte de mis logros se los debo a ustedes.

Camila Paulette Gallegos Arévalo

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por darme salud y vida para cumplir uno de mis sueños, graduarme como Biotecnóloga

Quiero agradecer especialmente al Dr. Alexis Debut, jefe del laboratorio de Caracterización de Nanomateriales, por darme la oportunidad de trabajar en uno de sus proyectos de investigación, y por su asesoría y exigencia durante todo el proceso para obtener un trabajo final de calidad. Además, por su excelente desempeño como docente y por todos los conocimientos compartidos y que han contribuido a mi formación profesional.

A las Ingenieras Karla Vizuite y Katherine Pazmiño, técnicos del laboratorio de Caracterización de Nanomateriales, por facilitarme todas las herramientas necesarias para desarrollar la tesis y por guiarme en el proceso.

Al Dr. Marco Javier Flores Calero, profesor del Departamento de Eléctrica y Electrónica, por asesorarme en toda la parte estadística del trabajo, que fue clave para entender y discutir los resultados obtenidos.

A mis padres, por enseñarme desde pequeña hacerme cargo de mis responsabilidades, sabiendo que siempre contaré con su apoyo cuando lo necesite. Gracias a ustedes y a mi hermano, que con su amor y compañía han hecho más llevadero este proceso.

A mi amiga Fiorella por ser una vía de escape en los momentos más estresantes de la carrera y por entenderme como nadie.

A mis amigas, Vanessa y Janyna, por acompañarme desde tercer semestre y ser el mejor grupo de trabajo; y a todos mis amigos de la universidad por compartir conmigo los momentos más estresantes y divertidos. Han sido mis más grandes maestros de vida.

Índice de contenido

Resultado del análisis de Copyleaks	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Listado de Tablas	10
Listado de figuras	11
Listado de abreviaturas	13
Resumen.....	16
Abstract.....	17
Capítulo I: Introducción.....	18
Formulación del problema.....	18
Justificación del problema.....	23
Objetivos.....	23
Objetivo General	23
Objetivos Específicos	24
Capítulo II: Marco Teórico	25
Clasificación de Nanopartículas.....	27
<i>Nanopartículas Poliméricas</i>	27
<i>Nanopartículas Inorgánicas</i>	34
<i>Nanopartículas Basadas en Lípidos</i>	35

Síntesis de nanopartículas.....	37
<i>Métodos Bottom-Up</i>	37
<i>Métodos Top-Down</i>	39
Caracterización de nanopartículas.....	41
<i>Microscopio electrónico de barrido (SEM)</i>	41
<i>Dispersión de luz dinámica (DLS)</i>	43
<i>Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)</i>	43
<i>Análisis termogravimétrico (TGA)</i>	44
<i>Calorimetría diferencial de barrido (DSC)</i>	44
<i>Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)</i>	44
<i>Difracción de rayos X (XRD)</i>	44
<i>Microscopio electrónico de transmisión (TEM)</i>	45
Aplicaciones de las nanopartículas.....	45
Capítulo III: Materiales y métodos.....	50
Síntesis de nanopartículas de PLGA.....	50
Caracterización de nanopartículas de PLGA.....	51
<i>Caracterización en DLS</i>	51
<i>Caracterización en SEM</i>	52
Medición de diámetros de nanopartículas.....	53
Análisis estadístico.....	55
Capítulo IV: Resultados.....	57
Caracterización de nanopartículas en DLS.....	57
Caracterización de nanopartículas en SEM.....	61

Medición de diámetros de nanopartículas obtenidos mediante el software Fiji.....	62
Análisis estadístico	69
<i>Análisis estadístico de los tamaños obtenidos por DLS.....</i>	<i>69</i>
<i>Análisis estadístico de las mediciones obtenidas mediante Fiji a partir de las imágenes de SEM.....</i>	<i>77</i>
Capítulo V: Discusión	86
Capítulo VI: Conclusiones	93
Capítulo VII: Recomendaciones	94
Referencias	96

Listado de Tablas

Tabla 1: Diferencias entre los polímeros naturales y sintéticos	28
Tabla 2: Productos basados en PLGA y aprobados por la FDA	48
Tabla 3: Resumen de la metodología llevada a cabo en los ensayos 1 y 2.....	56
Tabla 4: Tamaño y desviación estándar, medidos en nanómetros, y obtenidos mediante la caracterización por DLS en el Ensayo 1	57
Tabla 5: Tamaño y desviación estándar, medidos en nanómetros, y obtenidos mediante la caracterización por DLS, para el Ensayo 2.....	59
Tabla 6: Promedio en nanómetros del diámetro largo (DL), diámetro corto (DC) y esfericidad (ESF) de las nanopartículas sintetizadas a diferentes temperaturas en el ensayo 1.....	63
Tabla 7: Promedio en nanómetros del diámetro largo (DL), diámetro corto (DC) y esfericidad (ESF) de las nanopartículas sintetizadas por triplicado, a diferentes temperaturas en el ensayo 2.	65
Tabla 8: Cumplimiento de supuestos para los datos de DLS en el ensayo 1 y 2.....	72

Tabla 9: Valores p obtenidos del ANOVA entre repeticiones para cada temperatura, en el ensayo 2.	73
Tabla 10: Valores p obtenidos del ANOVA entre temperaturas por cada repetición, en el ensayo 2.	74
Tabla 11: Comparación de a pares entre temperaturas del ensayo 1	74
Tabla 12: Comparación de a pares entre las repeticiones para cada temperatura, en el ensayo 2.....	75
Tabla 13: Comparación de a pares entre las temperaturas para cada repetición, en el ensayo 2.....	76
Tabla 14: Resultados del ANOVA y la prueba t de Student para los datos de DLS. 77	
Tabla 15: Análisis estadístico de los datos obtenidos de SEM para el ensayo 1 y 280	
Tabla 16: Comparación de a pares entre las repeticiones de cada temperatura para el ensayo 1.....	80
Tabla 17: Comparación de a pares entre las repeticiones de cada temperatura para el ensayo 2.....	82
Tabla 18: Comparación de a pares entre las temperaturas en cada repetición, para el ensayo 2.....	82

Listado de figuras

Figura 1: Fenómeno de agregación de las nanopartículas	26
Figura 2: Estructura química de PLGA y sus monómeros	30
Figura 3: Polimerización de PLGA por apertura de anillo	32
Figura 4: <i>Estructura química del polietilenglicol o PEG</i>	33
Figura 5: Estructura de un liposoma	36
Figura 6: Clasificación de los métodos de síntesis de nanopartículas.....	37
Figura 7: Esquema de la síntesis de pirólisis por aspersion de llama.....	38

Figura 8: Método de nanoprecipitación para la síntesis de nanopartículas poliméricas	40
Figura 9: Diseño y función de SEM.....	42
Figura 10: Configuraciones típicas usadas en nanopartículas	46
Figura 11: Técnica de nanoprecipitación para la síntesis de nanopartículas de PLGA	51
Figura 12: Caracterización en DLS	52
Figura 13: Caracterización en SEM	53
Figura 14: Diámetro largo (DL) y corto (DC) de una nanopartícula	53
Figura 15: Tipos de curvas de distribución dependientes de la curtosis.....	54
Figura 16: Gráfico de líneas de los tamaños promedio y desviación estándar obtenidos en DLS para el ensayo 1	58
Figura 17: Gráfico de líneas de los tamaños promedio y desviación estándar obtenidos en DLS para el ensayo 2	61
Figura 18: Nanopartículas sintetizadas A) a 20°C en el ensayo 1 y B) a 40°C, en la segunda repetición del ensayo 2	62
Figura 19: Gráfico de líneas de los diámetros promedio y su desviación estándar obtenidos en Fiji de los datos de SEM, ensayo 1	63
Figura 20: Gráfico de líneas de la esfericidad de las nanopartículas caracterizadas en SEM para el ensayo 1	64
Figura 21: Gráfico de líneas de los diámetros promedio y su desviación estándar obtenidos en Fiji de los datos de SEM, ensayo 2	66
Figura 22: Gráfico de líneas de la esfericidad de las nanopartículas caracterizadas en SEM para el ensayo 2.....	66
Figura 23: <i>Histogramas de los datos del diámetro largo obtenidos en SEM para A) 10 °C, B) 20 °C, C) 30 °C, D) 40 °C y E) 50 °C en el ensayo 1.....</i>	68

Figura 24: Histogramas de los datos del diámetro largo obtenidos en SEM para A) 10 °C, B) 20 °C, C) 30 °C, D) 40 °C y E) 50 °C, en el ensayo 2.	69
Figura 25: Q-Q plot obtenido para tamaño de las nanopartículas en A) ensayo 1 y B) ensayo 2, tratamiento de 10°C.	70
Figura 26: Gráfica de dispersión que indica la homocedasticidad de los datos en A) ensayo 1 y B) ensayo 2, tratamiento de 20°C de la muestra diluida	71
Figura 27: Q-Q plot obtenido para el diámetro largo de las nanopartículas sintetizadas a 10°C en el A) ensayo 1 y B) ensayo 2	78
Figura 28: Resultados obtenidos para el tamaño de las NPs obtenidos de DLS en A) ensayo 1 y B) ensayo 2.....	83
Figura 29: Resultados obtenidos para el diámetro de las NPs medidos a partir de las imágenes de SEM, en A) ensayo 1 y B) ensayo 2	84
Figura 30: Resultados obtenidos para la esfericidad de las NPs, en A) ensayo 1 y B) ensayo 2	85

Listado de abreviaturas

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

PLGA: Ácido poli(láctico-co-glicólico)

DDS: Sistema de entrega de fármacos

NPs: Nanopartículas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

PLA: Ácido poliláctico

PGA: Ácido poliglicólico

PEG: Polietilenglicol

PCL: Policaprolactona

PEO: Óxido de polietileno

PVA: Alcohol de polivinilo

PU: Poliuretano

PTMC: Poli (carbonato de trimetileno)

DMF: N, N-dimetilformamida

LA: Ácido láctico

GA: Ácido glicólico

ROP: Polimerización por apertura de anillo

SLN: Nanopartículas sólidas de lípidos

NLC: Portadores de lípidos nanoestructurados

CMC: Concentración micelar crítica

SEM: Microscopio Electrónico de Barrido

DLS: Dispersión de Luz Dinámica

FTIR: Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier

TGA: Análisis termogravimétrico

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

AFM: Microscopio de Fuerza Atómica

XRD: Difracción de rayos X

TEM: Microscopio electrónico de transmisión

Tg: Temperatura de transición vítrea

ANOVA: Análisis de varianza

DC: Diámetro corto

DL: Diámetro largo

ESF: Esfericidad

MC: Muestra concentrada

MD: Muestra diluida

Resumen

El poli (ácido láctico-co-glicólico) o PLGA es un polímero sintético aprobado por la FDA para ser utilizado en formulaciones farmacéuticas, gracias a su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Es usado comúnmente en la síntesis de nanopartículas empleadas como sistemas de entrega de fármacos, que permiten llevar el agente terapéutico directamente al lugar de destino. Algunas propiedades de las nanopartículas de PLGA, principalmente su forma y tamaño, pueden influir directamente en su efecto terapéutico; es por ello que el objetivo del presente estudio fue analizar la influencia de la temperatura en el tamaño y forma de las nanopartículas de PLGA sintetizadas por nanoprecipitación. Para ello se sintetizaron nanopartículas de PLGA a 5 temperaturas diferentes. Estas fueron caracterizadas por Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) para determinar su tamaño y forma. De las imágenes SEM se midieron los diámetros largos y cortos con la ayuda del software Fiji. Posteriormente se realizó el análisis estadístico de los resultados, y se determinó que las nanopartículas disminuyeron su tamaño en el rango de temperaturas de 10°C a 20°C, y de 40°C a 50°C, y aumentaron en el rango de 20°C a 40°C; manteniendo su forma esférica en todo momento gracias al método de síntesis utilizado. La variación del tamaño fue atribuida principalmente a las propiedades fisicoquímicas del PLGA, como su solubilidad y degradación hidrolítica incrementadas a altas temperaturas, y también a sus propiedades térmicas como su temperatura de transición vítrea

Palabras clave:

- **NANOPARTÍCULAS DE PLGA**
- **NANOPRECIPITACIÓN**
- **TEMPERATURA**
- **TAMAÑO**
- **FORMA.**

Abstract

Poly (lactic-co-glycolic acid) or PLGA is a synthetic polymer approved by the FDA for use in pharmaceutical formulations due to its biodegradability and biocompatibility. It is commonly used in the synthesis of nanoparticles used as drug delivery systems, which allow the therapeutic agent to be delivered directly to the target site. Some properties of PLGA nanoparticles, mainly their shape and size, can directly influence their therapeutic effect; that is why the aim of the present study was to analyze the influence of temperature on the size and shape of PLGA nanoparticles synthesized by nanoprecipitation. For this, PLGA nanoparticles were synthesized at 5 different temperatures. These were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS) and Scanning Electron Microscopy (SEM) to determine their size and shape. From the SEM images the long and short diameters were measured with the help of Fiji software. Subsequently, the statistical analysis of the results was carried out, and it was determined that the nanoparticles decreased in size in the temperature range of 10°C to 20°C, and from 40°C to 50°C, and increased in the range of 20°C to 40 °C; maintaining their spherical shape at all times due to the synthesis method used. The size variation was mainly attributed to the physicochemical properties of PLGA, such as its increased solubility and hydrolytic degradation at high temperatures, and also to its thermal properties such as its glass transition temperature.

Key words:

- **PLGA NANOPARTICLES**
- **NANOPRECIPITATION**
- **TEMPERATURA**
- **SIZE**
- **SHAPE**

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

La nanomedicina es una rama de aplicación de los nanomateriales que surge como una alternativa de alto potencial a la medicina tradicional ya que cambia el enfoque del diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades, mediante mejoras en la eficiencia y la especificidad de las formulaciones farmacéuticas; mientras mejora la calidad de vida de los pacientes (Mabrouk et al., 2021). En la Nanomedicina, se define como material nanoestructurado a aquellos que presentan un tamaño menor que 200 nm, aunque no existe una convención internacional para esta definición (Mabrouk et al., 2021).

Por otro lado, los sistemas de entrega de fármacos o DDS (por sus siglas en inglés, "Drug Delivery Systems") son formulaciones usadas clínica y preclínicamente para la entrega de sustancias terapéuticas con la finalidad de ofrecer tratamiento para una enfermedad específica (Liang et al., 2020). Las desventajas de los DDS, como la efectividad limitada o su falta de selectividad pudieron ser superadas gracias a los avances de la nanomedicina (Adamo et al., 2017). Con la aplicación de DDSs basados en nanomateriales se ha logrado obtener una mayor eficacia del fármaco ya que se aumenta su vida útil, mejora su solubilidad y su liberación se realiza de manera controlada o sostenida (Dang & Guan, 2020).

Los DDS más utilizados comúnmente son las nanopartículas ya que con un tamaño y propiedades óptimas permiten que el agente de interés terapéutico pueda encapsularse/cargarse/conjugarse en su interior o superficie y de esta manera distribuirse directa e individualmente al lugar de destino (Ahmad et al., 2021). Dentro de las nanopartículas, las de PLGA o ácido poli (láctico-co-glicólico), un polímero sintético, han sido de las más estudiadas en los últimos 20 años. Tal es así que el uso del PLGA en formulaciones farmacéuticas ha sido aprobado por la FDA debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad (Ming et al., 2009).

Las nanopartículas de PLGA se pueden sintetizar por diversos métodos como: emulsificación-difusión, *salting-out* (Astete & Sabliov, 2006), doble emulsión, secado por aspersion, nanoprecipitación (Pazmiño Viteri et al., 2020), evaporación de emulsión-disolvente, difusión de emulsificación-solvente (Mehta et al., 2016), entre otros. Específicamente, en el método de nanoprecipitación, las nanopartículas se forman en una suspensión coloidal cuando la fase orgánica se agrega lentamente a la fase acuosa con agitación moderada (Y. Wang et al., 2016). Este método es una buena opción porque lleva poco tiempo, requiere poca cantidad de materia prima y consume poca energía (Barreras-Urbina et al., 2016). Sin embargo, se requiere de un alto control sobre las condiciones de síntesis como la temperatura, velocidad de goteo, el solvente, la velocidad de agitación, entre otros; ya que influyen directamente sobre el tamaño y forma de la nanopartícula obtenida (Lee et al., 2016).

Es importante destacar que la forma y tamaño de las nanopartículas son características fundamentales que se deben considerar dentro del diseño óptimo de nanomateriales con aplicaciones futuras en la Nanomedicina, ya que estos repercuten en su efecto terapéutico (Adamo et al., 2017). Por ello, se han desarrollado y utilizado varios métodos físicos y químicos para sintetizar nanopartículas de forma y tamaño controlados (Varanda et al., 2019). Los métodos químicos se utilizan en el enfoque de abajo hacia arriba (*bottom-up*) e influyen en el tamaño y la forma de la nanopartícula ya que producen nanopartículas más ordenadas y cristalinas (comparado con los métodos físicos) que resultan en un mayor cambio en sus morfologías superficiales (Ahlawat et al., 2018) (Park et al., 2007)

La forma de las NPs puede variar dependiendo de los parámetros de síntesis utilizados. Por ejemplo, las nanopartículas de almidón (polímero natural) sintetizadas por nanoprecipitación, cambian de forma dependiendo de la proporción en volumen

de almidón:etanol. Así, pueden adquirir formas fibrosas, fibrosas alargadas o esféricas cuando la relación en volumen de almidón:etanol es de 1:10, 1:15 y 1:20; respectivamente (Chin et al., 2011). En otro estudio, utilizaron el método de hidrólisis ácida y el método de precipitación para sintetizar nanopartículas de almidón de alta y baja cristalinidad, respectivamente. En ambos casos añadieron surfactantes aniónicos y catiónicos y no observaron cambios en la morfología de las NPs, sin embargo, al añadir Tween 20 (surfactante no iónico) se produjo la absorción física del surfactante a la superficie de las NPs de alta cristalinidad y su ingreso a las NPs de baja cristalinidad, generado por la estructura porosa de las mismas y las interacciones hidrofílicas-hidrofílicas entre Tween 20 y el grupo hidroxilo del almidón; provocando a su vez, cambios en la morfología de las nanopartículas (Putro et al., 2020).

La forma de la nanopartícula juega un papel fundamental en los procesos de internalización y liberación de fármacos (Adamo et al., 2017). Ridolfo et al. (2019), en su estudio evaluaron la interacción entre nanopartícula de copolímeros y las células de la retina del ojo, probando 4 formas diferentes: esféricas, tubulares, micelas y micelas en forma de gusanos (*worms*). Las micelas y micelas en forma de gusanos fueron absorbidos más fácilmente por las células que sus homólogos tubulares; este comportamiento de absorción distintivo se debió a las propiedades de difusión mejoradas de las estructuras de alta relación de aspecto, que fue más intensa en el caso de los *worms* debido a su mayor relación de aspecto longitud: ancho en comparación con la de los tubos (Ridolfo et al., 2021).

Las nanopartículas esféricas captaron menos fármaco que las micelas, debido a la estructura molecular de copolímeros PEG-PTMC/PCL en las micelas y a su proceso de hidratación directa. Las nanopartículas esféricas liberaron más rápidamente el fármaco que las nanopartículas en forma de tubo; la movilidad en el vítreo (sustancia gelatinosa) fue más fácil para los *worms*, seguido de las

nanopartículas tubulares y finalmente las esféricas; esto debido a que las formas tubulares poseían una difusión mejorada dada por su capacidad para atravesar el gel vítreo de forma más eficaz que las esferas (Ridolfo et al., 2021).

Por otro lado, el control sobre el tamaño se logra variando los parámetros utilizados durante la síntesis de nanopartículas, como la concentración del polímero, miscibilidad del solvente usado en agua (Cheng et al., 2007), la temperatura, la fuerza iónica de la fase acuosa, el caudal de inyección, velocidad de agitación y el calibre de la aguja para inyección (Wei Huang & Chenming Zhang, 2018). Por ejemplo, en el caso de la nanoprecipitación, se sabe que un aumento en la concentración del polímero en la solución orgánica inicial, conduce a un aumento del tamaño volumétrico medio de las nanopartículas de PLGA; de esta manera se observó que las NPs aumentaron de 60 nm a 165 nm en N, N-dimetilformamida (DMF) a medida que la concentración del polímero aumentó 10 veces de 5 mg/ml a 50 mg/ml. Además, un aumento en la miscibilidad del solvente usado en agua, conduce a una disminución en el tamaño de las nanopartículas debido a una difusión más eficiente del solvente y la dispersión del polímero en agua (Cheng et al., 2007).

Por otro lado, la temperatura, la fuerza iónica de la fase acuosa y el caudal de inyección de la fase orgánica tienen un impacto significativo sobre el tamaño: el aumento de la temperatura provoca una disminución del tamaño de la NP debido a que las altas temperaturas aumentan la solubilidad del PLGA, inhibiendo la precipitación. La combinación de este parámetro con la fuerza iónica de la fase acuosa y el caudal de inyección de la fase orgánica, se pueden utilizar para un control de tamaño preciso. Por otro lado, la velocidad de agitación, el calibre de la aguja para inyección y la concentración final del polímero no tienen un impacto significativo, pero son beneficiosos desde el punto de vista de la fabricación, porque si se utiliza un reactor con múltiples puntos de inyección y agitación continua se

logra la producción de NPs de alto rendimiento, sin afectar su tamaño (Wei Huang & Chenming Zhang, 2018)

El tamaño de la nanopartícula influye directamente en el proceso posterior de entrega del fármaco e interacción con el cuerpo humano, dicta su toxicidad y capacidad de focalización (Rizvi & Saleh, 2018). Además afecta su perfil de biodistribución: las nanopartículas muy pequeñas con un diámetro medio entre 60-70 nm se excretan rápidamente, mientras que las nanopartículas más grandes (200 nm o más) pueden ser secuestradas por el hígado o el bazo, por lo que solo las nanopartículas con un diámetro entre 70 y 200 nm son óptimas para aplicaciones *in vivo* (Locatelli & Comes Franchini, 2012).

Uno de los parámetros más importantes es la temperatura, sin embargo, su efecto sobre el tamaño de las nanopartículas ha sido poco estudiado. Uno de los pocos estudios es el de Huang y sus colaboradores, quienes determinaron que hay una disminución aproximada de 10 nm en el tamaño de nanopartículas de PLGA con cada aumento de 10 grados de temperatura, evaluado en un rango de 0 a 80°C (Wei Huang & Chenming Zhang, 2018)

También se ha relacionado la temperatura de transición vítrea (T_g) con el tamaño de los agregados de NPs poliméricas, determinando el tipo de deformación que sufre el polímero cuando se expone a temperaturas superiores o inferiores a su T_g (Wilson et al., 2020). Otro estudio determinó que las NPs de poliestireno más grandes, tienen mayor T_g debido a su falta de sensibilidad al calentamiento, comparado con las NPs más pequeñas de este polímero (Homaeigohar et al., 2020). Debido a la escasez de estudios de este tipo y la poca relevancia estadística generada por la baja cantidad de datos con los que trabajan las investigaciones existentes, no se conoce la relación directa entre la temperatura aplicada en el método de nanoprecipitación con la forma y tamaño de nanopartículas de PLGA.

Justificación del problema

Algunas propiedades de las NPs, como su forma y tamaño, pueden influir en las interacciones con diversos fluidos biológicos (Ridolfo et al., 2021), el tiempo de circulación dentro del organismo, el grado de captación por parte de las células del sistema inmune (A. K. Jain & Thareja, 2019), y por lo tanto, va a impactar en la entrega de carga bioactiva, modulando el desempeño terapéutico (Ridolfo et al., 2021).

A partir de estos datos, se puede entender la necesidad de controlar la forma y el tamaño de las nanopartículas durante su proceso de síntesis, para obtener posteriormente, un tratamiento terapéutico eficiente. Sin embargo, es importante que la estadística que respalda estos estudios esté apoyada en una buena cantidad de datos para que los resultados sean lo más cercanos posibles a la realidad. Los estudios revisados para el presente trabajo están justificados a partir de una baja cantidad de datos (Wilson et al., 2020) o en otros casos, no se especifica el número de datos con los que se está trabajando (Homaeigohar et al., 2020)

Bajo esta premisa, el objetivo del presente estudio es analizar la influencia de la temperatura en el tamaño y forma de nanopartículas de PLGA sintetizadas por nanoprecipitación, utilizando como base un conjunto amplio de datos recolectados en el laboratorio, con el fin de obtener resultados que se acerquen lo más posible a la realidad.

Objetivos

Objetivo General

- Estudiar la influencia de la temperatura en la síntesis de nanopartículas de PLGA.

Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas de PLGA por la técnica de nanoprecipitación y caracterizarlas mediante Microscopio Electrónico de Barrido (SEM), y Dispersión de Luz Dinámica (DLS).
- Realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de las mediciones de las imágenes de SEM en el software Fiji.

Capítulo II: Marco Teórico

Las nanopartículas (NPs) constituyen una amplia clase de materiales con dimensiones por debajo de 100 nm (I. Khan et al., 2019). Las propiedades físicas, químicas y biológicas de las nanopartículas son únicas a nanoescala en comparación con sus respectivas partículas a escalas superiores; esto se debe a que poseen un área superficial relativamente mayor al volumen, mayor reactividad o estabilidad en un proceso químico, mayor resistencia mecánica, mayor conductividad eléctrica y térmica, propiedades ópticas únicas, entre otros (Ealias & Saravanakumar, 2017). Estas propiedades de las nanopartículas les han permitido ser utilizadas en numerosas aplicaciones como en la remediación ambiental (Smita et al., 2012), cosméticos (Fytianos et al., 2020), industria de la construcción (Mohajerani et al., 2019), textil (Rivero et al., 2015), automotriz, electrónica, entre otros (Bissessur, 2020).

Una de las aplicaciones más demandadas es la entrega de drogas o fármacos, en este campo se usan principalmente las nanopartículas poliméricas, gracias a su habilidad para circular durante un periodo prolongado de tiempo para dirigirse a un órgano en particular, proteger al fármaco de la degradación, mejorar la penetración intracelular; también se han utilizado como portadores de ADN en terapia génica, y como un medio de administración de proteínas, péptidos y genes (Mohanraj & Chen, 2015). Las ventajas de usar nanopartículas como un sistema de entrega de drogas son:

1. El tamaño y características de superficie de las NP son fáciles de manipular con el fin de lograr una entrega eficaz del fármaco (Gelperina et al., 2005).
2. La liberación del fármaco durante el transporte y en el sitio de localización está controlada, aumentando de esta manera la eficacia terapéutica y reduciendo los efectos secundarios (Mohanraj & Chen, 2015)

3. La carga del fármaco puede ser relativamente alta y al incorporarse al sistema no genera ninguna reacción química; esto representa un factor importante para preservar la actividad del fármaco (Rizvi & Saleh, 2018)
4. El sistema se puede utilizar para varias vías de administración, incluyendo la oral, nasal, parenteral, intraocular, entre otras menos comunes (Yildirimer et al., 2011).

A pesar de estas ventajas, las nanopartículas también tienen limitaciones, muchas de ellas relacionadas con su tamaño. Por ejemplo, las nanopartículas de pequeño tamaño y área superficial grande dan como resultado una carga de fármaco limitada y generan el fenómeno de agregación, que se puede observar en la Figura 1, este fenómeno dificulta el manejo físico de las nanopartículas en forma líquida y seca (Mohanraj & Chen, 2015).

Figura 1

Fenómeno de agregación de las nanopartículas



Nota. Adaptado de “Effects of Size and Aggregation/Agglomeration of Nanoparticles on the Interfacial/Interphase Properties and Tensile Strength of Polymer Nanocomposites” (p. 5), por M. Aqeel, 2018, *Nanoscale Res Lett*, 13 (214).

A continuación, se va a detallar la clasificación de las nanopartículas, y sus métodos de síntesis y caracterización.

Clasificación de Nanopartículas

Las nanopartículas pueden clasificarse en diferentes tipos de acuerdo a su tamaño, forma, y propiedades físicas y químicas. Según Mitchell et al (2021), las nanopartículas se pueden dividir según sus propiedades en: poliméricas, inorgánicas y basadas en lípidos.

Nanopartículas Poliméricas.

Estas nanopartículas pueden encapsular o atrapar diferentes tipos de cargas útiles como compuestos hidrófobos (Jose et al., 2019), hidrófilos (Liu et al., 2020), moléculas de diferente peso molecular como pequeñas moléculas (Strand et al., 2019), macromoléculas biológicas, proteínas (L. Zhang et al., 2020) y vacunas (Anderson, Deborah K., Liang, 2017). Esta capacidad se genera gracias a las diferentes maneras en que los compuestos pueden ser atrapados por las nanopartículas, por ejemplo, se pueden encapsular dentro de su núcleo, atraparse en la matriz del polímero, conjugarse químicamente al polímero o unirse a la superficie de la nanopartícula (Mitchell et al., 2021).

Son muy utilizados como sistemas de administración de fármacos gracias a sus propiedades de liberación controlada, su habilidad para proteger drogas y otras moléculas con actividad biológica contra el medio ambiente, y su biodisponibilidad e índice terapéutico mejorado (Zielinska et al., 2020). Este tipo de nanopartículas pueden ser sintetizadas a partir de materiales naturales o sintéticos, así como de monómeros o polímeros preformados (Mitchell et al., 2021). A continuación, se detallará algunas características y ejemplos de polímeros naturales y sintéticos.

Los polímeros naturales son materiales de alto peso molecular (Rajeswari, 2017) que se extraen de plantas como por ejemplo la celulosa (Ioelovich, 2008), almidón (Pokhrel, 2015), pectina (Flutto, 2003), entre otros (Kulkarni et al., 2012); o de animales como la quitina (Zargar et al., 2015) o el alginato (Eiselt et al., 2000) (Kulkarni et al., 2012). Estos materiales presentan estructuras similares a la matriz

extracelular de los tejidos nativos, lo que le permiten tener una buena adherencia celular y evitar reacciones inmunológicas; aunque en algunos casos, estas propiedades se ven limitadas por la variabilidad de los lotes dentro de los procesos de producción y purificación. (Puertas-Bartolomé et al., 2021). Durante la producción, los polímeros naturales se encuentran expuestos al medio ambiente, por lo que corren el riesgo de contaminación microbiana (Srivastava & Abul Kalam, 2019).

Por otro lado, los polímeros sintéticos son materiales sintéticos puros que se obtienen mediante un proceso químico llamado polimerización (Srivastava & Abul Kalam, 2019). En este grupo están los poli (α -hidroxiésteres) que incluyen policaprolactona (PCL), ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) y su copolímero PLGA; y los poli (éteres) que incluyen óxido de polietileno (PEO) y polietilenglicol (PEG), alcohol de polivinilo (PVA) y poliuretano (PU); que son los materiales sintéticos degradables más estudiados (Reddy et al., 2021). Los polímeros sintéticos tienen buenas propiedades mecánicas y estabilidad térmica (Sionkowska, 2011). En la siguiente tabla se presenta una breve comparación entre los polímeros naturales y sintéticos.

Tabla 1

Diferencias entre los polímeros naturales y sintéticos

Característica	Polímero		Referencia
	Natural	Sintético	
Producción	De origen natural	Proceso químico	(Bolívar-Monsalve et al., 2021) (B. ter Horst et al., 2019)
Compatibilidad celular	Biocompatible	Contiene impurezas que no permite el crecimiento celular	(Reddy et al., 2021)
Morfología	No se pueden procesar en varias formas	Se pueden procesar en una variedad de formas	(Sionkowska, 2011)

Característica	Polímero		Referencia
	Natural	Sintético	
Efectos adversos	Ninguno por ser de origen natural	En el medio ambiente y el ser humano	(Muhamad et al., 2014)
Costo de producción	Bajo	Alto	(Srivastava & Abul Kalam, 2019)

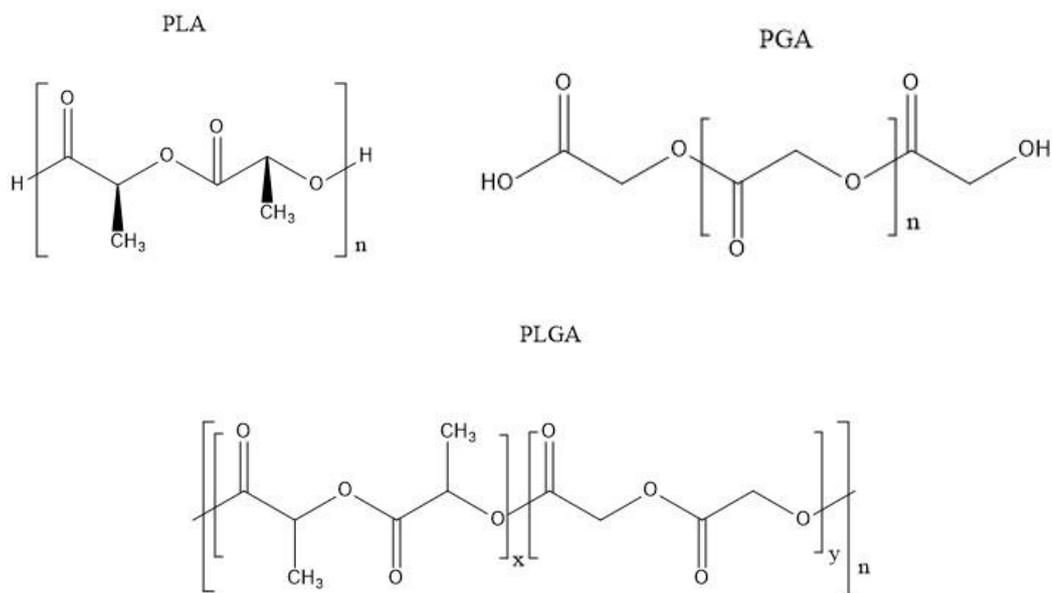
Nanopartículas de PLGA. El PLGA o poli (ácido láctico-co-glicólico) es un copolímero hidrófobo resultado de la reacción de policondensación de ácido láctico (LA) y ácido glicólico (GA) (Gentile et al., 2014); los cuales son transformados en los polímeros PLA (ácido poliláctico) y PGA (ácido poliglicólico). Ambos son polímeros de poliéster alifático porque tienen un esqueleto unido a un éster alifático que puede hidrolizarse cuando se lleva a cabo reacciones de polimerización (Figura 2) (Pazmiño Viteri et al., 2020).

El LA se produce principalmente por la fermentación natural de carbohidratos y a través de una policondensación se transforma en PLA (Pazmiño Viteri et al., 2020). El PLA es rígido e hidrófobo (debido a sus grupos laterales metilo) con baja resistencia mecánica (Rezvantlab et al., 2018). Se puede preparar en forma altamente cristalina o completamente amorfa debido a sus cadenas de polímero desordenadas (Makadia & Siegel, 2011). Es soluble en diferentes solventes orgánicos como el benceno, cloroformo, acetonitrilo, dioxano y otros (Sato et al., 2012). El GA es un metabolito natural que se encuentra en el cuerpo humano y se produce a partir de la fermentación de los microorganismos, de forma natural o a través de métodos químicos a partir de compuestos que derivan del petróleo. La dimerización del GA produce PGA (Z. Zhang et al., 2014), que es un compuesto hidrófilo con baja solubilidad en agua y rápida tasa de degradación en condiciones fisiológicas (Rezvantlab et al., 2018), carece de cualquier grupo lateral metilo y muestra una estructura altamente cristalina (45-55%) (Makadia & Siegel, 2011) (Gunatillake et al., 2006).

El PLGA, como copolímero del PLA y PGA, hereda las propiedades intrínsecas de sus monómeros constitucionales (Rezvantab et al., 2018), dependiendo de la proporción de los mismos, lo que determinará también la hidrofobicidad y el tiempo de deterioro del polímero final. Por ejemplo, si el ácido poliláctico está en mayor porcentaje se genera un PLGA más hidrófobo, que tarda más en degradarse en agua (Nsamela, 2020); sin embargo, un caso especial se presenta cuando se tiene una proporción 50:50 entre ambos monómeros, pues se ha visto que el PLGA en estas condiciones se hidroliza mucho más rápido en comparación con uno que contenga cantidades más altas de cualquiera de los dos monómeros (Locatelli & Comes Franchini, 2012).

Figura 2

Estructura química de PLGA y sus monómeros



Nota. Adaptado de “Elaboración de nanopartículas de PLGA estabilizadas con la mezcla poli-dodecil sulfato de sodio: degradación de PLGA y liberación de fármaco durante almacenamiento” (p.8), por S. Flores, 2011. x: número de unidades de ácido láctico; y: número de unidades de ácido glicólico

El PLGA es muy utilizado en el diseño y formulación de sistemas de administración de fármacos para aplicaciones biomédicas, como las nanopartículas de PLGA que pueden encapsular agentes antiterapéuticos (Rezvantab et al., 2018), hidrófilos e hidrófobos (Español et al., 2016). Ha sido aprobado por la FDA por su biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioseguridad y la versatilidad en su formulación y funcionalización (Ghitman et al., 2020). Las propiedades de biodegradabilidad y bioseguridad se le atribuye al hecho de que los monómeros resultado de la hidrólisis del PLGA se metabolizan en el cuerpo a través del ciclo del ácido tricarbóxico o ciclo de Krebs, dando como resultado subproductos como CO₂ y H₂O, generando una toxicidad sistémica mínima (Swider et al., 2018).

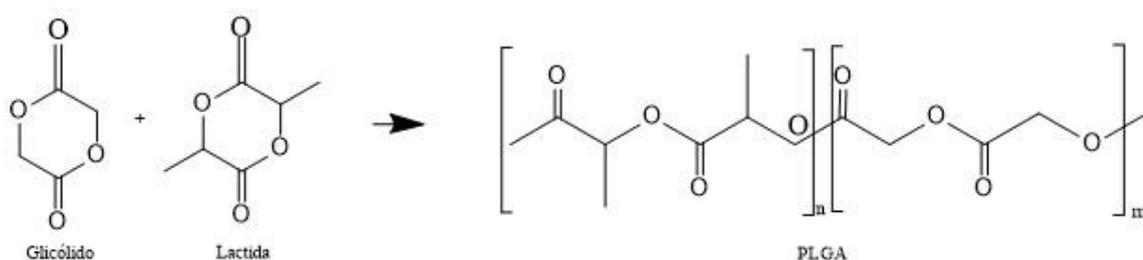
El PLGA es soluble en una amplia gama de disolventes comunes. Si el polímero tiene mayor cantidad de PLA se disuelve con disolventes clorados, como diclorometano o cloroformo, y con disolventes miscibles en agua como acetona o tetrahidrofurano; mientras que si el PLGA tiene una mayor cantidad de PGA se disuelve con disolventes fluorados, como hexafluoroisopropanol (Swider et al., 2018). Para la síntesis de nanopartículas de PLGA, se suele utilizar acetona debido a su reducida toxicidad y menor punto de ebullición (Locatelli & Comes Franchini, 2012). En el agua, este polímero se degrada por hidrólisis de sus enlaces éster; esta degradación hace que algunas propiedades del PLGA como la temperatura de transición vítrea (T_g), el contenido de humedad y el peso molecular, varíen con el tiempo. El cambio de las propiedades del PLGA durante su biodegradación influye en la tasa de liberación y degradación de las moléculas de fármaco incorporadas, cuando se lo utiliza para la formulación de nanopartículas (Makadia & Siegel, 2011).

La síntesis de PLGA se logra comúnmente mediante reacciones de polimerización de apertura de anillo de lactida y glicólido (Figura 3), o mediante reacciones de policondensación de ácido láctico y ácido glicólico para formar polímeros de bloque de PLA y PGA. Los procesos de polimerización de apertura de

anillo generan polímeros PLGA de alto peso molecular, mientras que los procesos de policondensación son más adecuados para la síntesis de polímeros de bajo peso molecular (Zhi et al., 2021). El peso molecular va a estar dado por la longitud de la cadena del polímero, la misma que da una idea básica sobre la naturaleza química del mismo, es decir, si es hidrófobo o hidrófilo; por ejemplo, se sabe que los polímeros que tienen una longitud de cadena corta son hidrofóbicos, mientras que los que tienen una cadena larga son generalmente hidrofílicos (S. Sharma et al., 2016).

Figura 3

Polimerización de PLGA por apertura de anillo



Nota. n: número de unidades de lactida; m: número de unidades de glicólido. Adaptado de *Síntesis de PLA, PGA y PLGA vía ROP*, de Sergio Flores, 2011, <https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/175/1/Sergio%20Enrique%20Flores%20Villase%20C3%B1or%20maestria.pdf>.

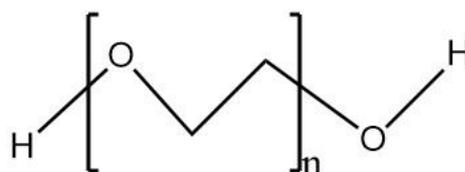
Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas de PLGA dependen principalmente de las propiedades del polímero de PLGA utilizado para la síntesis, incluida la relación del ácido láctico a ácido glicólico, peso molecular y temperatura de almacenamiento. Sin embargo, la mayoría de las propiedades de las nanopartículas, como su tamaño y distribución, dependen del método de síntesis y los parámetros de síntesis aplicados dentro de este método (Swider et al., 2018). Por ejemplo, Cheng et al (2007), establecieron que un aumento en la concentración

del polímero en la solución orgánica inicial conduce a un aumento del tamaño volumétrico medio de las nanopartículas de PLGA; por otro lado determinaron que un aumento en la miscibilidad del solvente usado en agua en la técnica de nanoprecipitación, conduce a una disminución en el tamaño de las nanopartículas.

Las nanopartículas de PLGA se pueden funcionalizar con polietilenglicol (PEG) u otros polímeros hidrófilos, dando como resultado que se vuelvan casi invisibles para el sistema retículo-endotelial, que es responsable de la eliminación de partículas del torrente sanguíneo (Pelaz et al., 2015). El tiempo de retención para las partículas hidrófilas es comparativamente más largo que para las partículas hidrófobas; es decir, la adición de PEG (polímero soluble en agua) ayuda a que las nanopartículas circulen por la sangre durante más tiempo, y reduce las interacciones con biomoléculas como lípidos o proteínas séricas (Swider et al., 2018). El PEG (Figura 4) no es un polímero biodegradable porque se excreta inalterado en el riñón y no sufre ningún proceso de biodegradación en el cuerpo, por lo que tampoco se acumula en los tejidos (Locatelli & Comes Franchini, 2012).

Figura 4

Estructura química del polietilenglicol o PEG



Nota. Adaptado de “Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications” (p. 1258), por A. D’ souza, 2016, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 13(9).

Nanopartículas Inorgánicas.

Las nanopartículas inorgánicas son aquellas que tienen de base materiales como la plata, el zinc y el cobre; aunque también se puede usar oro, hierro, sílice (Pandey & Dahiya, 2016), cobalto y níquel; siendo estos últimos los menos utilizados por su toxicidad y vulnerabilidad a la oxidación (Khalid et al., 2020).

Las NPs inorgánicas se pueden sintetizar por métodos físicos y químicos. Los primeros dependen del principio de subdividir los materiales precursores a granel en nanopartículas más pequeñas, mientras que el enfoque químico implica la reducción de iones metálicos en átomos metálicos en presencia de agentes estabilizantes, seguida de la agregación controlada de átomos (Kango et al., 2013)

Las características del material del que parte las nanopartículas inorgánicas van a determinar sus propiedades físicas, eléctricas, magnéticas y ópticas. Las NPs inorgánicas se caracterizan por presentar variabilidad en su tamaño, estructura y geometría; son adecuadas para aplicaciones terapéuticas y están limitadas en toxicidad y solubilidad (Mitchell et al., 2021). Además su estabilidad, facilidad de síntesis y sus propiedades magnéticas, ópticas y electrónicas hacen que las NP inorgánicas sean atractivas para la obtención de imágenes y ablación de tejido maligno en terapias de cáncer (Bayda et al., 2017) (Labouta & Schneider, 2013).

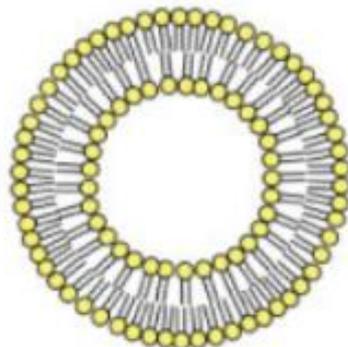
Las nanopartículas de plata son utilizadas en el tratamiento de infecciones bacterianas en quemaduras, heridas abiertas y úlceras crónicas, gracias a su efecto bactericida (Labouta & Schneider, 2013). Las NPs de óxido de zinc son usadas en el campo de la cosmetología y medicina como agente antibacteriano y catalizador, sin embargo se ha reportado varios tipos de toxicidad asociados a este tipo de NPs, como citotoxicidad, genotoxicidad, toxicidad pulmonar, entre otros (Keerthana & Kumar, 2020). Las NPs de cobre se usan ampliamente como apósitos para heridas y en aplicaciones modernas como sensores de gas, superconductores de alta temperatura y células solares (Rafique et al., 2017).

La modificación de la superficie de nanopartículas inorgánicas ha atraído mucha atención porque produce una excelente integración y una interfaz mejorada entre nanopartículas y matrices poliméricas (Kango et al., 2013). La integración de nanopartículas inorgánicas con matrices poliméricas combinan las funcionalidades de ambas para generar un tipo de nanomaterial con mejores propiedades ópticas, mecánicas, eléctricas, magnéticas, reológicas y retardantes al fuego (Breiner & Mark, 1998) (Rong et al., 2001).

Nanopartículas Basadas en Lípidos.

Su estructura típica es esférica y comprende al menos una bicapa lipídica que rodea un compartimento acuoso interno (Mitchell et al., 2021). Pueden transportar moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas, mostrar muy poca o ninguna toxicidad y aumentar el tiempo de acción del fármaco mediante una vida media prolongada y una liberación controlada del mismo (García-Pinel et al., 2019). El interés creciente en los sistemas basados en lípidos se debe a que mejoran la biodisponibilidad oral, reducen la variabilidad del perfil plasmático y mejora la caracterización de excipientes lipoides (Ekambaram et al., 2012). Existen tres tipos de nanopartículas basadas en lípidos que se describen brevemente a continuación:

Liposomas. Como se observa en la Figura 5, los liposomas suelen estar compuestos por fosfolípidos que pueden formar estructuras vesiculares unilaminares y multilaminares, lo que le da la capacidad de encapsular fármacos hidrófilos, hidrófobos y lipófilos (Mitchell et al., 2021). Pueden actuar como sistemas mejorados de administración de fármacos cuando actúan como liposomas activos, que tienen la capacidad de desestabilizar sus membranas mediante el uso de estímulos externos como la temperatura (Ewe et al., 2014), pH (Shi et al., 2002), ultrasonido (Suzuki et al., 2010), enzimas específicas (Meers, 2001), entre otros (Chen et al., 2017).

Figura 5*Estructura de un liposoma*

Nota. Adaptado de “Lipid-based nanoparticles for contrast-enhanced MRI and molecular imaging” (p.144), por Mulder et al., 2006, *NMR in Biomedicine*, 9 (1).

Nanopartículas sólidas de lípidos (SLN). Sistemas formados de componentes lipídicos fisiológicamente tolerados que se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente (Ekambaram et al., 2012). Pueden transportar una variedad de terapéuticos como pequeñas moléculas, grandes biomoléculas como polisacáridos, material genético (ADN/ARNip) y antígenos de vacunas (Paliwal et al., 2020). Ofrecen ventajas combinatorias de los sistemas de nanopartículas poliméricas, emulsiones grasas y liposomas (Paliwal et al., 2020); algunas de estas ventajas son biocompatibilidad (Li et al., 2009), mejoramiento de la estabilidad del fármaco (Shilpi et al., 2015), protección de fármacos lábiles sensibles al medio ambiente (Valdes et al., 2020) y administración dirigida del fármaco (Esposito et al., 2019).

Portadores de lípidos nanoestructurados (NLC). Se crean a partir de una mezcla de lípidos en fase sólida y líquida (Puri et al., 2009). Este sistema se desarrolló para superar las limitaciones de los SLN; por tanto, los NLC tienen una mayor capacidad de carga de fármaco y también podrían evitar la expulsión del fármaco durante el almacenamiento al evitar la cristalización de lípidos debido a la

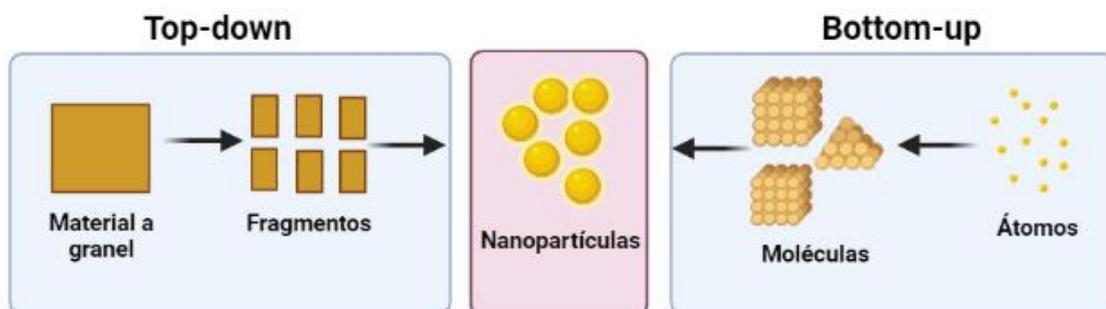
presencia de lípidos líquidos en la formulación de NLC (García-Pinel et al., 2019). También presenta ciertas ventajas sobre los sistemas de liposomas ya que la disponibilidad de métodos adecuados para la producción a gran escala de NLC resuelve el costoso requisito tecnológico que implica la producción en masa de liposomas (Muller et al., 2005). Los NLC son sistemas biocompatibles que se distinguen por una morfología rígida que contribuye a sus propiedades únicas en comparación con otras formulaciones a base de lípidos (H. Muller et al., 2011).

Síntesis de nanopartículas

Los métodos de síntesis de nanopartículas se clasifican en métodos de arriba hacia abajo (*top-down*) y de abajo hacia arriba (*bottom-up*). Como se observa en la Figura 6, la principal diferencia entre ambos es el material de partida para la preparación de las nanopartículas. En los métodos *top-down* se parte del material a granel y se reduce a nanopartículas mediante procesos físicos, químicos y mecánicos; mientras que en los métodos *bottom-up*, el material de partida son los átomos o moléculas (Jamkhande et al., 2019).

Figura 6

Clasificación de los métodos de síntesis de nanopartículas



Métodos Bottom-Up

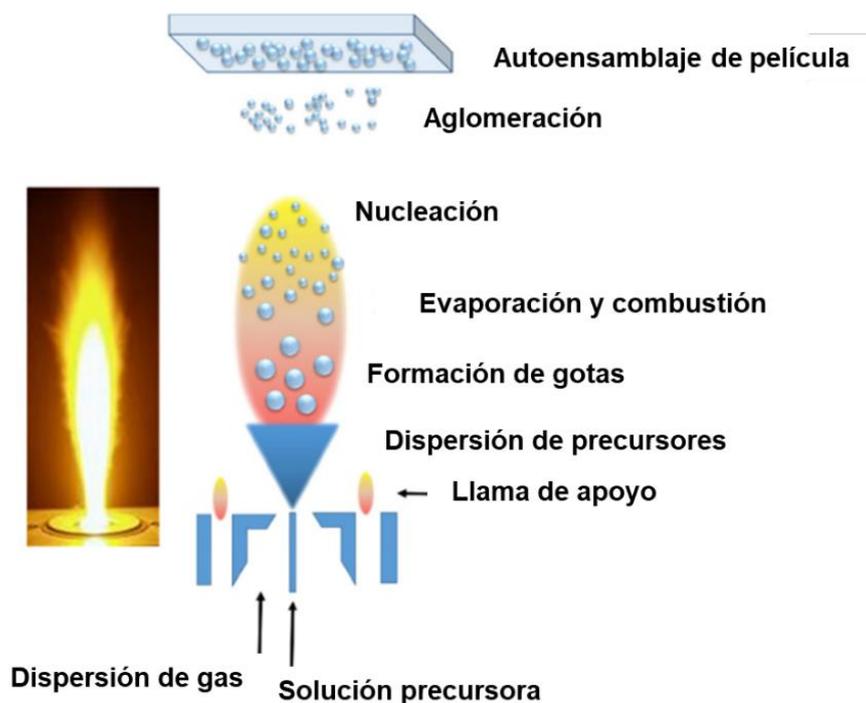
Los métodos *bottom-up* o también conocidos como métodos de abajo hacia arriba, se refieren a la construcción de un material desde abajo, es decir, átomo por

átomo, molécula por molécula, agrupación por agrupación, entre otros. Son alternativas que generan menos residuos, y por lo tanto, son más económicas (Pal, 1986). Pirólisis, biosíntesis, polimerización en emulsión y polimerización interfacial están entre los más usados; siendo los dos últimos, métodos empleados para la síntesis de nanopartículas poliméricas.

La pirólisis, como se observa en la Figura 7, es un proceso que implica quemar un precursor (líquido o vapor) con llama en un horno a alta presión, y posteriormente recuperar las nanopartículas a partir de los subproductos y gases de combustión. Por otro lado, la biosíntesis es un proceso ecológico y respetuoso con el medio ambiente, ya que utiliza bacterias, hongos, extractos de plantas, entre otros; que junto con los precursores adecuados van a producir nanopartículas (Ealias & Saravanakumar, 2017).

Figura 7

Esquema de la síntesis de pirólisis por aspersion de llama



Nota. Adaptado de *Metal Oxide Nanostructures* (p.33), por Nunes et al., 2019.

La polimerización en emulsión es un método en el cual se disuelve el tensoactivo o surfactante en una fase acuosa junto con el fármaco, hasta que se alcanza la concentración micelar crítica (CMC). El interior de la micela proporciona las condiciones adecuadas para la polimerización. Luego se añade el monómero que representa una fase oleosa y se agita la mezcla para formar la emulsión. Por último se realiza la neutralización de la suspensión y la filtración de las nanopartículas poliméricas (Mawunya & Šoóš, n.d.).

El método de polimerización interfacial tiene lugar en la interfaz de dos fases miscibles, lo que permite que exista una gran flexibilidad en la topología de la superficie y las propiedades químicas de los materiales funcionales preparados (Song et al., 2017).

Métodos Top-Down

El enfoque de arriba hacia abajo implica la descomposición del material a granel en estructuras de tamaño nanométrico. Estos métodos son simples, aunque el mayor problema son los defectos estructurales que se generan en la superficie del nanomaterial (Pal, 1986). Algunos de los métodos *top-down* más utilizados que emplean polímeros para la síntesis de nanopartículas son: *salting-out*, nanoprecipitación y evaporación en emulsión (Y. Wang et al., 2016).

Nanoprecipitación. También conocido como método de desplazamiento de solvente. Es una técnica realizada en un solo paso, donde las nanopartículas se obtienen de forma instantánea; por lo que resulta rápido y fácil de desarrollar. Las nanopartículas se forman en una suspensión coloidal cuando la fase orgánica se agrega lentamente a la fase acuosa con agitación moderada (Y. Wang et al., 2016).

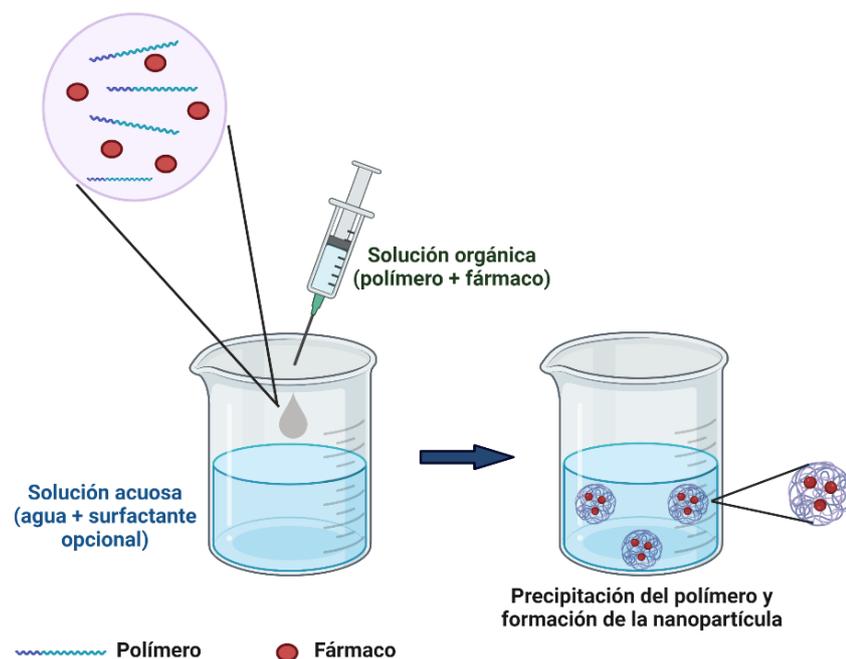
La técnica requiere dos solventes miscibles; idealmente el polímero y el fármaco deben disolverse en el primero (el disolvente), pero no en el segundo sistema (el no disolvente). La Figura 8 es un esquema de este proceso: el polímero y

el fármaco se disuelven en la solución orgánica que, a su vez, puede ser mezclada en agua, por ejemplo, acetona o metanol; esta solución luego se añade gota a gota a una solución acuosa (Y. Wang et al., 2016).

Tan pronto como el disolvente que contiene el polímero se ha difundido en el medio de dispersión, el polímero precipita, lo que implica un atrapamiento del fármaco (Piñón-Segundo et al., 2017). La formación rápida de las nanopartículas obedece al efecto Marangoni, que se debe a las turbulencias interfaciales que tienen lugar en la interfaz del solvente y el no solvente y resultan de fenómenos complejos como el flujo, la difusión, y las variaciones de tensión superficial (Bilati et al., 2005).

Figura 8

Método de nanoprecipitación para la síntesis de nanopartículas poliméricas



Tanto la nanoprecipitación como los otros métodos *top-down* antes mencionados (*salting-out* y evaporación en emulsión) comparten dos pasos principales: el primero que consiste en preparar un sistema emulsionado y el

segundo paso donde las NPs se endurecen y se forman. Este último va a variar dependiendo de la técnica que se esté empleando: por ejemplo, en la técnica de *salting-out*, la fase acuosa consiste en una solución saturada de electrolito, lo que provoca que en esta técnica no se dé la difusión del disolvente debido a la existencia de sales.

Por otro lado, en la técnica de evaporación en emulsión, se evapora el solvente orgánico al vacío para que se precipite el polímero y se formen las nanopartículas (Y. Wang et al., 2016).

Caracterización de nanopartículas

Las nanopartículas poliméricas se pueden caracterizar en función de algunos aspectos y de acuerdo a ello se aplicará un método u otro. Se puede caracterizar el material de partida del polímero (FTIR, TGA, NMR, ICP-MS, DSC, RP-HPLC acoplado con ELSD, GPC, MALLS), el tamaño (técnicas de dispersión de luz, TEM, SEM, AFM, criogenia, tomografía tridimensional, rayos X de energía dispersiva), características de superficie (DLS, técnicas de separación, RP-HPLC con UV-VIS, ensayos biológicos, XRD, entre otros), la carga y concentración del fármaco (ELSD, CAD, espectrometría de masa, RP-HPLC con UV-VIS), entrega del fármaco (diálisis de equilibrio, ultra centrifugación, ultrafiltración, células de difusión), estabilidad (dispersión de luz, difracción láser, EM, AFM) y reproducibilidad (RP-HPLC, diálisis de equilibrio, ultra centrifugación, ultrafiltración, células de difusión) (Pazmiño Viteri et al., 2020).

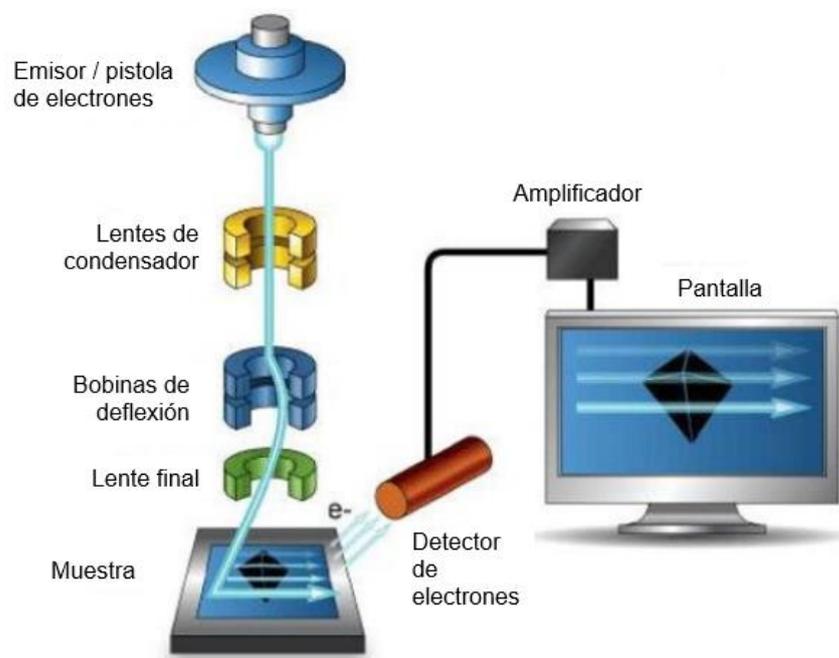
Microscopio electrónico de barrido (SEM).

Este instrumento es un método de caracterización en el que, con haces de electrones de alta energía, se escanea la superficie de la muestra, pudiendo establecer el tamaño, forma y textura del analito (Figura 9).

SEM llega a producir imágenes de alta resolución donde se pueden ver partículas de menos de 1 nm (Titus et al., 2019), pero solo funciona con muestras deshidratadas y conductoras; es por eso que en el caso de partículas no metálicas, se requiere de un dispositivo de recubrimiento por pulverización catódica que cubra la muestra con un material conductor, generalmente oro (Amidon et al., 2009).

Figura 9

Diseño y función de SEM



Nota. Adaptado de "Characterization of Tin-Oxide (SnO₂ -Ni) Based Sensors" (p.94), por K. Kanakamedala, 2019, *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 9(6).

Con este método es más difícil generar una distribución del tamaño de partícula ya que, si bien la información obtenida es visual y descriptiva, por lo general es no cuantitativa, ya que solo se ven unas pocas partículas en el campo de visión. Sin embargo, cuando se utiliza SEM con otras técnicas como la difracción láser, puede proporcionar información adicional valiosa sobre la textura de las

partículas, lo que puede ayudar a explicar los problemas de aglomeración o flujo (Amidon et al., 2009).

Dispersión de luz dinámica (DLS).

La dispersión de luz dinámica es una técnica que mide el tamaño hidrodinámico (Kumar et al., 2020) y la distribución de partículas en dispersión (Pilaquina et al., 2019), cuantificando el movimiento por difusión. El método se basa en el movimiento Browniano de las partículas, el cual hace que la luz láser que proviene del equipo se disemine en diferentes intensidades, las cuales son analizadas para obtener la velocidad del movimiento Browniano, y por lo tanto, el tamaño de partícula mediante la relación de Stokes-Einstein: (IESMAT, n.d.)

$$D = \frac{k T}{6 \pi \eta r} \quad (1)$$

Donde D es el coeficiente de difusión, k es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta, η la viscosidad y r el radio de la partícula.

El coeficiente de difusión depende del tamaño de las partículas, cuanto más pequeñas son las partículas, más rápidos son sus movimientos. Las altas temperaturas también aumentan el movimiento browniano (Mahmood et al., 2017).

Como se puede ver en la ecuación (1), la ley de Stokes-Einstein expresa el coeficiente de difusión en términos de viscosidad del solvente y radio molecular del soluto, se basa en el supuesto de que un ion o molécula en difusión se mueve entre moléculas de soluto como lo hace una entidad macroscópica (Schiller, 1991).

Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR).

Es una herramienta muy versátil para la caracterización de la superficie de las nanopartículas. En condiciones específicas, se puede determinar la composición química de la superficie de las nanopartículas (Kumar et al., 2018) y se pueden

identificar los sitios reactivos de la superficie responsables de la reactividad de la superficie (Baraton & Merhari, 2007) (KUMAR et al., 2016).

Análisis termogravimétrico (TGA)

Es una técnica experimental para medir el cambio de masa de una muestra en función de la temperatura y/o el tiempo, en una atmósfera controlada. El TGA se puede utilizar para determinar las propiedades y características de los polímeros, las temperaturas de descomposición de los polímeros, el contenido de humedad absorbida o el contenido de metal residual en una muestra (Dongargaonkar & Clogston, 2018).

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

DSC es un aparato que mide el cambio en las propiedades físicas de una muestra, y el cambio de la temperatura en dependencia del tiempo (Haynie, 2001). Mientras sucede la variación de temperatura, este aparato mide una cantidad de calor, difundido o absorbido por la muestra, en base a una comparación diferencial dada entre la temperatura de la muestra y la temperatura del material de referencia (Gallagher, 1998).

Microscopio de Fuerza Atómica (AFM)

A diferencia de otras técnicas de microscopía, el AFM ofrece visualización de partículas individuales y grupos de partículas, en tres dimensiones (Rao et al., 2007). También brinda información de sus propiedades físicas como el tamaño, la morfología, la textura de la superficie y la rugosidad. Además puede caracterizar nanopartículas en múltiples medios, incluido el aire, entornos controlados e incluso dispersiones líquidas (Scalf & West, 2006).

Difracción de rayos X (XRD).

Es una de las técnicas más usadas en la caracterización de nanopartículas. Normalmente, XRD proporciona información sobre la estructura cristalina (Kumar et

al., 2020), la naturaleza de la fase, los parámetros de la red y el tamaño de grano cristalino (Mourdikoudis et al., 2018). También se utiliza para determinar el espesor de películas delgadas, así como las disposiciones atómicas en materiales amorfos como los polímeros (R. Sharma et al., 2012).

Microscopio electrónico de transmisión (TEM).

Es una técnica no invasiva que proporciona información sobre la forma, el tamaño y la morfología general de las nanopartículas. Esta técnica también se utiliza para demostrar la encapsulación de fármacos y la formación de partículas núcleo-capa mediante diferencias de contraste. Además, ayuda a diferenciar las nanopartículas sintetizadas con polímeros de distinto peso molecular (Pazmiño Viteri et al., 2020).

Aplicaciones de las nanopartículas

Las nanopartículas tienen un sinnúmero de aplicaciones en diferentes áreas como: medicina, biología, electrónica, medio ambiente, industria mecánica, entre otras (Kumar et al., 2020). Una de las ramas más demandadas para las nanopartículas es la medicina, ya que tienen un uso potencial para la administración de medicamentos, logrando una mayor eficiencia terapéutica y efectos secundarios debilitados.

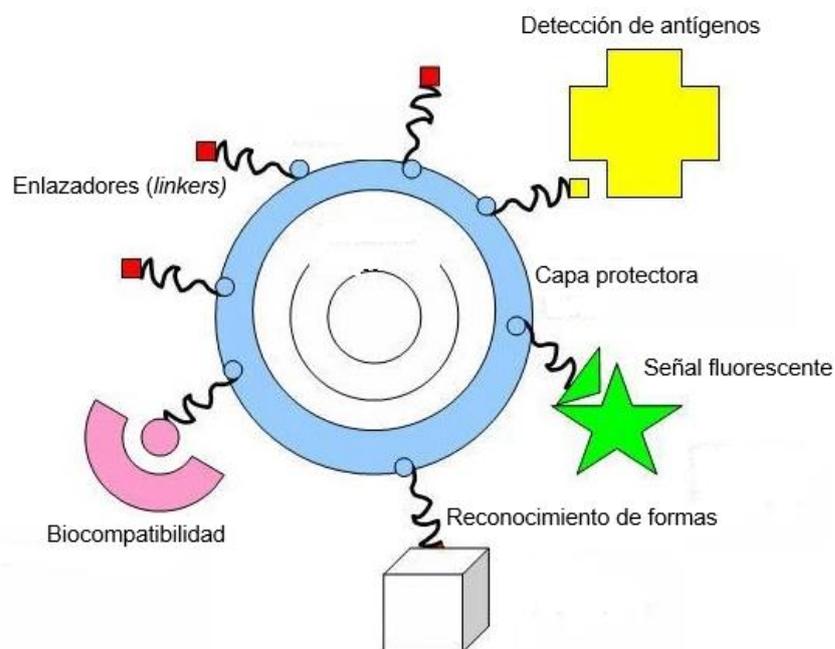
Las propiedades ópticas de las nanopartículas (principalmente nanopartículas metálicas) ha permitido su aplicación en imágenes biológicas y celulares, así como en aplicaciones terapéuticas fototérmicas (I. Khan et al., 2019) (Kumar et al., 2015).

El hecho de que las nanopartículas existan en el mismo dominio de tamaño que las proteínas, las hace adecuadas para el etiquetado biológico; sin embargo, para interactuar con el objetivo biológico, es necesario que la nanopartícula sea recubierta por una capa que actúe como interfaz bioinorgánica.

Ejemplos de recubrimientos biológicos pueden incluir anticuerpos, biopolímeros como el colágeno o monocapas de moléculas pequeñas que hacen que las nanopartículas sean biocompatibles. Por lo tanto, las nanopartículas pueden adquirir diferentes configuraciones para volverlas aptas para aplicaciones médicas o biológicas (Figura 10).

Figura 10

Configuraciones típicas usadas en nanopartículas



Nota. Adaptado de “Applications of nanoparticles in biology and medicine” (p. 2), por O. Salata, 2004, *Journal of Nanobiotechnology*, 2.

Recientemente, las NPs similares a enzimas se han convertido en un área de interés creciente ya que, comparadas con las enzimas naturales, las NPs similares a enzimas son estables frente a la desnaturalización, de bajo costo, de fácil tratamiento y almacenamiento, y altamente resistentes a elevadas concentraciones de sustrato. Gracias a estas propiedades, las NPs se han aplicado con éxito al análisis bioquímico y la degradación de contaminantes orgánicos (J. Xie et al., 2012). En el área de remediación ambiental, las nanopartículas también juegan un

papel fundamental, ya que, gracias a algunas de sus propiedades como su gran superficie específica, alta capacidad de adsorción y modificación a baja temperatura, son consideradas como extractantes prometedores de contaminantes para la depuración de aguas naturales y efluentes industriales. Las nanopartículas de FeO/NiO cerivalentes, y las nanopartículas químicamente modificadas de sílice, titania, zirconia y magnesia son altamente efectivas en este campo (Kaur & Gupta, 2009).

Diferentes formulaciones de PLGA han sido una opción común para la producción de una variedad de dispositivos biomédicos como injertos, suturas, implantes y dispositivos prostéticos (R. A. Jain, 2000). A pesar de 31 años de investigación y desarrollo, solo hay 19 formulaciones basadas en PLGA aprobadas por la FDA (Tabla 12) ya que hay una gran ausencia de equivalentes genéricos aprobados basados en PLGA (Ochi et al., 2021).

Entre estas formulaciones se encuentran microesferas (Arshady, 1991), microcápsulas (Yeh et al., 1996), nanopartículas (Desai et al., 2010), pellets (G. Sharma et al., 2007), implantes (Klose et al., 2008), entre otros (T. Ahmed, 2015). Por ejemplo, las microesferas de acetato de leuprolida (Lupron Depot®) fue el primer producto de microesferas inyectables basado en PLGA lanzado en el mercado estadounidense (Ochi et al., 2021) destinado al tratamiento del cáncer de próstata (Ming et al., 2009). Zoladex® y Eligard® son dos formulaciones de liberación sostenida a base de matriz polimérica. Eligard®, un implante de depósito inyectable de formación in situ para la administración de acetato de leuprolida, Zoladex® se suministra como una jeringa precargada que contiene acetato de goserelina disperso en una matriz PLGA cilíndrica (Schwendeman et al., 2014).

Tabla 2*Productos basados en PLGA y aprobados por la FDA*

Nombre del producto	Ingrediente Activo	Duración	Año de aprobación	Ref
Lupron Depot®	Acetato de leuprolida	1,3,4,6 meses	1989	(Okada et al., 1994)
Zoladex® Depot	Acetato de goserelina	1,3 meses	1989	(Fernandez Del Moral et al., 1996)
Sandostatin® LAR	Acetato de octreotida	1 mes	1998	(Garland et al., 2003)
Atridox®	Hiclato de doxiciclina	1 semana	1998	(M. Ahmed & Vandana, 2012)
Nutropin Depot®	Somatotropina	1 mes	1999	(Kemp et al., 2004)
Trelstar®	Pamoato de triptorelina	1,3,6 meses	2000	(Teillac et al., 2004)
Somatuline® Depot	Lanreotida	1 mes	2000	(Carmichael, 2012)
Arestin®	HCl de minociclina	2 semanas	2001	(Persson et al., 2006)
Eligard®	Acetato de leuprolida	1,3,4,6 meses	2002	(Okada et al., 1994)
Risperidal®	Risperidona	2 semanas	2003	(Rawat et al., 2012)
Vivitrol®	Naltrexona	1 mes	2006	(Dean, 2005)

Nombre del producto	Ingrediente Activo	Duración	Año de aprobación	Ref
Ozurdex®	Dexametasona	3 meses	2009	(Saincher & Gottlieb, 2020)
Propel®	Furoato de mometasona	1 mes	2011	(Santarelli & Han, 2016)
Bydureon®	Xenatida	1 semana	2012	(Painter et al., 2013)
Lupaneta Pack™	Acetato de leuprolida	3 meses	2012	(Okada et al., 1994)
Signifor® LAR	Pasireotida	1 mes	2014	(Samson, 2016)
Zilretta®	Acetoamida de triamcinolona	3 meses	2017	(Paik et al., 2019)
Sublocade™	Buprenorfina	1 mes	2017	(Lorman, 2018)
Perseris™	Risperidona	1 mes	2018	(Karas et al., 2019)

Nota. Recuperado de Ochi et al., (2021). Influence of PLGA molecular weight distribution on leuprolide release from microspheres.

International Journal of Pharmaceutics, 599, 120450.

Capítulo III: Materiales y métodos

Se realizaron dos ensayos diferentes, el ensayo 1 y 2. En ambos se utilizó el mismo proceso de síntesis (nanoprecipitación) y los mismos métodos de caracterización de nanopartículas (DLS y SEM). La diferencia entre ambos fue el número de nanopartículas analizadas. A continuación, se detalla la metodología aplicada para los dos ensayos:

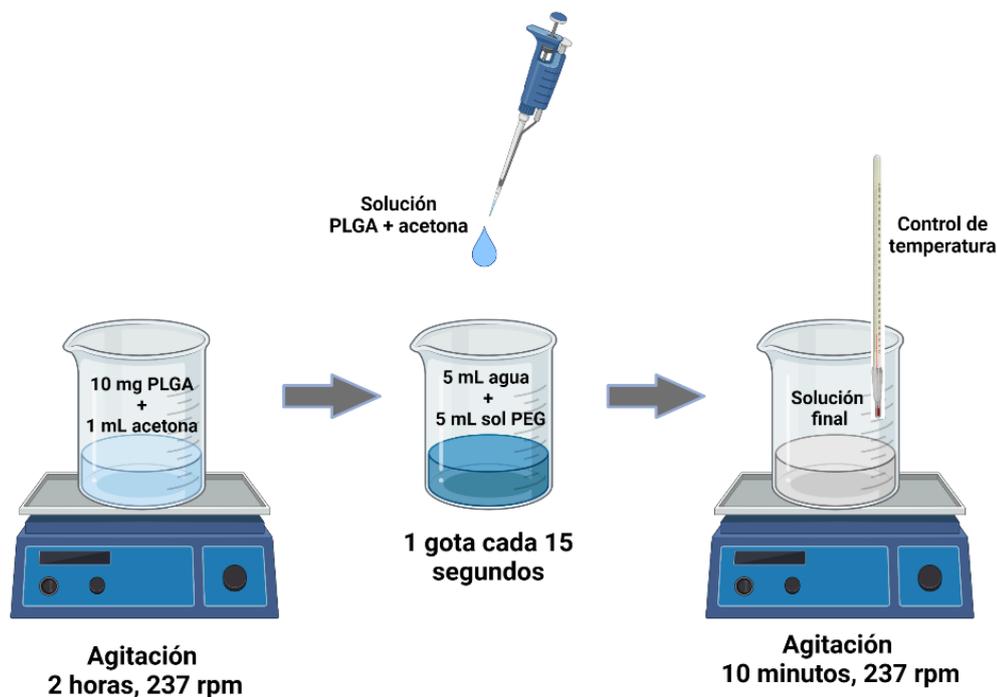
Síntesis de nanopartículas de PLGA

Para la síntesis de nanopartículas de PLGA se utilizó la técnica de nanoprecipitación (Figura 11). Se diluyeron 10 mg de PLGA en 1 mL de acetona, solución que se agitó por 2 horas a 237 rpm. Transcurrido este tiempo, se recuperó esta solución con una micropipeta y se la hizo gotear a una velocidad de 1 gota cada 15 segundos sobre una mezcla que contenía 5 mL de agua con 5 mL de una solución de 0.01 mg/mL de PEG. La mezcla final se agitó a 237 rpm durante 10 minutos.

Todo el proceso se llevó a cabo en un ambiente controlado en el cual se aplicaron cinco temperaturas diferentes: 10°C, 20°C, 30°C, 40°C y 50°C. Para evitar la volatilización del solvente se cerró el sistema herméticamente dentro de una campana de extracción. Las nanopartículas sintetizadas se almacenaron a 4°C para su posterior caracterización.

Figura 11

Técnica de nanoprecipitación para la síntesis de nanopartículas de PLGA



Caracterización de nanopartículas de PLGA

La caracterización se llevó a cabo por dos métodos: Dispersión de luz dinámica-DLS (HORIBA LB-550) y Microscopio Electrónico de Barrido-SEM (FEG-SEM TESCAN MIRA 3)

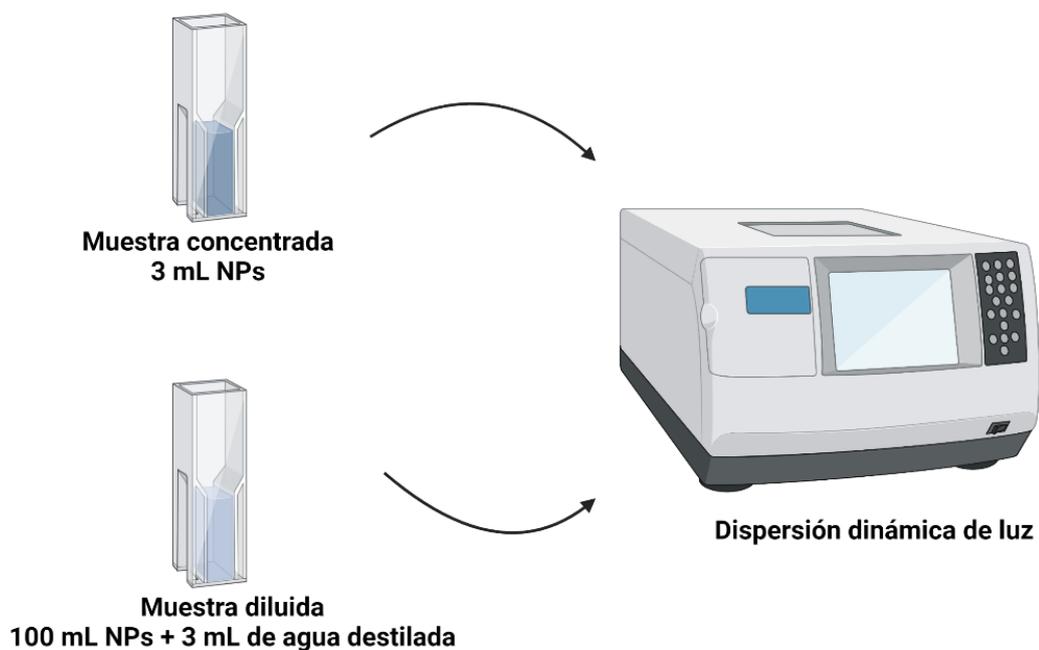
Caracterización en DLS

Para la medición del tamaño de nanopartículas en DLS, se tomaron en cuenta dos muestras: una concentrada y otra diluida, para cada tratamiento. La muestra concentrada corresponde a la que se obtuvo directamente de la síntesis por nanoprecipitación, el volumen de muestra agregado a la celda de cuarzo fue de 3 mL. Para obtener la muestra diluida, se disolvieron 100 uL de muestra en 3 mL de agua destilada (Figura 12). La disolución se realizó porque la muestra generalmente es muy densa, por lo que el espacio entre las nanopartículas se reduce, formando aglomerados que aumentan el promedio de la medición (Farrell & Brousseau, 2014),

en cambio, en una muestra diluida las nanopartículas están más dispersas y se facilita su caracterización.

Figura 12

Caracterización en DLS

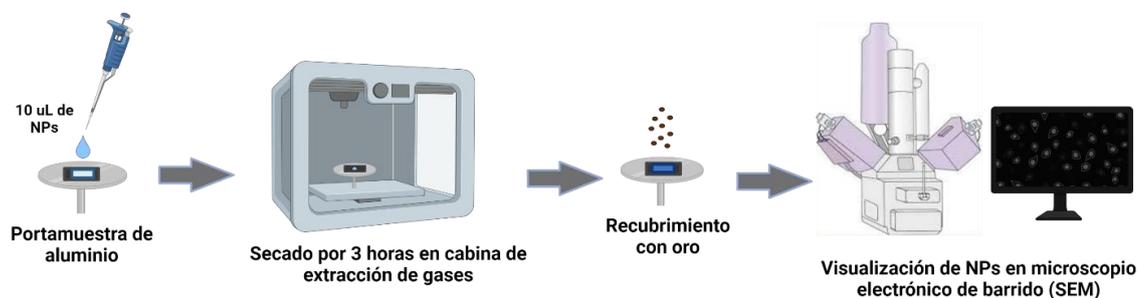


Caracterización en SEM

Como se observa en la Figura 13, para la visualización de nanopartículas en SEM se colocó 10 μ L de la muestra sobre una oblea de silicio fijada sobre un portamuestras de aluminio con cinta de carbono doble faz. A continuación, se dejó secar dentro de una cabina de extracción de gases durante 3 horas con flujo de aire encendido, y posteriormente se recubrió con una capa de oro de 20 nm de espesor, utilizando el *Sputter coating Quorum Q150 R ES*. Se obtuvieron micrografías por cada tratamiento con un voltaje de aceleración de 5kV. Posteriormente se realizó el análisis y medición de diámetros en el software Fiji.

Figura 13

Caracterización en SEM



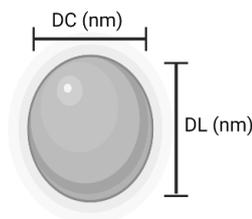
Medición de diámetros de nanopartículas

Utilizando el software Fiji, se midió el diámetro largo (DL) y el diámetro corto (DC) (Figura 14) de las nanopartículas para cada temperatura (10, 20, 30, 40 y 50°C). Los datos obtenidos fueron registrados en Microsoft Excel, donde se obtuvo el promedio, desviación estándar, curtosis, coeficiente de asimetría y la esfericidad de las nanopartículas, aplicando, para esta última, la Ecuación (2) establecida por Riley (1941).

$$\text{Esfericidad} = \sqrt{\frac{DC}{DL}} \quad (2)$$

Figura 14

Diámetro largo (DL) y corto (DC) de una nanopartícula



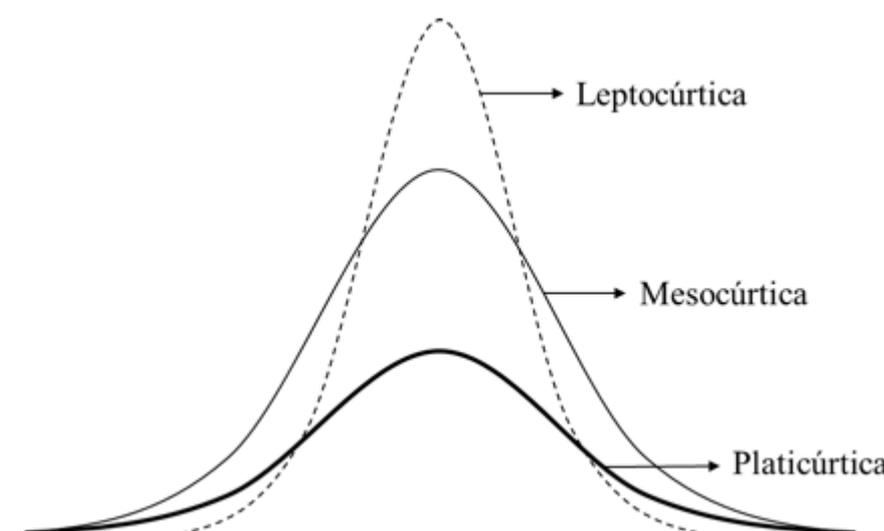
Los valores del coeficiente de asimetría y curtosis indicaron la forma de la distribución de las variables estudiadas (diámetros y esfericidad) (Molina & Rodrigo,

2014). El coeficiente de asimetría mide el grado de asimetría de la distribución con respecto a la media. Si este valor es mayor a cero, indica que la distribución se encuentra sesgada hacia la izquierda, si es menor a cero, significa que la distribución se sesga a la derecha y un valor de cero significa que la distribución es simétrica (Quesada & Vergara, 2007).

La curtosis es un valor que determina que tan apuntada o achatada es una distribución cuando se la compara con un comportamiento o distribución normal. Se dice que es una distribución mesocúrtica si sus datos se distribuyen igual que una variable normal. En este caso, su coeficiente de curtosis es 0. La distribución es leptocúrtica si los datos están más apegados hacia la media, tomando un valor de curtosis positivo. Y es una distribución platicúrtica si los datos están muy dispersos y el valor de la curtosis es menor a 0 (Oliva, 2010). Esta información se puede entender mejor con el siguiente gráfico:

Figura 15

Tipos de curvas de distribución dependientes de la curtosis



Nota. Adaptado de “Diferencias en la estimación del coeficiente de curtosis en diferentes softwares estadísticos” (p. 12), por L. Aguilar, 2019, *e-Agronegocios*, 5(2).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software Info Stat. Primero se analizó la normalidad a través del método gráfico de Q-Q plot y el método analítico de Shapiro-Wilks modificado; luego se comprobó la homocedasticidad de los datos a través del gráfico de dispersión de residuos vs predichos, de la variable de interés. En el caso de cumplir ambos supuestos, se realizó el análisis de varianza paramétrico o ANOVA para conocer si los datos presentan diferencias significativas y determinar si las variables estudiadas (temperatura y repeticiones) influyen en el tamaño de las nanopartículas (Chan, 2003).

Si no se cumplía el supuesto de normalidad, se procedió hacer un análisis de varianza no paramétrico. Existen 2 posibles pruebas para el análisis de varianza no paramétrico: el test de Kruskal Wallis y la prueba de la mediana, ambas utilizadas cuando se trabaja con varias muestras de datos independientes (Gómez et al., 2003). La prueba de la mediana se aplica cuando la variable independiente (en este caso la temperatura) es categórica, es decir, es una variable que puede tomar uno de un número limitado, y por lo general fijo, de posibles valores (Crawford, 1997); y las variables independientes (tamaño, diámetros y esfericidad) tiene, al menos, un nivel de medida de tipo ordinal, es decir, que se puede ordenar de forma jerárquica (Mishra et al., 2018). A partir de esta información, se descartó el uso de esta prueba ya que no cumple con el requisito de las variables independientes de tipo ordinal.

A. Horst & Bradley (2014) en su investigación mencionan que, para aplicar la prueba de Kruskal Wallis, se deben cumplir 3 supuestos: datos tomados al azar de las poblaciones, observaciones independientes y distribuciones similares. Si se confirma el cumplimiento de estos supuestos, se puede aplicar esta prueba y posteriormente determinar qué grupos presentan diferencias mediante una

comparación de a pares. A continuación, se presenta una comparación en la metodología de los ensayos 1 y 2:

Tabla 3: *Resumen de la metodología llevada a cabo en los ensayos 1 y 2*

PROCESO	DETALLE	ENSAYO 1	ENSAYO 2
Síntesis de NPs	Método utilizado	Nanoprecipitación	
	Veces que se repitió el proceso	1	3
Caracterización de NPs	Métodos utilizados	DLS y SEM	
	Número de NPs analizadas	2000-4000	9000
Análisis estadístico	Prueba para datos de DLS	ANOVA	
	Prueba para datos de SEM	Kruskal Wallis	

Capítulo IV: Resultados

Caracterización de nanopartículas en DLS

En la Tabla 4 se detallan los tamaños de las nanopartículas y su desviación estándar obtenidas a partir de DLS, para el ensayo 1. Como se puede observar hay pocos datos ya que solo se midió una vez la muestra correspondiente a cada temperatura (una sola muestra). Los tamaños de muestras diluidas y concentradas se encuentran en un rango entre 162 a 208 nm, aproximadamente; donde la muestra más pequeña corresponde a la muestra diluida de 40°C, con un valor de $162 \pm 54,6$ nm. La muestra más grande corresponde al tratamiento de muestra diluida de 10°C, con un valor de $208,3 \pm 67,2$ nm. Como se observa en la Figura 16, los tamaños en muestras concentradas y diluidas de este ensayo, disminuyen en el rango de 10°C hasta 40°C y aumentan desde 40°C hasta 50°C.

Tabla 4

Tamaño y desviación estándar, medidos en nanómetros, y obtenidos mediante la caracterización por DLS en el Ensayo 1

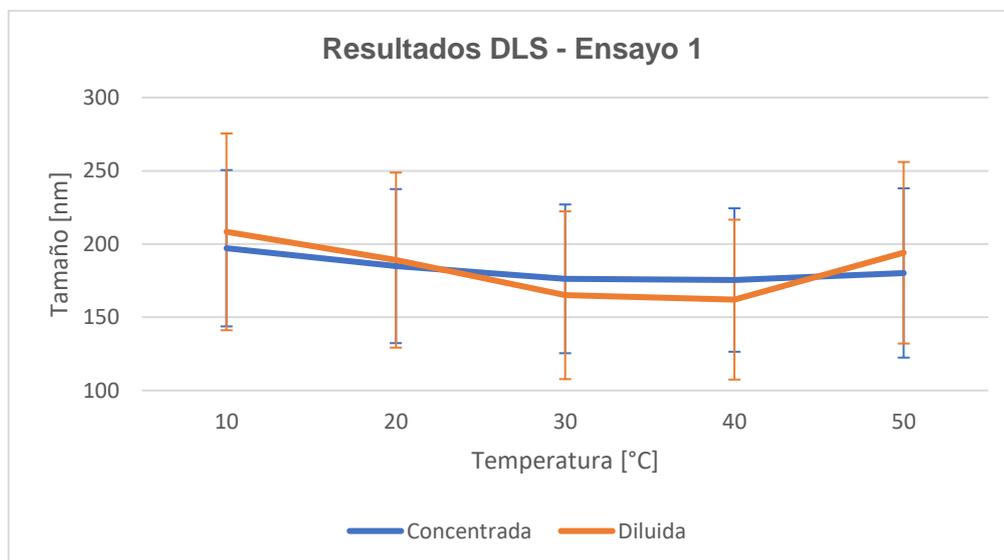
ENSAYO 1		
Temperatura (°C)	MC (nm)	MD (nm)
10	$197,1 \pm 53,4$	$208,3 \pm 67,2$
20	$184,9 \pm 52,6$	$189 \pm 59,8$
30	$176,2 \pm 50,8$	$165 \pm 57,3$
40	$175,4 \pm 49$	$162 \pm 54,6$
50	$180,2 \pm 57,8$	194 ± 62

Nota. MC: muestra concentrada; MD: muestra diluida

En la Figura 16 se observa de forma gráfica los tamaños promedio en cada temperatura para muestras diluidas y concentradas, para el primer ensayo.

Figura 16

Gráfico de líneas de los tamaños promedio y desviación estándar obtenidos en DLS para el ensayo 1



En la Tabla 5 se detallan los tamaños de las nanopartículas y su desviación estándar obtenidas a partir de DLS, para el ensayo 2. En este caso se tienen más datos que el ensayo 1 porque se midieron 3 veces cada muestra correspondiente a cada temperatura (3 muestras por temperatura). Los tamaños de muestras diluidas y concentradas se encuentran en un rango entre 144 a 221 nm, aproximadamente; donde la muestra más pequeña corresponde al tratamiento 30°C, MC, repetición 3, medición 3, con un valor de $144,9 \pm 60,2$ nm. La muestra más grande corresponde al tratamiento 40°C, MC, repetición 1, medición 3, con un valor de $221,7 \pm 61,6$ nm. En la mayoría de casos el tamaño de las nanopartículas concentradas es mayor que el tamaño de las nanopartículas diluidas. En el ensayo 2, el tamaño promedio en las muestras concentradas disminuye cuando varía la temperatura de 10 a 20°C y de 40 a 50°C, en el rango de 20 a 40°C, el tamaño aumenta progresivamente. Las muestras diluidas tienen un comportamiento diferente ya que el tamaño disminuye de 20 a 30°C y de 40 a 50°C, mientras que de 10 a 20°C y de 30 a 40°C, aumenta, esto se puede observar en la Figura 17.

Tabla 5

Tamaño y desviación estándar, medidos en nanómetros, y obtenidos mediante la caracterización por DLS, para el Ensayo 2

ENSAYO 2									
T (°C)	N° de medición	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3		Promedio (nm)	
		MC	MD	MC	MD	MC	MD	MC	MD
10	1	177,6 ± 59,2	159,5 ± 56,3	166,7 ± 54,5	159,4 ± 50,5	192,9 ± 52,4	187,3 ± 49,2	179,1 ± 55,4	168,7 ± 52,0
	2	181,6 ± 54,8	160,7 ± 57,8	162,9 ± 58,1	149,0 ± 53,3	199,4 ± 52,1	185,5 ± 51,0	181,3 ± 55,0	165,1 ± 54,0
	3	158,7 ± 46,1	165,1 ± 51,4	169,5 ± 54,9	146,7 ± 56,6	187,3 ± 54,7	182,0 ± 62,1	171,8 ± 51,9	164,6 ± 56,7
	Promedio (nm)	172,6 ± 53,4	161,8 ± 55,2	166,4 ± 55,8	151,7 ± 53,5	193,2 ± 53,1	184,9 ± 54,1	177,4 ± 54,1	166,1 ± 54,2
20	1	161,9 ± 47,2	179,4 ± 51,2	174,8 ± 51,3	181,2 ± 45,0	189,0 ± 54,6	184,7 ± 59,1	175,2 ± 51,0	181,8 ± 51,8
	2	170,4 ± 55,7	178,1 ± 56,0	175,9 ± 45,0	174,8 ± 42,1	167,9 ± 49,8	178,4 ± 53,8	171,4 ± 50,2	177,1 ± 50,6
	3	171,3 ± 60,7	178,9 ± 52,7	181,6 ± 49,0	171,3 ± 45,5	172,7 ± 53,7	178,4 ± 53,8	175,2 ± 54,5	176,2 ± 50,7
	Promedio (nm)	167,9 ± 54,5	178,8 ± 53,3	177,4 ± 48,4	175,8 ± 44,2	176,5 ± 52,7	180,5 ± 55,6	173,9 ± 51,9	178,4 ± 51,0
30	1	188,2 ± 59,0	169,6 ± 58,4	169,4 ± 45,9	175,2 ± 49,3	181,8 ± 53,1	190,1 ± 54,9	179,8 ± 52,7	178,3 ± 54,2
	2	195,4 ± 51,5	178,4 ± 51,5	175,5 ± 51,2	171,0 ± 51,2	171,6 ± 64,5	189,6 ± 54,4	180,8 ± 55,7	179,7 ± 52,4
	3	185,9 ± 53,6	178,3 ± 51,1	176,4 ± 46,5	179,9 ± 50,5	176,7 ± 62,8	170,5 ± 69,1	179,7 ± 54,3	176,2 ± 56,9
	Promedio (nm)	189,8 ± 54,7	175,4 ± 53,7	173,8 ± 47,9	175,4 ± 50,3	176,7 ± 60,1	183,4 ± 59,5	180,1 ± 54,2	178,1 ± 54,5
40	1	218,1 ± 64,0	212,1 ± 61,0	184,3 ± 50,5	169,4 ± 45,9	187,0 ± 56,1	183,4 ± 53,4	196,5 ± 56,9	188,3 ± 53,4

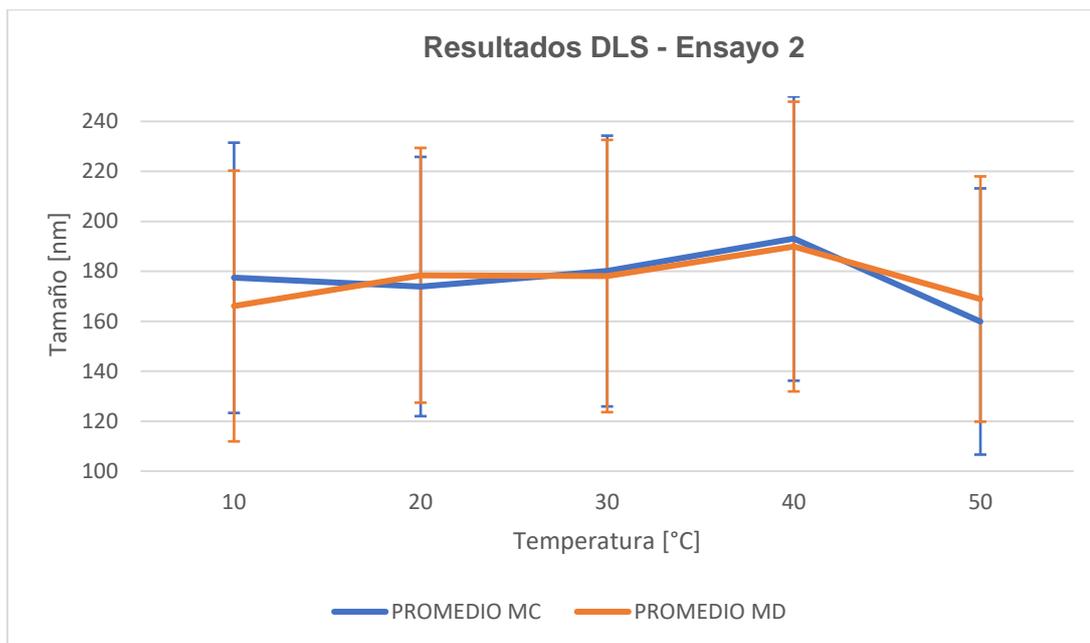
	2	209,0 ± 56,8	219,8 ± 61,5	181,2 ± 51,0	164,0 ± 59,1	186,7 ± 54,2	185,6 ± 56,1	192,3 ± 54,0	189,8 ± 58,9
	3	221,7 ± 61,6	220,9 ± 64,6	159,5 ± 55,2	182,0 ± 52,8	190,3 ± 62,5	171,6 ± 67,4	190,5 ± 59,8	191,5 ± 61,6
	Promedio (nm)	216,3 ± 60,8	217,6 ± 62,4	175,0 ± 52,2	171,8 ± 52,6	188,0 ± 57,6	180,2 ± 59,0	193,1 ± 56,9	189,9 ± 58,0
	1	166,2 ± 56,1	156,3 ± 51,3	172,2 ± 47,0	171,8 ± 47,9	139,3 ± 56,0	177,3 ± 46,3	159,2 ± 53,0	168,5 ± 48,5
	2	168,8 ± 55,0	160,4 ± 52,5	175,0 ± 43,9	171,8 ± 47,3	138,2 ± 58,2	177,5 ± 52,4	160,7 ± 52,4	169,9 ± 50,7
50	3	168,1 ± 52,3	160,6 ± 45,2	166,2 ± 50,7	169,3 ± 48,9	144,9 ± 60,2	175,5 ± 50,5	159,7 ± 54,4	168,5 ± 48,2
	Promedio (nm)	167,7 ± 54,5	159,1 ± 49,7	171,1 ± 47,2	171,0 ± 48,0	140,8 ± 58,1	176,8 ± 49,7	159,9 ± 53,3	168,9 ± 49,1

Nota. MC: muestra concentrada; MD: muestra diluida

En la Figura 17 se observa de forma gráfica los tamaños promedio en cada temperatura para muestras diluidas y concentradas, para el segundo ensayo.

Figura 17

Gráfico de líneas de los tamaños promedio y desviación estándar obtenidos en DLS para el ensayo 2



Nota. MC: muestra concentrada, MD: muestra diluida

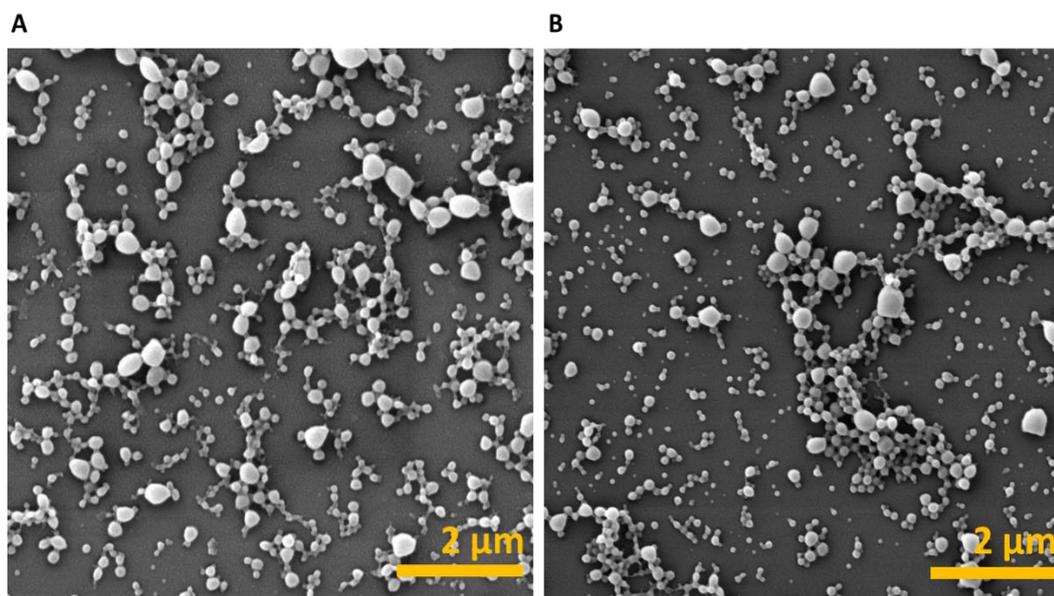
Caracterización de nanopartículas en SEM

Las imágenes obtenidas de SEM en ambos ensayos mostraron nanopartículas de PLGA esféricas, algunas formando aglomerados y otras más separadas. La Figura 18 muestra dos ejemplos de las imágenes analizadas.

Para el ensayo 1 se utilizaron 4 imágenes por temperatura (Anexo 1-5). Para el ensayo 2 se analizaron aproximadamente 5 imágenes por temperatura en cada repetición, es decir, el total de datos analizados en el ensayo 2 fueron extraídos de 75 imágenes obtenidas de SEM (Anexo 6-20).

Figura 18

Nanopartículas sintetizadas A) a 20°C en el ensayo 1 y B) a 40°C, en la segunda repetición del ensayo 2

**Medición de diámetros de nanopartículas obtenidos mediante el software Fiji**

En la Tabla 6 se observan los valores para el diámetro largo, corto y esfericidad obtenidos a partir de las imágenes de SEM para el ensayo 1. A partir de esta tabla y de la Figura 19 se determina que los valores de los diámetros aumentan en el rango de temperatura de 10°C a 20°C y de 40°C a 50°C, y disminuyen en el rango de 20°C a 40°C, siendo este último el que presentó los diámetros más pequeños con valores de 110,147 nm para el diámetro largo y 90,059 nm para el diámetro corto; mientras que el tratamiento de 50°C fue el que presentó los tamaños mayores, con un diámetro largo de 166,291 nm y diámetro corto de 146,302 nm. Por otro lado, la esfericidad varía entre 0,88 y 0,94 (Figura 20).

Tabla 6

Promedio en nanómetros del diámetro largo (DL), diámetro corto (DC) y esfericidad (ESF) de las nanopartículas sintetizadas a diferentes temperaturas en el ensayo 1

ENSAYO 1			
T (°C)	DL (nm)	DC (nm)	ESFERICIDAD
10	138,82 ± 46,7	109,964 ± 32,6	0,897
20	151,229 ± 67,5	121,619 ± 55,2	0,899
30	120,431 ± 48,6	94,011 ± 36,4	0,888
40	110,147 ± 44,6	90,059 ± 36,7	0,907
50	166,291 ± 75,6	146,302 ± 64,9	0,938

Figura 19

Gráfico de líneas de los diámetros promedio y su desviación estándar obtenidos en Fiji de los datos de SEM, ensayo 1

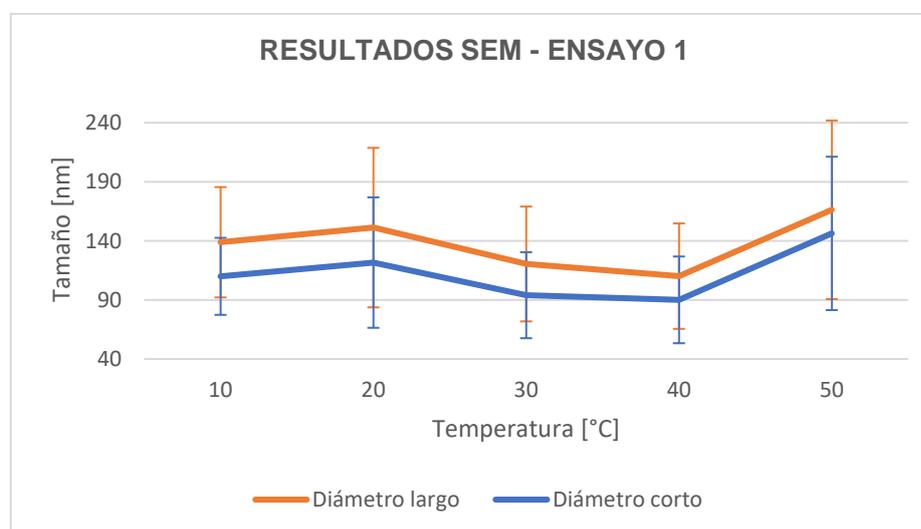
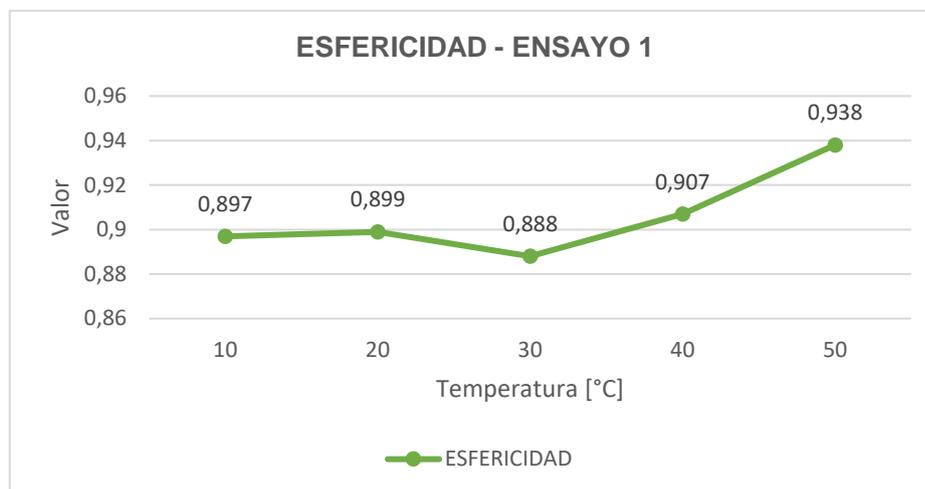


Figura 20

Gráfico de líneas de la esfericidad de las nanopartículas caracterizadas en SEM para el ensayo 1



En la Tabla 7 se presenta el promedio de los diámetros y esfericidad obtenidos para cada tratamiento en el ensayo 2. Se puede ver que los valores de los diámetros varían para cada temperatura y repetición, sin seguir un patrón definido; sin embargo, la esfericidad se mantiene en un rango entre 0,9 y 0,91.

En el ensayo 2, las nanopartículas sintetizadas a 40°C fueron las de mayor tamaño, con un valor promedio para el diámetro largo de 136,87 nm, diámetro corto de 112,31 nm y esfericidad de 0,91. Mientras que las nanopartículas de menor tamaño corresponden a una temperatura de 20°C, registrando un diámetro largo promedio de 119,05 nm; diámetro corto de 95,90 nm y esfericidad de 0,90.

El promedio obtenido de las 3 repeticiones para la variable diámetro, indica que su valor de 10°C a 20°C disminuye, desde los 20°C a los 40°C aumenta, y de 40°C a 50°C vuelve a disminuir. La diferencia en el valor del diámetro, cuando éste disminuye, es de aproximadamente 10 nm.

Tabla 7

Promedio en nanómetros del diámetro largo (DL), diámetro corto (DC) y esfericidad (ESF) de las nanopartículas sintetizadas por triplicado, a diferentes temperaturas en el ensayo 2.

		ENSAYO 2				
		Temperatura (°C)				
Repetición		10	20	30	40	50
1	DL (nm)	119,28 ± 43,5	117,51 ± 38	124,91 ± 45,4	164,59 ± 73,4	102,99 ± 43,1
	DC (nm)	96,05 ± 35,4	91,95 ± 29	101,74 ± 39	132,98 ± 63,6	80,17 ± 34,8
	ESF (nm)	0,899	0,887	0,901	0,896	0,882
2	DL (nm)	125,20 ± 45,7	114,78 ± 35,4	121,90 ± 43,4	123,68 ± 43,4	126,70 ± 50,3
	DC (nm)	102,94 ± 38,1	93,04 ± 30,4	99,91 ± 37,3	102,77 ± 37,3	105,67 ± 42,5
	ESF (nm)	0,908	0,899	0,905	0,913	0,914
3	DL (nm)	143,83 ± 48,5	124,87 ± 40	130,61 ± 47,4	122,33 ± 45,7	150,09 ± 59,6
	DC (nm)	115,99 ± 39,7	102,72 ± 34,6	109,48 ± 41,9	101,19 ± 38,7	125,13 ± 51,1
	ESF (nm)	0,900	0,907	0,915	0,910	0,913
Promedio (nm)	DL	129,44 ± 45,9	119,05 ± 37,8	125,81 ± 45,4	136,87 ± 54,2	126,59 ± 51
	DC	104,99 ± 37,7	95,90 ± 94	103,71 ± 39,4	112,31 ± 46,4	103,66 ± 128,4
	ESF	0,902	0,897	0,907	0,906	0,903

En la Figura 21 y Figura 22 se resume de forma gráfica el comportamiento de los diámetros largo y corto, y de la esfericidad; respectivamente, a lo largo de todas las temperaturas evaluadas, para el ensayo 2.

Figura 21

Gráfico de líneas de los diámetros promedio y su desviación estándar obtenidos en Fiji de los datos de SEM, ensayo 2

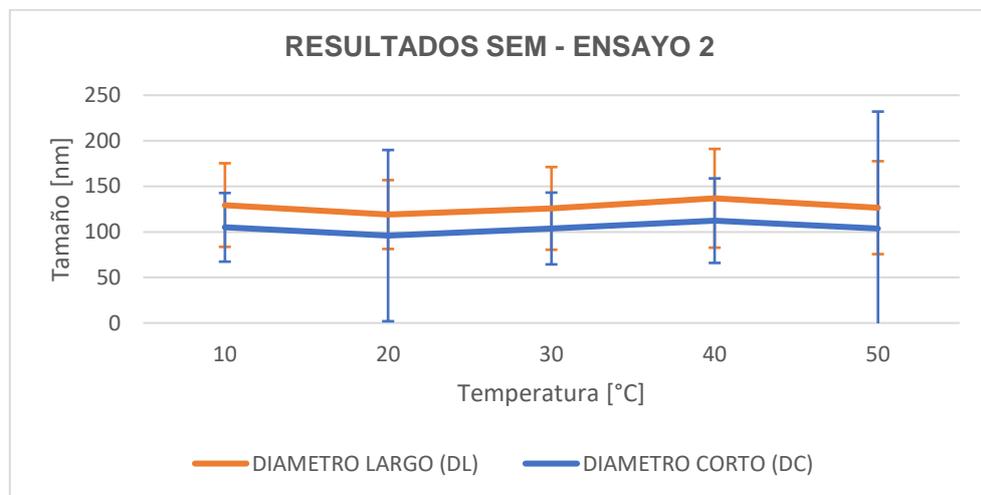
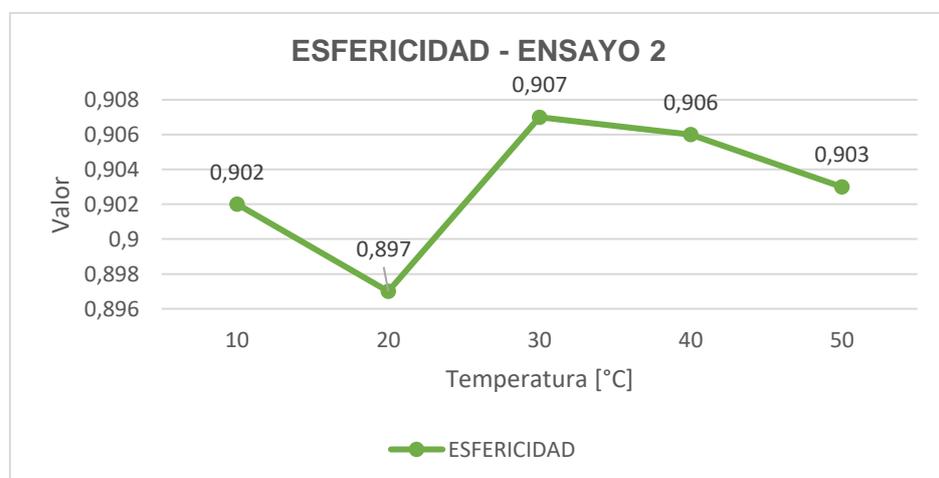


Figura 22

Gráfico de líneas de la esfericidad de las nanopartículas caracterizadas en SEM para el ensayo 2

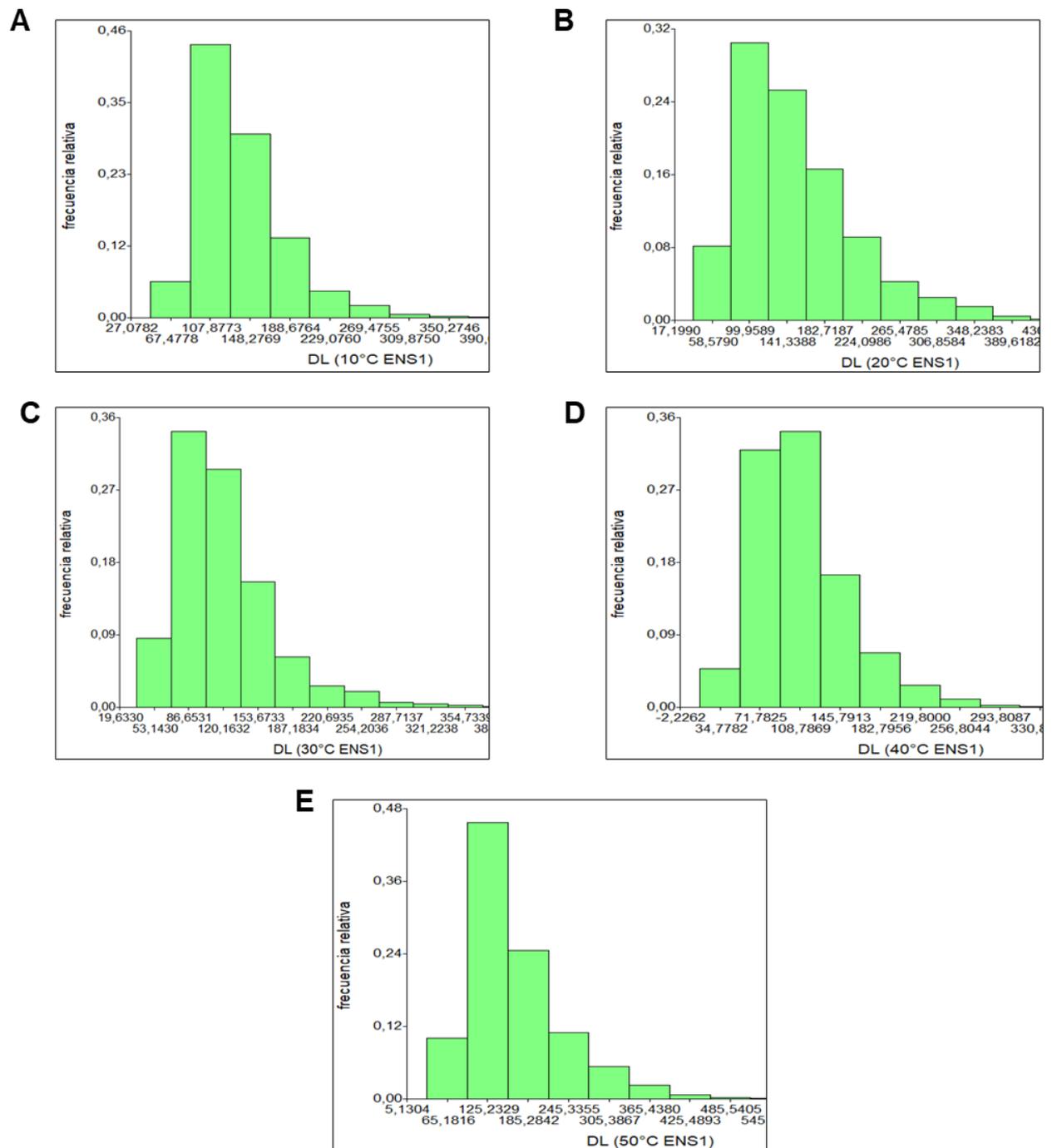


En ambos ensayos se analizó el coeficiente de asimetría y curtosis para los diámetros largo y corto, y para la esfericidad, en cada tratamiento, como se observan en los Anexos 34, 35 y 36, para el ensayo 1; y Anexo 37, 38 y 39, para el ensayo 2. Los valores del coeficiente de asimetría fueron positivos para los diámetros largo y corto de todos los tratamientos en ambos ensayos, lo que significa que la distribución para estas dos variables está sesgada a la izquierda. Por otro lado, el valor del coeficiente de asimetría para el caso de la esfericidad tuvo un valor negativo en ambos ensayos, por lo que los datos correspondientes a esta variable estuvieron sesgados hacia la derecha. Esto se pudo comprobar mediante histogramas realizados para cada tratamiento, por ejemplo, como se observa en las Figuras 23 y 24, el histograma para el diámetro largo en el ensayo 1 y 2, respectivamente; siguen una distribución alineada a la izquierda. Los histogramas que indican la distribución del diámetro corto y la esfericidad para el ensayo 1 se encuentran en el Anexo 40 y 41; y para el ensayo 2 en el Anexo 42 y 43.

Los valores de curtosis fueron positivos para los datos del diámetro largo y corto de todos los tratamientos, para los dos ensayos; esto quiere decir que obedecen a una distribución leptocúrtica. Sin embargo, para el caso de la esfericidad en el ensayo 1, el coeficiente de curtosis fue positivo en los tratamientos de 10°C, 20°C y 30°C; pero fue negativo en los tratamientos de 40°C y 50°C y, por lo tanto, los datos siguieron una distribución platicúrtica. Para el ensayo 2, la curtosis en los datos de esfericidad fueron todos negativos, por lo que la forma de la curva de distribución fue platicúrtica. Esta información se pudo comprobar también con los histogramas.

Figura 23

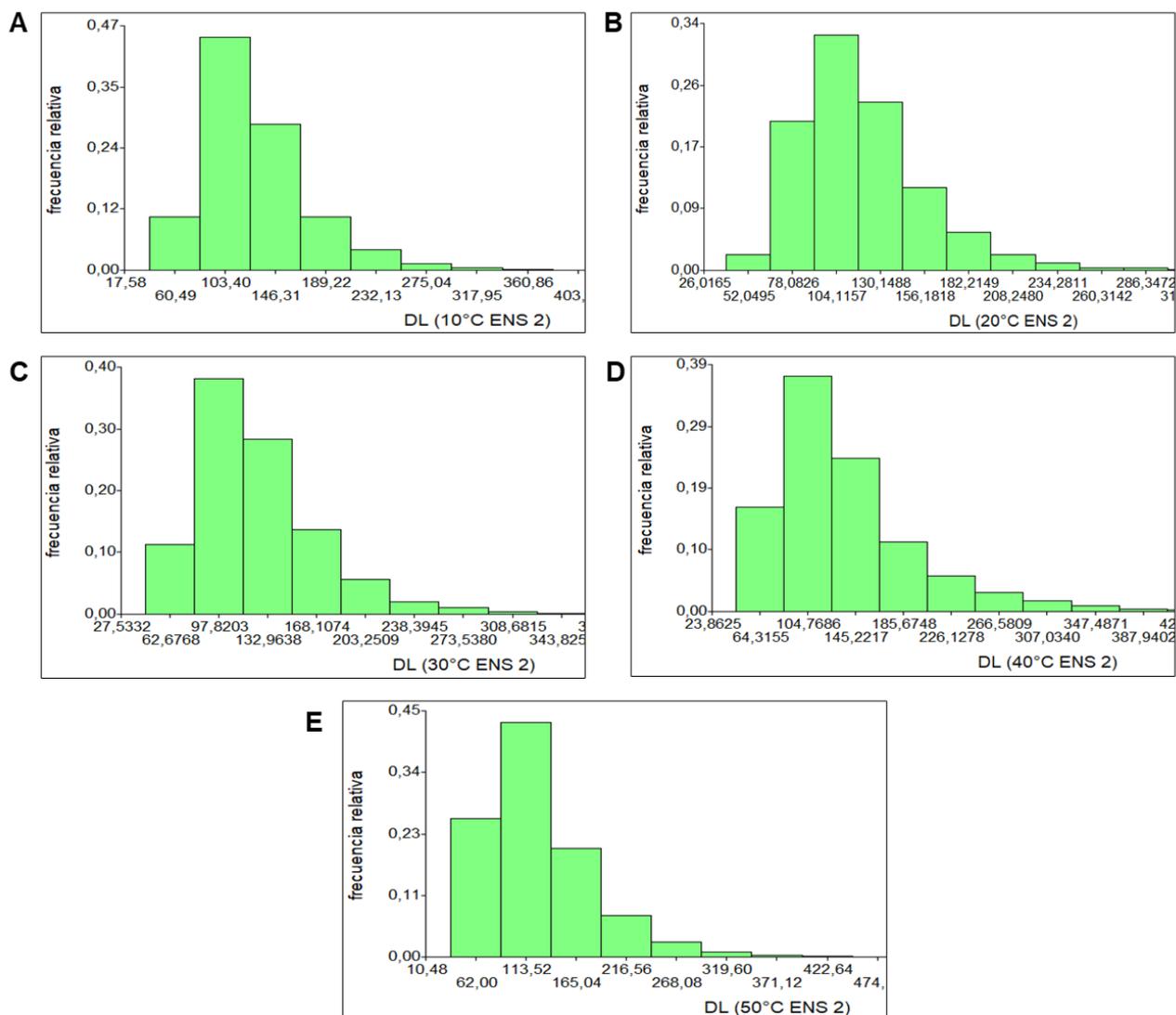
Histogramas de los datos del diámetro largo obtenidos en SEM para A) 10 °C, B) 20 °C, C) 30 °C, D) 40 °C y E) 50 °C en el ensayo 1.



Nota. DL: diámetro largo

Figura 24

Histogramas de los datos del diámetro largo obtenidos en SEM para A) 10 °C, B) 20 °C, C) 30 °C, D) 40 °C y E) 50 °C, en el ensayo 2.



Nota. DL: diámetro largo

Análisis estadístico

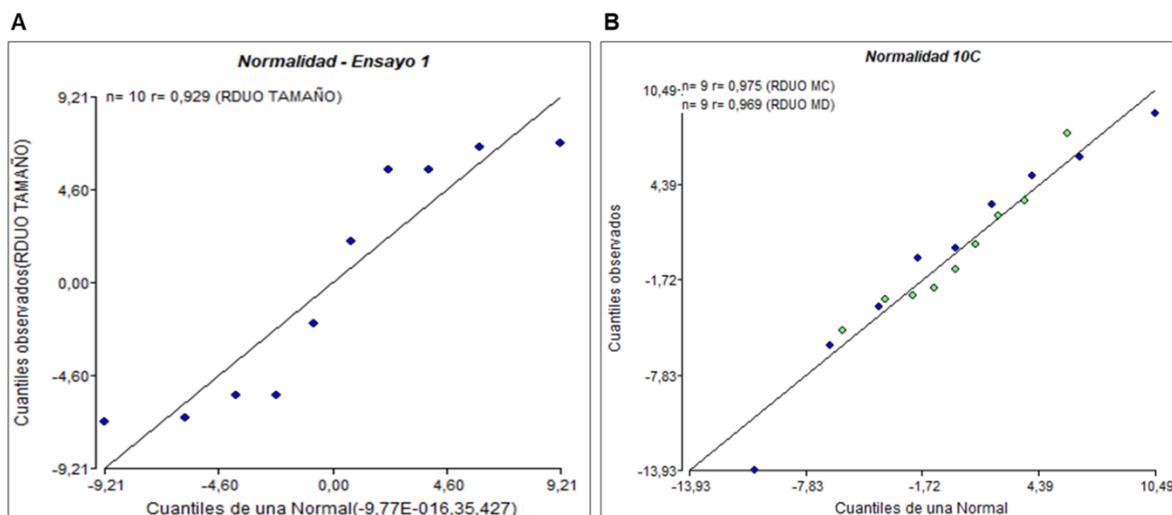
Análisis estadístico de los tamaños obtenidos por DLS

Supuesto de normalidad. Para analizar este supuesto se utilizaron dos métodos: uno gráfico conocido como Q-Q plot y el método analítico de Shapiro-Wilks modificado. Según Q-Q plot, los datos del tamaño de las nanopartículas siguen una

distribución normal ya que se ajustan a la recta de 45° para el ensayo 1 (Figura 25A) y para el ensayo 2 (Figura 25B y Anexo 21).

Figura 25

Q-Q plot obtenido para tamaño de las nanopartículas en A) ensayo 1 y B) ensayo 2, tratamiento de 10°C.



Nota. En el gráfico B, MC: muestra concentrada (puntos azules), MD: muestra diluida (puntos verdes), RDUO: residuos.

Para comprobar los resultados que arrojó el Q-Q plot se realizó la prueba de Shapiro-Wilks modificado para cada tratamiento, utilizando un nivel de confianza del 95%. Las hipótesis que se sometieron a prueba fueron: H_0 : las observaciones tienen distribución normal versus H_1 : las observaciones no tienen distribución normal (Bee Wah & Mohd Razali, 2011). Para el ensayo 1, el valor p obtenido de esta prueba fue de 0,8850; y para el ensayo 2 se obtuvieron valores p mayores al nivel de confianza (0,05) en muestras diluidas y concentradas, en las temperaturas de 10, 20, 30 y 40°C; lo que significa que se acepta la hipótesis nula de que las observaciones siguen una distribución normal. Sin embargo, se tuvo un caso particular en el ensayo 2 con el tratamiento de 50°C, ya que los valores p indicaron que los datos de las

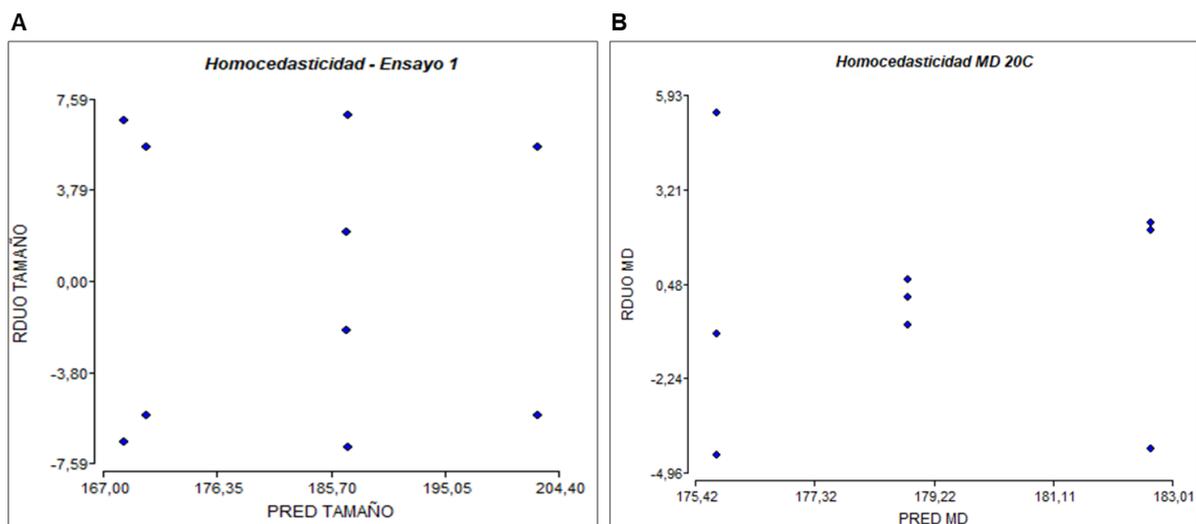
muestras diluidas siguen una distribución normal, pero los de las muestras concentradas no.

Este hecho demuestra la importancia de los métodos analíticos para el análisis del supuesto de normalidad, ya que, en este caso, el Q-Q plot para el tratamiento de 50°C en el ensayo 2 indicaba que los datos siguen una distribución normal, pero fue corregido con el método analítico de Shapiro-Wilks modificado.

Supuesto de homocedasticidad. Todos los datos analizados, tanto para el ensayo 1 como para el ensayo 2, fueron homocedásticos, es decir, sus varianzas eran iguales. Esto se puede observar en la Figura 26, donde los puntos siguen un patrón o estructura definido, lo que indica homocedasticidad en los datos (Balzarini et al., 2008). Los gráficos de homocedasticidad restantes para el ensayo 2 se encuentran en el Anexo 22 y 23.

Figura 26

Gráfica de dispersión que indica la homocedasticidad de los datos en A) ensayo 1 y B) ensayo 2, tratamiento de 20°C de la muestra diluida



Nota. RDUO: residuos, PRED: predichos, MD: muestra diluida

A continuación, se presenta un resumen del cumplimiento de supuestos para los datos de DLS en ambos ensayos:

Tabla 8

Cumplimiento de supuestos para los datos de DLS en el ensayo 1 y 2

ENSAYO 1 Y ENSAYO 2	
Normalidad	Homocedasticidad
Prueba utilizada	
Q-Q plot	Método gráfico de Predichos VS
Shapiro-Wilks modificado	Residuos
Cumplimiento de supuestos	
Cumple para todos los datos en ensayo 1 y en ensayo 2 cumple para todos excepto para MD (50°C)	Cumple para todos los datos

Nota. MD: muestra diluida

Análisis de varianza. El método que se utilizó en este caso para analizar la varianza es el ANOVA, que es una prueba que se aplica cuando se quiere comparar más de dos grupos independientes cuyos datos cumplen los supuestos de normalidad y homocedasticidad (Mishra et al., 2019). En este caso, para ambos ensayos, los datos obtenidos en DLS cumplieron ambos supuestos. Utilizando un nivel de confianza del 95%, se evaluaron las siguientes hipótesis:

H_0 : las medias de las poblaciones son iguales vs

H_1 : al menos una de las medias es diferente.

Para el ensayo 1, se realizó un ANOVA para conocer la influencia de la temperatura en la variable de estudio (tamaño de NPs). Para el ensayo 2 se realizaron dos ANOVAs, uno para conocer la influencia de las repeticiones en el tamaño de las NPs, y el otro para conocer la influencia de la temperatura sobre la misma variable. El valor p obtenido para el ANOVA del ensayo 1 fue de 0,0366 y los

valores p obtenidos en ambos ANOVAs del ensayo 2 se detallan en las Tabla 9 y Tabla 10. Los valores p menores a 0,05 indican que se rechaza la hipótesis nula, es decir, las medias son diferentes significativamente. En función de esta premisa, se determina que la temperatura influye en el tamaño de las NPs para el ensayo 1, y para el ensayo 2 se determina que la variable repeticiones influye en los tamaños obtenidos a 10°C y 40°C en muestras diluidas y concentradas, y a 30°C en muestras concentradas.

En los tratamientos restantes, la variación del tamaño no se debe necesariamente a las repeticiones, sino que puede tener otro factor que esté provocando esta diferencia; como por ejemplo la naturaleza del PLGA utilizado (proporción 50:50 de sus monómeros constitucionales) que implica que el polímero se hidrolice mucho más rápido en comparación con uno que contenga cantidades más altas de cualquiera de los dos monómeros (Locatelli & Comes Franchini, 2012), provocando que la muestra diluida presente tamaños menores a los de la muestra concentrada.

Tabla 9

Valores p obtenidos del ANOVA entre repeticiones para cada temperatura, en el ensayo 2.

ENSAYO 2				
	10 °C	20 °C	30 °C	40 °C
MC	0,0157	0,1662	0,0119	0,0032
MD	0,0003	0,1428	0,3838	0,0006

Nota. MC: muestra concentrada; MD: muestra diluida

En la Tabla 10 se detallan los valores p obtenidos del ANOVA realizado para conocer la influencia de la temperatura en el tamaño de las nanopartículas, por repetición. Los valores p menores a 0,05 corresponden a las muestras concentradas

de la repetición 1 y 3 y a las muestras diluidas de la repetición 1 y 2. Esto quiere decir que, en estos tratamientos, la temperatura influye sobre el tamaño de las NPs, mientras que en los demás no.

Tabla 10

Valores p obtenidos del ANOVA entre temperaturas por cada repetición, en el ensayo 2.

ENSAYO 2			
	REP 1	REP 2	REP 3
MC	<0,0001	0,4049	<0,0001
MD	<0,0001	0,0031	0,5793

A partir de estos resultados, se realizó la comparación de a pares para identificar las poblaciones con diferencias significativas: aquellas con una letra en común no difieren de forma significativa, pero los que tienen letras diferentes, sí. En las Tablas Tabla 11, Tabla 12 y Tabla 13, se detalla esta información para los ensayos 1 y 2.

De la Tabla 11 se puede decir que los tratamientos de 30°C y 40°C difieren significativamente con el tratamiento de 10°C, porque pertenecen a grupos diferentes, en otras palabras, la temperatura es la causante de la diferencia de tamaños observada en estos tratamientos.

Tabla 11

Comparación de a pares entre temperaturas del ensayo 1

COMPARACIÓN DE A PARES ENTRE REPETICIONES – ENSAYO 1					
T (°C)	10	20	30	40	50
GRUPOS	B	A-B	A	A	A-B

Nota. Los grupos con una letra en común no difieren significativamente en las variables analizadas (tamaño de NP)

Como se puede observar en la Tabla 12 (ensayo 2), aquellos tratamientos que presentaron valores p mayores al nivel de significancia (0,05) (Tabla 9), tienen la misma letra, es decir, los tratamientos no difieren de forma significativa, y, por lo tanto, en ellos, la variación del tamaño no se debe a las repeticiones. Un ejemplo de este caso es en el tratamiento a 20°C – MC. Por otro lado, en el tratamiento a 30°C de muestras diluidas, se puede ver que las repeticiones 2 y 3 no difieren de forma significativa entre ellas porque comparten la misma letra, pero sí difieren con la repetición 1.

Tabla 12

Comparación de a pares entre las repeticiones para cada temperatura, en el ensayo

2

COMPARACIÓN DE A PARES ENTRE REPETICIONES – ENSAYO 2			
T (°C)	REP	MC	MD
10	1	A	B
	2	A	A
	3	B	C
20	1	A	A
	2	A	A
	3	A	A
30	1	B	A
	2	A	A
	3	A	A
40	1	B	B
	2	A	A
	3	A	A

Nota. Los grupos con una letra en común no difieren significativamente en las variables analizadas (MC y MD). MC: muestra concentrada. MD: muestra diluida

En la siguiente tabla se observa la comparación de a pares para el ensayo 2, pero en este caso, entre temperaturas, para cada repetición:

Tabla 13

Comparación de a pares entre las temperaturas para cada repetición, en el ensayo 2

COMPARACIÓN DE A PARES ENTRE TEMPERATURAS – ENSAYO 2			
REP	T (°C)	MC	MD
1	10	A	A
	20	A	B
	30	B	B
	40	C	C
2	10	A	A
	20	A	B
	30	A	B
	40	A	B
3	10	B	A
	20	A-B	A
	30	A-B	A
	40	A	A

Nota. Los grupos con una letra en común no difieren significativamente en las variables analizadas (MC y MD). MC: muestra concentrada. MD: muestra diluida

Por otro lado, se analizó la diferencia entre muestras concentradas y diluidas a través de la prueba t de Student, para ambos ensayos. Ésta prueba exige que se cumplan los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos y es utilizada cuando se quiere comparar dos grupos (Mishra et al., 2019). Utilizando un nivel de confianza del 95%, se evaluaron las siguientes hipótesis:

H_0 : las medias de los dos grupos son estadísticamente iguales vs

H_1 : las medias de los dos grupos son estadísticamente diferentes entre sí

El valor p obtenido en esta prueba para el ensayo 1 fue de 0,9282 y para el ensayo 2 fue de 0,8725; ambos son mayores al valor p del nivel de confianza utilizado (0,05); entonces se acepta la hipótesis nula, es decir, la media de los datos de la muestra concentrada es estadísticamente igual a la media de los datos de la muestra diluida, en ambos ensayos. Es decir, que la dilución de la muestra no afecta en gran medida al tamaño de las NPs medido por DLS. Esto se puede corroborar con la Figura 16 y Figura 17, para el ensayo 1 y 2, respectivamente. En estas figuras se observa que las curvas de la muestra concentrada y la muestra diluida presentan un comportamiento muy similar a lo largo del rango de temperaturas.

A continuación, se presenta un resumen del ANOVA y la prueba t de Student para los datos de DLS:

Tabla 14

Resultados del ANOVA y la prueba t de Student para los datos de DLS

	Influencia repeticiones en el tamaño (ensayo 2)	Influencia temperatura en el tamaño (ensayos 1 y 2)	Comparación MC vs MD (ensayo 1 y 2)
Prueba utilizada	ANOVA	ANOVA	T de Student
Resultados	Influye en MD (10 °C y 40 °C) y MC (30 °C)	Para ambos ensayos, influye en todos los tratamientos	Igualdad en las medias de ambos grupos

Nota. MC: muestra concentrada; MD: muestra diluida

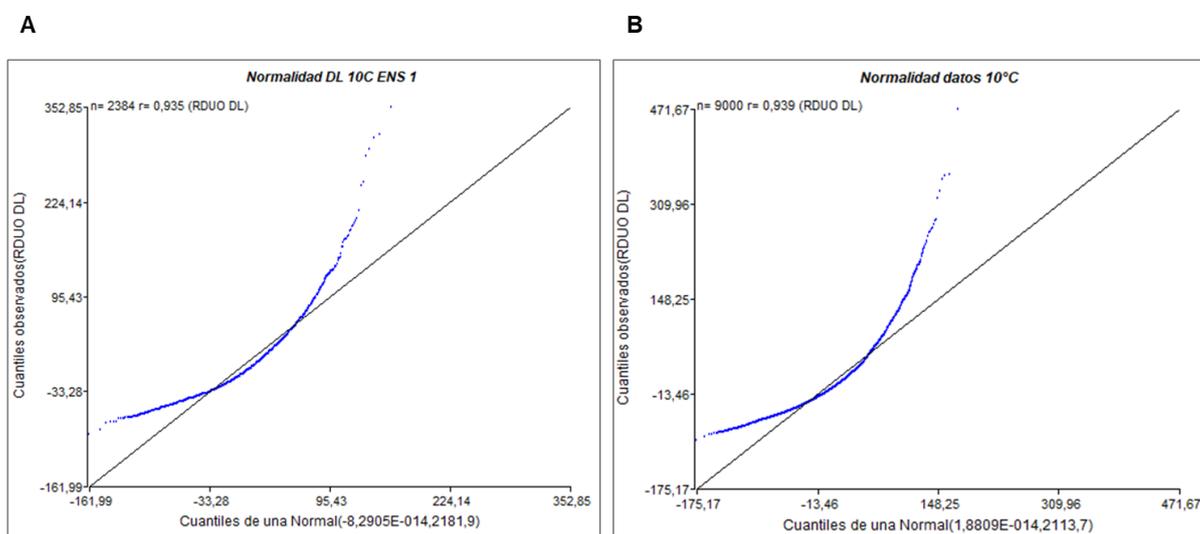
Análisis estadístico de las mediciones obtenidas mediante Fiji a partir de las imágenes de SEM

Supuesto de normalidad. Al igual que con los datos de DLS, se comprobó el supuesto de normalidad mediante dos pruebas: Q-Q plot y el método analítico de Shapiro-Wilks modificado. Según el método de Q-Q plot, los valores de diámetro largo, corto y esfericidad no cumplieron con el supuesto de normalidad para el

ensayo 1 y 2 (Balzarini et al., 2008), ya que estos no se ajustaron a la recta de 45°. La Figura 27 corresponde al gráfico de Q-Q plot para el análisis de la normalidad de los datos del diámetro largo, para la muestra de 10 °C en ambos ensayos. Este comportamiento se repite para los valores de diámetro largo, diámetro corto y esfericidad en todas las temperaturas, en los ensayos 1 y 2 (Anexo 24-33).

Figura 27

Q-Q plot obtenido para el diámetro largo de las nanopartículas sintetizadas a 10°C en el A) ensayo 1 y B) ensayo 2



Nota. DL: diámetro largo, RDUO: residuos.

Para comprobar los resultados arrojados por el método gráfico, se realizó la prueba de Shapiro-Wilks modificado, utilizando un nivel de confianza del 95%. Las hipótesis que se sometieron a prueba fueron: H_0 : las observaciones tienen distribución normal versus H_1 : las observaciones no tienen distribución normal (Balzarini et al., 2008).

En todos los casos analizados (para los ensayos 1 y 2) las observaciones no siguen una distribución normal porque el valor p obtenido ($< 0,0001$) fue menor al nivel de confianza (0,05). De esta manera se comprobó por el método gráfico de Q-

Q plot y la prueba de Shapiro-Wilks modificado, que los datos analizados para cada temperatura en ambos ensayos, no siguen una distribución normal.

Análisis de varianza no paramétrico. Sabiendo que los datos no se ajustaron a una distribución normal, se comprobó otros 3 supuestos que deben cumplirse para utilizar la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Estos supuestos son: datos obtenidos al azar de las poblaciones, observaciones independientes y distribuciones similares (A. Horst & Bradley, 2014). Para el caso de los dos ensayos, el primer supuesto está comprobado ya que las micrografías obtenidas de SEM fueron capturadas de sitios aleatorios de la muestra. El segundo supuesto se cumple ya que los valores de una muestra no afectan los valores de la otra, es decir, son muestras independientes (M. Xu et al., 2017).

Finalmente, el supuesto de distribuciones similares se cumple para cada variable, y se lo puede comprobar con el coeficiente de asimetría calculado para cada tratamiento (Anexo 34-39) y los histogramas generados (Figura 23, Figura 24, Anexo 40-43).

Con los supuestos comprobados, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para el análisis de varianza, con un nivel de confianza del 95%. Las hipótesis que se sometieron a prueba fueron: H_0 : las medias de todas las poblaciones son idénticas versus H_1 : algunas de las poblaciones presentan promedios mayores que otras (Balzarini et al., 2008).

En todos los casos, la prueba de Kruskal Wallis dio valores p menores a 0,0001; rechazando la hipótesis nula e indicando que algunas de las poblaciones tienen sus diámetros promedio y esfericidad promedio, mayores que otras poblaciones. Es decir, para el ensayo 1, la temperatura influye en el tamaño de las NPs; y para el ensayo 2, la repetición y la temperatura influyen en la medida del diámetro de las nanopartículas. A continuación, se presenta un resumen del análisis

estadístico realizado hasta el momento, de los datos obtenidos de SEM para ambos ensayos.

Tabla 15

Análisis estadístico de los datos obtenidos de SEM para el ensayo 1 y 2

ENSAYO 1 Y ENSAYO 2		
	Prueba utilizada	Resultados
Normalidad	Q-Q plot Shapiro-Wilks modificado	Los datos no cumplen el supuesto de normalidad
Influencia de la temperatura (ensayo 1 y 2) y de las repeticiones (ensayo 2) en el tamaño de las NPs	Kruskal Wallis	Influyen en todos los tratamientos

Con este resultado se procedió hacer la comparación de a pares entre tratamientos, para identificar las poblaciones con diferencias significativas. Como se observa en la Tabla 16 para el diámetro largo y corto del ensayo 1, todas las temperaturas pertenecen a grupos diferentes, es decir, difieren significativamente. Por otro lado, para la esfericidad, todas difieren significativamente a excepción de las temperaturas de 10°C y 20°C, que pertenecen al mismo grupo.

Tabla 16

Comparación de a pares entre las repeticiones de cada temperatura para el ensayo

1

ENSAYO 1					
	Temperatura (°C)				
	10	20	30	40	50
DL (nm)	C	D	B	A	E
DC (nm)	C	D	B	A	E

ESF	B	B	A	C	D
------------	----------	----------	----------	----------	----------

Nota. Los grupos con una letra en común no difieren significativamente en las variables analizadas (DL, DC, ESF)

Para el ensayo 2, la comparación de a pares está resumida en las Tabla 17 y Tabla 18. En la Tabla 17 se observa que las variables de interés (DL, DC y esfericidad) difieren significativamente en las repeticiones 1 y 3 de todas las temperaturas, a excepción de la esfericidad para la temperatura de 10°C, en donde el valor en la repetición 1 y 3, pertenecen al mismo grupo.

En algunos casos, los diámetros obtenidos en cada repetición varían significativamente, por ejemplo, en la temperatura de 10°C y 50°C. Mientras que a 40°C los diámetros calculados en la segunda y tercera repetición pertenecen al mismo grupo y, por lo tanto, no varían significativamente. Para el caso de la esfericidad, todos los datos son diferentes significativamente en cada repetición, a excepción de las temperaturas de 10°C y 50°C.

La Tabla 18 muestra la comparación de a pares entre temperaturas en cada repetición. Se puede observar que en la mayoría de casos los valores de diámetros y esfericidad en cada tratamiento tienen diferencias significativas, porque han sido clasificados en grupos diferentes. Entre los casos que son una excepción a este comportamiento está la temperatura de 10°C, que fue la que presentó menos diferencias significativas con otras temperaturas en cada repetición.

A partir de la comparación de a pares entre los distintos tratamientos, se determina que las diferencias en los diámetros y la esfericidad entre muestras, se debe a la influencia de la temperatura (factor ambiental) y las repeticiones que se realizaron durante el ensayo. Este último factor implica un error sistemático que se produce por la inexactitud reproducible introducida por un equipo, calibración, o técnica defectuosos (Barlow, 2002).

Tabla 17

Comparación de a pares entre las repeticiones de cada temperatura para el ensayo

2

COMPARACIÓN DE A PARES ENTRE REPETICIONES – ENSAYO 2				
T (°C)	REP	DL	DC	ESFERICIDAD
10	1	A	A	A
	2	B	B	B
	3	C	C	A
20	1	B	A	A
	2	A	A	B
	3	C	B	C
30	1	B	A	A
	2	A	A	B
	3	C	B	C
40	1	B	B	A
	2	A	A	B
	3	A	A	C
50	1	A	B	A
	2	B	B	B
	3	C	B	B

Nota. Los grupos con una letra en común no difieren significativamente en las variables analizadas (DL, DC, ESF)

Tabla 18

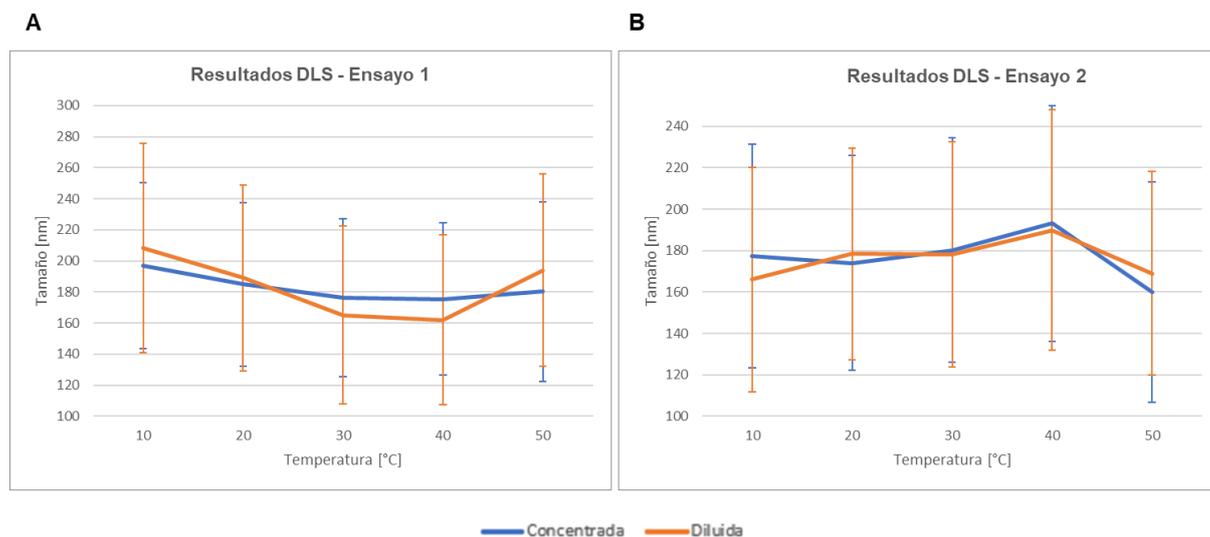
Comparación de a pares entre las temperaturas en cada repetición, para el ensayo 2

COMPARACIÓN DE A PARES ENTRE TEMPERATURAS – ENSAYO 2				
REP	T (°C)	DL	DC	ESFERICIDAD
1	10	B	C	C-D
	20	B	B	B
	30	C	D	D
	40	D	E	C
	50	A	A	A
2	10	D	C	C
	20	A	A	A
	30	C	B	B
	40	B	B	D
	50	C-D	C	D
3	10	D	D	A
	20	B	B	B
	30	C	C	D
	40	A	A	C
	50	D	E	D

Comparación Ensayo 1 y Ensayo 2. Los resultados obtenidos a partir del DLS se pueden observar en la Figura 28. A pesar de que el análisis estadístico indica que existe la influencia de la temperatura en el tamaño de las NPs, para ambos ensayos, el gráfico demuestra una tendencia diferente para los dos, de la variable de interés, a lo largo del rango de temperaturas, siendo este más variable para el ensayo 2 que para el ensayo 1.

Figura 28

Resultados obtenidos para el tamaño de las NPs obtenidos de DLS en A) ensayo 1 y B) ensayo 2

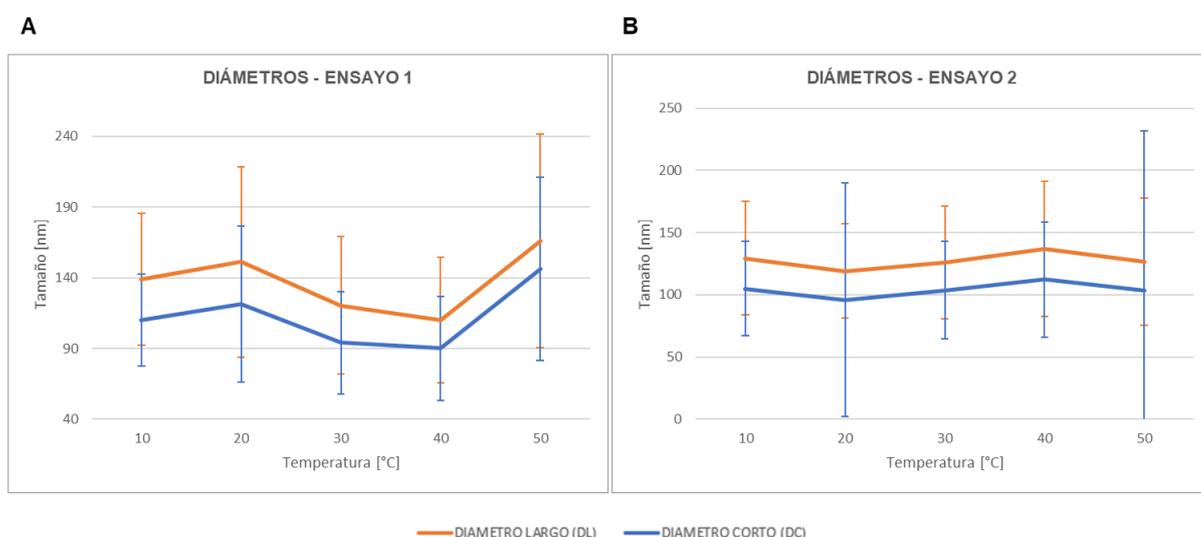


Uno de los aportes más significativos del presente estudio es la cantidad de datos medidos en el software Fiji a partir de las imágenes de SEM para el análisis del tamaño de las NPs. En el ensayo 1, se utilizó la misma técnica de síntesis, pero se midieron de 2000-4000 NPs para cada temperatura (10, 20, 30, 40 y 50°C) mientras que en el ensayo 2, el número de mediciones fue de 9000 NPs para cada temperatura, existiendo una diferencia de aproximadamente 5000 datos, por temperatura, entre ambos estudios.

Como se puede observar en la Figura 29, la variación en el tamaño de las NPs para ambos ensayos difiere en todo el rango de temperaturas analizado: en la imagen de la izquierda se observa un aumento del tamaño de los diámetros desde 10°C hasta 20°C, y desde 40°C a 50°C, y una disminución desde 20°C hasta 40°C. Por otro lado, en la figura de la derecha sucede lo contrario, hay una disminución del tamaño de los diámetros desde 10°C hasta 20°C, y desde 40°C a 50°C, y un aumento desde 20°C hasta 40°C.

Figura 29

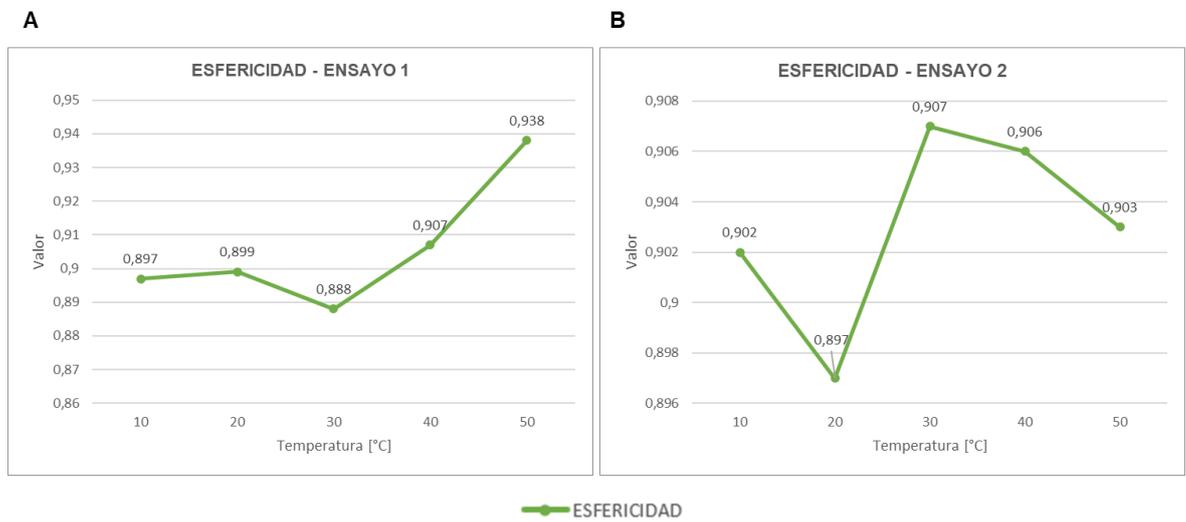
Resultados obtenidos para el diámetro de las NPs medidos a partir de las imágenes de SEM, en A) ensayo 1 y B) ensayo 2



Para el caso de la esfericidad se observa en la Figura 30 que, para el estudio donde se utilizó menos datos (ensayo 1), esta variable fluctúa entre 0,88 y 0,94; mientras que para el ensayo 2 la variación se encuentra en un rango menor, entre 0,89 y 0,91. Estos resultados demuestran la importancia de trabajar con la mayor cantidad de datos posible, ya que la diferencia que se genera por la cantidad de datos utilizados, puede ser significativa y por lo tanto, afectar a la interpretación de los resultados y futuras conclusiones de la investigación.

Figura 30

Resultados obtenidos para la esfericidad de las NPs, en A) ensayo 1 y B) ensayo 2



Capítulo V: Discusión

Para la discusión de este trabajo se tomará en cuenta únicamente los datos obtenidos del ensayo 2, ya que sus resultados son más representativos por la cantidad de datos manejados en el mismo, comparado con el ensayo 1. Los resultados del ensayo 1 serán comparados posteriormente, en esta discusión, con los del ensayo 2, para entender la importancia del número de datos en una investigación.

A partir de las imágenes de SEM, se determinó que las nanopartículas de PLGA fueron esféricas en todos los tratamientos, sin embargo, al analizar el valor de la esfericidad obtenida a partir de los diámetros medidos con el software Fiji, se pudo ver que todas tomaron valores menores a 1. A este tipo de partículas se las conoce como no esféricas (D. Wang & Fan, 2013), ya que solo aquellas cuya esfericidad es igual a 1, son consideradas nanopartículas perfectamente esféricas (Bagheri & Bonadonna, 2016).

Sin embargo, cabe destacar que la forma de las nanopartículas fue la misma en todos los tratamientos, es decir, todas tuvieron una forma parecida a una esfera, lo cual indica que la temperatura no tuvo ninguna influencia sobre esta característica. Esto pudo deberse al método de síntesis utilizado ya que en varios estudios han sintetizado nanopartículas de PLGA por el método de nanoprecipitación y han obtenido nanopartículas esféricas (Niu et al., 2009) (H. Xie & Smith, 2010). Además, solo utilizando métodos diferentes a la nanoprecipitación se pueden obtener nanopartículas de PLGA de diferentes formas: alargadas o en forma de aguja a partir del método de estiramiento de nanopartículas esféricas (B. Zhang et al., 2017), discos, elipsoides y varillas obtenidos variando los parámetros en un sistemas de microfluidos (S. Xu et al., 2005) (Cao et al., 2019), y en general, partículas con formas diferentes a una esfera, a través de métodos como litografía

(Glangchai et al., 2008), plantillas no humectantes (PRINT) (DeSimone, 2016) (Enlow et al., 2012), entre otros (Haryadi et al., 2019).

El control sobre el tamaño de las nanopartículas sintetizadas por el método de nanoprecipitación se logra variando algunos parámetros como la concentración del polímero, el solvente usado en agua (Cheng et al., 2007), la temperatura, el caudal de inyección, velocidad de agitación y el calibre de la aguja para inyección. Estos parámetros, dependiendo del caso, pueden provocar un aumento o disminución en el tamaño de las NPs (Wei Huang & Chenming Zhang, 2018).

Para el caso de la temperatura, existe un estudio realizado por Wei Huang & Chenming Zhang (2018) en el que sintetizaron nanopartículas de PLGA por nanoprecipitación y detectaron una disminución aproximada de 10 nm en el tamaño de la nanopartícula con cada aumento de 10 grados de temperatura. Este comportamiento se pudo evidenciar en el presente trabajo, para los datos obtenidos de SEM, cuando se aumentó la temperatura desde 10°C a 20°C y desde 40°C a 50°C, consiguiendo una disminución en el diámetro largo de 129,44 a 119,05 nm, y de 136,87 a 126,59 nm; respectivamente; y en el diámetro corto de 104,99 a 95,90 nm y de 112,31 a 103,66 nm; respectivamente. Esta disminución, según Wei Huang & Chenming Zhang (2018), se explica por las propiedades fisicoquímicas del PLGA: a mayor temperatura, mayor es la solubilidad del PLGA, inhibiendo la precipitación; además, algunos polímeros como el PLGA presentan una rápida degradación hidrolítica a altas temperaturas.

A pesar de que existen varias similitudes como los rangos de temperatura testeados, la nanoprecipitación como técnica utilizada para la síntesis de NPs y el uso de PLGA como polímero base; entre el estudio de Wei Huang & Chenming Zhang (2018) y el presente trabajo; la tendencia a disminuir el tamaño de las NPs con el aumento de la temperatura no se observa en todo el rango de temperatura evaluado, posiblemente por la presencia de variaciones entre ambos estudios

durante el proceso de síntesis, como el uso de una bomba de jeringa montada verticalmente durante el goteo de la fase orgánica en la fase acuosa, y el tiempo de agitación de la solución final (toda a noche) en el estudio de Wei Huang & Chenming Zhang (2018), frente al uso de la técnica manual con micropipeta y un tiempo de agitación de 10 minutos; en la presente investigación. Además, no se especifica el número de nanopartículas ni la estadística utilizada en la investigación de Wei Huang & Chenming Zhang (2018), solo se sabe que el método de medición es diferente al utilizado en esta tesis, ya que emplearon un analizador de tamaño de partícula (Malvern Panalitical, 2013), mientras que nosotros medimos las nanopartículas manualmente, con el Software Fiji.

La relación solvente:agua en el método de nanoprecipitación influye en el tamaño de la nanopartícula, así lo confirma un estudio realizado por Oliveira et al (2013), en el cual, el tamaño de las nanopartículas de PLGA sintetizadas disminuyó a medida que aumentaba la relación acetona:agua. Al incrementar la cantidad de solvente añadido en la fase acuosa, el volumen final aumenta, en consecuencia, se reduce el tamaño ya que se forman más sitios de nucleación que van a formar nanopartículas más pequeñas una vez que la concentración final del polímero se mantiene fija. Sabiendo que el punto de ebullición de la acetona (usada como solvente orgánico en el presente trabajo) es de 56°C (Chemicals & Sheet, 2002); fue necesario añadir más cantidad de esta sustancia durante el proceso de síntesis a 50°C. Por lo tanto, la disminución en el diámetro de las nanopartículas sintetizadas a 50°C también se puede explicar porque la relación acetona:agua en este tratamiento aumentó, en comparación con los ensayos realizados a otras temperaturas.

Para entender los resultados obtenidos en el rango de temperaturas de 20°C a 40°C (aumento en el tamaño de las NPs), se ha tomado en cuenta el sistema termodinámico involucrado durante el proceso. Algunas de las propiedades termodinámicas a tomar en cuenta del PLGA son: la temperatura de transición vítrea

(T_g), el punto de fusión (T_m), la temperatura de recristalización (T_c) y el calor de fusión (DH_m) (Damadzadeh et al., 2010); donde la temperatura de transición vítrea es la que presenta una relación más cercana con el tamaño de las nanopartículas (Wilson et al., 2020) (Homaeigohar et al., 2020).

La temperatura de transición vítrea es una de las principales propiedades utilizadas para entender la sensibilidad térmica de un compuesto polimérico (R. A. Khan et al., 2021), es aquella a la cual las propiedades mecánicas de un plástico/adhesivo se ven alteradas fuertemente por los movimientos internos de las cadenas de polímero de las que están compuestas (R. Xie et al., 2020). Dichos cambios en las propiedades mecánicas se han estudiado variando la temperatura de exposición a la que es sometido el polímero, y se determinó que: a temperaturas menores a la T_g, el polímero presenta una deformación elástica reversible, cuando la temperatura se aproxima a la T_g, la deformación es irreversible; y cuando es mayor a la T_g del polímero, las nanopartículas poliméricas tienen un comportamiento de fluido viscoso (Wilson et al., 2020). La T_g del PLGA (50:50) es de 45°C (Mu & Feng, 2003), por lo tanto, en el rango de temperaturas de 20 a 40°C, el polímero tendrá una deformación elástica reversible, lo que significa que no se va a deformar completamente y estará disponible para generar nanopartículas; por esta razón, en este rango de temperaturas, el tamaño de las NPs medidas en SEM, aumenta.

Además, se conoce gracias al estudio de Homaeigohar et al (2020) que las NPs más grandes tienen mayor T_g atribuida a su área de superficie menos expuesta, por lo tanto, tendrán una falta de sensibilidad al calentamiento en comparación con las nanopartículas más pequeñas. En consecuencia, la absorción de calor por las nanopartículas más grandes tiene lugar más lentamente (Homaeigohar et al., 2020). Esto indica que el aumento del tamaño de las nanopartículas en el rango de 20°C a 40°C contribuye al incremento en su temperatura de transición vítrea y, por lo tanto, a una mayor tolerancia a la

deformación del PLGA con el aumento de la temperatura, manteniéndose disponible para la formación de nanopartículas cada vez de mayor tamaño.

Si bien, al establecer una comparación entre los tamaños obtenidos por DLS en muestras concentradas vs los tamaños obtenidos en muestras diluidas, mediante la prueba de t Student, se determinó que ambos grupos no presentan diferencias significativas, la Figura 17 muestra que en la mayoría de casos, los datos de la muestra concentrada son ligeramente mayores que los de la muestra diluida. Esto sucede porque para formar las nanopartículas, se utilizó PLGA de proporción 50:50 de sus monómeros constitucionales (PLA y PGA); a estas condiciones el polímero se hidroliza mucho más rápido en comparación con uno que contenga cantidades más altas de cualquiera de los dos monómeros (Locatelli & Comes Franchini, 2012). Otra razón se debe a que el agua penetra a través del polímero e interrumpe las fuerzas de van der Waals y los enlaces de hidrógeno, provocando una disminución de la temperatura de transición vítrea, por lo que la deformación del polímero va a suceder más pronto en las muestras diluidas que en las concentradas por tener una Tg más baja, disminuyendo la disponibilidad del mismo para formar NPs y por lo tanto, generando NPs más pequeñas (Lanao et al., 2013).

En esta investigación el único parámetro que fue alterado para estudiar su influencia en el tamaño de las nanopartículas, fue la temperatura. Los demás parámetros como la concentración y tipo de polímero utilizado, la velocidad y tiempos de agitación y goteo, y la cantidad y tipo de solvente empleado se mantuvieron constantes en todos los tratamientos, por lo que se asume que las variaciones en el tamaño de las nanopartículas no se relacionan con ninguno de ellos. Por ejemplo, durante el proceso se añadió una cantidad determinada y única de polietilenglicol o PEG para hacer funcionales las nanopartículas de PLGA, es decir, para que pasen desapercibidas por el sistema retículo-endotelial, que es el responsable de la eliminación de partículas del torrente sanguíneo (Pelaz et al.,

2015). Sin embargo, estudios han demostrado que un aumento en la cantidad de PLGA-PEG durante la técnica de nanoprecipitación provoca un aumento en el tamaño de las nanopartículas (Bakhaidar et al., 2019) (Wei Huang & Chenming Zhang, 2018).

Para el caso de la velocidad de agitación, se sabe que generalmente el tamaño de la nanopartícula tiende a disminuir a medida que aumenta la velocidad de agitación en la evaporación del solvente (Hernández-Giottonini et al., 2020). Para entender esto, es importante conocer el proceso de nucleación, que es aquel mediante el cual los núcleos (semillas) actúan como plantillas para el crecimiento de las nanopartículas (Thanh et al., 2014). Entonces, la velocidad de agitación influye en la velocidad de nucleación del polímero, donde una agitación lenta resulta en velocidades de nucleación lentas, generando partículas más grandes, mientras que una mezcla adecuada promueve el aumento de la velocidad de nucleación, lo que conduce a la formación de pequeñas nanopartículas (Lince et al., 2008). El conocimiento de este hecho es fundamental para entender el proceso de síntesis de nanopartículas, sin embargo, en este estudio no fue considerado ya que la velocidad de agitación fue constante en todos los tratamientos, con un valor de 237 rpm.

Finalmente se debe mencionar el solvente utilizado, ya que su influencia en el tamaño de las nanopartículas es muy amplio porque no solo se debe tomar en cuenta la cantidad de solvente, sino también su naturaleza, la cual incluye su miscibilidad en agua (Cheng et al., 2007), coeficiente de difusión (Wei Huang & Chenming Zhang, 2018), interacción con el fármaco encapsulado (Morsi et al., 2016), entre otros (Hernández-Giottonini et al., 2020). Por ejemplo, Cheng et al (2007) informan que un aumento de la miscibilidad del solvente con el agua condujo a una disminución en el tamaño promedio de las nanopartículas de PLGA PEGilado cargadas con docetaxel, lo que presumiblemente se debe a una difusión más eficiente del solvente y la dispersión del polímero en el agua. Esta información no

fue considerada en el presente estudio ya que se utilizó 1 mL de acetona, como solvente, en todos los tratamientos.

Aunque los estudios citados durante este capítulo permiten explicar los resultados obtenidos en el presente trabajo, es importante mencionar que muchos de ellos no exponen la parte estadística (Homaeigohar et al., 2020), (Wei Huang & Chenming Zhang, 2018); o en su lugar, trabajan con pocos datos (Wilson et al., 2020), generando una disminución en la confiabilidad y veracidad de los mismos. Por ejemplo, las conclusiones del estudio de la deformación del polímero en función de su temperatura de transición vítrea, fueron obtenidas a partir del análisis de 6000 nanopartículas poliméricas (Wilson et al., 2020), una cantidad pequeña que arroja resultados que pueden variar si se trabajara con más datos.

Esta suposición de que los resultados pueden variar en función del número de datos utilizados, se pudo comprobar cuando se compararon los resultados del ensayo 1, donde se aplicó la misma metodología que en el presente trabajo (ensayo 2), pero con menos datos (2000-4000 NPs). Se observó que los tamaños de NPs medidos en DLS tuvieron un comportamiento completamente diferente e incluso opuesto en ambos ensayos. Para los resultados de SEM, los tamaños medidos siguieron un patrón distinto a lo largo de las temperaturas para ambos ensayos, y la esfericidad también se comportó diferente en ambos casos. De allí, la importancia de incluir la mayor cantidad de datos para que los resultados obtenidos se acerquen lo más posible a la realidad.

Por otro lado, los materiales utilizados en la metodología, como el polímero y el solvente, y la técnica aplicada para la síntesis de nanopartículas, varían en todas las investigaciones, por lo que resulta difícil contrastar los resultados. Es por ello que los datos que se obtienen son propios para el polímero, solvente y técnica aplicada; es decir, el comportamiento observado en este estudio: una disminución del tamaño a temperaturas bajas, seguido de un aumento hasta los 40°C y finalmente una

disminución en el rango de 40°C a 50°C, es una tendencia única de las nanopartículas de PLGA sintetizadas por nanoprecipitación y donde se utiliza como solvente la acetona. También es importante mencionar que aunque se dedujo que la temperatura influye en el tamaño de las nanopartículas de PLGA, no se observó un patrón definido en esta variación, es decir, no se puede afirmar que el tamaño de las nanopartículas es directamente proporcional a la temperatura aplicada durante el proceso de síntesis.

Capítulo VI: Conclusiones

- La forma de las nanopartículas de PLGA sintetizadas por nanoprecipitación fue constante en todos los tratamientos, es decir, la variación de la temperatura durante el proceso de síntesis no influyó en esta variable, en su lugar, se determinó que la forma de las nanopartículas cambia dependiendo de la técnica de síntesis aplicada.
- El tamaño de las nanopartículas medidos en DLS, para el ensayo 2, vario dentro de un rango de 160 nm a 193 nm, siendo el tratamiento de 50°C el que presentó el menor tamaño y la muestra de 40°C la de tamaños más grandes. Por otro lado, los diámetros medidos a partir de las imágenes de SEM estuvieron entre 96 nm y 137 nm, donde la muestra de 20°C presentó los tamaños menores y la de 40°C los tamaños mayores.
- La variación en el tamaño de las nanopartículas de PLGA no siguió un patrón definido y constante en el rango de temperaturas estudiado, ya que presentó una disminución en el rango de 10°C a 20°C, luego un aumento de 20°C a 40°C, y nuevamente disminuyó cuando se cambió la temperatura desde 40°C hasta 50°C.
- La disminución del tamaño desde los 10°C hasta los 20°C y desde los 40°C a los 50°C, se produjo porque a altas temperaturas, la solubilidad del PLGA

aumenta, inhibiendo la precipitación; además de que este polímero presenta una rápida degradación hidrolítica a altas temperaturas.

- El aumento del tamaño de las nanopartículas entre los 20°C y 40°C se explica por la relación entre la temperatura de transición vítrea del polímero (T_g) y el tipo de deformación que sufre: cuando la temperatura aplicada al sistema se aproxima a la T_g del PLGA (45°C), la deformación es reversible, es decir, no se deformará completamente y estará disponible para formar nanopartículas cada vez de mayor tamaño a medida que aumenta la temperatura hasta los 40°C.
- La diferencia en los tamaños obtenidos en DLS para muestras concentradas y diluidas (las primeras con tamaños mayores a las segundas), radica en las propiedades del PLGA utilizado en este estudio, que lo hacen más propenso a la hidrólisis y a los cambios en su temperatura de transición vítrea.
- Los datos obtenidos son propios para el polímero, solvente y técnica aplicada; es decir, el comportamiento observado en este estudio: una disminución del tamaño a temperaturas bajas, seguido de un aumento hasta los 40°C y finalmente una disminución en el rango de 40°C a 50°C, es una tendencia única de las nanopartículas de PLGA sintetizadas por nanoprecipitación y donde se utiliza como solvente la acetona.
- Se observaron resultados diferentes e incluso opuestos en el ensayo 1 y 2, lo que indica que la cantidad de datos analizados influye directamente en los resultados obtenidos, y mientras mayor cantidad de datos se trabajen, más representativos y acercados a la realidad serán los resultados.

Capítulo VII: Recomendaciones

- Utilizar un sistema de goteo de mayor precisión en la técnica de nanoprecipitación para disminuir los posibles efectos de esta variable sobre el tamaño de las nanopartículas.

- Automatizar el proceso de síntesis para controlar los parámetros involucrados, con el fin de asegurar que estas variables se mantengan constantes en todos los tratamientos y evitar errores asociados al operador.
- Añadir más temperaturas en el rango testeado para ampliar y generalizar los resultados.
- Incluir un método de caracterización del tamaño de las nanopartículas, llevado a cabo por un equipo, para contrastar con los resultados obtenidos en DLS.

Referencias

- Adamo, G., Campora, S., & Gherzi, G. (2017). Functionalization of nanoparticles in specific targeting and mechanism release. In *Nanostructures for Novel Therapy: Synthesis, Characterization and Applications* (pp. 57–80). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46142-9.00003-7>
- Ahlawat, J., Henriquez, G., & Narayan, M. (2018). Enhancing the delivery of chemotherapeutics: Role of biodegradable polymeric nanoparticles. *Molecules*, 23(9), 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules23092157>
- Ahmad, M. Z., Rizwanullah, M., Ahmad, J., Alasmay, M. Y., Akhter, M. H., Abdel-Wahab, B. A., Warsi, M. H., & Haque, A. (2021). Progress in nanomedicine-based drug delivery in designing of chitosan nanoparticles for cancer therapy. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 0(0), 1–22. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1869737>
- Ahmed, M., & Vandana, K. (2012). A comparative evaluation of atrigel delivery system (10% doxycycline hyclate) Atridox with scaling and root planing and combination therapy in treatment of periodontitis: A clinical study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 16(1), 43–48.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3357034/>
- Ahmed, T. (2015). Review: Approaches to develop PLGA based in situ gelling system with low initial burst. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(2), 657–665.
- Amidon, G. E., Secreast, P. J., & Mudie, D. (2009). Particle, Powder, and Compact Characterization. *Developing Solid Oral Dosage Forms*, 163–186.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53242-8.00008-4>
- Anderson, Deborah K., Liang, J. W. and C. L. (2017). Mucosal Immunization with a pH-Responsive Nanoparticle Vaccine Induces Protective CD8+ Lung-Resident

- Memory T Cells. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.9b00326>. Mucosal
- Arshady, R. (1991). Preparation of biodegradable microspheres and microcapsules: 2. Polyactides and related polyesters. *Journal of Controlled Release*, 2(1), 92–102.
- Astete, C. E., & Sabliov, C. M. (2006). Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 17(3), 247–289. <https://doi.org/10.1163/156856206775997322>
- Bagheri, G., & Bonadonna, C. (2016). Aerodynamics of Volcanic Particles: Characterization of Size, Shape, and Settling Velocity. Characterization of Size, Shape, and Settling Velocity. In *Volcanic Ash: Hazard Observation*. Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100405-0.00005-7>
- Bakhaidar, R., Green, J., Alfahad, K., Samanani, S., Moollan, N., O'Neill, S., & Ramtoola, Z. (2019). Effect of size and concentration of PLGA-PEG nanoparticles on activation and aggregation of washed human platelets. *Pharmaceutics*, 11(10), 1–14. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100514>
- Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Rienzo, J., & Robledo, C. (2008). *Manual del Usuario-Infostat* (E. Brujas (ed.)).
- Baraton, M.-I., & Merhari, L. (2007). Dual contribution of FTIR spectroscopy to nanoparticles characterization: surface chemistry and electrical properties. *Nanomaterials Synthesis, Interfacing, and Integrating in Devices, Circuits, and Systems II*, 6768, 676806. <https://doi.org/10.1117/12.736988>
- Barlow, R. (2002). Systematic Errors: facts and fictions. *Advanced Statistical Techniques*, August 2002. <http://arxiv.org/abs/hep-ex/0207026>
- Barreras-Urbina, C. G., Ramírez-Wong, B., López-Ahumada, G. A., Burruel-Ibarra, S.

- E., Martínez-Cruz, O., Tapia-Hernández, J. A., & Rodríguez Félix, F. (2016). Nano- and Micro-Particles by Nanoprecipitation: Possible Application in the Food and Agricultural Industries. *International Journal of Food Properties*, 19(9), 1912–1923. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1089279>
- Bayda, S., Hadla, M., Palazzolo, S., Riello, P., Corona, G., Toffoli, G., & Rizzolio, F. (2017). Inorganic Nanoparticles for Cancer Therapy: A Transition from Lab to Clinic. *Current Medicinal Chemistry*, 25(34), 4269–4303. <https://doi.org/10.2174/0929867325666171229141156>
- Bee Wah, Y., & Mohd Razali, N. (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(November), 21–33.
- Bilati, U., Allémann, E., & Doelker, E. (2005). Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24(1), 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2004.09.011>
- Bissessur, R. (2020). Polymer Science and Nanotechnology. In R. Narain (Ed.), *Nanomaterials applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816806-6.00018-2>
- Bolívar-Monsalve, E. J., Alvarez, M. M., Hosseini, S., Espinosa-Hernandez, M. A., Ceballos-González, C. F., Sanchez-Dominguez, M., Shin, S. R., Cecen, B., Hassan, S., Di Maio, E., & Trujillo-De Santiago, G. (2021). Engineering bioactive synthetic polymers for biomedical applications: A review with emphasis on tissue engineering and controlled release. *Materials Advances*, 2(14), 4447–4478. <https://doi.org/10.1039/d1ma00092f>
- Breiner, J. M., & Mark, J. E. (1998). Preparation, structure, growth mechanisms and properties of siloxane composites containing silica, titania or mixed silica-titania

- phases. *Polymer*, 39(22), 5483–5493. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(97\)10276-2](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(97)10276-2)
- Cao, J., Choi, J. S., Oshi, M. A., Lee, J., Hasan, N., Kim, J., & Yoo, J. W. (2019). Development of PLGA micro- and nanorods with high capacity of surface ligand conjugation for enhanced targeted delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2018.08.008>
- Carmichael, J. (2012). Lanreotide depot deep subcutaneous injection: a new method of delivery and its associated benefits. *Patient Preference and Adherence*, 6, 73. <https://doi.org/10.2147/PPA.S20783>
- Chan, Y. H. (2003). Biostatistics 102: Quantitative Data - Parametric & Non-parametric Tests. *Singapore Medical Journal*, 44(8), 391–396.
- Chemicals, S., & Sheet, D. (2002). Shell Chemicals. *Environment, March*, 1–3.
- Chen, W., Deng, W., & Goldys, E. M. (2017). Light-Triggerable Liposomes for Enhanced Endolysosomal Escape and Gene Silencing in PC12 Cells. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 7(June), 366–377. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.04.015>
- Cheng, J., Teply, B., Sherifi, I., Sung, J., Luher, G., Levy, E., Radovic, A., Langer, R., & Farokhzad, O. (2007). Formulation of Functionalized PLGA-PEG Nanoparticles for In Vivo Targeted Drug Delivery. *Biomaterials*, 28(1), 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.047>.Formulation
- Chin, S. F., Pang, S. C., & Tay, S. H. (2011). Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), 1817–1819. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.07.012>
- Crawford, I. (1997). Levels Of Measurement And Scaling. In *Marketing Research and Information Systems*. <https://www.fao.org/3/w3241e/w3241e04.htm#chapter 3>:

levels of measurement and scaling

- Damadzadeh, B., Jabari, H., Skrifvars, M., Airola, K., Moritz, N., & Vallittu, P. K. (2010). Effect of ceramic filler content on the mechanical and thermal behaviour of poly-L-lactic acid and poly-L-lactic-co-glycolic acid composites for medical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(9), 2523–2531. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4110-9>
- Dang, Y., & Guan, J. (2020). Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart Materials in Medicine*, 1(April), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.smaim.2020.04.001>
- de Oliveira, A. M., Jäger, E., Jäger, A., Stepánek, P., & Giacomelli, F. C. (2013). Physicochemical aspects behind the size of biodegradable polymeric nanoparticles: A step forward. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436, 1092–1102. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.08.056>
- Dean, R. L. (2005). The preclinical development of Medisorb® Naltrexone, a once a month long-acting injection, for the treatment of alcohol dependence. *Clinical Trials*, 643–655.
- Desai, K. G. H., Olsen, K. F., Mallery, S. R., Stoner, G. D., & Schwendeman, S. P. (2010). Formulation and in vitro-in vivo evaluation of black raspberry extract-loaded PLGA/PLA injectable millicylindrical implants for sustained delivery of chemopreventive anthocyanins. *Pharmaceutical Research*, 27(4), 628–643. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-0038-5>
- DeSimone, J. M. (2016). Co-opting Moore's law: Therapeutics, vaccines and interfacially active particles manufactured via PRINT®. *Journal of Controlled Release*, 240, 541–543. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.019>

- Dongargaonkar, A. A., & Clogston, J. D. (2018). Quantitation of surface coating on nanoparticles using thermogravimetric analysis. *Methods in Molecular Biology*, 1682, 57–63. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7352-1_6
- Ealias, A. M., & Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263(3), 0–15. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>
- Eiselt, P., Yeh, J., Latvala, R. K., Shea, L. D., & Mooney, D. J. (2000). Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. *Biomaterials*, 21(19), 1921–1927. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00033-8)
- Ekambaram, P., Sathali, A. H., & Priyanka, K. (2012). Solid lipid nanoparticles- A review. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 2(2), 80–102. <https://www.tsijournals.com/articles/solid-lipid-nanoparticles-a-review.pdf>
- Enlow, E., Luft, C., Napier, M., & DeSimone, J. (2012). Potent Engineered PLGA Nanoparticles by Virtue of Exceptionally High Chemotherapeutic Loadings. *Nano Letters*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1021/nl104117p>.Potent
- Español, L., Larrea, A., Andreu, V., Mendoza, G., Arruebo, M., Sebastian, V., Aurora-Prado, M. S., Kedor-Hackmann, E. R. M., Santoro, M. I. R. M., & Santamaria, J. (2016). Dual encapsulation of hydrophobic and hydrophilic drugs in PLGA nanoparticles by a single-step method: drug delivery and cytotoxicity assays. *RSC Advances*, 6(112), 111060–111069. <https://doi.org/10.1039/C6RA23620K>
- Esposito, E., Sguizzato, M., Drechsler, M., Mariani, P., Carducci, F., Nastruzzi, C., Valacchi, G., & Cortesi, R. (2019). Lipid nanostructures for antioxidant delivery: A comparative preformulation study. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 10, 1789–1801. <https://doi.org/10.3762/bjnano.10.174>

- Ewe, A., Schaper, A., Barnert, S., Schubert, R., Temme, A., Bakowsky, U., & Aigner, A. (2014). Storage stability of optimal liposome-polyethylenimine complexes (lipopolyplexes) for DNA or siRNA delivery. *Acta Biomaterialia*, *10*(6), 2663–2673. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.037>
- Farrell, E., & Brousseau, J. (2014). Guide for DLS sample preparation. *Brookhaven Instruments*, *1*(631), 1–3.
- Fernandez Del Moral, P., Dijkman, G. A., Debruyne, F. M. J., Witjes, W. P. J., & Kolvenbag, G. J. M. C. (1996). Three-month depot of goserelin acetate: Clinical efficacy and endocrine profile. *Urology*, *48*(6), 894–900. [https://doi.org/10.1016/S0090-4295\(96\)00300-7](https://doi.org/10.1016/S0090-4295(96)00300-7)
- Flutto, L. (2003). Pectin. Properties and Determination. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (pp. 4440–4449). <http://psycnet.apa.org/record/1969-15018-001>
- Fytianos, G., Rahdar, A., & Kyzas, G. Z. (2020). Nanomaterials in cosmetics: Recent updates. *Nanomaterials*, *10*(5), 1–16. <https://doi.org/10.3390/nano10050979>
- Gallagher, P. (1998). *Handbook of thermal analysis and calorimetry* (M. Brown (ed.)).
- García-Pinel, B., Porrás-Alcalá, C., Ortega-Rodríguez, A., Sarabia, F., Prados, J., Melguizo, C., & López-Romero, J. M. (2019). Lipid-based nanoparticles: Application and recent advances in cancer treatment. *Nanomaterials*, *9*(4), 1–23. <https://doi.org/10.3390/nano9040638>
- Garland, J., Buscombe, J. R., Bouvier, C., Bouloux, P., Chapman, M. H., Chow, A. C., Reynolds, N., & Caplin, M. E. (2003). Sandostatin LAR (long-acting octreotide acetate) for malignant carcinoid syndrome: a 3-year experience. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *17*(3), 437–444. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2003.01420.x>

- Gelperina, S., Kisich, K., Iseman, M. D., & Heifets, L. (2005). The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *172*(12), 1487–1490. <https://doi.org/10.1164/rccm.200504-613PP>
- Gentile, P., Chiono, V., Carmagnola, I., & Hatton, P. V. (2014). An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(3), 3640–3659. <https://doi.org/10.3390/ijms15033640>
- Ghitman, J., Biru, E. I., Stan, R., & Iovu, H. (2020). Review of hybrid PLGA nanoparticles: Future of smart drug delivery and theranostics medicine. *Materials and Design*, *193*, 108805. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.108805>
- Glangchai, L. C., Caldorera-Moore, M., Shi, L., & Roy, K. (2008). Nanoimprint lithography based fabrication of shape-specific, enzymatically-triggered smart nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, *125*(3), 263–272. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.10.021>
- Gómez, M., Danglot, C., & Vega, L. (2003). Sinopsis de pruebas estadísticas no paramétricas. Cuando usarlas. *Revista Mexicana de Pediatría*, *70*(2), 91–99. <https://doi.org/10.1227/00006123-198203000-00001>
- Gunatillake, P., Mayadunne, R., & Adhikari, R. (2006). Recent developments in biodegradable synthetic polymers. In *Biotechnology Annual Review* (Vol. 12, Issue 06, pp. 301–347). [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(06\)12009-8](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(06)12009-8)
- H. Muller, R., Shegokar, R., & M. Keck, C. (2011). 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications. *Current Drug Discovery Technologies*, *8*(3), 207–227. <https://doi.org/10.2174/157016311796799062>

- Haryadi, B. M., Hafner, D., Amin, I., Schubel, R., Jordan, R., Winter, G., & Engert, J. (2019). Nonspherical Nanoparticle Shape Stability Is Affected by Complex Manufacturing Aspects: Its Implications for Drug Delivery and Targeting. *Advanced Healthcare Materials*, 8(18), 1900352. <https://doi.org/10.1002/adhm.201900352>
- Haynie, D. (2001). Energy Transformation. In *Biological Thermodynamics* (pp. 2–15). https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=4xExFogxIPEC&oi=fnd&pg=PA1&ots=LrpH_bCe5W&sig=Ps43kvsMdpbJFo9G2IGJ2-aMllg&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- Hernández-Giottonini, K. Y., Rodríguez-Córdova, R. J., Gutiérrez-Valenzuela, C. A., Peñuñuri-Miranda, O., Zavala-Rivera, P., Guerrero-Germán, P., & Lucero-Acuña, A. (2020). PLGA nanoparticle preparations by emulsification and nanoprecipitation techniques: Effects of formulation parameters. *RSC Advances*, 10(8), 4218–4231. <https://doi.org/10.1039/c9ra10857b>
- Homaeigohar, S., Kabir, R., & Elbahri, M. (2020). Size-Tailored Physicochemical Properties of Monodisperse Polystyrene Nanoparticles and the Nanocomposites Made Thereof. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62095-8>
- Horst, A., & Bradley, D. (2014). *Kruskal-Wallis Method : Compare 3 or More Samples*. <https://statsthe wayilikeit.files.wordpress.com/2014/09/kruskal-wallis.pdf>
- IESMAT. (n.d.). *Dynamic Light Scattering (DLS)*.
- Ioelovich, M. (2008). Cellulose as a nanostructured polymer: A short review. *BioResources*, 3(4), 1403–1418. <https://doi.org/10.15376/biores.3.4.ioelovich>
- Jain, A. K., & Thareja, S. (2019). In vitro and in vivo characterization of

pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. *Artificial Cells,*

Nanomedicine and Biotechnology, 47(1), 524–539.

<https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1561457>

Jain, R. A. (2000). The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 21(23), 2475–2490. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00115-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00115-0)

Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., & Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53(July 2018), 101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>

Jose, S., Cinu, T. A., Sebastian, R., Shoja, M. H., Aleykutty, N. A., Durazzo, A., Lucarini, M., Santini, A., & Souto, E. B. (2019). Transferrin-conjugated Docetaxel-PLGA nanoparticles for tumor targeting: Influence on MCF-7 cell cycle. *Polymers*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/polym11111905>

Kango, S., Kalia, S., Celli, A., Njuguna, J., Habibi, Y., & Kumar, R. (2013). Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic-inorganic nanocomposites - A review. *Progress in Polymer Science*, 38(8), 1232–1261. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2013.02.003>

Karas, A., Burdge, G., & Rey, J. A. (2019). Perseris™: A New and Long-Acting, Atypical Antipsychotic Drug-Delivery System. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 44(8), 460–466. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31447532>

Kaur, A., & Gupta, U. (2009). A review on applications of nanoparticles for the preconcentration of environmental pollutants. *Journal of Materials Chemistry*, 19(44), 8279–8289. <https://doi.org/10.1039/b901933b>

- Keerthana, S., & Kumar, A. (2020). Potential risks and benefits of zinc oxide nanoparticles: a systematic review. *Critical Reviews in Toxicology*, 50(1), 47–71. <https://doi.org/10.1080/10408444.2020.1726282>
- Kemp, S. F., Fielder, P. J., Attie, K. M., Blethen, S. L., Reiter, E. O., Ford, K. M., Marian, M., Dao, L. N., Lee, H. J., & Saenger, P. (2004). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Characteristics of a Long-Acting Growth Hormone (GH) Preparation (Nutropin Depot) in GH-Deficient Children. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89(7), 3234–3240. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030825>
- Khalid, K., Tan, X., Mohd Zaid, H. F., Tao, Y., Lye Chew, C., Chu, D. T., Lam, M. K., Ho, Y. C., Lim, J. W., & Chin Wei, L. (2020). Advanced in developmental organic and inorganic nanomaterial: a review. *Bioengineered*, 11(1), 328–355. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1736240>
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Khan, R. A. A., Qi, H. K., Huang, J. H., & Luo, M. B. (2021). A simulation study on the effect of nanoparticle size on the glass transition temperature of polymer nanocomposites. *Soft Matter*, 17(35), 8095–8104. <https://doi.org/10.1039/d1sm00843a>
- Klose, D., Siepmann, F., Elkharraz, K., & Siepmann, J. (2008). PLGA-based drug delivery systems: Importance of the type of drug and device geometry. *International Journal of Pharmaceutics*, 354(1–2), 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.10.030>
- Kulkarni, V., Butte, K., & Rathod, S. (2012). Natural Polymers – A Comprehensive Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical*

Sciences, 3(4), 1597–1613.

Kumar, B., Smita, K., Cumbal, L., Debut, A., Camacho, J., Hernández-Gallegos, E., Chávez-López, M. de G., Grijalva, M., Angulo, Y., & Rosero, G. (2015).

Pomosynthesis and biological activity of silver nanoparticles using *Passiflora tripartita* fruit extracts. *Advanced Materials Letters*, 6(2), 127–132.

<https://doi.org/10.5185/amlett.2015.5697>

Kumar, B., Smita, K., Debut, A., & Cumbal, L. (2018). Utilization of *Persea americana* (Avocado) oil for the synthesis of gold nanoparticles in sunlight and evaluation of antioxidant and photocatalytic activities. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 10, 231–237.

<https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.07.009>

KUMAR, B., SMITA, K., DEBUT, A., & CUMBAL, L. (2016). Extracellular green synthesis of silver nanoparticles using Amazonian fruit Araza (*Eugenia stipitata* McVaugh). *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)*, 26(9), 2363–2371. [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(16\)64359-5](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(16)64359-5)

Kumar, B., Smita, K., Galeas, S., Sharma, V., Guerrero, V. H., Debut, A., & Cumbal, L. (2020). Characterization and application of biosynthesized iron oxide nanoparticles using *Citrus paradisi* peel: A sustainable approach. *Inorganic Chemistry Communications*, 119(May), 108116.

<https://doi.org/10.1016/j.inoche.2020.108116>

Labouta, H. I., & Schneider, M. (2013). Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: Current status and critical review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(1), 39–54. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.04.004>

Lanao, R. P. F., Jonker, A. M., Wolke, J. G. C., Jansen, J. A., Van Hest, J. C. M., & Leeuwenburgh, S. C. G. (2013). Physicochemical properties and applications of poly(lactic-co-glycolic acid) for use in bone regeneration. *Tissue Engineering -*

- Part B: Reviews*, 19(4), 380–390. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0443>
- Lee, B. K., Yun, Y., & Park, K. (2016). PLA micro- and nano-particles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 176–191.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.020>
- Li, H. L., Zhao, X. Bin, Ma, Y. K., Zhai, G. X., Li, L. B., & Lou, H. X. (2009). Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 133(3), 238–244.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.10.002>
- Liang, J., Peng, X., Zhou, X., Zou, J., & Cheng, L. (2020). Emerging applications of drug delivery systems in oral infectious diseases prevention and treatment. *Molecules*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030516>
- Lince, F., Marchisio, D. L., & Barresi, A. A. (2008). Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 322(2), 505–515.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.03.033>
- Liu, X., Li, C., Lv, J., Huang, F., An, Y., Shi, L., & Ma, R. (2020). Glucose and H₂O₂ Dual-Responsive Polymeric Micelles for the Self-Regulated Release of Insulin. *ACS Applied Bio Materials*, 3(3), 1598–1606.
<https://doi.org/10.1021/acsbm.9b01185>
- Locatelli, E., & Comes Franchini, M. (2012). Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(12), 1316.
<https://doi.org/10.1007/s11051-012-1316-4>
- Lorman, W. J. (2018). Sublocade: The Once-Monthly Buprenorphine Injectable. *Journal of Addictions Nursing*, 29(2), 139–140.

<https://doi.org/10.1097/JAN.0000000000000223>

- Mabrouk, M., Das, D. B., Salem, Z. A., & Beherei, H. H. (2021). Nanomaterials for biomedical applications: Production, characterisations, recent trends and difficulties. *Molecules*, 26(4), 1–27. <https://doi.org/10.3390/molecules26041077>
- Mahmood, S., Mandal, U. K., Chatterjee, B., & Taher, M. (2017). Advanced characterizations of nanoparticles for drug delivery: Investigating their properties through the techniques used in their evaluations. *Nanotechnology Reviews*, 6(4), 355–372. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0050>
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3(3), 1377–1397. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>
- Malvern Panalitical. (2013). *Gama Zetasizer Advance*.
- Mawunya, K. E., & Šoóš, M. (n.d.). Preparation of Polymeric Nanoparticles – [PP]. *Laboratoř Přípravy Nano a Mikromateriálů*, 1–6.
- Meers, P. (2001). Enzyme-activated targeting of liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53(3), 265–272. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00205-8](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00205-8)
- Mehta, H., Shastri, V., & Muthurajan, H. (2016). Recent Advancement in PLGA Nano Polymer Synthesis and its Applications. *Journal of Nanomedicine Research*, 4(1), 1–5. <https://doi.org/10.15406/jnmr.2016.04.00076>
- Ming, J., Wang, X., Marin, C., Wang, H., Lin, P., Yao, Q., & Chen, C. (2009). Current advances in research and clinical applications of PLGAbased nanotechnology. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 9(4), 325–341. <https://doi.org/10.1586/erm.09.15.Current>
- Mishra, P., Pandey, C. M., Singh, U., & Gupta, A. (2018). Scales of measurement and presentation of statistical data. *Annals of Cardiac Anaesthesia*, 21(4), 419–

422. https://doi.org/10.4103/aca.ACA_131_18

- Mishra, P., Singh, U., Pandey, C., Mishra, P., & Pandey, G. (2019). Application of student's t-test, analysis of variance, and covariance. *Annals of Cardiac Anaesthesia*, 22(4), 407. https://doi.org/10.4103/aca.aca_94_19
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(2), 101–124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Mohajerani, A., Burnett, L., Smith, J. V., Kurmus, H., Milas, J., Arulrajah, A., Horpibulsuk, S., & Kadir, A. A. (2019). Nanoparticles in construction materials and other applications, and implications of nanoparticle use. *Materials*, 12(19), 1–25. <https://doi.org/10.3390/ma12193052>
- Mohanraj, V., & Chen, Y. (2015). Nanoparticles – A Review. *International Journal of Physiotherapy*, 2(1), 347. <https://doi.org/10.15621/ijphy/2015/v2i1/60039>
- Molina, G., & Rodrigo, M. (2014). *Caracterización de grupos: Estadísticos de forma de la distribución*.
- Morsi, N., Ghorab, D., Refai, H., & Teba, H. (2016). Ketorolac tromethamine loaded nanodispersion incorporated into thermosensitive in situ gel for prolonged ocular delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 506(1–2), 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.021>
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. K. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/c8nr02278j>
- Mu, L., & Feng, S. S. (2003). A novel controlled release formulation for the anticancer

drug paclitaxel (Taxol®): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS. *Journal of Controlled Release*, 86(1), 33–48. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00320-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00320-6)

- Muhamad, I., Selvakumaran, S., & Asmak, N. (2014). Designing Polymeric Nanoparticles for Targeted Drug Delivery System. In *Nanomedicine* (pp. 288–312). https://www.researchgate.net/publication/280858357_Designing_Polymeric_Nanoparticles_for_Targeted_Drug_Delivery_System
- Mulder, W. J. M., Strijkers, G. J., van Tilborg, G. A. F., Griffioen, A. W., & Nicolay, K. (2006). Lipid-based nanoparticles for contrast-enhanced MRI and molecular imaging. *NMR in Biomedicine*, 19(1), 142–164. <https://doi.org/10.1002/nbm.1011>
- Muller, R., Mader, K., & Gohla, S. (2005). Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. *Doktorsavhandlingar Vid Chalmers Tekniska Hogskola*, 50(2314), 1–63.
- Niu, X., Zou, W., Liu, C., Zhang, N., & Fu, C. (2009). Modified nanoprecipitation method to fabricate DNA-loaded PLGA nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 35(11), 1375–1383. <https://doi.org/10.3109/03639040902939221>
- Nsamela, A. (2020). *Microfluidics for PLGA nanoparticle synthesis: a review*. <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/microfluidics-for-plga-nanoparticle-synthesis-a-review/>
- Nunes, D., Pimentel, A., Santos, L., Barquinha, P., Pereira, L., Fortunato, E., & Martins, R. (2019). Synthesis, design, and morphology of metal oxide nanostructures. In *Metal Oxide Nanostructures*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811512-1.00002-3>

- Ochi, M., Wan, B., Bao, Q., & Burgess, D. J. (2021). Influence of PLGA molecular weight distribution on leuprolide release from microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 599(February), 120450.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120450>
- Okada, H., Doken, Y., Ogawa, Y., & Toguchi, H. (1994). Preparation of three-month depot injectable microspheres of leuprorelin acetate using biodegradable polymers. *Pharmaceutical Research*, 11(8), 1143–1147.
<https://doi.org/10.1023/a:1018936815654>
- Oliva, J. (2010). Medidas de forma: Asimetría y curtosis. Momentos. In *Estadística* (pp. 1–5). <https://estadisticaucv.files.wordpress.com/2010/12/asimetria-y-curtosis.pdf>
- Paik, J., Duggan, S. T., & Keam, S. J. (2019). Triamcinolone Acetonide Extended-Release: A Review in Osteoarthritis Pain of the Knee. *Drugs*, 79(4), 455–462.
<https://doi.org/10.1007/s40265-019-01083-3>
- Painter, N. A., Morello, C. M., Singh, R. F., & McBane, S. E. (2013). An Evidence-Based and Practical Approach to Using Bydureon in Patients With Type 2 Diabetes. *The Journal of the American Board of Family Medicine*, 26(2), 203–210. <https://doi.org/10.3122/jabfm.2013.02.120174>
- Pal, B. (1986). *Top-down and bottom-up approaches for synthesis of nanomaterials. Introduction : Key issues in the fabrication of Nanomaterials :*
- Paliwal, R., Paliwal, S. R., Kenwat, R., Kurmi, B. Das, & Sahu, M. K. (2020). Solid lipid nanoparticles: a review on recent perspectives and patents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30(3), 179–194.
<https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1720649>
- Pandey, P., & Dahiya, M. (2016). A Brief Review on Inorganic Nanoparticles. *Journal*

of Critical Reviews, 3(3), 18–26.

- Park, J., Joo, J., Soon, G. K., Jang, Y., & Hyeon, T. (2007). Synthesis of monodisperse spherical nanocrystals. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(25), 4630–4660. <https://doi.org/10.1002/anie.200603148>
- Pazmiño Viteri, K., Vizuete, K. S., Alexis, F., Kumar, B., & Debut, A. (2020). A Closer Look to Polyesters: Properties, Synthesis, Characterization, and Particle Drug Delivery Applications. *Nanoscience & Nanotechnology-Asia*, 11(5), 1–42. <https://doi.org/10.2174/2210681210999201124155313>
- Pelaz, B., Del Pino, P., Maffre, P., Hartmann, R., Gallego, M., Rivera-Fernández, S., De La Fuente, J. M., Nienhaus, G. U., & Parak, W. J. (2015). Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano*, 9(7), 6996–7008. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01326>
- Persson, G. R., Salvi, G. E., Heitz-Mayfield, L. J. A., & Lang, N. P. (2006). Antimicrobial therapy using a local drug delivery system (ArestinR) in the treatment of peri-implantitis. I: microbiological outcomes. *Clinical Oral Implants Research*, 17(4), 386–393. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01269.x>
- Pilaquinga, F., Morejón, B., Ganchala, D., Morey, J., Piña, N., Debut, A., & Neira, M. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using *Solanum mammosum* L. (Solanaceae) fruit extract and their larvicidal activity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). *PLoS ONE*, 14(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224109>
- Piñón-Segundo, E., Llera-Rojas, V. G., Leyva-Gómez, G., Urbán-Morlán, Z., Mendoza-Muñoz, N., & Quintanar-Guerrero, D. (2017). The emulsification-diffusion method to obtain polymeric nanoparticles: Two decades of research. In *Nanoscale Fabrication, Optimization, Scale-up and Biological Aspects of*

Pharmaceutical Nanotechnology. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813629-4.00002-4>

- Pokhrel, S. (2015). A review on introduction and applications of starch and its biodegradable polymers. *International Journal of Environment*, 4(4), 114–125. <https://doi.org/10.3126/ije.v4i4.14108>
- Puertas-Bartolomé, M., Mora-Boza, A., & García-Fernández, L. (2021). Emerging biofabrication techniques: A review on natural polymers for biomedical applications. *Polymers*, 13(8), 1–26. <https://doi.org/10.3390/polym13081209>
- Puri, A., Loomis, K., Smith, B., Lee, J. H., Yavlovich, A., Heldman, E., & Blumenthal, R. (2009). Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: From concepts to clinic. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 26(6), 523–580. <https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v26.i6.10>
- Putro, J. N., Ismadji, S., Gunarto, C., Soetaredjo, F. E., & Ju, Y. H. (2020). A study of anionic, cationic, and nonionic surfactants modified starch nanoparticles for hydrophobic drug loading and release. *Journal of Molecular Liquids*, 298, 112034. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.112034>
- Quesada, V., & Vergara, J. (2007). Coeficiente de asimetría. In *Estadística básica con aplicaciones en Ms Excel*. <https://www.eumed.net/libros-gratis/2007a/239/7c.htm>
- Rafique, M., Shaikh, A. J., Rasheed, R., Tahir, M. B., Bakhat, H. F., Rafique, M. S., & Rabbani, F. (2017). Synthesis, Characterization and Applications of Copper Nanoparticles Using Green Method. *Nano*, 12(4). <https://doi.org/10.1142/S1793292017500436>
- Rajeswari, S. (2017). Natural Polymers: a Recent Review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, June, 472–494.

<https://doi.org/10.20959/wjpps20178-9762>

Rao, A., Schoenenberger, M., Gnecco, E., Glatzel, T., Meyer, E., Brändlin, D., & Scandella, L. (2007). Characterization of nanoparticles using atomic force microscopy. *Journal of Physics: Conference Series*, *61*(1), 971–976.

<https://doi.org/10.1088/1742-6596/61/1/192>

Rawat, A., Bhardwaj, U., & Burgess, D. J. (2012). Comparison of in vitro–in vivo release of Risperdal® Consta® microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, *434*(1–2), 115–121.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.05.006>

Reddy, M. S. B., Ponnamma, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. K. (2021). A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds. *Polymers*, *13*(7). <https://doi.org/10.3390/polym13071105>

Rezvantalab, S., Drude, N. I., Moraveji, M. K., Güvener, N., Koons, E. K., Shi, Y., Lammers, T., & Kiessling, F. (2018). PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 1260.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01260>

Ridolfo, R., Tavakoli, S., Junnuthula, V., Williams, D. S., Urtti, A., & Van Hest, J. C. M. (2021). Exploring the Impact of Morphology on the Properties of Biodegradable Nanoparticles and Their Diffusion in Complex Biological Medium. *Biomacromolecules*, *22*(1), 126–133.

<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00726>

Riley, N. (1941). Projection sphericity. *Journal of Sedimentary Petrology*, *11*(2), 94–97.

Rivero, P. J., Urrutia, A., Goicoechea, J., & Arregui, F. J. (2015). Nanomaterials for Functional Textiles and Fibers. *Nanoscale Research Letters*, *10*(1), 1–22.

<https://doi.org/10.1186/s11671-015-1195-6>

Rizvi, S. A. A., & Saleh, A. M. (2018). Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *26*(1), 64–70.

<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012>

Rong, M. Z., Zhang, M. Q., Zheng, Y. X., Zeng, H. M., & Friedrich, K. (2001).

Improvement of tensile properties of nano-SiO₂/PP composites in relation to percolation mechanism. *Polymer*, *42*(7), 3301–3304.

[https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(00\)00741-2](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(00)00741-2)

Saincher, S. S., & Gottlieb, C. (2020). Ozurdex (dexamethasone intravitreal implant) for the treatment of intermediate, posterior, and panuveitis: a systematic review of the current evidence. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12348-019-0189-4>

Salata, O. V. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, *6*(3), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-12>

Samson, S. L. (2016). Management of Hyperglycemia in Patients With Acromegaly Treated With Pasireotide LAR. *Drugs*, *76*(13), 1235–1243.

<https://doi.org/10.1007/s40265-016-0615-y>

Santarelli, G. D., & Han, J. K. (2016). Evaluation of the PROPEL® mini sinus implant for the treatment of frontal sinus disease. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *13*(12), 1789–1793. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1250740>

Sato, S., Gondo, D., Wada, T., Kanehashi, S., & Nagai, K. (2012). Effects of various liquid organic solvents on solvent-induced crystallization of amorphous poly(lactic acid) film. *Journal of Applied Polymer Science*, *129*(3), 1607–1617.

<https://doi.org/10.1002/app.38833>

Scalf, J., & West, P. (2006). Part I: Introduction to Nanoparticle Characterization with

AFM. *Pacific Nanotechnology*, 1–8.

<https://doi.org/10.1134/S0031918X10070021>

Schiller, R. (1991). The Stokes-Einstein law by macroscopic arguments. *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation. Part, 37*(3), 549–550.

[https://doi.org/10.1016/1359-0197\(91\)90033-X](https://doi.org/10.1016/1359-0197(91)90033-X)

Schwendeman, S. P., Shah, R. B., Bailey, B. A., & Schwendeman, A. S. (2014).

Injectable controlled release depots for large molecules. *Journal of Controlled Release*, 190, 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.057>

Sharma, G., Italia, J. L., Sonaje, K., Tikoo, K., & Ravi Kumar, M. N. V. (2007).

Biodegradable in situ gelling system for subcutaneous administration of ellagic acid and ellagic acid loaded nanoparticles: Evaluation of their antioxidant potential against cyclosporine induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Controlled Release*, 118(1), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.11.026>

Sharma, R., Bisen, D. P., Shukla, U., & Sharma, B. G. (2012). X-ray diffraction: a powerful method of characterizing nanomaterials. *Recent Research in Science and Technology*, 4(8), 77–79.

Sharma, S., Parmar, A., Kori, S., & Sandhir, R. (2016). PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 80, 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.014>

Shi, G., Guo, W., Stephenson, S. M., & Lee, R. J. (2002). Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic/anionic lipid combinations. *Journal of Controlled Release*, 80(1–3), 309–319. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00017-2)

Shilpi, S., Vimal, V. D., & Soni, V. (2015). Assessment of lactoferrin-conjugated solid lipid nanoparticles for efficient targeting to the lung. *Progress in Biomaterials*,

4(1), 55–63. <https://doi.org/10.1007/s40204-015-0037-z>

- Sionkowska, A. (2011). Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 36(9), 1254–1276. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003>
- Smita, S., Gupta, S. K., Bartonova, A., Dusinska, M., Gutleb, A. C., & Rahman, Q. (2012). Nanoparticles in the environment: Assessment using the causal diagram approach. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 11(SUPPL.1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-11-S1-S13>
- Song, Y., Fan, J. B., & Wang, S. (2017). Recent progress in interfacial polymerization. *Materials Chemistry Frontiers*, 1(6), 1028–1040. <https://doi.org/10.1039/c6qm00325g>
- Srivastava, P., & Abul Kalam, S. (2019). Natural Polymers as Potential Antiaging Constituents. *Pharmacognosy - Medicinal Plants*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80808>
- Strand, M. S., Krasnick, B. A., Pan, H., Zhang, X., Bi, Y., Brooks, C., Wetzels, C., Sankpal, N., Fleming, T., Peter Goedegebuure, S., DeNardo, D. G., Gillanders, W. E., Hawkins, W. G., Wickline, S. A., & Fields, R. C. (2019). Precision delivery of RAS-inhibiting siRNA to KRAS driven cancer via peptide-based nanoparticles. *Oncotarget*, 10(46), 4761–4775. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27109>
- Suzuki, R., Namai, E., Oda, Y., Nishiie, N., Otake, S., Koshima, R., Hirata, K., Taira, Y., Utoguchi, N., Negishi, Y., Nakagawa, S., & Maruyama, K. (2010). Cancer gene therapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure. *Journal of Controlled Release*, 142(2), 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.027>

- Swider, E., Koshkina, O., Tel, J., Cruz, L. J., de Vries, I. J. M., & Srinivas, M. (2018). Customizing poly(lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 73, 38–51. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.006>
- Teillac, P., Heyns, C. F., Kaisary, A. V., Bouchot, O., & Blumberg, J. (2004). Pharmacodynamic Equivalence of a Decapeptyl 3-Month SR Formulation with the 28-Day SR Formulation in Patients with Advanced Prostate Cancer. *Hormone Research in Paediatrics*, 62(5), 252–258. <https://doi.org/10.1159/000081629>
- ter Horst, B., Moiemmen, N. S., & Grover, L. M. (2019). Natural polymers. In *Biomaterials for Skin Repair and Regeneration*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102546-8.00006-6>
- Thanh, N. T. K., Maclean, N., & Mahiddine, S. (2014). Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. *Chemical Reviews*, 114(15), 7610–7630. <https://doi.org/10.1021/cr400544s>
- Titus, D., James Jebaseelan Samuel, E., & Roopan, S. M. (2019). Nanoparticle characterization techniques. In *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102579-6.00012-5>
- Valdes, S. A., Alzhrani, R. F., Rodriguez, A., Lansakara-p, D. S. P., Thakkar, S. G., Cui, Z., & States, U. (2020). A solid lipid nanoparticle formulation of 4-(N)-docosahexaenoyl 2', 2'-difluorodeoxycytidine with increased solubility, stability, and antitumor activity. *Int J Pharm*, 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118609.A>
- Varanda, L. C., Souza, C. G. S., Moraes, D. A., Neves, H. R., Souza Junior, J. B., Silva, M. F., Bini, R. A., Albers, R. F., Silva, T. L., & Beck, W. (2019). Size and shape-controlled nanomaterials based on modified polyol and thermal

- decomposition approaches. A brief review. In *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* (Vol. 91, Issue 4). <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920181180>
- Wang, D., & Fan, L. S. (2013). Particle characterization and behavior relevant to fluidized bed combustion and gasification systems. In *Fluidized Bed Technologies for Near-Zero Emission Combustion and Gasification*. <https://doi.org/10.1533/9780857098801.1.42>
- Wang, Y., Li, P., Tran, T. T. D., Zhang, J., & Kong, L. (2016). Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer. *Nanomaterials*, 6(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nano6020026>
- Wei Huang, & Chenming Zhang. (2018). Tuning the size of poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) nanoparticles fabricated by nanoprecipitation. *Biotechnology Journal*, 13(1), 1–19. <https://doi.org/10.1002/biot.201700203>. Tuning
- Wilson, J. F., Trunov, D., Šrom, O., Štětina, J., Hassouna, F., Kosek, J., & Šoóš, M. (2020). Temperature modulated polymer nanoparticle bonding: A numerical and experimental study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 601(March). <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.125010>
- Xie, H., & Smith, J. W. (2010). Fabrication of PLGA nanoparticles with a fluidic nanoprecipitation system. *Journal of Nanobiotechnology*, 8(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-18>
- Xie, J., Zhang, X., Wang, H., Zheng, H., Huang, Y., & Xie, J. (2012). Analytical and environmental applications of nanoparticles as enzyme mimetics. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 39, 114–129. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.021>
- Xie, R., Weisen, A. R., Lee, Y., Aplan, M. A., Fenton, A. M., Masucci, A. E., Kempe, F., Sommer, M., Pester, C. W., Colby, R. H., & Gomez, E. D. (2020). Glass

- transition temperature from the chemical structure of conjugated polymers. *Nature Communications*, 11(1), 4–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14656-8>
- Xu, M., Fralick, D., Zheng, J. Z., Wang, B., Tu, X. M., & Feng, C. (2017). The differences and similarities between two-sample t-test and paired t-test. *Shanghai Archives of Psychiatry*, 29(3), 184–188. <https://doi.org/10.11919/j.issn.1002-0829.217070>
- Xu, S., Nie, Z., Seo, M., Lewis, P., Kumacheva, E., Stone, H. A., Garstecki, P., Weibel, D. B., Gitlin, I., & Whitesides, G. M. (2005). Generation of Monodisperse Particles by Using Microfluidics: Control over Size, Shape, and Composition. *Angewandte Chemie*, 117(5), 734–738. <https://doi.org/10.1002/ange.200462226>
- Yeh, M. K., Davis, S. S., & Coombes, A. G. A. (1996). Improving protein delivery from microparticles using blends of Poly(DL lactide co-glycolide) and poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) copolymers. In *Pharmaceutical Research* (Vol. 13, Issue 11, pp. 1693–1698). <https://doi.org/10.1023/A:1016496824839>
- Yildirimer, L., Thanh, N. T. K., Loizidou, M., & Seifalian, A. M. (2011). Toxicological considerations of clinically applicable nanoparticles. *Nano Today*, 6(6), 585–607. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2011.10.001>
- Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015). A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng Reviews*, 2(3), 204–226. <https://doi.org/10.1002/cben.201400025>
- Zhang, B., Sai Lung, P., Zhao, S., Chu, Z., Chrzanowski, W., & Li, Q. (2017). Shape dependent cytotoxicity of PLGA-PEG nanoparticles on human cells. *Scientific Reports*, 7(1), 7315. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07588-9>
- Zhang, L., Beatty, A., Lu, L., Abdalrahman, A., Makris, T. M., Wang, G., & Wang, Q.

(2020). Microfluidic-assisted polymer-protein assembly to fabricate homogeneous functional nanoparticles. *Materials Science and Engineering C*, 111(February), 110768. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110768>

Zhang, Z., Ortiz, O., Goyal, R., & Kohn, J. (2014). Biodegradable Polymers. In *Principles of Tissue Engineering* (pp. 441–473). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00023-9>

Zhi, K., Raji, B., Nookala, A. R., Khan, M. M., Nguyen, X. H., Sakshi, S., Pourmotabbed, T., Yallapu, M. M., Kochat, H., Tadrous, E., Pernell, S., & Kumar, S. (2021). Plga nanoparticle-based formulations to cross the blood-brain barrier for drug delivery: From r&d to cgm. *Pharmaceutics*, 13(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040500>

Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Nagasamy Venkatesh, D., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25(16). <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>