



**Evaluación de la Dosis Letal Media (DL50) de nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) administradas por vía oral en ratones Balb / c.**

Tibán Molina, Gissela Estefanía

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

Debut, Alexis Patrice Martial Ph.D

3 de septiembre 2020



### Document Information

---

**Analyzed document** TESIS\_URKUND\_TIBAN.docx (D78168796)  
**Submitted** 8/25/2020 10:19:00 PM  
**Submitted by** DEBUT ALEXIS PATRICE MARTIAL  
**Submitter email** apdebut@espe.edu.ec  
**Similarity** 0%  
**Analysis address** apdebut.espe@analysis.orkund.com

### Sources included in the report

---

<b>W</b>	URL: <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7026499/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7026499/</a> Fetched: 8/25/2020 10:20:00 PM	 1
<b>SA</b>	<b>Tesis Roger Tapia.docx</b> Document Tesis Roger Tapia.docx (D53779764)	 1

Firma:



Firma digitalizada por:  
**ALEXIS  
PATRICE  
MARTIAL, DEBUT**

Debut, Alexis Patrice Martial Ph.D

C. C....1725238297..



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, "**Evaluación de la Dosis Letal Media (DL50) de nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) administradas por vía oral en ratones Balb / c**" fue realizado por la señorita **Tibán Molina Gissela Estefanía** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 1 de septiembre del 2020

Firma:



.....  
Debut, Alexis Patrice Martial Ph.D

C. C.1725238297.



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Tibán Molina Gissela Estefanía**, con cédula de ciudadanía n° 1723305866, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Evaluación de la Dosis Letal Media (DL50) de nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) administradas por vía oral en ratones Balb / c"** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 24 de agosto del 2020

Firma

.....  
**Tibán Molina, Gissela Estefanía**

C.C.: 1723305866  
.....



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Tibán Molina Gissela Estefanía**, con cédula de ciudadanía n° 1723305866, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "Evaluación de la Dosis Letal Media (DL50) de nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) administradas por vía oral en ratones Balb / c" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 24 de agosto del 2020

Firma

.....  
**Tibán Molina, Gissela Estefanía**

C.C.: 1723305866.....

## Dedicatoria

*A Dios:*

*Por acompañarme en este duro y difícil camino y brindarme la fuerza y la perseverancia para terminar mis estudios universitarios.*

*A mis padres:*

*Por su apoyo y sacrificio, por inculcarme valores como el respeto, la honestidad y la responsabilidad.*

*A mi familia y amigos:*

*Por la confianza que han depositado en mí, y por estar siempre dispuestos brindarme su ayuda.*

*A mis maestros:*

*Por su guía y por compartir conmigo su experiencia y sus conocimientos de la mejor manera.*

Gissela Tiban M

## Agradecimientos

Gracias a Dios, por mi salud y la de mi familia. A mi padre, Enrique Tibán, y a mi madre, Betty Molina, por brindarme su apoyo incondicional, el cual me ha permitido cumplir cada una de mis metas. A mis hermanos Ian y Jhosue porque siempre he podido contar con ellos. Por esto y más, este logro es también de mi familia.

Gracias a mis tutores por su paciencia, responsabilidad y esmero. Gracias también a las Karla Vizuite y Katherine Pazmiño, técnicos de laboratorio, por sus consejos y brindarme su ayuda en todo momento.

Gissela Tiban M

## Índice de contenido

Dedicatoria .....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de tablas .....	11
Índice de figuras .....	12
Resumen.....	13
Abstract.....	14
Capítulo I: Introducción.....	15
Antecedentes.....	15
Justificación .....	19
Planteamiento del problema .....	20
Objetivos.....	21
Objetivo general .....	21
Objetivos Específicos .....	21
Hipótesis.....	22
Capítulo II: Marco referencial.....	23
PLGA.....	23
Propiedades Físico-químicas del PLGA .....	24
Perfil de Biodistribución .....	24
Copolímeros del PLGA y Modificaciones de Superficie .....	24
Encapsulamiento de drogas en NP basadas en PLGA.....	25
Métodos de Síntesis de NP poliméricas para el Encapsulamiento de Fármacos .....	26

Método de nanoprecipitación.....	28
Estudios toxicológicos.....	30
Toxicidad Aguda y Dosis Letal Media (DL50) .....	30
Importancia y objetivos de los Estudios de Toxicidad Aguda en el campo de la Nanotecnología .....	30
Bases legales para el uso de animales en investigaciones científicas.....	31
Métodos estadísticos para determinar el DL50.....	31
Capítulo III: Metodología.....	33
Ubicación del lugar de investigación .....	33
Ubicación política .....	33
Ubicación geográfica.....	33
Ubicación Ambiental.....	33
Espacio físico en donde se llevarán a cabo los experimentos con animales ...	33
Diseño Experimental.....	34
Tipo de investigación.....	35
Variables de respuesta.....	35
Operatividad de las variables .....	35
Recolección de información.....	35
Análisis de la información .....	36
Síntesis y purificación de nanopartículas .....	36
Síntesis de nanopartículas de PLGA .....	36
Eliminación del solvente de síntesis de las PLGA NP.....	37
Preparación de inóculo.....	37
Administración de las dosis de PLGA NP en ratones.....	38

Unidad es experimentales .....	38
Características del PLGA .....	39
Dosis... ..	39
Inoculación .....	40
Sacrificio de los animales y necropsias.....	41
Capítulo IV: Resultados y Discusión .....	42
Resultados.....	42
Caracterización de PLGA NP .....	42
Sintomatología y toxicidad.....	43
Análisis estadístico del peso corporal de los animales antes y después del experimento .....	43
Necropsias .....	47
Mortalidad Post inoculación.....	47
Determinación de la DL50 de las PLGA NP .....	49
Discusión .....	49
Capítulo V Conclusiones y Recomendaciones .....	56
Conclusiones .....	56
Recomendaciones .....	56
Bibliografía.....	57

**Índice de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Métodos de Síntesis de nanopartículas poliméricas .....	26
<b>Tabla 2.</b> Composición de la comida de los animales de experimentación .....	34
<b>Tabla 3.</b> Arreglo factorial 5x2 utilizado en el diseño experimental .....	35
<b>Tabla 4.</b> Operatividad de las variables .....	36
<b>Tabla 5.</b> Grupo de Dosis para la Determinación DL50 oral de PLGA NP .....	38
<b>Tabla 6.</b> Información del reactivo .....	39
<b>Tabla 7.</b> Cuadro de Dosis de PLGA NP administradas en los animales .....	40
<b>Tabla 8.</b> Resumen del peso corporal inicial y final de los animales. ....	43
<b>Tabla 9.</b> Comparación de Pesos Promedios (g) de órganos de ratones después de de la administración de PLGA NP por vía oral. ....	47
<b>Tabla 10.</b> Mortalidad de ratones después de la administración única de PLGA NP por vía oral. ....	48

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura química del Poli D, ácido L-láctico-co-glicólico (PLGA) .....	23
<b>Figura 2.</b> Métodos de síntesis de NP poliméricas. Representación esquemática los principales métodos de síntesis. A) Emulsión / evaporación. B) Difusión de emulsificación. C) Nanoprecipitación. ....	29
<b>Figura 3.</b> Métodos para representar el porcentaje de mortalidad .....	32
<b>Figura 4.</b> Caracterización de PLGA NP mediante SEM .....	42
<b>Figura 5.</b> Análisis del porcentaje de ganancia de peso corporal de los animales durante el período observación. ....	45
<b>Figura 6.</b> Curva de supervivencia de ratones Balb / c tratados con distintas dosis de PLGA NP. ....	49

## RESUMEN

El ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) es un polímero ampliamente utilizado para formular nanopartículas con aplicaciones biomédicas, sin embargo, no se ha reportado un rango de dosis seguro para su administración en modelos animales. Por lo que, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la DL50 (dosis letal media) de nanopartículas de PLGA (PLGA NP) administradas por vía oral en ratones Balb / c. Las PLGA NP fueron sintetizadas por el método de nanoprecipitación siguiendo el protocolo de Fessi et al. (1992) modificado, y se purificaron por destilación al vacío y liofilización. Para la determinación de la DL50 se dividió a los ratones (10 semanas de edad y peso promedio de 33 g) en cinco grupos de estudio, cada uno conformado por cinco machos y cinco hembras. Además, se contó con un grupo de control (6 machos y 5 hembras). Las PLGA NP suspendidas en buffer PBS pH 7,4 fueron administradas en cinco dosis: 100, 223, 400, 600 y 800 mg / kg. La tasa de supervivencia fue del 100%, excepto para el grupo tratado con 223 mg / kg, en el que se registró un ratón macho fallecido. Debido a que no se estableció el límite de respuesta de 100 % de mortalidad, no fue posible calcular la DL50 por ningún método estadístico. Por lo que se puede concluir que las PLGA NP administradas por vía oral en dosis de hasta 800 mg / kg no produjeron efectos tóxicos en ratones Balb / c.

### Palabras clave:

- **DOSIS LETAL MEDIA**
- **POLÍMERO**
- **NANOPARTÍCULA**
- **NANOPRECIPITACIÓN**
- **TASA DE SUPERVIVENCIA Y MORTALIDAD**

## ABSTRACT

Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is a polymer widely used to formulate nanoparticles with biomedical applications, however, a safe dose range for its administration in animal models has not been reported. That's why, the purpose of this study was to evaluate the LD50 (mean lethal dose) of PLGA nanoparticles (PLGA NP) administered orally in BALB / c mice. The PLGA NPs were synthesized by the nanoprecipitation method following the modified protocol of Fessi et al. (1992), and purified by vacuum distillation and lyophilization. To determine the LD50, the mice (10 weeks old and average weight of 33 g) were divided into five study groups, each one made up of five males and five females. In addition, there was a control group of 11 individuals (6 males and 5 females). The PLGA NPs suspended in PBS buffer with a pH of 7.4 were administered in five doses: 100, 223, 400, 600 and 800 mg / kg. The survival rate of the mice was 100%, except for the group treated with 223 mg / kg, in this case a deceased male mouse was recorded. Because the 100% mortality response limit was not established, it was not possible to calculate the LD50 by any statistical method. Therefore, it can be concluded that PLGA NPs administered orally in doses up to 800 mg / kg did not produce toxic effects in Balb / c mice.

### Keywords:

- **MEDIAN LETAL DOSE**
- **POLYMER**
- **NANOPARTICLE**
- **NANOPRECIPITATION**
- **SURVIVAL AND MORTALITY RATE**

## Capítulo I

### Introducción

#### Antecedentes

El PLGA es un copolímero de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico contiene un carbono asimétrico que en términos estereoquímicos, se describe como la forma D o L clásicos y, en ocasiones, como las formas R y S, respectivamente. Las formas enantioméricas del polímero PLA son ácido poli D-láctico (PDLA) y ácido poli L-láctico (PLLA) (Makadia & Siegel, 2011). PLGA es generalmente un acrónimo para poli D, ácido L-láctico-co-glicólico donde las formas de ácido D y L-láctico están en la misma proporción. Es soluble en una amplia gama de disolventes comunes, incluidos los disolventes clorados, tetrahidofurano, acetona o acetato de etilo (Uhrich et al., 1999).

Se ha demostrado que las propiedades físicas de PLGA dependen de múltiples factores, incluido el peso molecular inicial, la relación de PLA y PGA, el tamaño del dispositivo, la exposición al agua (forma de la superficie) y la temperatura de almacenamiento. Las nanopartículas de PLGA (PLGA NP) se han preparado principalmente mediante la emulsificación-difusión, la evaporación del disolvente y los métodos de nanoprecipitación (Kumari et al., 2010).

El PLGA es uno de los polímeros biodegradables más exitosamente utilizados para formular nanopartículas (NP); tiene múltiples aplicaciones biomédicas en vacunación, cáncer e inflamación. Debido a que es un compuesto aprobado por la FDA (Administración de alimentos y medicamentos de EE.UU, por sus siglas en inglés) y la

EMA (Agencia Europea de Medicamentos, por sus siglas en inglés) para ser usado en varios sistemas de administración de drogas en humanos (Danhier et al., 2012).

La encapsulación de un fármaco en NP basadas en PLGA protege al fármaco contra la degradación, permite la liberación sostenida del fármaco y hace posible dirigir el fármaco directamente a órganos o células específicos (Sahoo et al., 2008). Estos conjugados de PLGA cargados de drogas no solo prolongan el tiempo de circulación *in vivo* del agente terapéutico de varios minutos a varias horas, sino que también reducen la absorción celular a lo largo de la ruta endocítica (Sahoo et al., 2008).

Por este motivo, en la actualidad existen formulaciones y métodos de producción adaptados a varios tipos de drogas, esto con el fin de modificar las propiedades de la superficie de las NP para proporcionar una mejor interacción con los materiales biológicos (Danhier et al., 2012) y, sobre todo, para que estas puedan escapar del reconocimiento del sistema fagocítico mononuclear, ya que puede ocasionar la eliminación prematura del sistema polímero-droga. Por lo tanto, la modificación de la superficie de las NP juega un papel fundamental en sus aplicaciones *in vivo* (Kim et al., 2005).

Para mejorar la aplicación del PLGA en nanomedicina se han desarrollado varios tipos de copolímeros de bloques de poliésteres con polietilenglicol (PEG) como: dibloque PLGA / PEG (Cheng et al., 2007; Y. P. Li et al., 2001), moléculas tribloque ABA (PLGA-PEG-PLGA) (Ghahremankhani et al., 2007) y BAB (PEG-PLGA-PEG) (Jeong et al., 2000).

Los copolímeros de tipo dibloque presentan cadenas de PEG orientadas hacia la fase acuosa externa formando micelas en donde se encapsula la compuesto químico de

interés y de esta manera se reducen las interacciones con moléculas extrañas, lo que proporciona una mayor estabilidad de almacenamiento (Tobío et al., 1998). Sin embargo, la adición de PEG al sistema también da como resultado una reducción de la eficiencia de encapsulación de fármacos y proteínas, incluso con las técnicas de fabricación más apropiadas (Tobío et al., 1998).

La incorporación reducida del fármaco puede deberse a la interferencia estérica de la interacción fármaco / proteína-polímero por las cadenas de PEG (Tobío et al., 1998). Por su parte, los polímeros tribloque PLGA-PEG-PLGA o PEG-PLGA-PEG, están compuestos de segmentos de PLGA hidrófobos y segmentos de PEG hidrófilos, lo que resulta en una mayor facilidad de manejo durante la fabricación, formulación, filtración y llenado, ya que son termorresistentes (Duvvuri et al., 2005; Ghahremankhani et al., 2007).

Las PLGA NP son aplicadas en vacunación, pues la liberación prolongada de antígenos puede proporcionar respuestas inmunes más efectivas, evitar el riesgo de tolerancia y sustituir la necesidad de varias administraciones (Jiang et al., 2005). Las investigaciones relacionadas con el empleo de PLGA NP en terapias contra el cáncer han aumentado sustancialmente en los últimos años, puesto que, los agentes quimioterapéuticos comunes pueden provocar toxicidad sistémica y efectos adversos que limitan su eficacia terapéutica (Danhier et al., 2009). En general, las PLGA NP contribuyen al efecto de permeabilidad y una retención mejoradas (EPR), factores considerados como un estándar en el diseño de nuevos sistemas de administración de medicamentos para tratar el cáncer (Makadia & Siegel, 2011). Se han probado vacunas contra el cáncer encapsulando antígenos asociados a tumores solos (Zhang et al., 2011) o asociados con adyuvantes (Hamdy et al., 2008).

La biocompatibilidad y biodegradabilidad del PLGA se asumió por su utilidad en la producción de suturas biodegradables. Las suturas Dexon (PGA) y Vicryl L-PLGA (8:92) se han sido aplicadas exitosamente durante más de 30 años (Anderson & Shive, 1997). La hidrólisis del PLGA produce ácido láctico y ácido glicólico; estos dos monómeros son endógenos y el cuerpo los metaboliza fácilmente a través del ciclo de Krebs, por lo que se espera que produzcan una mínima toxicidad sistémica (Kumari et al., 2010). Proteínas, péptidos, lipopéptidos, lisados celulares, virus y ADN plasmídico han sido encapsulados con éxito en PLGA NP (Clawson et al., 2010).

Varios estudios han demostrado que la implantación de PLGA en huesos o tejidos blandos de animales podría causar una respuesta inflamatoria leve (Tiainen et al., 2004). Sin embargo, en el estudio realizado por Kim et al. (2007), en el que se examinaron las reacciones inflamatorias provocadas por prótesis de PLGA implantadas por vía subcutánea en un modelo de rata Fisher, los análisis inmunohistoquímicos de secciones de tejido realizados catorce días después de la implantación, evidenciaron que los implantes basados en PLGA provocaron una inflamación severa, probablemente debido a la degradación de PLGA formando un ambiente ácido.

Por otro lado, se ha reportado acumulación de PLGA NP cargadas con fármacos, hasta siete días después de la administración, principalmente en órganos como el hígado y el bazo (Reul et al., 2012; Semete et al., 2012). Según Guo et al. (2015), complejos de PLGA NP cargados con daunorubicin (DNR) provocaron cambios patológicos leves de corazón, hígado, bazo, pulmón y riñón de los ratones tratados. La distribución de las NP no dirigidas, en estos órganos, podría atribuirse a la captura inespecífica por el sistema reticuloendotelial (J. Li et al., 2011; Paul et al., 2013).

Del mismo modo, los estudios *in vivo* han revelado pérdida de peso significativa en los individuos tratados con PLGA NP cargadas; a diferencia de los individuos tratados solamente con PLGA NP, en donde dicha pérdida no fue relevante, aunque no se especifica la dosis exacta de polímero que fue administrada (Peter Christopher et al., 2014).

Los estudios toxicológicos del PLGA muestran posibles alteraciones tisulares locales en el sitio de aplicación (Sundback et al., 2005). Estas generalmente son leves, pero se debe considerar que las aplicaciones de este compuesto a nanoescala pueden provocar resultados diferentes, debido a que las NP de cualquier material pueden crear biodistribuciones y perfiles toxicológicos específicos (Olivier et al., 1999).

### **Justificación**

El perfil de toxicidad de una sustancia permite identificar su impacto en la estructura y funcionalidad de los órganos. Los estudios toxicológicos ayudan a determinar en qué medida la toxicidad biológica es dependiente de la dosificación, especie, mecanismo o vía de administración. Las lesiones que podrían ocurrir en los riñones, el corazón, el hígado y otros órganos vitales ayudan a determinar el margen de seguridad de un medicamento. Los resultados obtenidos pueden ser muy útiles para maximizar la seguridad y minimizar el riesgo en futuros ensayos clínicos, y, además, ayudan a establecer cuáles órganos deben ser monitoreados.

Si bien la encapsulación de fármacos en NP presenta numerosas ventajas, también se debe tomar en cuenta que pueden generar o potenciar efectos tóxicos. Para evaluar la toxicidad de una sustancia en un sistema nanotecnológico se debe obligatoriamente considerar la acción de los nanomateriales que lo componen y monitorear su interacción con los sistemas biológicos.

Por esta razón, la biocompatibilidad de los nanoportadores debe ser establecida en base a los estudios toxicológicos, se debe considerar que, si bien los estudios *in vitro* proporcionan resultados alentadores, estos pueden estar muy lejos de la realidad *in vivo*. Siendo así, la determinación de la DL50 (cantidad de una sustancia que, si es administrada en una dosis única a un grupo objetivo de animales, causará la muerte del 50% de ellos) es muy importante como una medida de la toxicidad aguda de los productos químicos.

Los estudios revisados en los que se ha probado nuevos sistemas de administración de fármacos basados en PLGA NP asumen que es biocompatible, pero no proporcionan información precisa sobre la dosis de NP sin carga que es administrada en los modelos animales durante los ensayos *in vivo* y no existen investigaciones que se centren en la determinación de la DL50, o que muestren un rango de seguridad para su administración.

En general, los estudios de toxicidad aguda de NP basadas en PLGA revisados para el presente trabajo, se limitan a atribuir la toxicidad de sus formulaciones al fármaco que contienen, pero no investigan a fondo los efectos del PLGA en la funcionalidad de los órganos, evolución del peso y sobrevivencia de los animales. Tener un conocimiento claro sobre un rango de dosis adecuado de PLGA NP será de gran ayuda para evaluar *in vivo* posteriores nanoformulaciones basadas en este compuesto.

### **Planteamiento del problema**

Los polímeros biodegradables actualmente tienen múltiples aplicaciones en ciencias farmacéuticas y biomédicas. Las aplicaciones de PLGA NP incluyen el suministro específico y controlado de diversos fármacos, péptidos, proteínas, anticuerpos monoclonales, factores de crecimiento y ADN (Mir et al., 2017). Sin

embargo, aunque la toxicidad de PLGA NP cargadas con diferentes sustancias se ha estudiado ampliamente, no se ha evaluado directamente los efectos del PLGA, pues pocas investigaciones muestran la concentración exacta de polímero que contienen sus formulaciones.

Por otro lado, las PLGA NP pueden sintetizarse por varios métodos, la mayoría de los cuales emplea solventes tóxicos, por lo que las NP deben pasar por un riguroso proceso de purificación. Es necesario conocer los efectos de las NP sin carga para así evaluar los posibles efectos que estas puedan ocasionar por sí solas, es decir, sin la interacción de la molécula encapsulada. Este primer paso es muy importante para la formulación de productos de interés farmacéutico.

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Evaluar la Dosis Letal Media (DL50) de nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) administradas por vía oral en ratones Balb / c.

### ***Objetivos Específicos***

- Sintetizar nanopartículas de PLGA por el método de nanoprecipitación.
- Eliminar totalmente el solvente de síntesis de las nanopartículas de PLGA mediante destilación al vacío y liofilización.
- Determinar la Dosis Letal Media (DL50) de las nanopartículas de PLGA mediante el Método Bliss.
- Determinar si el sexo de los animales influye en su respuesta ante la administración oral de diferentes dosis de nanopartículas de PLGA.

**Hipótesis**

H0: La determinación de la dosis letal media (DL50) de las PLGA NP demostró que no producen ningún grado de toxicidad al ser administradas por vía oral en ratones BALB / c.

H1: La determinación de la dosis letal media (DL50) de las PLGA NP demostró que producen toxicidad al ser administradas por vía oral en ratones Balb/ c.

## Capítulo II

### Marco referencial

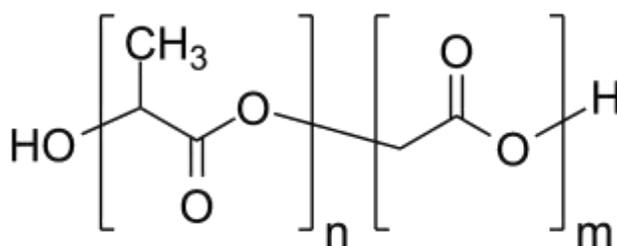
#### PLGA

El ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) es un copolímero de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA). Ya que el ácido poliláctico tiene un carbono asimétrico en su estructura química, tiene dos enantioméricas, y su estructura se describe típicamente como la forma D o L en términos estereoquímicos (Makadia & Siegel, 2011). PLGA es generalmente un acrónimo de poli D, ácido L-láctico-co-glicólico donde las formas de ácido D y L-láctico están en la misma proporción (Makadia & Siegel, 2011). Se puede observar la estructura química del PLGA en la Figura 1.

La hidrólisis del PLGA produce ácido láctico y ácido glicólico, estos dos monómeros son endógenos y el cuerpo los metaboliza fácilmente a través del ciclo de Krebs, por lo que se espera que produzcan una mínima toxicidad sistémica (Kumari et al., 2010). Por este motivo, el PLGA es uno de los polímeros biodegradables más exitosamente utilizados (Danhier et al., 2009).

#### Figura 1

*Estructura química del Poli D, ácido L-láctico-co-glicólico (PLGA)*



*Nota: Tomado de Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier (p.1377–1397), por Makadia & Siegel, 2011, Polymers.*

### ***Propiedades Físico-químicas del PLGA***

El PLGA es soluble en disolventes clorados, tetrahidofurano, acetona o acetato de etilo y se biodegrada en agua por la hidrólisis de sus enlaces éster (Uhrich et al., 1999). La hidrólisis de PLGA y sus propiedades fisicoquímicas pueden variar de acuerdo a su formulación, tiempo, temperatura de transición vítrea (Tg), el contenido de humedad, peso molecular, temperatura de almacenamiento y grado de cristalinidad (Siegel et al., 2006). Dichas propiedades, tienen una gran influencia en la velocidad de liberación y de degradación del fármaco incorporado en de las matrices poliméricas (Siegel et al., 2006).

### ***Perfil de Biodistribución***

Mediante estudios de distribución cuantitativa y autorradiografía de cuerpo entero, se ha determinado que las PLGA NP se acumulan rápidamente en el hígado, la médula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo y los macrófagos peritoneales (Bazile et al., 1992). La degradación del 30% de PLGA se da en la etapa inicial, luego se ralentiza y finalmente es eliminado por la respiración en el pulmón (Bazile et al., 1992). Se ha informado que las PLGA NP pueden ser reconocidas y eliminadas por el sistema de fagocitos mononucleares (MPS) (Panagi et al., 2001). Siendo las partículas con un tamaño <100 nm con una superficie hidrófila, las que tienen la mayor capacidad de evadir la MPS (Gref et al., 2000). Para abordar estas limitaciones, se ha modificado la superficie de las PLGA NP, con el fin de aumentar significativamente la vida media de la circulación sanguínea (Esmaeili et al., 2008).

### ***Copolímeros del PLGA y Modificaciones de Superficie***

Cuando las PLGA NP son administradas por vía intravenosa, corren el riesgo de ser eliminadas rápidamente por los macrófagos (Kim et al., 2005). La asociación de NP

con biomoléculas les permite circular dentro del sistema vascular sanguíneo por más tiempo. El método más común de modificación de superficie es la adsorción o injerto de PEG en la superficie de las NP, lo que evita su opsonización por ciertas proteínas séricas o plasmáticas (opsoninas) (Gref et al., 2000). Se ha demostrado que aumentar el peso molecular de las cadenas de PEG también disminuye la opsonización (Gref et al., 2000).

El desarrollo de nuevas y mejores formulaciones han dado como resultado la aplicación de PLGA y PEG como dibloque (PLGA-PEG) (Cheng et al., 2007; Y. P. Li et al., 2001), tribloque ABA (PLGA-PEG-PLGA) (Ghahremankhani et al., 2007) y BAB (PEG-PLGA-PEG) (Jeong et al., 2000).

### ***Encapsulamiento de drogas en NP basadas en PLGA***

La alta capacidad de carga de las NP reduce la cantidad de polímero que debe ser administrada (Soppimath et al., 2001). Los medicamentos o vacunas pueden encapsularse en las NP durante su fabricación o pueden ser adsorbidos después de su producción. La adsorción de fármacos se logra incubando los NP en una solución concentrada de fármacos (Soppimath et al., 2001).

La encapsulación del fármaco en el polímero, la dispersión del fármaco en el polímero, la adsorción del fármaco en la superficie de las NP. y la unión química del fármaco al polímero se puede lograr usando técnicas de incorporación / adsorción (Shenoy & Amiji, 2005). La cantidad de fármacos unidos a NP y el tipo de interacción entre fármacos y NP dependen de la estructura química del fármaco, la estructura del polímero y las condiciones de carga del fármaco (Shenoy & Amiji, 2005).

### ***Métodos de Síntesis de NP poliméricas para el Encapsulamiento de Fármacos***

Los principales métodos de síntesis de NP poliméricas para el encapsulamiento de fármacos se resumen en la Tabla 1. El solvente de síntesis de las NP puede ser eliminado por evaporación, filtración, destilación o centrifugación (Figura 2) (Pinto Reis et al., 2006; Urrejola et al., 2018).

**Tabla 1**

#### *Métodos de Síntesis de NP poliméricas*

<b>Método</b>	<b>Solvente</b>	<b>No solvente</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Emulsión / evaporación</b>	Inmiscible en agua. <sup>a</sup>	Agua con agente emulsionante (PVA). <sup>a</sup>	Rápido y escalable. <sup>b</sup> NP de tamaño y morfología controlada. <sup>b</sup>	Permite encapsular solo compuestos liposolubles y tiene altos requisitos de energía. <sup>c</sup>
<b>Doble emulsión</b>	Inmiscible en agua. <sup>a</sup>	Agua con agente emulsionante. <sup>a</sup>	Es rápido y permite encapsular compuestos solubles en agua. <sup>a</sup>	Resultados dependen de la elección del solvente y la velocidad de agitación. <sup>d</sup>
<b>Emulsión / difusión del solvente</b>	Parcialmente soluble, como el acetato de etilo. <sup>b</sup>	Agua purificada y agua con agente emulsionante (PVA). <sup>b</sup>	Logra altas eficiencias de encapsulación Es reproducible y escalable. <sup>e</sup>	Permite encapsular solo compuestos liposolubles. <sup>e</sup>

Método	Solvente	No solvente	Ventajas	Desventajas
<b>Nanoprecipitación</b>	Miscible en agua, como la acetona. <sup>f</sup>	Agua purificada y agua con agente estabilizador (PVA o PEG). <sup>f</sup>	Altas eficiencias de encapsulación de fármacos. <sup>g</sup>	Permite encapsular solo compuestos liposolubles. <sup>g</sup>
<b>Eliminación de la sal</b>	Miscible en agua, como el THF. <sup>h</sup>	Agua con agente estabilizador y una alta concentración de sacarosa o sales, como, el cloruro de magnesio. <sup>h</sup>	La sal minimiza el estrés cuando se trata de la encapsulación de proteínas. <sup>i</sup> No requiere un aumento de temperatura. <sup>j</sup>	Permite encapsular solo compuestos liposolubles y requiere extensos pasos de lavado. <sup>b</sup>
<b>Diálisis</b>	Miscible en agua, como DMA. <sup>k</sup>	Agua purificada. <sup>k</sup>	Permite encapsular tanto compuestos lipofílicos como hidrofílicos. <sup>k</sup>	Limitado a ciertos polímeros. <sup>k</sup>
<b>Tecnología de fluidos súper críticos</b>	No hace uso de solventes. <sup>f</sup>	Fluido supercrítico. <sup>l</sup>	Ecológico, rentable y no hace uso de solventes tóxicos. <sup>f</sup>	Aplicable solo en polímeros baja masa molecular. <sup>c</sup>

Nota: <sup>a</sup> Makadia & Siegel (2011). <sup>b</sup>Pinto Reis et al. (2006). <sup>c</sup>Soppimath et al. (2001).

<sup>d</sup>Chaisri et al. (2009). <sup>e</sup>Mahapatro & Singh (2011). <sup>f</sup>Sharma (2017). <sup>g</sup>Mohanraj & Chen (2007). <sup>h</sup>Zweers et al. (2004). <sup>i</sup>Jung (2000). <sup>j</sup>Lambert et al. (2001). <sup>k</sup>Mishima (2008).

Chernyak et al. (2001). Alcohol polivinílico (PVA). Tetrahidrofurano (THF).

Dimetilacetamida (DMA).

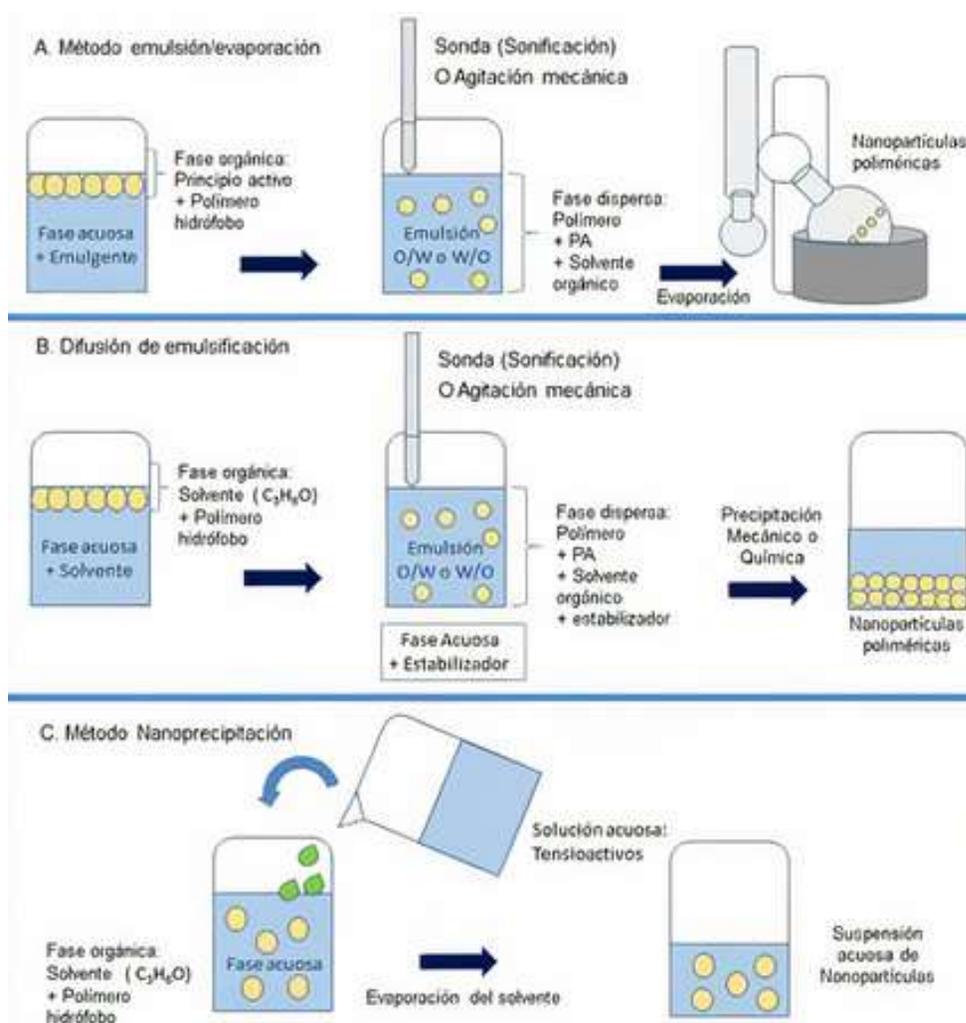
### ***Método de nanoprecipitación***

El método de nanoprecipitación, también llamado método de desplazamiento de solvente, implica la precipitación de un polímero preformado de una solución orgánica y la difusión del solvente orgánico en el medio acuoso en presencia o ausencia de un surfactante (Sharma, 2017; Vauthier et al., 2003). Los polímeros y las drogas se disuelven en un disolvente polar miscible en agua, como acetona, acetonitrilo, etanol o metanol (Mahapatro & Singh, 2011). Luego, la solución se vierte gota a gota en una solución acuosa que contiene un estabilizador. Las NP se forman instantáneamente por rápida difusión del solvente (Figura 2). Finalmente, el disolvente se elimina a presión reducida (Mahapatro & Singh, 2011).

Para facilitar la formación de partículas de polímero coloidal durante el primer paso del procedimiento, la separación de fases se realiza con un solvente totalmente miscible en el que también se disuelve el polímero (Sharma, 2017). Generalmente se informan altas eficiencias de carga para fármacos lipofílicos, sin embargo, la utilidad de esta técnica simple, se limita a los solventes miscibles con agua, en los cuales la velocidad de difusión es suficiente para producir emulsificación espontánea (Mohanraj & Chen, 2007). Los solventes más usados para disolver y aumentar el atrapamiento de drogas son la acetona y el diclorometano (Mohanraj & Chen, 2007; Sharma, 2017), catalogados como clase 3 (bajo potencial tóxico) y clase 2 (disolvente que debe limitarse), respectivamente, según el Consejo Internacional sobre Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de los Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH) (European Medicines Agency, 2019).

Figura 2

Esquema del proceso de síntesis de NP poliméricas. A) Emulsión / evaporación. B) Emulsión / difusión del solvente. C) Nanoprecipitación.



Nota: Tomado de *Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly)* (p. 1463–1471), por Urrejola et al., 2018, International Journal of Morphology.

## **Estudios toxicológicos**

Los estudios de toxicidad permiten analizar el perfil de seguridad de un compuesto de interés médico (Rispin et al., 2002). Además, proporcionan información importante sobre la relación entre las características fisicoquímicas de las NP y sus efectos biológicos (Yang et al., 2017).

### ***Toxicidad Aguda y Dosis Letal Media (DL50)***

La toxicidad aguda puede ser expresada por la DL50, es decir, la dosis que produce la muerte en el 50% de los animales (Rispin et al., 2002). Este tipo de estudios pretenden determinar los efectos a corto plazo de la administración de una dosis única de la sustancia de interés en animales, generalmente roedores (Creton et al., 2010).

### ***Importancia y objetivos de los Estudios de Toxicidad Aguda en el campo de la Nanotecnología***

La nanotecnología ha sido muy aplicada en las ciencias médicas debido a las propiedades de las NP (tamaño pequeño, composición química, estructura, gran área de superficie y forma), pero, dichas propiedades también podrían contribuir a su perfil toxicológico (Donaldson et al., 2006). De hecho, mientras menor sea el tamaño de una partículas, mayor será su área de superficie por unidad de masa; lo que provoca que sean reactivas en el entorno celular (Donaldson et al., 2006). Los estudios de toxicidad aguda buscan definir la capacidad tóxica de la sustancia, la susceptibilidad de los animales dependiendo de su especie o sexo e incluso identificar los órganos en los que se podrían presentar efectos adversos, para monitorearlos en futuros estudios (Creton et al., 2010).

### ***Bases legales para el uso de animales en investigaciones científicas***

El Art. 147 del Código Orgánico de Ambiente de la República del Ecuador expedido el 2017, establece que: “La experimentación con animales vivos se permitirá en universidades, laboratorios o centros de educación únicamente en los casos en donde no sea posible realizar otros procedimientos o alternativas. Se aplicará el principio internacional de reemplazo, reducción y refinamiento de procesos, así como estándares internacionales de bioética” (Codigo Organico Del Ambiente, 2017).

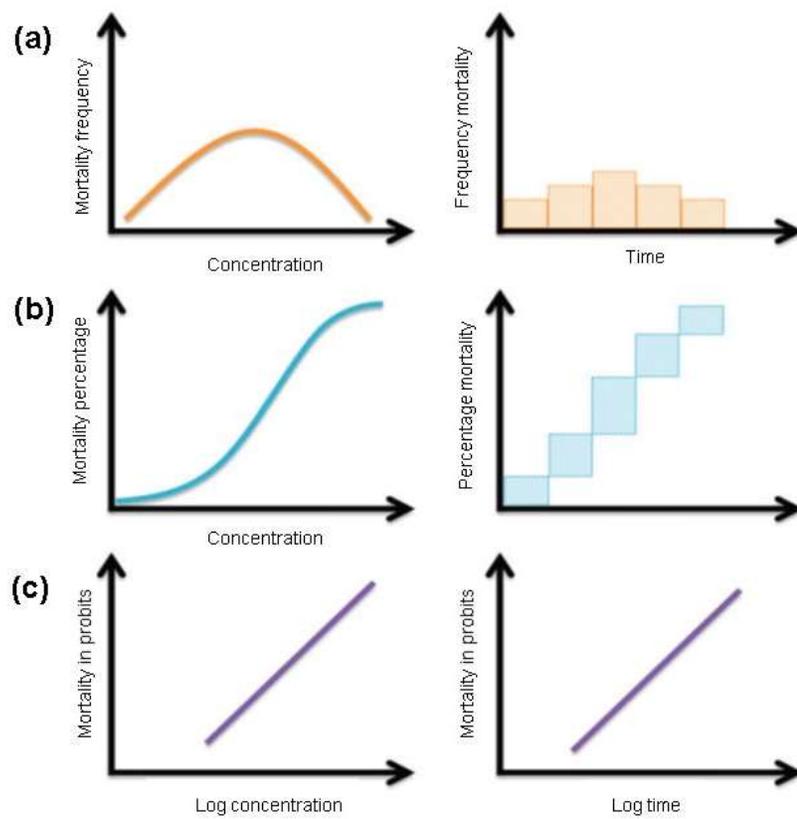
### ***Métodos estadísticos para determinar el DL50***

El método a usar para determinar los valores de DL50 en pruebas de toxicidad aguda depende de la forma de la distribución de tolerancia, es decir el porcentaje de organismos de una población dada que se verá afectada a una cierta dosis (Igbinsa et al., 2013). Según Raj et al. (2019), el valor de la DL50 se puede calcular por los siguientes métodos: Litchfield-Wilcoxon (gráfico) (Litchfield & Wilcoxon, 1949), Miller y Tainter (Miller & Tainter, 1944), Bliss (Bliss, 1934), Finney (Finney, 1972) y Thompson (Thompson, 1947).

Dado que el método Bliss es considerado preciso y sensible, sigue siendo aplicado en numerosos estudios (Li et al., 1995). El método Bliss (o modelo Probit) transforma las relaciones tiempo-mortalidad y dosis-mortalidad en relaciones lineales (Bliss, 1934; Raies & Bajic, 2016) (Figura 3). Este método tiene en cuenta la variación de la susceptibilidad de un individuo a los agentes tóxicos (Bliss, 1934, 1935).

### Figura 3

#### Métodos para representar el porcentaje de mortalidad



Nota: (a) La frecuencia de mortalidad (el número de sujetos muertos) versus la dosis o el tiempo. (b) La frecuencia en porcentajes (porcentaje de sujetos fallecidos). (c) Porcentajes en probits y la dosis o el tiempo en logaritmos. Tomado de *In silico toxicology: Computational methods for the prediction of chemical toxicity*, por Raies & Bajic, 2016, John Wiley & Sons.

## Capítulo III

### Metodología

#### Ubicación del lugar de investigación

##### *Ubicación política*

El proyecto fue ejecutado en el Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales del Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT) y en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE en la provincia de Pichincha, cantón Rumiñahui.

##### *Ubicación geográfica*

Sector Santa Clara General Rumiñahui S/N, Latitud: 0° 18' 53.5" (m), Longitud: 78° 26' 36.5" (m).

##### *Ubicación Ambiental*

Los factores climáticos reportados por el Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del Cantón Rumiñahui (2014), se resumen a continuación:

- Altitud media: 2500 msnm.
- Temperatura: promedio 16°C, mínima 9 °C y máxima 23°C.
- Precipitación media anual: 1000mm.
- Humedad relativa: 73,5%.

##### ***Espacio físico en donde se llevarán a cabo los experimentos con animales***

Los animales fueron tratados bajo las directrices bioéticas de los animales para la experimentación científica expuesto en el Art 7.8.8 de la Organización Internacional de Sanidad animal (OIE) (OIE, 2019).

- **Ubicación:** La experimentación con animales se llevó a cabo en el laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

- **Contención:** Jaula convencional para bioterio 425x276x153 cm estándar tipo 3.
- **Distribución o densidad:** Machos y hembras separados a las 4 semanas de nacidos y 5 ratones por jaula.
- **Alimentación:** Los ratones tienen acceso libre a alimento y bebederos de agua, la composición del alimento se detalla en la Tabla 2.

**Tabla 2.**

*Composición de la comida de los animales de experimentación*

Componente	Porcentaje
Proteína cruda (mín.)	16.0%
Grasa cruda (mín.)	3.0%
Fibra cruda (máx.)	6.0%
Ceniza (máx.)	8.0%
Humedad (máx.)	13.0%

- **Manejo de luz, temperatura, humedad, ruidos y vibraciones:** Acceso a personas autorizadas, aseo dos veces la semana, juguetes de papel dentro de las jaulas.
- **Temperatura:** 18-22°C
- **Humedad relativa:** 30-70%

### **Diseño Experimental**

Para el presente estudio se empleó un diseño bifactorial 5x2 (Tabla 3) mediante el cual se evaluó la influencia de la dosis (factor 1) y el sexo del modelo animal (factor 2)

en la tasa de supervivencia de los modelos animales. Se realizaron 10 tratamientos con 5 repeticiones. Además, se contó con un grupo de control de 11 individuos.

**Tabla 3.**

*Arreglo factorial 5x2 utilizado en el diseño experimental*

<b>Grupo</b>	<b>Dosis de PLGA NP (mg/kg)</b>	<b>Sexo de ratones</b>	<b>Número de repeticiones</b>	<b>Tratamiento</b>
<b>1</b>	Dosis 1	Hembras	5	1
		Machos	5	2
<b>2</b>	Dosis 2	Hembras	5	3
		Machos	5	4
<b>3</b>	Dosis 3	Hembras	5	5
		Machos	5	6
<b>4</b>	Dosis 4	Hembras	5	7
		Machos	5	8
<b>5</b>	Dosis 5	Hembras	5	9
		Machos	5	10

#### ***Tipo de investigación***

Exploratoria, correlacional, con diseño experimental.

#### ***Variables de respuesta***

Las variables de respuesta a este estudio es el número de animales vivos y muertos.

#### ***Operatividad de las variables***

La operatividad de las variables y sus factores se indican en la Tabla 4.

#### ***Recolección de información***

Se registró el peso, mortalidad, signos de toxicidad y análisis anatomopatológico.

**Tabla 4***Operatividad de las variables*

<b>Variable independiente</b>	<b>Variable dependiente</b>
Dosis	Número de individuos muertos
Sexo	Número de individuos muertos

***Análisis de la información***

Para la elaboración de histogramas, la curva de supervivencia y el análisis estadístico mediante pruebas paramétricas como el análisis de varianza ANOVA y pruebas no paramétricas como la prueba Kruskal- Wallis, se hizo uso del software GraphPad Prism versión de software 8.0. (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Para pruebas de comparación de medias, y estadística descriptiva se utilizó el software Microsoft Excel (2016).

**Síntesis y purificación de nanopartículas*****Síntesis de nanopartículas de PLGA***

La síntesis de las PLGA NP se llevó a cabo mediante el método de nanoprecipitación, siguiendo el protocolo descrito por Fessi et al. (1992) modificado. Se utilizó el reactivo Resomer® 502 ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (Sigma Aldrich). El proceso consistió en preparar una solución de PLGA en acetona (Sigma Aldrich), para lo cual se añadió 100 mg de polímero en 10 ml de acetona pura a una temperatura 30° y se dejó en agitación durante 2 horas. Luego, la solución de PLGA-acetona se añadió por goteo a una solución de agua y PEG (Sigma Aldrich) al 0,001%. El PEG se

preparó a partir de una solución madre de 0,01% en agua y se dejó agitar a altas revoluciones por 10 minutos.

La caracterización de las PLGA NP se llevó a cabo en microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FEG-SEM, por sus siglas en inglés) marca Tescan modelo MIRA 3. Previo a la observación, 5  $\mu$ L de PLGA NP fueron colocados sobre obleas de silicio y secadas con flujo de aire continuo por 3 horas en una campana extractora de gases (ESCO EFB-4A2). A continuación, las muestras fueron cubiertas con una capa de aproximadamente 20 nm de oro usando un evaporador marca Quorum modelo Q150R ES y observadas con el detector de electrones secundarios a 10kV.

#### ***Eliminación del solvente de síntesis de las PLGA NP***

Para la eliminación del solvente de síntesis de las PLGA NP (acetona) por destilación al vacío, se utilizó el rotavapor BUCHI R-210. La temperatura del baño María del rotavapor no excedió los 30°C, ya que esta fue la temperatura de síntesis de las NP. Se ajustó la presión a 35 mmHg, debido a que era la más baja posible. Posteriormente, las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido y liofilizadas (ILSHINE Biobase) por 48 horas seguidas.

#### ***Preparación de inóculo***

Las PLGA NP liofilizadas fueron disueltas en el volumen de buffer PBS pH 7.4 autoclavado (Tuttnauer 2540EKA) necesario para obtener soluciones con una concentración peso / volumen acorde con la dosis que será aplicada. Luego, las soluciones fueron homogenizadas utilizando el vórtex Fisher Scientific. En base a la bibliografía consultada y a los resultados obtenidos en el primer ensayo (223 mg / kg), se realizaron pruebas con dosis de 100, 400, 600 y 800 mg / kg. Las

dosis de 600 y 800 mg / kg tuvieron que ser filtradas a través de una membrana estéril con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  (EMD Millipore) debido a la aglomeración de las NP.

### **Administración de las dosis de PLGA NP en ratones**

#### ***Unidades experimentales***

Se utilizaron un total de 61 ratones Balb / c (31 machos, 30 hembras) que pertenecían al Bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, las cuales tenían una edad de 10 semanas y un peso promedio de 33, 38 gramos (Tabla 5).

**Tabla 5.**

*Grupo de Dosis para la Determinación DL50 oral de PLGA NP*

<b>Grupo</b>	<b>PLGA NP mg/kg</b>	<b>Sexo</b>	<b>Número de animales</b>	<b><math>\bar{X}</math> del peso inicial</b>
1	223	Hembras	5	31,40
	223	Machos	5	36,20
2	100	Hembras	5	31,60
	100	Machos	5	38,14
3	400	Hembras	5	30,32
	400	Machos	5	37,84
4	600	Hembras	5	28,98
	600	Machos	5	35,48
5	800	Hembras	5	28,88
	800	Machos	5	35,00
<b>Total</b>			<b>50</b>	<b>33,384</b>

En primer ensayo se administró una dosis de 223 mg /kg de PLGA NP a 10 ratones, mitad machos y mitad hembras, además de 2 ratones en los que no se administraron NP, los cuales sirvieron como control negativo. La dosis inicial se determinó en base a bibliografía y la administración fue oral. Posteriormente tomando en cuenta la dosis del ensayo inicial, se realizaron cuatro ensayos, uno con una dosis

menor (100 mg / kg) y tres con dosis mayores (400, 600 y 800 mg / kg), de igual manera, cada dosis fue administrada en grupos de 10 ratones mitad machos y mitad hembras y se contó con 5 ratones hembra y 4 ratones macho como controles negativos.

### **Características del PLGA**

Para el estudio se utilizó el reactivo Resomer® 502 ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), cuyas especificaciones se resumen en la Tabla 6.

**Tabla 6.**

#### *Información del PLGA*

<b>Característica</b>	<b>Especificación</b>
<b>Nombre</b>	Resomer® RG 502 H, Poly(D,L-lactide-co-glycolide)
<b>Fórmula</b>	$[C_3H_4O_2]_x[C_2H_2O_2]_y$
<b>Número CAS</b>	719889
<b>Empresa</b>	SIGMA-ALDRICH
<b>Lote</b>	BCCB0256

### **Dosis**

Para el estudio se prepararon soluciones de PLGA disueltos en buffer PBS pH de 7,4 autoclavado y cada una fue sometida a vórtex por varios minutos antes de cada administración. Previo a la preparación de las dosis, los animales fueron pesados y se obtuvo el peso promedio general de machos y hembras de cada grupo. Las dosis fueron ajustadas a un volumen de 1 ml, para esto se realizó una disolución de las soluciones madre, como se explica en la Tabla 7.

**Tabla 7***Dosis de PLGA NP administradas en los animales*

Grupo	Sexo	PLGA NP (mg / kg)	$\bar{X}$ del peso de los ratones (kg)	PLGA NP (mg)	Concentración de la Solución madre (mg/ml)	Volumen 1 ml (mg / ml)
1	Hembras	223	0,031	7,002	8,500	0,824
	Machos	223	0,036	8,073	8,500	0,950
2	Hembras	100	0,032	3,160	4,000	0,790
	Machos	100	0,038	3,814	4,000	0,954
3	Hembras	400	0,030	12,128	16,000	0,758
	Machos	400	0,038	15,136	16,000	0,946
4	Hembras	600	0,029	17,388	22,000	0,790
	Machos	600	0,035	21,288	22,000	0,968
5	Hembras	800	0,029	23,104	28,000	0,825
	Machos	800	0,035	28,000	28,000	1,000

***Inoculación***

Para el manejo de los animales de experimentación para la determinación de la DL50 se siguieron los protocolos establecidos en la por el método 420 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD) para el manejo, aplicación y el uso ético de animales (OECD, 2001).

Los animales fueron identificados siguiendo los códigos de perforación de oído (Stewart & Schroeder, 2019) y se registró el peso de cada uno. El volumen administrado fue de 1 ml; y se usó una sonda orogástrica. Primero se procedió a inmovilizar al animal y luego se introdujo la sonda lenta y suavemente, aquí el ratón comienza a tragar y la sonda se inserta dentro del esófago (Fuentes et al., 2008). Los animales del Grupo 1 fueron observados durante 7 días y los animales de los demás grupos durante 14 días luego de la administración, se registró su peso, su comportamiento y mortalidad.

La experimentación con animales fue realizada en el Bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, y se contó con la guía del Doctor Rachid Seqqat, docente investigador del Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura y del CENCINAT.

### **Sacrificio de los animales y necropsias**

El último día se registró el peso de los animales y luego fueron sacrificados por dislocación cervical manual. Luego del sacrificio, se evaluó la presencia de alteraciones a nivel macroscópico.

## Capítulo IV

### Resultados y Discusión

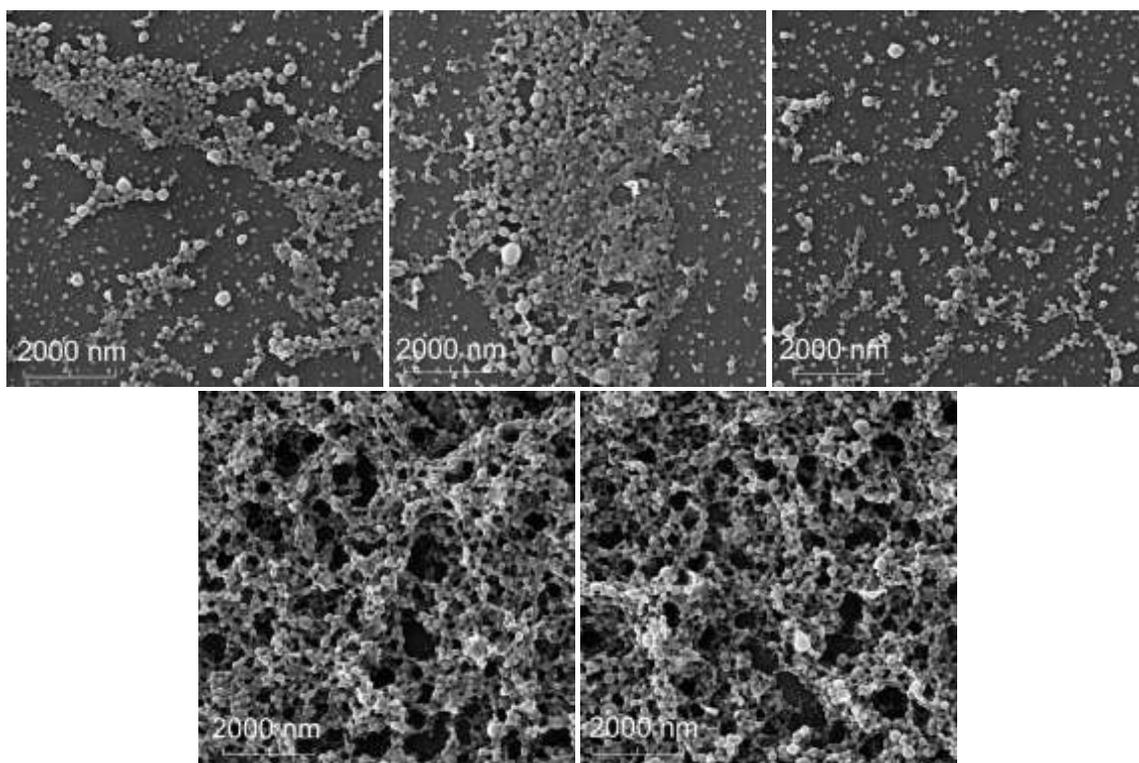
#### Resultados

##### *Caracterización de PLGA NP*

La caracterización de las PLGA NP sintetizadas por el método de Fessi et al. (1992) modificado, se llevó a cabo mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), las imágenes obtenidas se muestran en la Figura 4.

#### Figura 4.

##### *Caracterización de PLGA NP mediante SEM*



*Nota:* La magnitud de las imágenes fue de 66,7 kx a 10 kv. Se midió el diámetro de 534 partículas en el software Image J2, encontrándose que el tamaño promedio es de 149,36nm con una desviación estándar de 56,32 (Rueden et al., 2017).

### ***Sintomatología y toxicidad***

La dosis aplicada inicialmente a un grupo de 10 ratones Balb / c sanos fue de 223 mg /kg, al final de este ensayo los ratones machos presentaron diversos síntomas que incluyen, el debilitamiento físico y cambios de comportamiento. Un ratón de este grupo murió en el día 5. Las hembras no mostraron ningún cambio ni signo de toxicidad. En el momento de las necropsias no se observaron cambios morfológicos macroscópicos en el hígado, corazón, riñón y pulmón.

Los Grupos 2, 3, 4 y 5 no mostraron cambios de comportamiento luego de la administración. En estos grupos el período de observación fue de 14 días, en los cuales no se observó ningún cambio, a diferencia del experimento anterior. Todos los ratones sobrevivieron hasta el final del experimento, sin presentar signos de toxicidad.

### ***Análisis estadístico del peso corporal de los animales antes y después del experimento***

El peso corporal de los animales fue tomado antes de la administración de las PLGA NP y diariamente durante el período de observación. En la Tabla 8 se muestra el resumen del peso corporal de cada grupo de estudio y de los grupos de control.

**Tabla 8**

*Resumen del peso corporal inicial y final de los animales*

<b>Grupo</b>	<b>Sexo</b>	<b>PLGA NP (mg/kg)</b>	<b>Número de animales</b>	<b><math>\bar{X}</math> del peso inicial (g)</b>	<b><math>\bar{X}</math> del peso final (g)</b>
1	Hembras	223	5	31,40	30,66
	Machos	223	5	36,20	37,05
Control	Machos	0	2	32,85	32,98
	Hembras	100	5	31,60	31,38
2	Machos	100	5	38,14	36,40
	Hembras	400	5	30,32	29,34*
3	Machos	400	5	37,84	38,16

Grupo	Sexo	PLGA NP (mg/kg)	Número de animales	$\bar{X}$ del peso inicial (g)	$\bar{X}$ del peso final (g)
4	Hembras	600	5	28,98	29,30
	Machos	600	5	35,48	36,12
5	Hembras	800	5	28,88	29,86
	Machos	800	5	35,00	35,30
Control	Hembras	0	5	29,90	31,06
	Machos	0	4	32,625	33,775

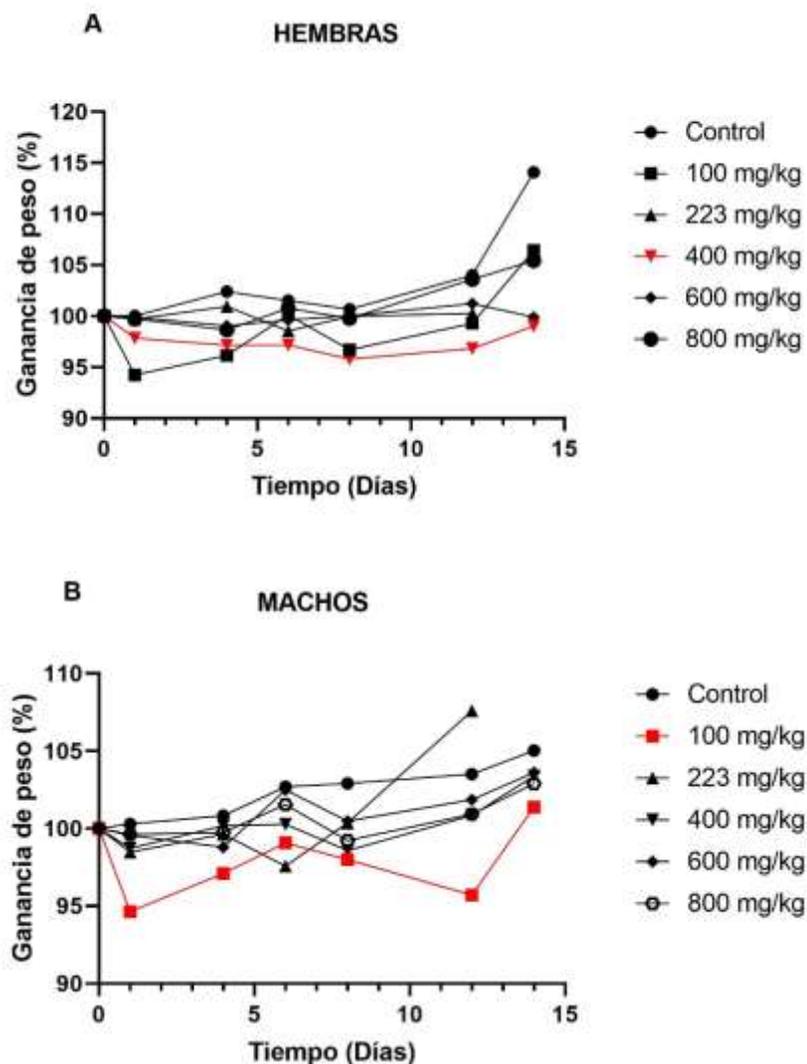
*Nota:* El (\*) indica el grupo en el que se encontró una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre la media del peso inicial y final, Microsoft Excel (2016).

Las medias del peso corporal inicial y final se compararon mediante la prueba t-Student con un 95% de confianza y se demostró que existe una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) únicamente en las hembras del Grupo 3 en las que se administró 400 mg / kg ( $p = 2.3459 \times 10^{-5}$ ).

Los resultados se analizaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para determinar las diferencias entre grupos. Primero, se comparó el peso de cada grupo con el grupo control, se encontró que el porcentaje de ganancia de peso varió significativamente ( $p < 0,05$ ) únicamente en los siguientes casos: hembras tratadas con 400 mg / kg ( $p = 0,0010$ ), machos tratados con 100 mg / kg ( $p = 0,0047$ ) (Figura 5). Los análisis estadísticos fueron realizados con ayuda del software GraphPad Prism versión de software 8.0. (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Figura 5

Análisis del porcentaje de ganancia de peso corporal de los animales durante el período observación



*Nota:* La línea de color rojo indica los grupos que mostraron una variación significativa ( $p < 0,05$ ) con el grupo de control. Los análisis estadísticos y los esquemas fueron elaborados con ayuda del software GraphPad Prism versión de software 8.0. (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Posteriormente, se compararon los pesos de machos y hembras de cada uno de los grupos, el análisis mostró que el porcentaje de ganancia de peso varió significativamente ( $p < 0,05$ ) entre los machos y hembras tratados con las dosis de 100, 400, 600 y 800 mg / kg ( $p = 0.0303, 0.0003, 0.0041, 0.0380$ , respectivamente). El único grupo en el que no se encontró una diferencia entre los resultados de cada sexo fue el Grupo 1 tratado con la dosis de 223 mg / kg ( $p = 0,1863$ ). Las pruebas Kruskal-Wallis se realizaron con el software GraphPad Prism versión de software 8.0. (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Se aplicaron las pruebas Shapiro-Wilk y Kolmogorov–Smirnov para determinar si los datos seguían una distribución normal. Una vez verificada la normalidad, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de tres vías con un diseño de bloques completo al azar, con el propósito de verificar si la influencia de los factores (dosis, sexo y tiempo) sobre la variable de respuesta (porcentaje de ganancia de peso) es estadísticamente significativa. El nivel de confianza considerado para este trabajo fue del 95 %. Se encontró que el factor tiempo influye estadísticamente en la variable de respuesta ( $p < 0,05$ ) en todos los grupos excepto en el Grupo 3 en el que se administró la dosis de 400 mg / kg. Por su parte, el factor dosis tuvo una influencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en todos los grupos, exceptuando el Grupo 1 que corresponde a una dosis de 223 mg / kg. El análisis mostró que el factor sexo y la interacción dosis-sexo tuvieron una influencia significativa en la variable de respuesta ( $p < 0,05$ ) únicamente para el Grupo 3 (400 mg / kg). Estos análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión de software 8.0. (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

### ***Necropsias***

Se examinó meticulosamente la forma y la apariencia de los órganos, y se analizaron las cavidades en busca de alteraciones. Se observó que la administración oral de PLGA NP no produjo un cambio en la forma de los órganos internos, ya que mantenían sus características propias. En la Tabla 9 se detalla el peso promedio de los órganos.

**Tabla 9**

*Resumen del peso de los órganos de ratones tratados con PLGA NP por vía oral.*

Grupo	Sexo	PLGA NP (mg / kg)	$\bar{X}$ del peso (g)			
			Riñones	Control	Hígado	Control
1	Hembras	223	0,346	0,447	1,795	1,616
	Machos	223	0,478	0,447	1,391	1,616
2	Hembras	100	0,345	0,315	1,800	1,775
	Machos	100	0,525	0,508	2,050	1,975
3	Hembras	400	0,330	0,315	1,330	1,775
	Machos	400	0,500	0,508	2,050	1,975
4	Hembras	600	0,320	0,315	1,300	1,775
	Machos	600	0,565	0,330	2,020	1,975
5	Hembras	800	0,295	0,315	1,485	1,775
	Machos	800	0,515	0,508	2,055	1,975

El peso promedio de los órganos de cada grupo se comparó con el grupo de control mediante la prueba estadística t-Student con un 95% de confianza. Se encontró una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre la media del peso de los riñones del Grupo 1 (223 mg / kg) y su grupo de control ( $p = 0.00467839$ ).

### ***Mortalidad Post inoculación***

Los resultados de mortalidad por la administración de una dosis única de PLGA NP mediante vía oral se presentan en la Tabla 10.

**Tabla 10**

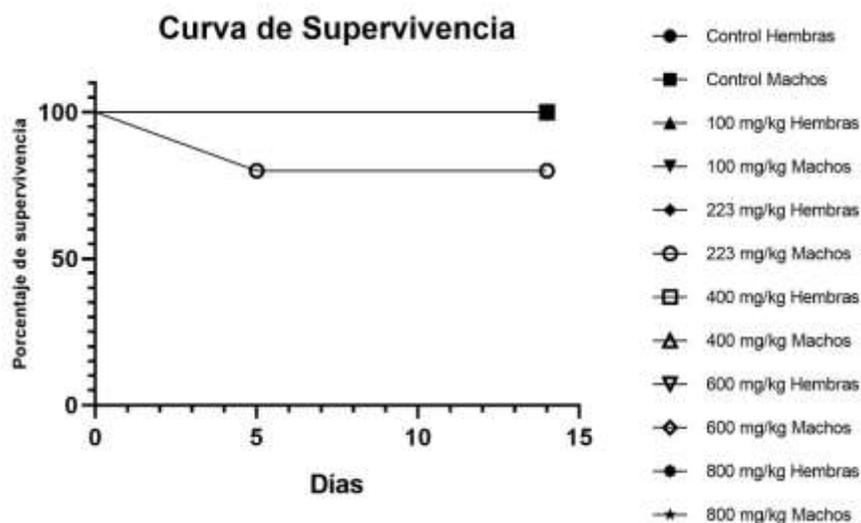
*Mortalidad de los ratones tratados con una dosis única de PLGA NP por vía oral*

<b>Grupo</b>	<b>PLGA NP (mg/kg)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Número de animales</b>	<b>Número de muertos</b>	<b>Número de Vivos</b>
1	223	Hembras	5	0	5
	223	Machos	5	1	4
2	100	Hembras	5	0	5
	100	Machos	5	0	5
3	400	Hembras	5	0	5
	400	Machos	5	0	5
4	600	Hembras	5	0	5
	600	Machos	5	0	5
5	800	Hembras	5	0	5
	800	Machos	5	0	5
Control	0	Hembras	5	0	5
	0	Machos	6	0	6
<b>Total</b>			61	1	60

En la Figura 6 se observa la elevada tasa de supervivencia de los ratones Balb/c tratados por vía oral con PLGA NP en un rango de dosis entre 100 y 800 mg / kg. Mediante las pruebas de prueba de Mantel-Cox y Logrank Test se encontró que no existe una diferencia significativa entre los grupos tratados y el grupo de control, así como tampoco se encontró la influencia del sexo de los animales en la tasa de supervivencia (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

**Figura 6**

*Curva de supervivencia de ratones Balb / c tratados con distintas dosis de PLGA NP*



*Nota:* Esquema elaborado en el software GraphPad Prism versión de software 8.0.

(GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

### ***Determinación de la DL50 de las PLGA NP***

Con los resultados obtenidos no fue posible calcular la DL50, ni por el método Bliss, ni por ningún otro método estadístico, esto debido a que no se estableció el límite de respuesta de 100 % de mortalidad.

### **Discusión**

Actualmente el PLGA es ampliamente usado en aplicaciones de administración de fármacos (Jain, 2000a; Panyam & Labhasetwar, 2003). Por esta razón, este estudio se centró en evaluar la toxicidad de las PLGA NP *in vivo*. Esto, debido a que todavía existe mucha controversia con respecto a los posibles efectos adversos de la administración oral de estos compuestos, por lo que se necesitan estudios que verifiquen la seguridad de estos

materiales (Lü et al., 2009). Adicionalmente, el desarrollo de sistemas de NP requiere una comprensión profunda de la respuesta biológica después de la exposición.

Acorde con Semete et al. (2010) la administración por vía oral de una dosis de 160 mg / kg de PLGA NP en ratones Balb / c ( 20-25 g de peso corporal) con el fin de compararlas con NP industriales, no provocó signos de toxicidad en el riñón, hígado, cerebro y corazón. De igual manera, en el estudio de Paul et al. (2013), se administraron dosis de 50, 75 y 100 mg / kg de PLGA NP cargadas con chelidonine, y se encontró que ninguna de estas dosis causó efectos tóxicos en ratones albinos suizos (20-25 g de peso corporal). Por esta razón, la dosis administrada inicialmente a un grupo de 10 ratones Balb / c sanos fue de 223 mg / kg, que corresponde a una dosis mayor a las mencionadas anteriormente, esto con el fin de observar los resultados y en base a ello seleccionar otras dosis.

Al finalizar el período de observación de este grupo, se encontró que los machos presentaron debilitamiento físico y cambios de comportamiento, además en el quinto día de observación se registró la muerte de un individuo de este grupo. Según (Navarro et al., 2012) las variaciones del comportamiento y apariencia normal de los animales pueden indicar una condición típica relacionada con enfermedad o daño, aunque cuando es así, estos signos suelen ir acompañados de pérdida de peso corporal.

Para determinar si existió o no una pérdida de peso, se realizó un análisis estadístico, el cual mostró que no existió una diferencia significativa (95 % de confianza) entre el peso inicial y final de los animales de este grupo y del mismo modo, la prueba Kruskal-Wallis tampoco mostró una variación significativa entre el porcentaje de ganancia de peso de los machos de este grupo en comparación con el grupo de control. Por otra parte, Fuentes et al. (2008), menciona que estas alteraciones pudieron ser causadas por otras variables como:

cambios de temperatura, iluminación, ruido, dieta o composición del aire. Sin embargo, se descartó estas posibles causas debido a que el grupo de control no mostró cambio alguno. En las necropsias no se observaron cambios morfológicos macroscópicos ni alteraciones en el peso del hígado y los riñones, sin embargo, al comparar las medias del peso de los riñones de los machos de este grupo y el grupo control, se encontró que son significativamente diferentes (95% de confianza).

Debido a estos resultados, para los siguientes ensayos se seleccionó una dosis menor a la inicial (100 mg / kg) y tres dosis mayores (400, 600 y 800 mg / kg). En estos grupos la administración de PLGA NP no provocó ninguna alteración o signo de toxicidad en los individuos de estudio, y tampoco se registró ninguna muerte. El análisis estadístico del peso corporal mostró que existió una diferencia significativa entre el peso inicial y final, de todos los grupos, con una sola excepción (hembras tratadas con 400 mg / kg).

De igual manera, también se encontró diferencias significativas en varios grupos luego de la comparación entre el peso de los individuos de los grupos de estudio con los del grupo control (Figura 5). Esta variación pudo ser causa de los efectos que cualquier sustancia administrada puede ejercer en un organismo, dependiendo de las vías de metabolización y la tasa de distribución de dicha sustancia (Navarro et al., 2012), variables que no se consideraron en el presente estudio. Las necropsias de los animales de experimentación no mostraron ningún cambio en la forma y tamaño de los órganos internos, así como el peso de los riñones e hígado tampoco tuvieron una diferencia significativa con el peso de los órganos del grupo de control.

La influencia del sexo en el porcentaje de ganancia de peso corporal de los animales se verificó mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, en este caso el único grupo en el que no se encontró una diferencia significativa correspondía a la dosis de 223 mg / kg.

Esta influencia se debe básicamente al efecto de las hormonas sexuales sobre la regulación del peso corporal (Shi & Clegg, 2009).

Con los resultados obtenidos en este estudio (Tabla 10), el cálculo de la DL50 fue imposible, ya que Bliss (1935) menciona que para el cálculo de este parámetro es imprescindible conocer una dosis que provoque el 100 % de supervivencia (100 mg / kg) y conocer la dosis que provoque el 100 % de mortalidad, misma que en este estudio no se pudo estimar. No se aumentó la dosis de PLGA NP en otro grupo de ratones debido a que resulta inútil aplicar dosis extremadamente altas, si éstas no tendrán una aplicación como tal en la encapsulación de fármacos, como lo demuestra el estudio publicado por Sarti et al. (2011), en el que se administró por vía oral 100 µl de solución de PLGA NP cargadas con ovoalbúmina (OVA) e el inmunoadyuvante monofosforil lípido A (MPLA) al 1 % (p / v) en ratones Balb / c (dosis que corresponde aproximadamente a 40 mg / kg) los cuales no mostraron ningún signo de toxicidad.

De igual manera los estudios realizados por Gajendiran et al. (2013), (2014); Mittal et al. (2007); y Yin et al. (2007); en los que se utilizaron ratones como modelo animal para la administración por vía oral de dosis aproximadas de 136, 98 mg / kg, 12 mg / kg, 5 mg / kg y 1 mg / kg de PLGA NP, respectivamente. Pero, cabe destacar que estas dosis de PLGA solo, no son exactas, ya que los datos mostrados en los artículos corresponden a todo el sistema de suministro de fármacos y esto incluye las PLGA NP, el fármaco de estudio y los adyuvantes.

Otros estudios, como la investigación de Guo et al. (2015), en la cual se estudió la toxicidad de NP de PEG-poly L-lysine (PLL)- PLGA (PEG-PLL-PLGA) administradas por vía intravenosa cargadas con el fármaco daunorubicin, muestra que la DL50 de sus NP fue de 464.4 mg / kg. En dicha investigación el cálculo de la DL50, fue posible debido a que se la

administración se realizó por vía intravenosa, en este caso se evita el metabolismo de primer paso, por lo que una mayor cantidad de PLGA NP pueden llegar directamente al torrente sanguíneo. Además, las PLGA NP estaban cargadas con un fármaco que posee cierto grado de toxicidad por sí mismo.

En el presente estudio se demostró que las PLGA NP sintetizadas por el método de nanoprecipitación siguiendo el protocolo descrito por Fessi et al. (1992) modificado, no muestran ningún efecto tóxico en un rango de dosis de 100 a 800 mg / kg. En adición, se demostró que la composición química del compuesto Resomer® 502 ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y los reactivos que intervinieron en la síntesis de NP, no contribuyeron a la toxicidad, lo que significa que el proceso de purificación por destilación al vacío y liofilización fue exitoso, ya que no se detectó la existencia de trazas de acetona en el inóculo. Este tipo de destilación fue muy útil, debido a que nos permitió usar temperaturas más bajas, por lo tanto, las PLGA NP al ser térmicamente sensibles se pudieron procesar fácilmente.

A pesar de esto, se presentaron ciertas dificultades durante la preparación del inóculo, puesto que luego del proceso de liofilización, las PLGA NP presentaban aglomeraciones. Según Ramos (2017), este problema puede estar relacionado con ciertas variables como la morfometría de la partícula, la humedad residual y la osmolaridad; y puede ser evitado modificando la concentración de PEG de las NP, ya que este compuesto sirve a la vez como lioprotector.

Debido a la aglomeración de las PLGA NP, los inóculos para las dosis de 600 y 800 mg / kg tuvieron que ser filtrados y esto pudo provocar la pérdida de un porcentaje de PLGA NP de estas soluciones. El proceso de filtración, es necesario para que el inóculo sea una mezcla homogénea, Guedj et al. (2015) menciona que inóculo fue filtrado con una membrana estéril de tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , y por tal razón las dosis administradas que

se reportan en el estudio (entre 20 y 1000  $\mu\text{g}$  por ratón) toman en cuenta únicamente la concentración de fármaco, mas no la concentración de PLGA. Danhier et al. (2009) también reportó que las suspensiones de PLGA NP cargadas con paclitaxel, tuvieron que ser filtradas con membranas de poros de 1,2  $\mu\text{m}$ , por lo que la concentración final del fármaco administrada tuvo que ser determinada por HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia). De manera similar, Duan et al. (2006) menciona que las diferentes dosis de PLGA NP cargadas con mitoxantrone contienen entre 20 y 50  $\mu\text{g}$  de fármaco, determinada por HPLC y una cantidad 3 mg polímero estimada a partir del porcentaje de encapsulación del fármaco.

Esto demuestra que estudios de PLGA NP en sistemas de administración de fármacos por vía intravenosa, reportan la concentración de fármaco administrada, pero se desconoce la concentración de PLGA exacta y solo se puede calcular un estimado de la misma. La determinación de la concentración exacta de PLGA en el filtrado, se podría realizar mediante técnicas como la espectroscopía UV-visible (Castellanos et al., 2018), esto puede ser tomado en cuenta para estudios posteriores.

La baja toxicidad de las PLGA NP y la razón por la que se consideran biodegradables, se debe a que experimentan la hidrólisis de sus enlaces éster en presencia de agua y sufren una degradación enzimática, para así producir los monómeros originales, ácido láctico y ácido glicólico, que son subproductos de varias vías metabólicas en el cuerpo en condiciones fisiológicas normales, mismos que pueden ser metabolizados y finalmente son eliminados del cuerpo por el ciclo de Krebs (Burch & Wood, 1991; Lü et al., 2009). Estos productos de biodegradación del PLGA se forman a una velocidad muy lenta y, por lo tanto, no afectan la función celular normal (Semete et al., 2010). La tasa de degradación de los polímeros PLGA está relacionada con la proporción de monómeros utilizados en la producción; el polímero que contiene una proporción de 50:50 de ácidos láctico y glicólico,

como el usado en este trabajo, se hidroliza mucho más rápido que los que contienen proporciones más altas de cualquiera de los dos monómeros (Jain, 2000b; Kitchell & Wise, 1985). Por tanto, existe una toxicidad sistémica mínima asociada con el uso de PLGA para la administración de fármacos o aplicaciones de biomateriales (Lü et al., 2009).

Si bien las necropsias realizadas no mostraron ningún cambio morfológico en los tejidos evaluados, lo que demuestra que las PLGA NP no causaron efectos tóxicos en las células, para garantizarlo hacen falta estudios histológicos. Se debe tomar en cuenta que, según Semete et al. (2010) la administración oral de PLGA NP con una capa de moléculas hidrofílicas de polietilenglicol (PLGA-PEG) minimizan la opsonización de las partículas, aumentando así el tiempo de circulación en la sangre con el eventual efecto de minimizar la cantidad de partículas que llegan al hígado.

Hasta el momento, se han utilizado diversos tensioactivos hidrofílicos para minimizar la opsonización. Los poloxámeros, las poloxaminas y otros polímeros como el quitosano también pueden usarse para este propósito. Esto, a su vez, minimizará el metabolismo de primer paso de los fármacos encapsulados (Storm et al., 1995).

Aunque en este estudio no se encontró evidencia que sustente algún efecto tóxico PLGA NP cuando se administran por vía oral en las dosis de hasta 800 mg / kg en ratones Balb / c. Es necesario realizar más estudios con otros sistemas de suministro de fármacos poliméricos a nanoescala, para evaluar su seguridad. Con este enfoque, la administración de medicamentos que tienen poca permeabilidad y solubilidad se puede mejorar en gran medida con sistemas de administración de medicamentos seguros y efectivos (Lü et al., 2009).

## Capítulo V

### Conclusiones y Recomendaciones

#### Conclusiones

- Las PLGA NP fueron sintetizadas por el método de nanoprecipitación, siguiendo el método de Fessi et al. (1992) modificado.
- El solvente de síntesis de las PLGA NP, acetona pura, se eliminó totalmente mediante la destilación al vacío de las soluciones de PLGA NP, y la posterior liofilización del producto de dicha destilación durante 48 horas seguidas.
- No fue posible determinar la DL50 de las PLGA NP mediante el Método Bliss, debido a que las dosis administradas: 100, 223, 400, 600 y 800 mg / kg, no lograron el límite de respuesta de 100 % de mortalidad.
- No se encontró evidencia de que el sexo influyó en su respuesta de los animales ante la administración oral de diferentes dosis de PLGA NP, esto debido a la alta tasa de supervivencia de los animales.

#### Recomendaciones

- Debido a las complicaciones encontradas para disolver las PLGA NP liofilizadas, en buffer PBS, se debe probar otras soluciones que puedan ser usadas en reemplazo de este buffer. También se recomienda estudiar si es posible administrar directamente la solución de PLGA NP en agua destilada, producto de la destilación al vacío.
- La concentración de PEG y su rol como agente protector frente a la liofilización, debe ser estudiada con más profundidad, para así evitar la aglomeración de las PLGA NP luego de este proceso.
- Es conveniente probar si es posible determinar la concentración de PLGA NP de una solución filtrada mediante espectrofotometría UV-visible o mediante otra técnica.

- El cálculo de la DL50 por vía intravenosa, también puede ser motivo de estudio. Esta forma de administración permite que una mayor cantidad de la sustancia administrada llegue directamente al torrente sanguíneo, eliminando la posibilidad de metabolismo de primer paso.

## **Bibliografía**

- Anderson, J. M., & Shive, M. S. (1997). Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 28(1), 5–24.  
[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00048-3)
- Bazile, D. V., Ropert, C., Huve, P., Verrecchia, T., Mariard, M., Frydman, A., Veillard, M., & Spenlehauer, G. (1992). Body distribution of fully biodegradable [14C]-poly(lactic acid) nanoparticles coated with albumin after parenteral administration to rats. *Biomaterials*, 13(15), 1093–1102. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(92\)90142-B](https://doi.org/10.1016/0142-9612(92)90142-B)
- Bliss, C. I. (1934). The method of probits. *Science*, 79(2037), 38–39.  
<https://doi.org/10.1126/science.79.2037.38>
- Bliss, C. I. (1935). The Calculation of the Dosage-Mortality Curve. *Annals of Applied Biology*, 22(1), 134–167. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1935.tb07713.x>
- Burch, J., & Wood, E. (1991). Biochemistry. *Biochemical Education*, 19(4), 221–222.  
[https://doi.org/10.1016/0307-4412\(91\)90117-q](https://doi.org/10.1016/0307-4412(91)90117-q)
- Castellanos, I., Velandia, J., González, M., Varela, D., & Ramírez, E. (2018). *Aplicaciones Y Generalidades De Un Espectrofotómetro Uv-Vis Uv-1800 De Shimadzu*. Ediciones EAN.  
<http://editorial.universidadean.edu.co/media/pdf-ean/aplic-genera-espectrofoto.pdf>
- Chaisri, W., Hennink, W., & Okonogi, S. (2009). Preparation and Characterization of

Cephalexin Loaded PLGA Microspheres. *Current Drug Delivery*, 6(1), 69–75.

<https://doi.org/10.2174/156720109787048186>

Cheng, J., Teply, B. A., Sherifi, I., Sung, J., Luther, G., Gu, F. X., Levy-Nissenbaum, E., Radovic-Moreno, A. F., Langer, R., & Farokhzad, O. C. (2007). Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials*, 28(5), 869–876. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.09.047>

Chernyak, Y., Henon, F., Harris, R. B., Gould, R. D., Franklin, R. K., Edwards, J. R., Desimone, J. M., & Carbonell, R. G. (2001). Formation of perfluoropolyether coatings by the rapid expansion of supercritical solutions (RESS) process. Part 1: Experimental results. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 40(26), 6118–6126. <https://doi.org/10.1021/ie010267m>

Clawson, C., Huang, C. T., Futralan, D., Martin Seible, D., Saenz, R., Larsson, M., Ma, W., Minev, B., Zhang, F., Ozkan, M., Ozkan, C., Esener, S., & Messmer, D. (2010). Delivery of a peptide via poly(d,l-lactic-co-glycolic) acid nanoparticles enhances its dendritic cell-stimulatory capacity. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(5), 651–661. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.03.001>

Creton, S., Dewhurst, I. C., Earl, L. K., Gehen, S. C., Guest, R. L., Hotchkiss, J. A., Indans, I., Woolhiser, M. R., & Billington, R. (2010). Acute toxicity testing of chemicals - Opportunities to avoid redundant testing and use alternative approaches. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(1), 50–83. <https://doi.org/10.3109/10408440903401511>

Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., & Pr at, V. (2012). PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 505–522. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.043>

- Danhier, F., Lecouturier, N., Vroman, B., Jérôme, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O., & Pr at, V. (2009). Paclitaxel-loaded PEGylated PLGA-based nanoparticles: In vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 133(1), 11–17.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.09.086>
- Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G., & Alexander, A. (2006). Carbon nanotubes: A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicological Sciences*, 92(1), 5–22.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj130>
- Duan, Y., Sun, X., Gong, T., Wang, Q., & Zhang, Z. (2006). Preparation of DHAQ-loaded mPEG-PLGA-mPEG nanoparticles and evaluation of drug release behaviors in vitro/in vivo. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(6), 509–516.  
<https://doi.org/10.1007/s10856-006-8933-3>
- Duvvuri, S., Janoria, K. G., & Mitra, A. K. (2005). Development of a novel formulation containing poly(D,L-lactide-co- glycolide) microspheres dispersed in PLGA-PEG-PLGA gel for sustained delivery of ganciclovir. *Journal of Controlled Release*, 108(2–3), 282–293. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.09.002>
- Esmaeili, F., Ghahremani, M. H., Esmaeili, B., Khoshayand, M. R., Atyabi, F., & Dinarvand, R. (2008). PLGA nanoparticles of different surface properties: Preparation and evaluation of their body distribution. *International Journal of Pharmaceutics*, 349(1–2), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.07.038>
- European Medicines Agency. (2019). ICH guideline Q3C (R6) on impurities: Guideline for Residual Solvents. *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, 31, 24.

- Fessi, C., Devissaguet, J. ., Puisieux, F., & Thies, C. (1992). *Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles*.  
<https://patentimages.storage.googleapis.com/bb/3c/b4/8aa5b233ae6809/US5118528.pdf>
- Finney, D. (1972). Finney, D. J.: Probit analysis. 3. Aufl. Cambridge University Press, Cambridge 1971. XV, 333 S., 41 Rechenbeispiele, 20 Diagr., 8 Tab., 231 Lit., L 5.80.  
*Biometrische Zeitschrift*, 14(1), 72–72. <https://doi.org/10.1002/bimj.19720140111>
- Fuentes, F., Mendoza, R., Rosales, A., & Cisneros, A. (2008). Guia de manejo y cuidado de animales de laboratorio:Raton. In *Instituto nacional de salud* (Issue 0511).  
[www.ins.gob.pe/insvirtual/images/.../GUIA\\_ANIMALES\\_RATON.pdf](http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/.../GUIA_ANIMALES_RATON.pdf)
- Gajendiran, M., Gopi, V., Elangovan, V., Murali, R. V., & Balasubramanian, S. (2013). Isoniazid loaded core shell nanoparticles derived from PLGA-PEG-PLGA tri-block copolymers: In vitro and in vivo drug release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.008>
- Gajendiran, M., Yousuf, S. M. J., Elangovan, V., & Balasubramanian, S. (2014). Gold nanoparticle conjugated PLGA-PEG-SA-PEG-PLGA multiblock copolymer nanoparticles: Synthesis, characterization, in vivo release of rifampicin. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(4), 418–427. <https://doi.org/10.1039/c3tb21113d>
- Ghahremankhani, A. A., Dorkoosh, F., & Dinarvand, R. (2007). PLGA-PEG-PLGA tri-block copolymers as an in-situ gel forming system for calcitonin delivery. *Polymer Bulletin*, 59(5), 637–646. <https://doi.org/10.1007/s00289-007-0807-4>
- Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal del Cantón Rumiñahui. (2014). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento territorial Actualización 2014 - 2019*.

- Gref, R., Lück, M., Quellec, P., Marchand, M., Dellacherie, E., Harnisch, S., Blunk, T., & Müller, R. H. (2000). "Stealth" corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): Influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18(3–4), 301–313. [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(99\)00156-3](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(99)00156-3)
- Guedj, A. S., Kell, A. J., Barnes, M., Stals, S., Gonçalves, D., Girard, D., & Lavigne, C. (2015). Preparation, characterization, and safety evaluation of poly(Lactide-co-glycolide) nanoparticles for protein delivery into macrophages. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 5965–5979. <https://doi.org/10.2147/IJN.S82205>
- Guo, L., Chen, B., Liu, R., Liu, P., Xia, G., Wang, Y., Li, X., Chen, W., Wang, X., & Jiang, H. (2015). Biocompatibility assessment of polyethylene glycol-poly L-lysine-poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles in vitro and in vivo. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(5), 3710–3719. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9509>
- Hamdy, S., Molavi, O., Ma, Z., Haddadi, A., Alshamsan, A., Gobti, Z., Elhasi, S., Samuel, J., & Lavasanifar, A. (2008). Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8+ T cell-mediated anti-tumor immunity. *Vaccine*, 26(39), 5046–5057. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.035>
- Igbinosa, O. O., Oviasogie, E. F., Igbinosa, E. O., Igene, O., Igbinosa, I. H., & Idemudia, O. G. (2013). Effects of biochemical alteration in animal model after short-term exposure of jatropha curcas (Linn) leaf extract. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/798096>
- Jain, R. A. (2000a). 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)

Jain, R. A. (2000b). 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)

Jeong, B., Bae, Y., & Kim, S. (2000). In Situ Gelation of PEG-PLGA-PEG Triblock Copolymer Aqueous Solutions and Degradation Thereof. *Journal of Biomedical Materials Research*, 50(2). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(200005\)50:2<171::AID-JBM11>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(200005)50:2<171::AID-JBM11>3.0.CO;2-F)

Jiang, W., Gupta, R. K., Deshpande, M. C., & Schwendeman, S. P. (2005). Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 57, Issue 3 SPEC. ISS., pp. 391–410). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.09.003>

Jung, T. (2000). Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1), 147–160. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00084-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00084-9)

Kim, D., El-Shall, H., Dennis, D., & Morey, T. (2005). Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 40(2), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2004.05.007>

Kitchell, J. P., & Wise, D. L. (1985). [32] Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug—polymer matrix systems. *Methods in Enzymology*, 112(C), 436–448. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(85\)12034-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(85)12034-3)

- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. In *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (Vol. 75, Issue 1, pp. 1–18). *Colloids Surf B Biointerfaces*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>
- Lambert, G., Fattal, E., & Couvreur, P. (2001). Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 99–112. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00116-2)
- Li, J., Feng, L., Fan, L., Zha, Y., Guo, L., Zhang, Q., Chen, J., Pang, Z., Wang, Y., Jiang, X., Yang, V. C., & Wen, L. (2011). Targeting the brain with PEG-PLGA nanoparticles modified with phage-displayed peptides. *Biomaterials*, 32(21), 4943–4950. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.031>
- Li, Y. P., Pei, Y. Y., Zhang, X. Y., Gu, Z. H., Zhou, Z. H., Yuan, W. F., Zhou, J. J., Zhu, J. H., & Gao, X. J. (2001). PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: Synthesis, preparation and biodistribution in rats. *Journal of Controlled Release*, 71(2), 203–211. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00218-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00218-8)
- Litchfield, J. J., & Wilcoxon, F. . (1949). Simplified method of evaluating dose- effect experiment. *J Pharmacol Exp Ther.*, 96(2), 99–113.
- Lü, J. M., Wang, X., Marin-Muller, C., Wang, H., Lin, P. H., Yao, Q., & Chen, C. (2009). Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. In *Expert Review of Molecular Diagnostics* (Vol. 9, Issue 4, pp. 325–341). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1586/erm.09.15>
- Mahapatro, A., & Singh, D. K. (2011). Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*, 9, 55. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-55>

- 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>
- Miller, L. C., & Tainter, M. L. (1944). Estimation of the ED50 and Its Error by Means of Logarithmic-Probit Graph Paper. *Experimental Biology and Medicine*, 57(2), 261–264.  
<https://doi.org/10.3181/00379727-57-14776>
- Codigo Organico Del Ambiente, Registro Oficial Suplemento 983 1 (2017).  
[http://gobiernoabierto.quito.gob.ec/Archivos/Transparencia/2017/07julio/A2/ANEXOS/PROCU\\_CODIGO\\_ORGANICO\\_ADMINISTRATIVO.pdf](http://gobiernoabierto.quito.gob.ec/Archivos/Transparencia/2017/07julio/A2/ANEXOS/PROCU_CODIGO_ORGANICO_ADMINISTRATIVO.pdf)
- Mir, M., Ahmed, N., & Rehman, A. ur. (2017). Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. In *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (Vol. 159, pp. 217–231). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.038>
- Mishima, K. (2008). Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 60, Issue 3, pp. 411–432). Adv Drug Deliv Rev. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.02.003>
- Mittal, G., Sahana, D. K., Bhardwaj, V., & Ravi Kumar, M. N. V. (2007). Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*, 119(1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.01.016>
- Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2007). Nanoparticles - A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(1), 561–573. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v5i1.14634>
- Navarro, J. A., Ramírez, R. A., & Villagrán, C. (2012). *Manual de procedimientos*

*recomendables para investigación con animales* (Issue 1).

<https://doi.org/10.16309/j.cnki.issn.1007-1776.2003.03.004>

OECD. (2001). Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure (chptr). *Oecd Guideline for Testing of Chemicals, December*, 1–14. <https://doi.org/10.1787/9789264070943-en>

Olivier, J. C., Fenart, L., Chauvet, R., Pariat, C., Cecchelli, R., & Couet, W. (1999). Indirect evidence that drug brain targeting using polysorbate 80- coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity. *Pharmaceutical Research*, 16(12), 1836–1842. <https://doi.org/10.1023/A:1018947208597>

Panagi, Z., Beletsi, A., Evangelatos, G., Livaniou, E., Ithakissios, D. S., & Avgoustakis, K. (2001). Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA-mPEG nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 221(1–2), 143–152. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00676-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00676-7)

Panyam, J., & Labhasetwar, V. (2003). Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 55, Issue 3, pp. 329–347). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00228-4)

Paul, A., Das, S., Das, J., Samadder, A., & Khuda-Bukhsh, A. R. (2013). Cytotoxicity and apoptotic signalling cascade induced by chelidonine-loaded PLGA nanoparticles in HepG2 cells in vitro and bioavailability of nano-chelidonine in mice in vivo. *Toxicology Letters*, 222(1), 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.07.006>

Peter Christoper, G. V., Vijaya Raghavan, C., Siddharth, K., Siva Selva Kumar, M., & Hari Prasad, R. (2014). Formulation and optimization of coated PLGA - Zidovudine nanoparticles using factorial design and in vitro in vivo evaluations to determine brain targeting efficiency. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22(2), 133–140.

<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.04.002>

Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., & Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. In *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (Vol. 2, Issue 1, pp. 8–21). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>

Raies, A. B., & Bajic, V. B. (2016). In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 6(April), 147–172. <https://doi.org/10.1002/wcms.1240>

Raj, J., Chandra, M., Dogra, T. D., & Pahuja, M. (2019). *Determinación de la dosis letal media de combinación de endosulfán y cipermetrina en ratas Wistar Abstracto*. 20(1), 1–5.

Ramos, G. (2017). Optimización del proceso de liofilización de sistemas nanoestructurados de flurbiprofeno para uso oftálmico y su influencia en el comportamiento biofarmacéutico. *Universitat de Barcelona*, 25–158.

Reul, R., Tsapis, N., Hillaireau, H., Sancey, L., Mura, S., Recher, M., Nicolas, J., Coll, J. L., & Fattal, E. (2012). Near infrared labeling of PLGA for in vivo imaging of nanoparticles. *Polymer Chemistry*, 3(3), 694–702. <https://doi.org/10.1039/c2py00520d>

Rispin, A., Farrar, D., Margosches, E., Gupta, K., Stitzel, K., Carr, G., Greene, M., Meyer, W., & McCall, D. (2002). Alternative methods for the median lethal dose (LD50) test: The up-and-down procedure for acute oral toxicity. *ILAR Journal*, 43(4), 233–243. <https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.233>

Rueden, C. T., Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., &

- Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 529. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Sahoo, S. K., Dilnawaz, F., & Krishnakumar, S. (2008). Nanotechnology in ocular drug delivery. In *Drug Discovery Today* (Vol. 13, Issues 3–4, pp. 144–151). Drug Discov Today. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.10.021>
- Sarti, F., Perera, G., Hintzen, F., Kotti, K., Karageorgiou, V., Kammona, O., Kiparissides, C., & Bernkop-Schnürch, A. (2011). In vivo evidence of oral vaccination with PLGA nanoparticles containing the immunostimulant monophosphoryl lipid A. *Biomaterials*, 32(16), 4052–4057. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.011>
- Semete, B., Booyesen, L., Kalombo, L., Ramalapa, B., Hayeshi, R., & Swai, H. S. (2012). Effects of protein binding on the biodistribution of PEGylated PLGA nanoparticles post oral administration. *International Journal of Pharmaceutics*, 424(1–2), 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.043>
- Semete, B., Booyesen, L., Lemmer, Y., Kalombo, L., Katata, L., Verschoor, J., & Swai, H. S. (2010). In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(5), 662–671. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.02.002>
- Sharma, D. (2017). Polymeric Nanoparticles Preparation Techniques and Applications for Drug Delivery System- a Brief Review. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6(6), 256–282. <https://doi.org/10.20959/wjpr20176-8474>
- Shenoy, D. B., & Amiji, M. M. (2005). Poly(ethylene oxide)-modified poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles for targeted delivery of tamoxifen in breast cancer. *International Journal of Pharmaceutics*, 293(1–2), 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.12.010>

- Shi, H., & Clegg, D. J. (2009). Sex differences in the regulation of body weight. *Physiology and Behavior*, *97*(2), 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.017>
- Siegel, S. J., Kahn, J. B., Metzger, K., Winey, K. I., Werner, K., & Dan, N. (2006). Effect of drug type on the degradation rate of PLGA matrices. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *64*(3), 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.06.009>
- Soppimath, K. S., Aminabhavi, T. M., Kulkarni, A. R., & Rudzinski, W. E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 70, Issues 1–2, pp. 1–20). J Control Release. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00339-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00339-4)
- Storm, G., Belliot, S. O., Daemen, T., & Lasic, D. D. (1995). Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 17, Issue 1, pp. 31–48). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0169-409X\(95\)00039-A](https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00039-A)
- Sundback, C. A., Shyu, J. Y., Wang, Y., Faquin, W. C., Langer, R. S., Vacanti, J. P., & Hadlock, T. A. (2005). Biocompatibility analysis of poly(glycerol sebacate) as a nerve guide material. *Biomaterials*, *26*(27), 5454–5464. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.004>
- Thompson, W. (1947). Use of moving averages and interpolation to estimate median-effective dose; fundamental formulas, estimation of error, and relation to other methods. *Bacteriol Rev*, *11*(2), 115–145.
- Tiainen, J., Soini, Y., Törmälä, P., Waris, T., & Ashammakhi, N. (2004). Self-reinforced polylactide/polyglycolide 80/20 screws take more than 1 1/2 years to resorb in rabbit

- cranial bone. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 70(1), 49–55. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30013>
- Tobío, M., Gref, R., Sánchez, A., Langer, R., & Alonso, M. J. (1998). Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharmaceutical Research*, 15(2), 270–275. <https://doi.org/10.1023/A:1011922819926>
- Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., & Shakesheff, K. M. (1999). Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chemical Reviews*, 99(11), 3181–3198. <https://doi.org/10.1021/cr940351u>
- Urrejola, M. C., Soto, L. V., Zumarán, C. C., Peñaloza, J. P., Álvarez, B., Fuentevilla, I., & Haidar, Z. S. (2018). Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). *International Journal of Morphology*, 36(4), 1463–1471. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022018000401463>
- Vauthier, C., Dubernet, C., Fattal, E., Pinto-Alphandary, H., & Couvreur, P. (2003). Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 55, Issue 4, pp. 519–548). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(03\)00041-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(03)00041-3)
- Yang, Y., Qin, Z., Zeng, W., Yang, T., Cao, Y., Mei, C., & Kuang, Y. (2017). Toxicity assessment of nanoparticles in various systems and organs. *Nanotechnology Reviews*, 6(3), 279–289. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0047>
- Yin, Y. S., Chen, D. W., Qiao, M. X., Wei, X. Y., & Hu, H. Y. (2007). Lectin-conjugated PLGA nanoparticles loaded with thymopentin: Ex vivo bioadhesion and in vivo biodistribution. *Journal of Controlled Release*, 123(1), 27–38.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.06.024>

Zweers, M. L. T., Engbers, G. H. M., Grijpma, D. W., & Feijen, J. (2004). In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide). *Journal of Controlled Release*, 100(3), 347–356.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.09.008>