

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
INFORME DE ACTIVIDADES DE SERVICIO SOCIAL

**“Nano-encapsulación de fitofármacos para su uso en el tratamiento contra el
cáncer de mama”.**

PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO

Diseño y desarrollo de formas farmacéuticas

Alumna: Janeth Andrea Campos Díaz

Matrícula: 2143025185

Asesores: Dr. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO

Dr. EDUARDO SAN MARTÍN MARTINEZ

Lugar de realización: Laboratorio de Biomateriales. Centro de Investigación en
Ciencia Aplicada Tecnología Avanzada Unidad Legarí.

Fecha de inicio y terminación: Enero 2019 -Julio 2019

Septiembre, 2019

Índice

INTRODUCCIÓN	4
MARCO TEÓRICO	5
Antecedentes	5
Nanopartículas	6
Alcohol polivinílico (PVA).....	8
Ácido poliláctico (PLA)	9
Cancerina y pristimerina	11
Dispersión de luz dinámica	13
OBJETIVOS	15
DESARROLLO EXPERIMENTAL	16
Fases a seguir	16
Equipos utilizados.....	16
Elección del método para elaborar nanopartículas	16
Determinación de la mejor formulación y análisis IR de las nano-partículas sin carga	18
Determinación del tamaño de partícula.....	19
Elaboración de nanopartículas cargadas con pristimerina.....	19
Eficiencia de encapsulación.....	20
Estabilidad de las nanopartículas	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
Determinación del tamaño de partícula	23
Determinación de la mejor formulación	23
Análisis IR de las nanopartículas	24
Nanopartículas cargadas con pristimerina	30
Eficiencia de encapsulación.....	32
Estabilidad de las nanopartículas	34
OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS	36
CONCLUSIONES	37
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

Vo. Bo. DEL CONTENIDO ACADÉMICO	41
RESUMEN	43
Vo. Bo. DEL CONTENIDO ACADÉMICO	45
ANEXO 1	46

Introducción

Las nanopartículas son utilizadas como vehículos de administración de fármacos, generalmente son menores a 100 nm en al menos una dimensión, y consisten en diferentes materiales biodegradables, como polímeros naturales o sintéticos, lípidos o metales. Las nanopartículas son absorbidas por las células de manera más eficiente que las micromoléculas más grandes y, por lo tanto, podrían usarse como sistemas de transporte y entrega efectivos. Para aplicaciones terapéuticas, los fármacos pueden integrarse en la matriz de la partícula o unirse a la superficie de la partícula (Sarabjeet, 2007)

El ácido poliláctico ha sido utilizado desde la década de 1960 en la construcción de implantes quirúrgicos y reparación de tejidos, actualmente tiene varias aplicaciones biomédicas, incluidas suturas, placas óseas, malla abdominal y administración de fármacos de liberación controlada. Este polímero al igual que el PLGA y el PGA, son biocompatibles, biodegradables y no tóxicos. El primer sistema de administración de medicamentos basado en PLGA aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) fue el sistema de administración de medicamentos de Lupron Depot (Byung, et. al., 2016). El PVA es un polímero sintético, soluble en agua, con excelentes propiedades de formación de película, emulsionante y adhesivo. También imparte buena resistencia a la tracción (TS) y biodegradabilidad y, por lo tanto, se ha utilizado en muchas aplicaciones de biomateriales. El USDA también ha aprobado el uso de PVA para envasar productos de carne y aves (Kanatt, et. al. 2012).

La cancerina (*Semialarium mexicanum*) Esta especie se puede encontrar en zonas cálido-húmedas, con temperatura promedio de 27 °C, en el Estado de Campeche (Zamora, et. Al., 2015). Es usada en México para el tratamiento contra el cáncer. Uno de los compuestos presentes en esta planta que se cree tiene actividad citotóxica es la pristimerina (Maldonado, et. Al. 2018). La pristimerina es un triterpenoide que induce citotoxicidad en varias líneas celulares de cáncer (Sun, et. Al. 2019).

Algunos polímeros para la nano-encapsulación pueden ser costosos, lo que dificulta la investigación de los nanocompuestos que están elaborados con ellos. Es por ello que en la presente investigación se busca desarrollar nanopartículas de pristimerina con polímeros de bajo costo, que sean eficientes, estables, con un diámetro hidrodinámico menor a 200 nm y que puedan ser utilizadas en el tratamiento contra el cáncer de mama. Se espera que estas nano-compuestas puedan continuarse estudiando en fases preclínica y clínica, como una alternativa menos invasiva contra cáncer de mama.

Marco teórico

Antecedentes

La nanomedicina, es un campo emergente que implementa el uso del conocimiento y las técnicas de nanociencia en la biología médica y la prevención y remediación de enfermedades. Implica la utilización de materiales nano dimensionales, incluidos los nano robots, los nanosensores para diagnóstico y los materiales de activación en células vivas (Patra et. al. 2016). La nanotecnología está separada de otros campos científicos porque el control de los materiales a escala nanométrica da como resultado propiedades significativamente cambiada. Con esta distinción en mente, las nanomedicinas son materiales a nano escala diseñados para mejorar significativamente el comportamiento biológico de agentes terapéuticos o de imagen molecular, así como nanopartículas que poseen nuevas propiedades médicamente útiles como resultado de su tamaño. De esta definición resulta claro que la investigación en nanomedicina abarca tanto la investigación aplicada en la ingeniería y aplicación de nuevas nanomedicinas, como la investigación básica que busca comprender las interacciones nano-bio. A lo largo de la corta vida del campo, el énfasis entre la investigación aplicada y la básica ha fluctuado, con las tendencias actuales hacia estudios más fundamentales, particularmente en nanomedicina para el cáncer (Charron & Zheng 2018).

La orientación a tumores mediante terapias basadas en nanomedicina se ha convertido en un enfoque prometedor para superar la falta de especificidad de los agentes quimioterapéuticos convencionales y para proporcionar a los médicos la capacidad de superar las deficiencias del tratamiento actual del cáncer. Los sistemas de administración de fármacos pueden utilizarse para atacar específicamente los tumores y mejorar el índice terapéutico y el perfil farmacocinético de los fármacos contra el cáncer (Danhier, F.2016).

La nanomedicina tiene como objetivo encontrar soluciones novedosas para las necesidades biomédicas urgentes, como el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades importantes, utilizando la nanotecnología en rápido desarrollo. Debido a los vasos sanguíneos tumorales irregulares y defectuosos junto con el drenaje linfático deficiente, es bien sabido que las nanopartículas tienden a mostrar retención pasiva en tumores sólidos debido al mayor efecto de permeabilidad y retención (EPR) (figura 1), aunque el valor clínico del efecto EPR está actualmente bajo cierto debate. Con el objetivo de aumentar la retención de tumor de moléculas terapéuticas al tiempo que reduce su distribución no específica en órganos normales, diversas nano plataformas han sido diseñados como medicamento / gen

nano transportadores para transportar de manera efectiva agentes terapéuticos en los tumores. La nanomedicina aprovechando las propiedades y funciones inherentes únicas de las nanopartículas, también ha mostrado grandes promesas para mejorar la eficacia de otros tipos de terapias como la fototerapia, la radioterapia y la inmunoterapia, presentando nuevas oportunidades para el tratamiento del cáncer (Liu & Feng, 2018)

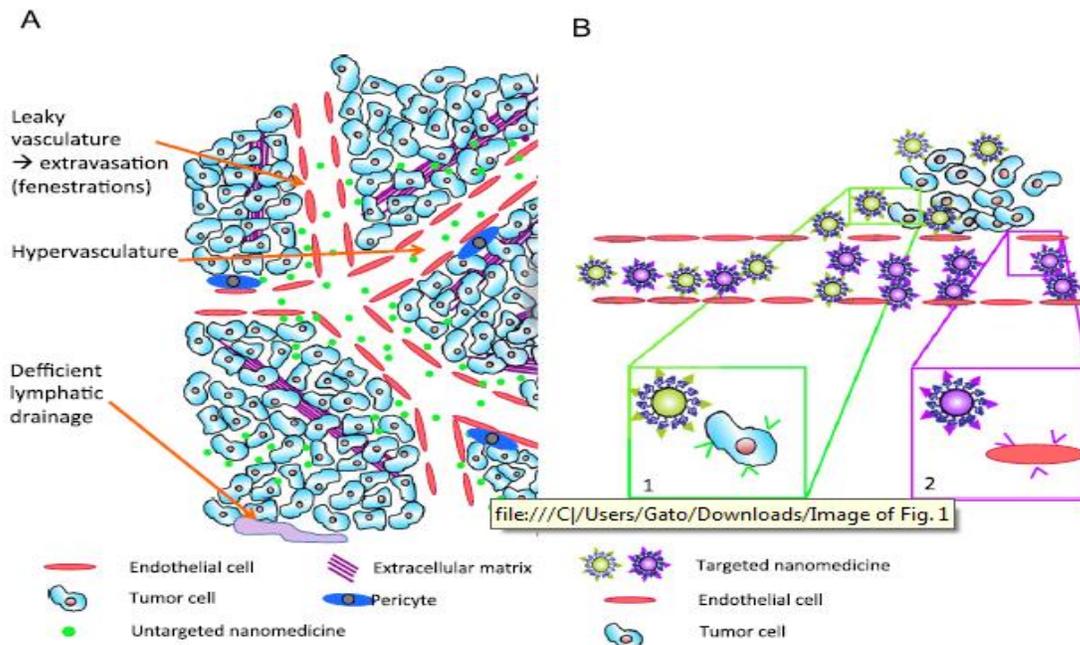


Figura 1 A) Efecto EPR de nanomedicina, B) La orientación activa de nanomedicina injertada con péptido o anticuerpo capaz de unirse a receptores específicos sobre expresados por (1) células cancerosas o (2) células endoteliales. (Danhier, F. 2016)

Nanopartículas

Las nanopartículas son utilizadas como vehículos de administración de fármacos, generalmente son menores a 100 nm en al menos una dimensión, y consisten en diferentes materiales biodegradables, como polímeros naturales o sintéticos, lípidos o metales. Se han utilizado muchos tipos de nanopartículas para la administración de fármacos (figura 1). Las nanopartículas son absorbidas por las células de manera más eficiente que las micromoléculas más grandes y, por lo tanto, podrían usarse como sistemas de transporte y entrega efectivos. Para aplicaciones terapéuticas, los fármacos pueden integrarse en la matriz de la partícula o unirse a la superficie de la partícula (Sarabjeet, 2007)

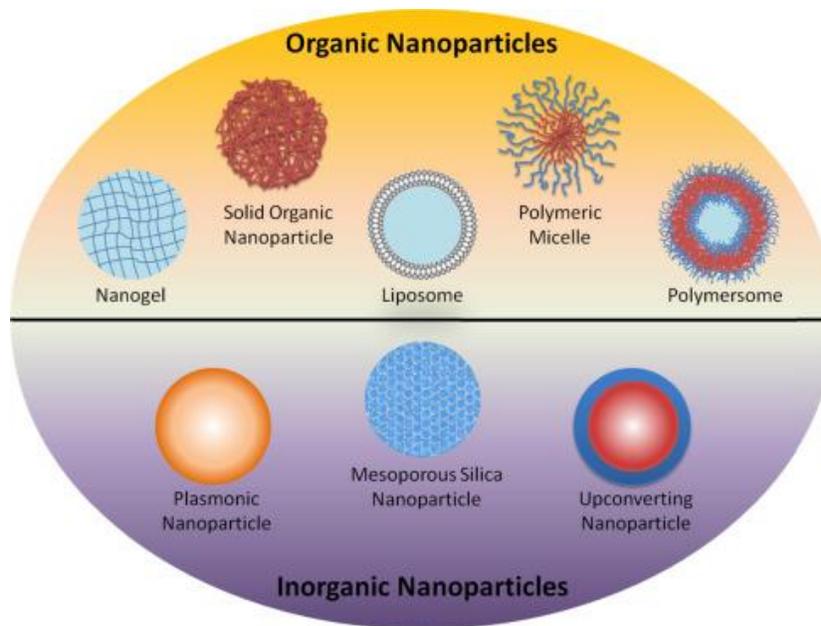


Figura 2. Nanopartículas orgánicas e inorgánicas que se han desarrollado como vehículos farmacológicos (Rwei, et. a. 2015)

Las nanopartículas ofrecen muchas ventajas como portadores terapéuticos, incluido el potencial para aumentar el tiempo de circulación del fármaco, mejorar la solubilidad del fármaco, administrar preferentemente a los sitios objetivo y disminuir los efectos secundarios. La nano encapsulación permite administrar fármacos con poca solubilidad en sangre a través del torrente sanguíneo y protege sus cargas terapéuticas del medio ambiente. Las nanopartículas con tamaños entre ~30 nm y 200nm se acumulan preferentemente en tejidos con vasculaturas relativamente permeables, como en los tumores, un efecto conocido como permeación y retención mejoradas (EPR). Esto puede conducir a una mejora del efecto terapéutico. El direccionamiento preferencial de los tejidos mediante nanopartículas se puede mejorar mediante el "direccionamiento activo", es decir, mediante la unión de ligandos que se dirigen al tejido de interés, mediante la aplicación de una fuente de energía externa u otros medios (Rwei, et.al. 2015)

Las nanopartículas son consideradas como transportadores de fármacos eficientes, un nano transportador adecuado debería permanecer coloidalmente estable en el cuerpo, ser biodegradable, atacar células tumorales específicas y liberar medicamentos de manera efectiva (Seidi, F., 2018). La sensibilidad diagnóstica, la eficacia del tratamiento y la biodisponibilidad de las nanopartículas, así como la heterogeneidad y la resistencia a los fármacos de los tumores plantean enormes desafíos para la implementación clínica (Ling, D., 2014).

PVA

El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero sintético soluble en agua con la mayor producción anual a nivel mundial. También es un polímero versátil con muchas aplicaciones industriales debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, resistencia química, excelentes propiedades físicas y propiedades de barrera a los gases. Particularmente, el PVA es muy adecuado para mezclarlo con polímeros naturales como la celulosa para hacer compuestos biodegradables, ya que es altamente polar y puede manipularse en soluciones de agua (Voranova, et.al. 2015).

El PVA es un termoplástico semicristalino, soluble en agua, rico en hidroxilo, no tóxico y biocompatible que puede formar enlaces de hidrógeno con la superficie oxigenada (Patole 2018), se puede sintetizar hidrolizando acetato de polivinilo (PVAc) (un polímero que no tiene que obtenerse del petróleo) obtenido por la polimerización del monómero de acetato de vinilo. La reacción de hidrólisis es incompleta, dando como resultado polímeros con diferentes grados de hidrólisis. Teniendo en cuenta que los grupos hidroxilo actúan como sitios de reticulación y forman enlaces de hidrógeno entre cadenas adyacentes, el PVA con diferentes grados de hidrólisis y tamaños de cadena da lugar a diferentes estructuras de polímeros (Van Etten 2014).

El (PVA) se considera el polímero más hidrofílico que tiene alta resistencia a la tracción, excelente flexibilidad y excelente capacidad de unión (Gungor, et.al. 2018). Además, tiene buena termo estabilidad, resistencia a la fluencia, alto módulo, resistencia química y capacidad de formación de película. Es un material importante en vista de sus aplicaciones a gran escala (Patole, et.al. 2018). La combinación de resistencia química y propiedades mecánicas ha llevado a su uso industrial generalizado en aplicaciones tales como: adhesivos, recubrimientos textiles y materiales de embalaje estériles. La biodegradabilidad y la no toxicidad del PVA han dado lugar a diversas aplicaciones biomédicas y farmacéuticas que incluyen, entre otras: mallas fibrosas y membranas para vendajes de heridas, sistemas de administración de fármacos, partículas de embolización de radiología intervencionista e hidrogeles utilizados en medicina ortopédica y lentes de contacto (Thomas, et. al. 2018)

Aunque el PVA puede procesarse fácilmente en películas, membranas y fibras, debe ser insoluble en agua para usarse en la mayoría de las aplicaciones. La acetalización del PVA por mono aldehídos como el formaldehído o el butiraldehído es uno de los métodos prácticos para obtener PVA insoluble en agua dependiendo del grado de acetalización (Gungor, et.al. 2018).

PLA

El ácido poli láctico ha sido utilizado desde la década de 1960 en la construcción de implantes quirúrgicos y reparación de tejidos, actualmente tiene varias aplicaciones biomédicas, incluidas suturas, placas óseas, malla abdominal y administración de fármacos de liberación controlada (Byung, et. al., 2016). La posibilidad de usar dispositivos en el cuerpo humano con mínima inflamación e infección para permitir la curación natural ha obligado a los investigadores a buscar alternativas biocompatibles y biodegradables. El ácido poli láctico es uno de los biopolímeros más prometedores utilizados en el mundo de hoy. Debido a su fuente orgánica, ha atraído muchas atenciones (Davachi, et. al., 2015)

PLA es poliéster alifático termoplástico que generalmente se deriva de productos agrícolas. Tiene varias propiedades atractivas, como su biocompatibilidad, alta resistencia, rigidez y termo-plasticidad; sin embargo, tiene baja resistencia al impacto. Debido a su disponibilidad comercial a un costo asequible, el PLA ha sido ampliamente estudiado y utilizado para aplicaciones de empaque. Este es sintetizado químicamente usando monómeros obtenidos de recursos agrícolas (tabla1), los polímeros sintéticos están siendo reemplazados gradualmente por materiales biodegradables, especialmente aquellos derivados de recursos naturales (debido a su biodegradabilidad) (Elsawy, et. al. 2017)

Tabla 1. Clasificación de polímeros biodegradables (Abdulla, et. al. 2017)

Categoría	Grupo	Ejemplo
Polímeros de biomasa	Polisacáridos	Almidones (trigo, papa, maíz) Productos celulósicos y lignocelulósicos (madera, popotes, etc.) Otros pectina, quitosano/quitina, encías)
	Proteínas y lípidos	Animales (caseína, suero, colágeno/gelatina)
Polímeros obtenidos mediante producción microbiana	Polihidroxicanoatos (PHA)	Poli (hidroxibutirato)(PHB)-poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV)
Polímeros sintetizados químicamente usando monómeros obtenidos de recursos agrícolas	Poli (hidroxiácido)	Ácido poli glicólico (PGA) Poli (ácido láctico) (PLA)
	Copoliésteres alifáticos	Poli (adipato de butileno-co-tereftalato) (PBSA)
Polímeros sintetizados químicamente a partir de recursos de combustibles fósiles	Copoliésteres aromáticos	Poli (adipato de succinato de butileno) (PBAT)
	Otros	Policaprolactonas (PCL), poliéster amidas (PEA)

Existen varias técnicas útiles para la preparación de micro y nanopartículas basadas en PLA. Las técnicas se clasifican en cuatro categorías. La categoría 1 son métodos tradicionales basados en emulsiones que son emulsión simple, emulsión doble y emulsiones múltiples. La categoría 2 son métodos basados en precipitación que incluyen nano precipitación, expansión rápida de fluido supercrítico en líquido, salado y diálisis. La categoría 3 son métodos de composición directa, como la técnica de fusión, secado por pulverización, fluido supercrítico y micropartículas formadoras in situ. La categoría 4 incluye nuevos enfoques que incluyen la técnica de micro fluidos y la técnica basada en plantillas / moldes. Otros criterios dependen del modo de encapsulación del fármaco. El medicamento está atrapado dentro de las partículas de "cápsulas" o dispersado en matrices de polímeros. La figura 2 muestra una estructura representativa de micro y nanopartículas con las cuatro categorías de técnicas de preparación (Byung, et. al., 2016).

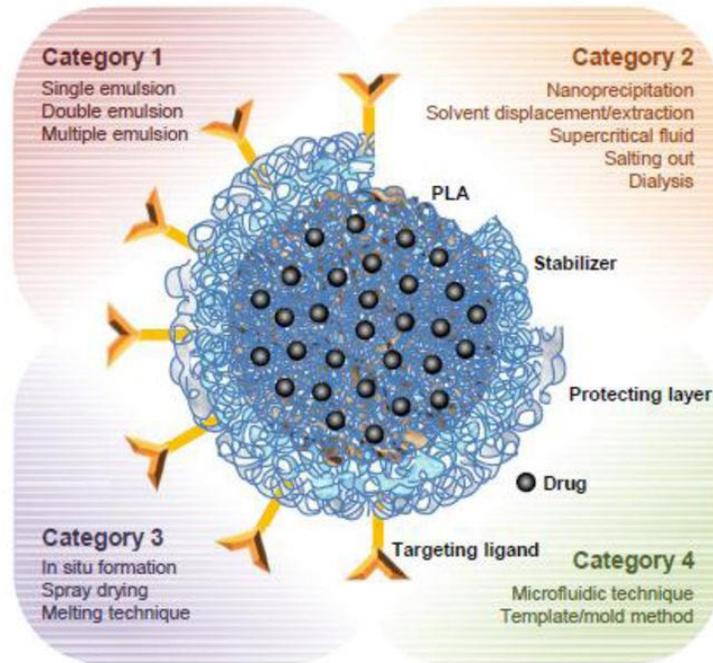


Figura 3. Métodos de fabricación de nanopartículas de PLA (Byung, et. al. 2016)

Cancerina y pristimerina

La cancerina (figura 4) es una planta leñosa que pertenece a la familia de las Celastrácea de la especie *Semialarium mexicanum*. Esta especie se puede encontrar en zonas selváticas cálido-húmedas, con temperatura promedio de 27 °C, en el Estado de Campeche y Yucatán (Zamora, et. al., 2015). Es usada en México para el tratamiento contra el cáncer. Uno de los compuestos presentes en esta planta que se cree tiene actividad citotóxica es la pristimerina (Maldonado, et. Al. 2018).



Figura 4. Cancerina (<https://nutricioni.com>)

La familia Celastrácea, comúnmente conocida como la familia agridulce, está muy extendida en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, incluidas África del

Norte, América Central y del Sur y Asia Central y Oriental. Esta familia comprende aproximadamente 98 géneros y 1210 especies, y son árboles, arbustos o lianas con tallos resinosos y hojas. Las especies de Celastrácea tienen una larga tradición de uso en medicina popular y agricultura.

Los extractos de plantas crudas de esta familia han mostrado una extraordinaria variedad de propiedades, que incluyen abortivo, antipirético, antiartritis, antibacteriano, anticancerígeno, antileucémico, antipalúdico, repelente de insectos, estimulación, anticonceptivo masculino, supresor del apetito y para tratar trastornos digestivos. La mayor parte de los componentes bioactivos de las especies de Celastrácea son terpenoides, que son una clase estructural diversa de metabolitos compuestos de unidades de isopreno de hidrocarburo C5.

Las características más importantes en las Celastraceae son los sesquiterpenos dihidro-b-agarofurano y los triterpenoides quinometídicos (denominados celastroloides), ambos reconocidos como marcadores químico taxonómicos de la familia. Los sesquiterpenos de dihidro-b-agarofurano muestran un alto grado de oxidación y forman poliésteres y alcaloides de piridina-sesquiterpeno con un amplio espectro de actividades biológicas como inmunosupresores, quimiopreventivos, reversión de la resistencia a múltiples fármacos (MDR), anti-VIH y anti repelentes de insectos. Además, los triterpenoides quinometídicos constituyen un grupo de D: A-friedonor-oleanos insaturados y oxigenados, sintetizados en las raíces de las plantas. También se han informado congéneres fenólicos, dímeros y trímeros. Estos compuestos han mostrado interesantes propiedades antibióticas, citostáticas y antipalúdicas (Bazzochi et al.2018)

La pristimerina es un derivado triterpenoide natural de quinona-meturo aislado de plantas pertenecientes a las familias Celastrácea o Hippocrateaceae. Se demostró que Pristimerina posee muchas propiedades biológicas como actividad antifúngica, antibacteriana y antioxidante. En los últimos años, Pristimerina ha recibido atención debido a su potente acción antitumoral. Puede detener la progresión del ciclo celular y tiene una potente actividad anti proliferativa en múltiples tipos de células tumorales. Los estudios han tratado de explorar otras utilidades terapéuticas de Pristimerina en función de su actividad antiinflamatoria, más recientemente se han estudiado sus efectos contra la lesión pulmonar aguda (Shaaban, et. al. 2018)

La pristimerina también ha demostrado una potente actividad anti proliferativa e inductora de apoptosis en las líneas celulares de cáncer de glioma, leucemia, mama, pulmón y próstata. La pristimerina exhibe actividad anticancerígena in vitro mediante la supresión de la progresión del ciclo celular, angiogénesis e inducción de apoptosis (Park & Kim, 2018). La inducción de apoptosis por pristimerina implica la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de caspasas, disfunción mitocondrial, inhibición del factor nuclear κ B (NF- κ B), Akt y MAP

quinasas. Además, también inhibe la actividad de la proteasoma, la migración de células tumorales y la angiogénesis (Liu, et. al. 2014).

Dispersión de luz dinámica

La dispersión dinámica de la luz (DLS) es una herramienta analítica utilizada de forma rutinaria para medir el tamaño hidrodinámico de nanopartículas y coloides en un entorno líquido (Jans, et. al. 2009)

Algunas de las ventajas de DLS para el dimensionamiento de partículas son su capacidad para proporcionar una estimación promedio del conjunto del tamaño de partículas en suspensiones, un amplio rango accesible de tamaños de partículas en el rango submicrométrico y una rápida adquisición de datos.

Esta técnica utiliza dos características comunes de los coloides, es decir, el efecto Tyndall (dispersión) y el movimiento browniano. Entre otros factores, la intensidad de la luz dispersa de una suspensión coloidal depende del ángulo de dispersión (θ) y el tiempo de observación (t) Esto conduce al desarrollo de dos tipos de experimentos de dispersión, a saber:

Dispersión de luz estática; El tiempo promedio de intensidad de dispersión se mide en varios ángulos de dispersión, para obtener información del tamaño de partícula la dimensión de los coloides debe estar en el mismo rango que la longitud de onda de la luz o al menos mayor que 20.

Dispersión de luz dinámica; Se mide la dependencia temporal de la intensidad, puede medir partículas que son mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz.

La dependencia del tiempo de la intensidad de dispersión surge del hecho de que, en condiciones ambientales, las partículas coloidales ya no son estacionarias en el medio de suspensión, sino que se mueven de manera aleatoria por el proceso de movimiento browniano. Cuando una radiación monocromática coherente se incide en una colección de partículas, Cada partícula actúa como una fuente secundaria debido a la dispersión de la radiación. Como las partículas se mueven al azar en el espacio, la distancia recorrida por las ondas dispersas desde la partícula hasta el detector varía con el tiempo. Debido a la interferencia de las ondas dispersas de las partículas, la intensidad neta fluctúa aleatoriamente en el tiempo a medida que cambian las posiciones relativas de las partículas. Esto produce "manchas" al azar en el espacio, que aparecen como puntos oscuros o brillantes que fluctúan aleatoriamente en un detector. Para observar tales manchas, es necesario que la resolución espacial del fotodetector sea lo suficientemente alta como para medir estas fluctuaciones en el tiempo.

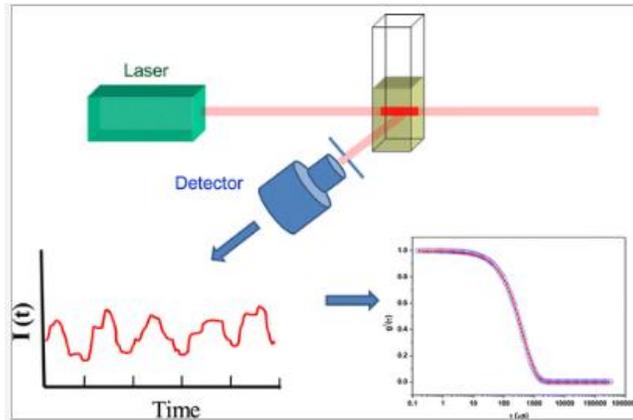


Ilustración 1. Técnica de dispersión de luz dinámica (Jans, et. al. 2009)

En DLS, se mide el tiempo característico de fluctuaciones en la intensidad dispersa, y depende del coeficiente de difusión de las partículas que experimentan movimiento browniano (Jans et. al. 2009)

Objetivo general.

Desarrollar nanopartículas de pristimerina con los polímeros PVA-PLA, que sean eficientes, estables, con un diámetro hidrodinámico menor a 200 nm.

Objetivos específicos

1. Elaborar nanopartículas sin carga con los polímeros PVA-PLA con diámetros hidrodinámicos menores a 100 nm para la posterior encapsulación de pristimerina.
2. Desarrollar nanopartículas PVA-PLA cargadas con pristimerina para su posterior análisis.
3. Observar la estabilidad y eficiencia de encapsulación de las nanopartículas PVA-PLA-pristimerina para saber si son una opción viable para el tratamiento de cáncer de mama.

Desarrollo experimental

Fases a seguir

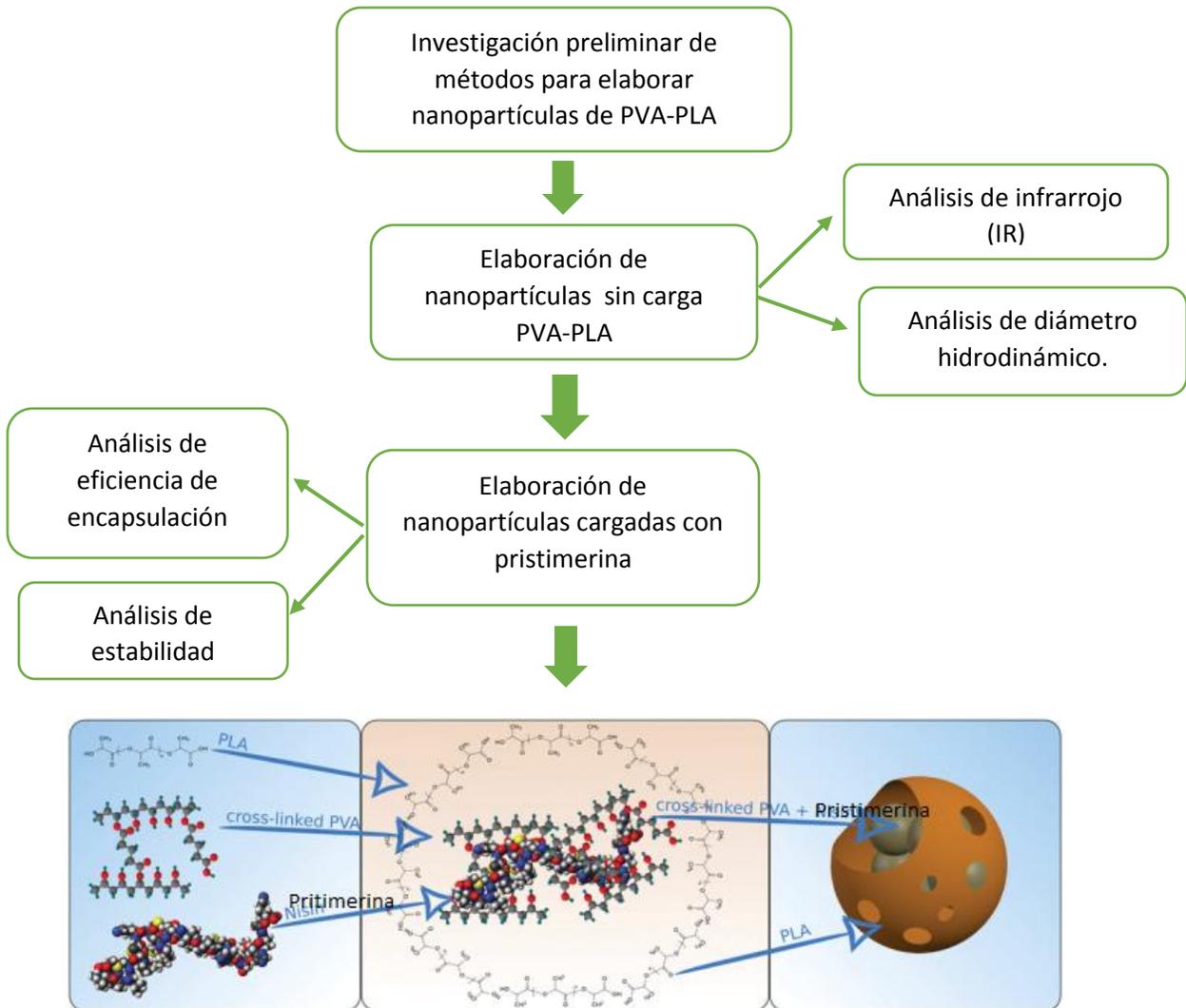


Ilustración 2. Nanopartículas PVA-PLA-pristimerina. Modificada de Holcapkova et. Al. 2017

Equipos utilizados

Nano Zetasizer

Zeta-Sizer Malvern, Series Nano-ZS Software versión 7.01 Malvern Instruments LTD.

Espectrómetro de Infrarrojo

Espectrómetro FTIR Agilent Cary 360. Software PC lab y Software Essential FTIR.

HPLC

HPLC Cromatógrafo Agilent 1200 (Agilent Technologies, Japón) equipado con un detector de longitud de onda múltiple HPLC-DAD y columna Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (Agilent Technologies, Japón) (4.6x100 mm, 3.5 μm)

Elección del método para elaborar nano-partículas

Se hizo una revisión bibliográfica para elegir el mejor método de encapsulación (tabla 2)

TABLA 2. MÉTODOS PARA REALIZAR NANO-PARTÍCULAS

PRINCIPIO ACTIVO	Método	Tamaño de partícula	Cantidad de reactivos	Referencia
LOMUSTINE	Nano precipitación	68 nm	PLA 100mg, PVA 50 mL 1% (p/v)	Mehrotra 2012
SIN P.A.	Difusión emulsificación	218-227 nm	PLA 10mg Lumogen Red 1 mg, Diclorometano 2 mL, Vinil sulfonato poli vinil alcohol 6 mL	Raudszus 2018
ENZIMA DE STREPTOCOCCUS EQUI	Doble emulsión evaporación de solvente	255.8 ± 10 nm	PVA 10 % (p/v) en Diclorometano, PLA 0.75% (p/v) en glicolquitosano	Florindo et. al. 2010
GLICOPROTEÍNA P	Evaporación de solvente	90-110 nm	PLA 350 mL en 100 mL de cloroformo, 150 mg en 20 mL de agua destilada	Zhang et. al. 2019

Se decidió utilizar el método descrito por Mehrotra 2012, debido a que fue el que obtuvo nano-partículas de menor diámetro y utilizó los mismos reactivos. El método se describe a continuación:

Para obtener el sistema de encapsulación formado por los polímeros PVA y PLA. Primero se disolvieron 100 mg de PLA en 20 mL de acetona la solución se mantuvo

en agitación con una parrilla de calentamiento/agitación durante 1 hora a una temperatura 90 °C. Para la solución de PVA se preparó al 0.1% (p/v) disolviendo 0.1 g en 100 mL de agua des-ionizada y se homogeneizó con un homogeneizador (figura 8) a 15500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos.

Posteriormente se dejó caer la solución de PLA gota a gota sobre la de PVA manteniendo la agitación durante 20 minutos. Después se evaporó el disolvente orgánico mediante rota evaporación, la mezcla sin acetona se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 hora.



Figura 8. Homogeneizador.

Determinación de la mejor formulación y análisis IR de las nanopartículas sin carga PVA-PLA

Para saber qué cantidad de reactivos se deben utilizar, se plantearon cuatro formulaciones (tabla 3) con diferentes cantidades de reactivos para realizar las nanopartículas, se prepararon por separado las soluciones de PVA y PLA con las cantidades indicadas en la tabla 2, posteriormente se dejó caer gota a gota una solución sobre otra y se mantuvo en agitación durante 20 minutos, transcurrido el tiempo la solución se filtró con papel whatman de 0.2 micras pesado con anterioridad para poder calcular el rendimiento de las nanopartículas, una vez filtradas las soluciones se midió el diámetro hidrodinámico en el equipo Nano

Zetasizer, después todos los lotes fueron centrifugados en tubos de 2 mL durante 1 hora a 13,000 revoluciones por minuto (rpm), los precipitados obtenidos se sometieron a análisis con espectroscopia de infrarrojo y así poder observar si se encontraba algún polímero en exceso en cada lote.

TABLA 3. FORMULACIONES DE NANOPARTÍCULAS PVA-PLA SIN CARGA

LOTE	PLA (mg)	Acetona (mL)	% PVA en 50 mL
01	100	20	1
02	90	20	0.1
03	33	15	0.01
04	25	15	0.01
05	20	15	0.01

Determinación del tamaño de partícula

Para la determinación del tamaño de partícula se utilizó el equipo Nano Zetasizer Malvern, para cada muestra y lote realizado se tomó 1 mL y se introdujo en el equipo. Se tomó en cuenta la viscosidad y el índice de refracción de la solución de PVA al 0.1% (p/v) disuelto en agua destilada, para introducirlos en el equipo y tener una medición más exacta del diámetro de las nanopartículas.

Elaboración de nanopartículas cargadas con extracto de cancerina

Se plantearon las siguientes formulaciones (tabla 4) de nanopartículas con extracto de cancerina y se prepararon por separado 65 mL de cada una.

Para las nanopartículas cargadas, primero se preparó la solución de PLA disolviendo 20 mg de PLA en 15 mL de acetona una vez disuelto el PLA, se agregaron 8, 10 y 12 mg de extracto de cancerina se agitó durante 20 minutos.

La solución de PVA se preparó al 0.01% en 50 mL de agua desionizada y se agitó con homogeneizador a una velocidad de 15500 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 minutos. Una vez listas las soluciones, se dejó caer la solución de PLA-extracto, sobre la solución de PVA gota a gota y se mantuvo en agitación magnética durante 18 horas.

El disolvente orgánico se evaporó en ROTAVAPOR durante tres horas. Pasado el tiempo se centrifugó a 13,000 rpm durante 1h en tubos de 2 mL (figura 9), los

sobrenadantes se guardaron para ser leídos en el Nano Zeta-Sizer y determinar su tamaño de partícula.



Figura 9. Nanopartículas centrifugadas, formulaciones con 8, 10 y 12 mg de pristimerina (Gilberto Torres comunicación oral)

TABLA 4. FORMULACIONES PARA NANOPARTÍCULAS CARGADAS

PLA+ ACETONA	PVA	Extracto de cancerina
20 MG EN 15 ML	50 mL al 0.01%	8 mg
20 MG EN 15 ML	50 mL al 0.01%	10 mg
20 MG EN 15 ML	50 mL al 0.01%	12 mg

Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación se analizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Para esto se cuantificó la cantidad de extracto de cancerina mediante una curva de calibración. Posteriormente se pesaron 10 mg del extracto y se re suspendió en 1mL de metanol.

De la solución acuosa de las nanopartículas se tomaron 5 mL de cada una y se centrifugaron a 13000 rpm, se colocaron en tubos de 1 mL, después se separaron los sobrenadantes y los botones se re suspendieron en 50 µL de acetona y 950 µL de metanol. Se preparó una fase móvil al 0.5 % de ácido fosfórico, se des-gasificó previamente 10 minutos a 25 KHz.

El análisis cromatográfico de HPLC fue elaborado en un cromatógrafo Agilent 1200 (Agilent Technologies, Japón) equipado con un detector de longitud de onda múltiple HPLC-DAD y una columna Zorbax Eclipse Plus C₁₈ (Agilent Technologies, Japón)

(4.6x100 mm, 3.5 μ m). La fase móvil consistió en H₂O: H₃PO₄ (99.5:0.5) como eluyente A y MeOH como eluyente B.

El sistema fue corrido en modo gradiente: 55-70% B; 0 a 10 min, 70-85%; 10 a 15 min, 85-90%; 15 a 23 min, 90-100%; 23 a 33 min seguido de una elución isocrática con 100% B por 3 minutos. La temperatura de la columna fue llevada a 30 °C, con un flujo de 0.7 mL por minuto y el volumen de inyección fue de 5 μ L. Los cromatogramas fueron leídos a 420 nm. Se usó una curva de calibración del estándar para el análisis cuantitativo de los extractos

Estabilidad de las nanopartículas cargadas

Para ver la estabilidad de las nanopartículas cargadas, se tomaron 20 mL de la solución acuosa de los nanocompuestos de cada una de las formulaciones (40%, 50% y 60%), de las cuales 10 mL fueron almacenados a temperatura ambiente y 10 mL se mantuvieron en refrigeración (figura 10). Se leyeron los tamaños de partícula el día 1, semana 1, semana 2 y semana 3.

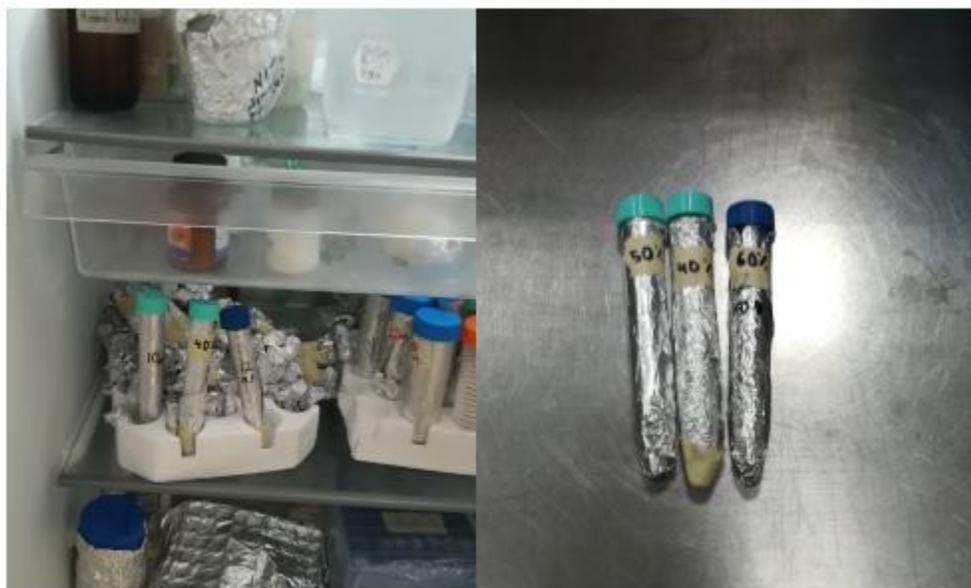


Figura 10. Nano-partículas para pruebas de estabilidad

Resultados

Determinación de tamaño de partícula

El tamaño de partícula de todos los lotes producidos fue medido en Nano Zetasizer, los lotes con diámetros hidrodinámicos más pequeño fueron los lotes 04 y 05 (figura 11 y 12). En cada medición de diámetro hidrodinámico hecho con este equipo se nos indica un promedio ponderado del tamaño de todas las nanopartículas presentes en la muestra, para el lote 04 hubo un tamaño de 82.37 nm y para el lote 05 un diámetro de 89.68 nm, ambos lotes presentan una gráfica de un solo pico, lo cual nos indica que todos los tamaños de las nanocompuestos son pequeños y se encuentran en rangos entre 80 y 90 nm, mientras que si el diagrama presentará más de un pico querría decir que hay una interferencia de nanopartículas de otros tamaños (pueden ser más grandes o más pequeñas) que podrían deberse a polvo en las muestras, o una necesidad de que la muestra sea filtrada (Expert Advice Nano Zeta-Sizer) o incluso que sea necesario cambiar el método de nano-encapsulación para obtener partículas con tamaños similares (Mehrotra 2012).

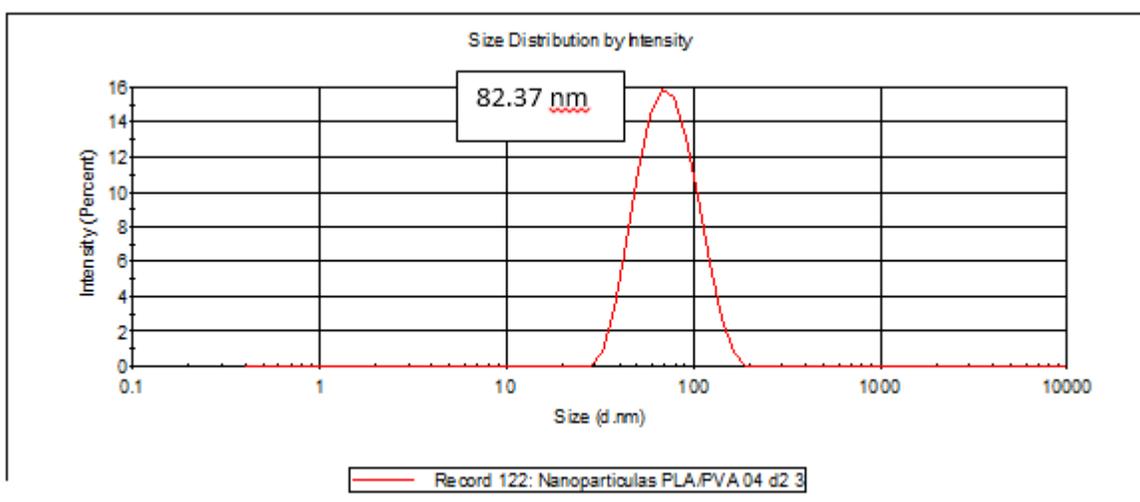


Figura 11. Diámetro hidrodinámico de las nanopartículas PVA-PLA lote 04. (Nano Zetasizer Malvern)

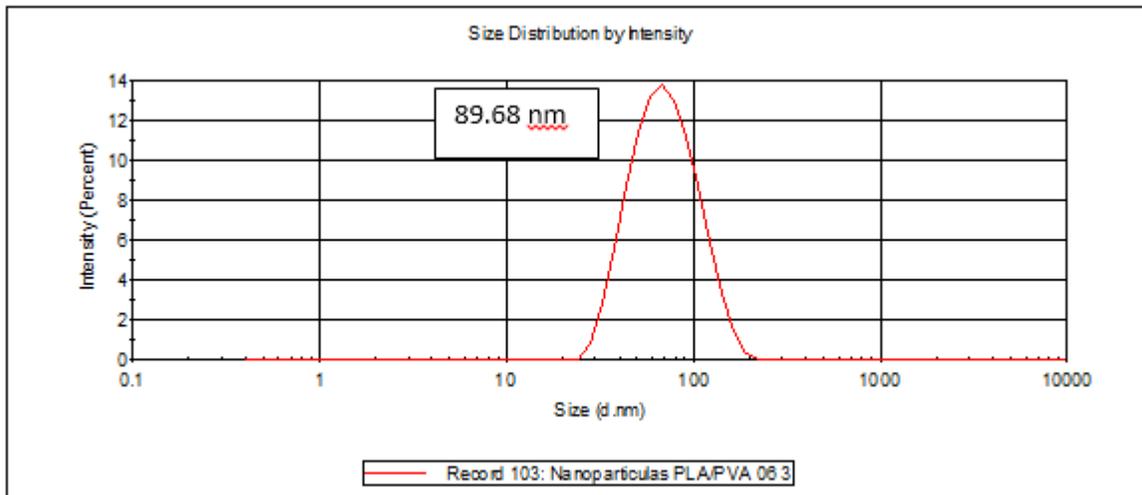


Figura 12. Diámetro hidrodinámico de las nanopartículas PVA-PLA lote 05. (Nano Zeta Siser Malvern)

Determinación de la mejor formulación

La mejor formulación para realizar las nanopartículas sin carga de PVA-PLA fue la que contenía 20 mg de PLA en 15 mL de acetona y 50 mL de PLA al 0.01%, esta formulación fue mejorada a partir de la formulación del lote 02 y 03, ya que el espectro IR (figura 15 y 16) nos indicaba en ellas un exceso de PLA, sabiendo esto se modificó la formulación hasta obtener las cantidades adecuadas de cada polímero.

Para esto después de cada formulación planteada se calcularon los rendimientos de los lotes 02 a 05 en la tabla 5 se puede observar que en la que hubo mejor rendimiento y por lo tanto menor pérdida de reactivos fue el lote número 05 también se observó que el tamaño de las nanopartículas fue el más pequeño de todas las formulaciones realizadas.

TABLA 5. RENDIMIENTO DE NANOPARTÍCULAS SIN CARGA

LOTE	Formulación	Tamaño (nm)	Rendimiento (%)
01	100 mg de Pla, 20 mL de acetona y PVA al 1%	110	No medido
02	90 mg de PLA, 20 mL de acetona y PVA al 0.1%	109.5	30.7
03	33 mg de PLA, 15 mL de acetona y PVA al 0.01%	74	82.27
04	25 mg de PLA, 15 mL de acetona y PVA al 0.01%	76	82.37
05	20 mg de PLA, 15 mL de acetona y PVA al 0.01%	70	89.68

Análisis IR de las nanopartículas

El análisis IR tanto de los polímeros como de los botones se presenta a continuación. El espectro IR de PLA (figura 10), presentó un porcentaje de transmitancia entre 4000-1000 cm^{-1} en el cual la banda ubicada en 3296 cm^{-1} se le asignó a el grupo OH, mientras que el pico entre 2951-2918 cm^{-1} se le atribuye al estiramiento alifático -C-H, a la banda que se presenta en 1747 cm^{-1} podría relacionarse con la C = O estiramiento de grupos éster.

Los picos a 1453 y 1359 cm^{-1} se asignaron a las vibraciones de deformación del grupo CH_3 , y los tres picos a 1183, 1084 y 1041 cm^{-1} se atribuyeron a las absorciones de vibración por estiramiento C – O (Hut, S. et. al. 2018).

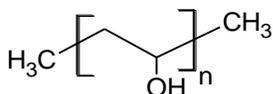
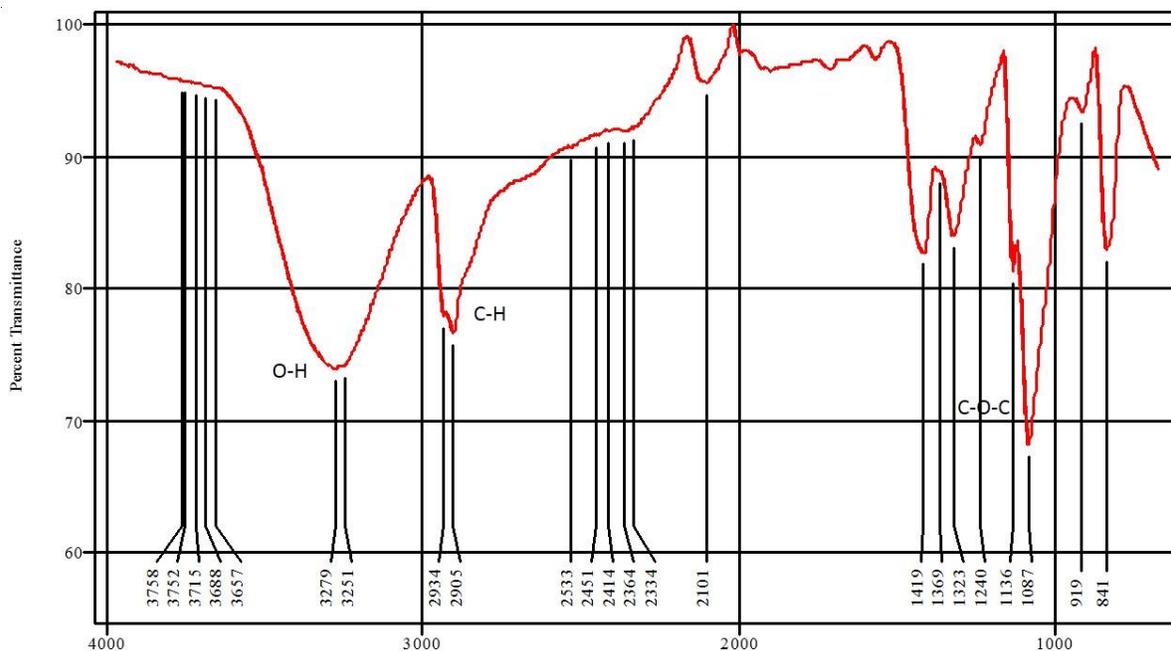


Figura 14. Espectro IR del Alcohol polivinílico (Essential FTIR y ChemSketch)

El botón obtenido del lote 02 (90 mg de PLA en 20 mL de acetona y PVA al 0.1%), Presento un espectro de IR muy parecido al de PLA, como se puede ver en la comparación de la figura 12 en la cual se puede ver a) IR del lote 02 y b) IR de PLA.

El espectro a) presenta una banda 1751 cm^{-1} , la cual es parecida a la banda del PLA en 1747 correspondiente al grupo $\text{C} = \text{O}$, los picos 1086 , 1085 y 1044 cm^{-1} de la formulación del lote 03, se corresponden con los picos 1083 , 1084 y 1041 cm^{-1} del enlace $\text{C}-\text{O}$ del PLA.

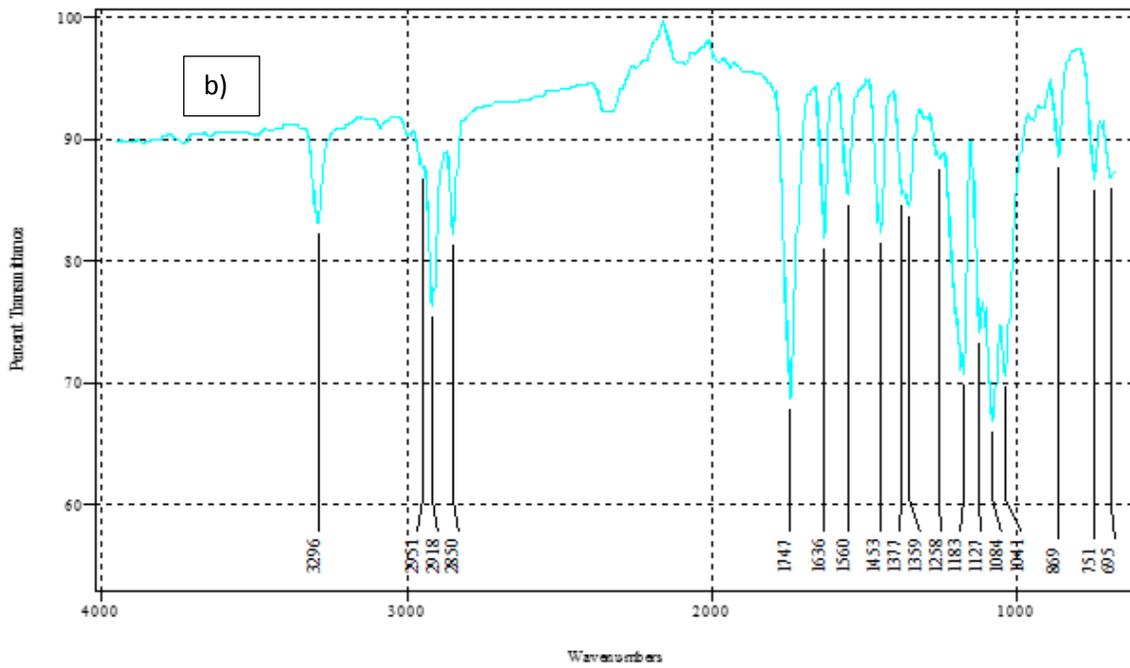
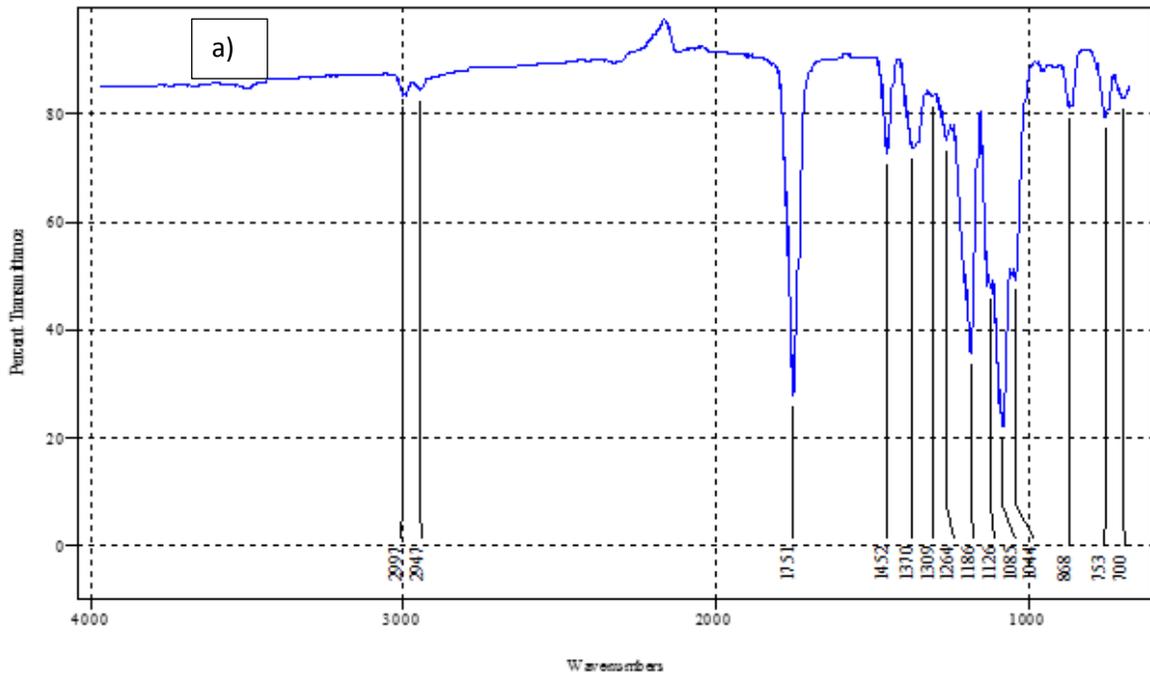


Figura 15. Espectro FTIR de la formulación del lote 02 a). FTIR en porcentaje de transmitancia del PLA b) (Essential FTIR)

La comparación de los IR en porcentaje de transmitancia del Lote 03 (33 mg de PLA en 15 mL de acetona PVA al 0.01%) y el PLA se puede ver en la figura 13, en la cual se puede ver a) espectro del lote 03 y b) espectro del PLA. En el espectro del lote 03 se puede ver dos pequeñas bandas entre 2996-2946 cm^{-1} las cuales podrían corresponder al enlace -C-H de los grupos alquilo presentes en el PLA, también puede observarse una banda en 1083 cm^{-1} que podría pertenecer al enlace C-O presente en el PLA.

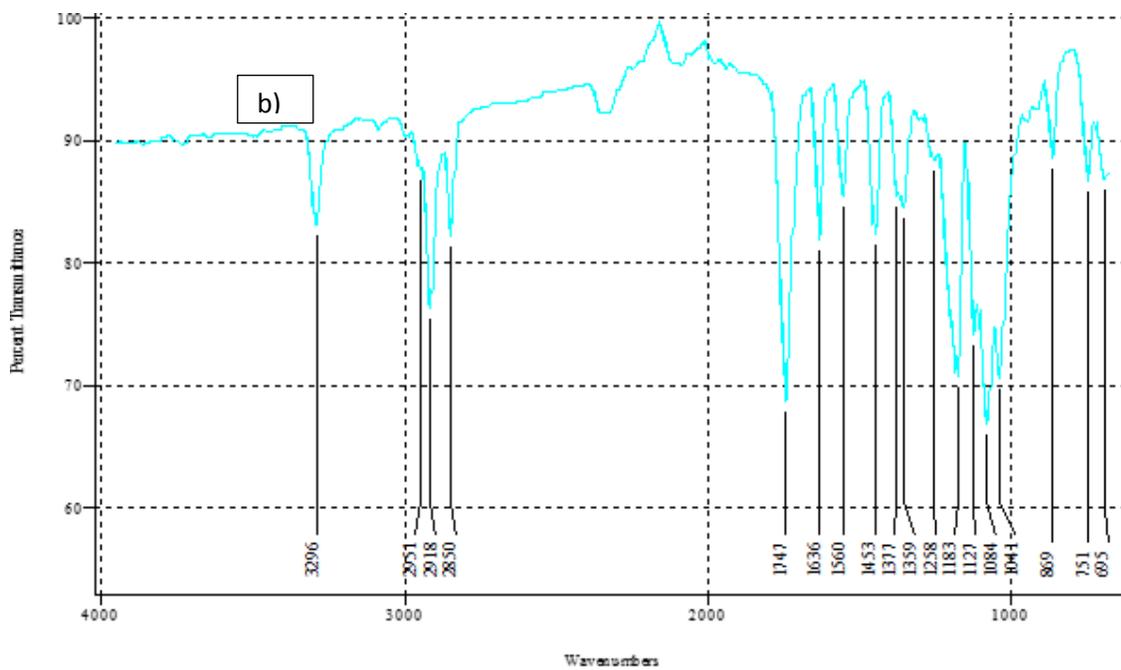
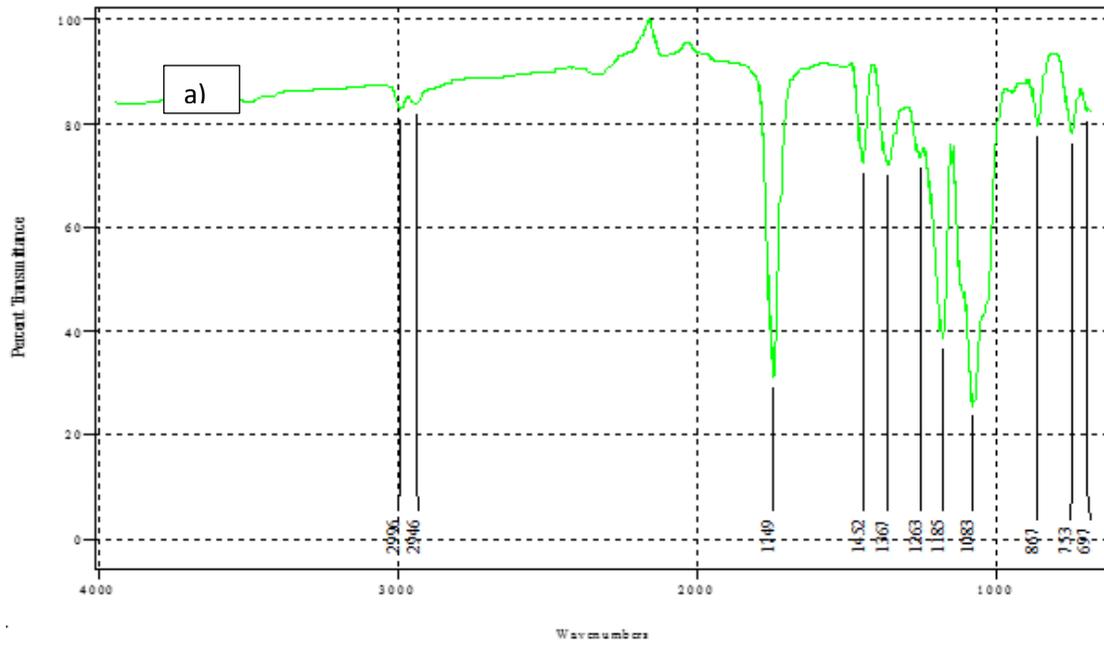


Figura 16. Espectro FTIR de la formulación del lote 03 a). Espectro FTIR en porcentaje de transmitancia del PLA. (Essential FTIR)

Nanopartículas cargadas con extracto de cancerina

Todas las nanopartículas que contenían extracto de cancerina tenían las mismas cantidades de reactivos, 20 mg de PLA en 15 mL de acetona y 50 mL de PVA al 0.01% (P/V), la cantidad de extracto se varió de acuerdo a la cantidad de PLA, creando así tres lotes uno con 8 mg de principio activo otro con 10mg y otro con 12 mg.

A todos los lotes se les midió el tamaño de partícula con el equipo Nano Zetasizer (figura 17, 18 y 19) se pudo ver que todos los lotes tenían un tamaño de partícula homogéneo ya que presentan un gráfico con un solo pico, también presentan un tamaño menor a 100 nm, está medición fue hecha sin haber evaporado el disolvente orgánico y como se puede ver en los gráficos la que obtuvo menor tamaño fue la formulación que contenía 8 mg de pristimerina la cual obtuvo un tamaño de 72 nm, seguido de la formulación con 10 mg de que tuvo un tamaño de 74 nm, mientras que la formulación con mayor cantidad de pristimerina tuvo un tamaño de 84 nm.

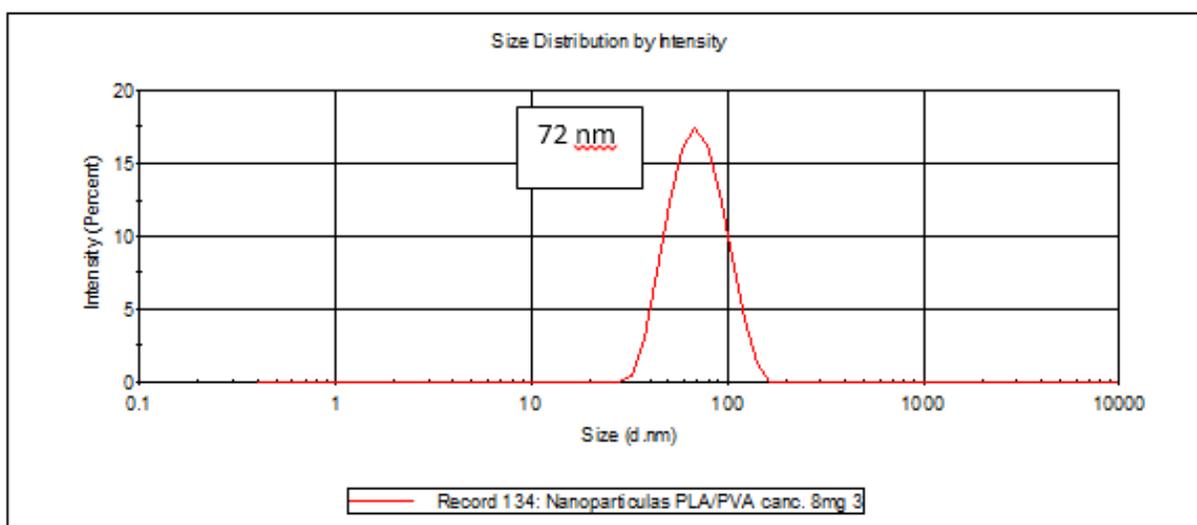


Figura 17. Grafica de intensidad de las nanopartículas con 8 mg de pristimerina (Nano Zetasiser Malvern)

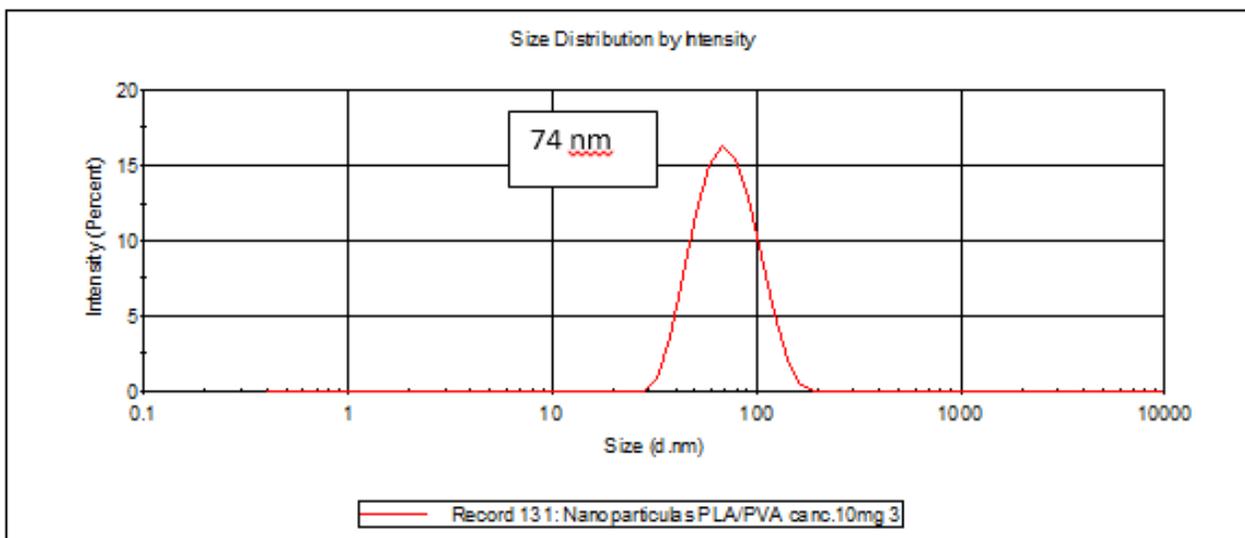


Figura 18. Grafica de intensidad de las nanopartículas con 10 mg de pristimerina (Nano Zeta Siser Malvern)

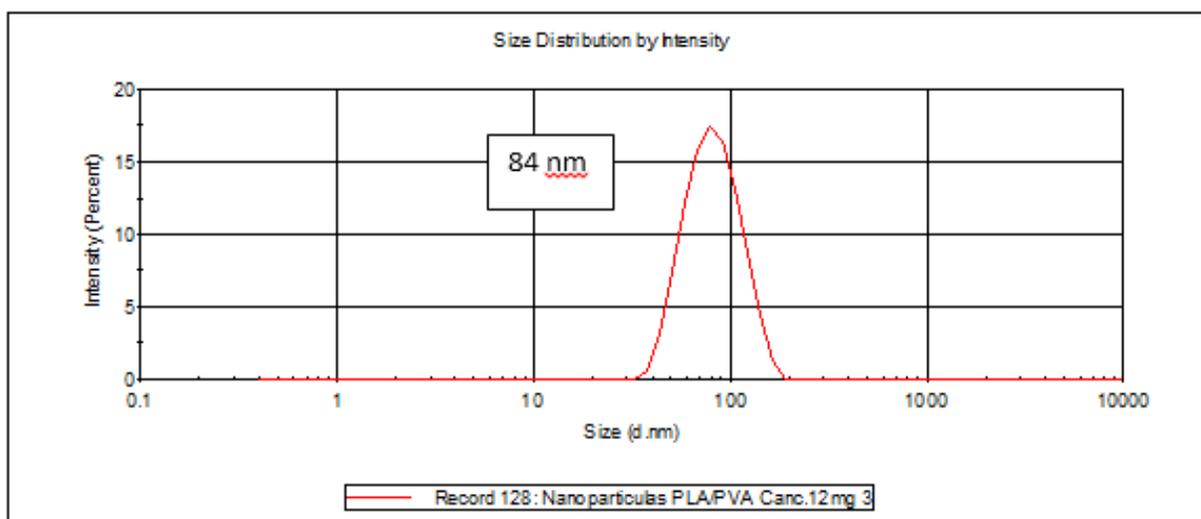


Figura 19. Grafica de intensidad de las nanopartículas con 12 mg de pristimerina (Nano Zetasiser Malvern)

Eficiencia de encapsulación

Los resultados de la eficiencia de encapsulación de los 5 mL centrifugados por cada lote cargado con extracto de cancerina se puede observar en la Tabla 7 la cual nos indica que la formulación que contiene 10 mg de principio activo es la mejor, debido a que en el sobrenadante de estas no se pudo encontrar la presencia de pristimerina.

Además, se observó una mayor eficiencia de encapsulación del 35%, otras formulaciones de nanopartículas de PVA-PLA han alcanzado un mínimo de eficiencia de encapsulación del 68 % en el cual fue reportada una mayor eficiencia de encapsulación cuanto mayor era la cantidad de fármaco (Rousaki, M. et.al.2014).

Mientras que en otro estudio donde se llevaron a cabo partículas de PVA-PLA se pudo observar que cuando aumentaban la proporción del fármaco manteniendo la proporción del polímero constante, la eficiencia del atrapamiento disminuía (Mehrotra, et.al. 2012) al igual que en este estudio.

Por lo que se sugirió que se debía mejorar el método de emulsificación, dado que el PVA del estabilizador de emulsión permanece en la interfaz durante la evaporación del solvente, existía la posibilidad de adsorción de los estabilizadores y del fármaco, lo que podría haber provocado un aumento de la adsorción del fármaco y una mayor eficiencia de atrapamiento con un mayor volumen acuoso, y también con un aumento en la concentración de PVA (Mehrotra, et. Al. 2012).

En la tabla 6 también se puede observar que al analizar el sobrenadante de la formulación con 12 mg de pristimerina, se encontró un pico correspondiente al compuesto, lo que nos indica que no es un sistema de nano encapsulación eficiente.

En el cromatograma (figura 20) se puede observar el pico correspondiente a la pristimerina que fue encontrado en 420 nm, al igual que lo reportado en Maldonado et. al. 2018.

TABLA 6. CUANTIFICACIÓN DE PRISTIMERINA

MUESTRA	Área bajo la curva	Concentración de pristimerina en $\mu\text{g/mL}$
BOTÓN 8 MG	9.1	2.86
BOTÓN 10 MG	23.6	7.03
BOTÓN 12 MG	5.23	1.75
SOBRENADANTE 8 MG	ND	<1
SOBRENADANTE 10 MG	ND	<1
SOBRENADANTE 12 MG	7.3	2.35
EXTRACTO 1	784.1	20.87
EXTRACTO 2	650.9	18.39

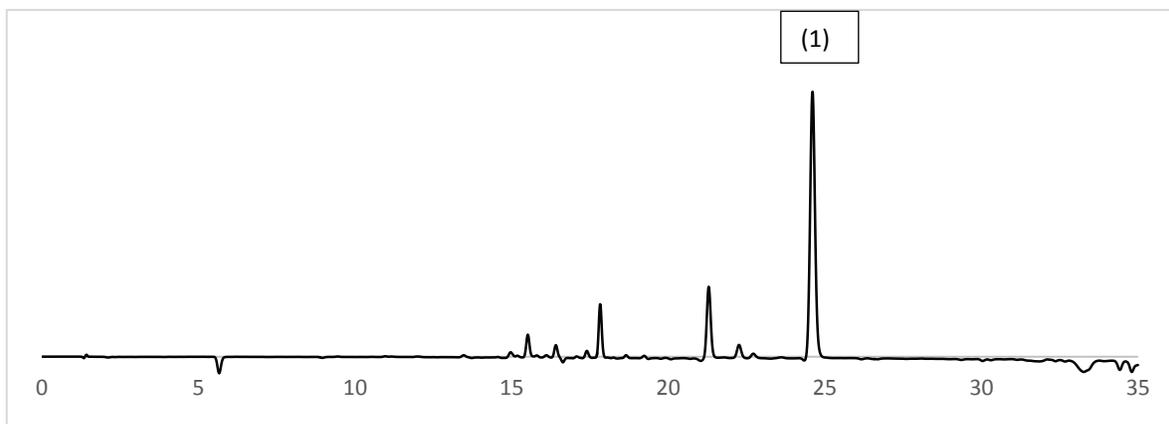
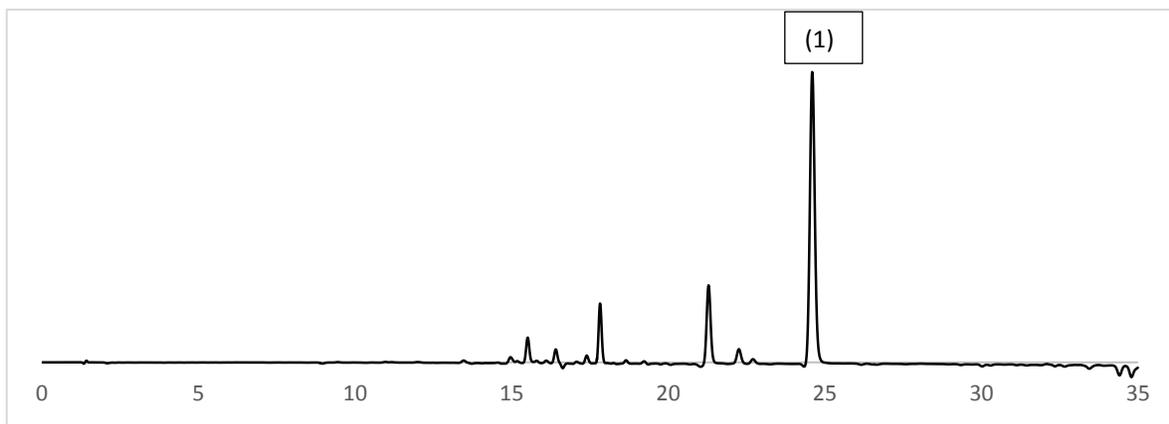


Figura 20. Cromatogramas de los extracto de cancerina: (arriba) Extracto crudo (abajo) (1) Pristimerina. Leído a una longitud de onda de 420 nm. (Cromatografo Agilent 1200)

Con base en los anteriores resultados se pudieron obtener los siguientes rendimientos

TABLA 7. EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DE PRISTIMERINA

MUESTRA	Eficiencia
BOTÓN 8 MG	14.3 %
BOTÓN 10 MG	35.1%
BOTÓN 12 MG	8.75%

Estabilidad de las nanopartículas cargadas

En las pruebas de estabilidad a temperatura ambiente (figura 21), se puede observar que las formulaciones de 40 y 50 % correspondientes a 8 y 10 mg de principio activo, no hubo una variación significativa del tamaño y este fue disminuyendo con respecto al tiempo, mientras que en la formulación correspondiente a 12 mg el tamaño fue aumentando con respecto al tiempo.

En la figura 22 se puede observar que las nanopartículas de las formulaciones de 8 y 10 mg no tuvieron un aumento significativo, mientras que la formulación de 12 mg aumento de tamaño después de la primera semana.

Con respecto a la figura 21 y 22 se puede decir que la mejor forma de almacenamiento de las nanopartículas de pristimerina es en refrigeración ya que no varía tanto el tamaño de las partículas.

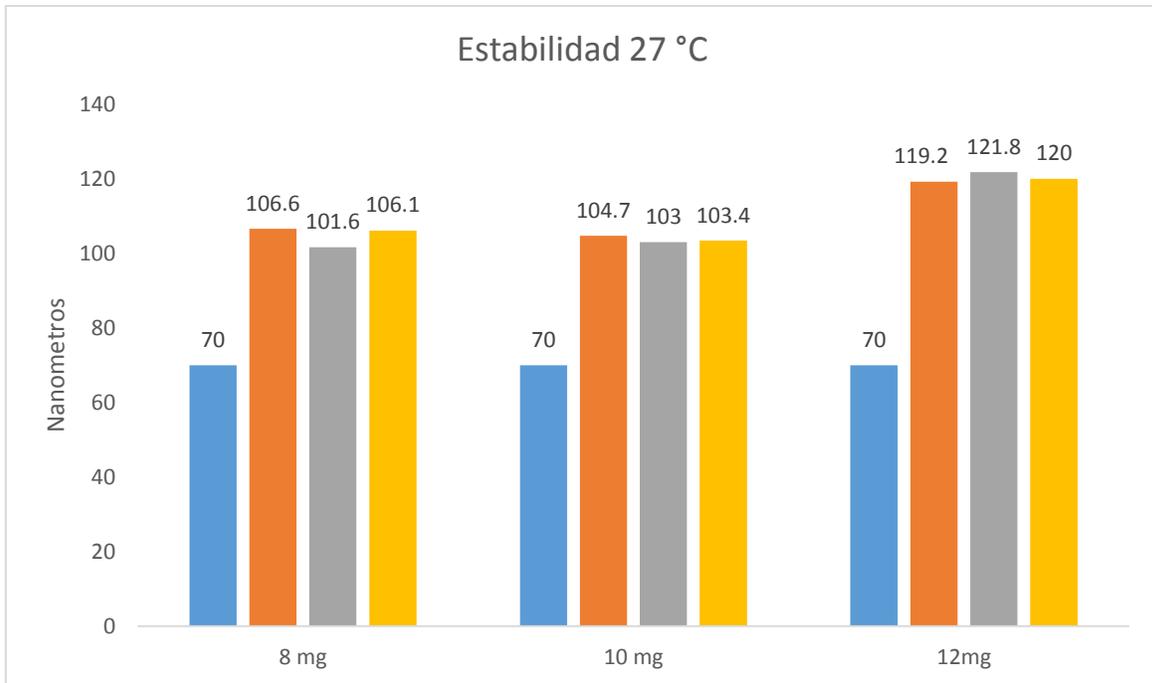


Figura 21. Estabilidad de las nanopartículas almacenadas a temperatura ambiente respecto al tiempo. ■ Día 0 ■ Día 1 ■ Semana 1 ■ Semana 2

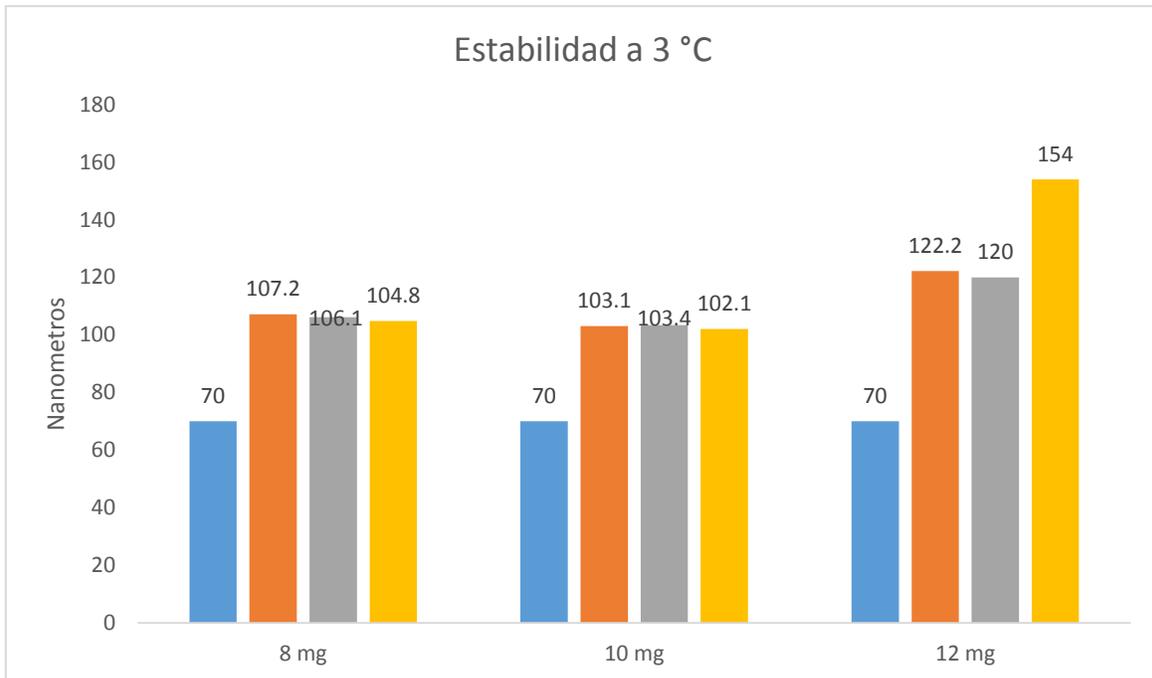


Figura 22. Estabilidad de las nanopartículas almacenadas en refrigeración respecto al tiempo ■ Día 0 ■ Día 1 ■ Semana 1 ■ Semana 2

Objetivos y metas alcanzados

Al realizar este proyecto se logró:

- ✓ Plantear un sistema de nano-encapsulación adecuado con los polímeros PVA-PLA.
- ✓ Elaborar nanopartículas sin carga con los polímeros PVA-PLA con diámetros hidrodinámicos menores a 100 nm.
- ✓ Desarrollar nanopartículas de pristimerina con los polímeros PVA-PLA, eficientes, estable con un tamaño de partícula entre 100 y 120 nm
- ✓ Determinar la estabilidad y eficiencia de encapsulación de las nanopartículas PVA-PLA-pristimerina.
- ✓ La licenciatura en química farmacéutica biológica me proporcionó las herramientas necesarias en cuanto al desarrollo, diseño y obtención de nuevas formas farmacéuticas como lo son actualmente las nanopartículas, así como el análisis y conocimiento de principios activos provenientes de productos naturales como la planta cancerina.

Conclusiones

- Se llevó a cabo el desarrollo de un sistema de encapsulación de PVA-PLA, adecuado para pristimerina, sin embargo, el tamaño obtenido de los nanocompuestos (entre 100 y 120 nm) podría mejorarse a través de otras técnicas de emulsificación para así obtener nanopartículas con diámetros hidrodinámicos menores a 100 nm que puedan usarse como transportadores eficientes de fármacos hacia los tumores cancerosos.
- El análisis de la eficiencia de encapsulación nos mostró que todas las nano capsulas cargadas contuvieron una buena eficiencia de encapsulación, pero se esperaba que la cantidad de pristimerina encapsulada fuera mayor a 12 mg.
- En cuanto a la estabilidad se pudo observar que con el tiempo eran un poco inestables ya que después del día uno comenzaron a disminuir su tamaño y durante la semana 2 aumentaron.

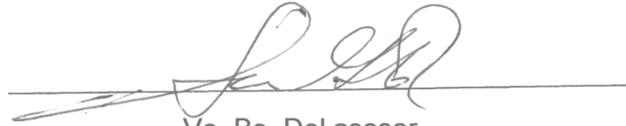
Referencias bibliograficas

1. Bazzocchi, I. L., Núñez, M. J., & Reyes, C. P. (2017). Bioactive diterpenoids from celastraceae species. *Phytochemistry Reviews*, 16(5), 861-881. doi:10.1007/s11101-017-9494-4
2. Boeva, Z. A., Catena, A., Höfler, L., Wehner, S., Fischer, C. B., & Lindfors, T. (2017). Improved water barrier properties of polylactic acid films with an amorphous hydrogenated carbon (a-C:H) coating. *Carbon*, 120, 157-164.
3. Charron, D. M., & Zheng, G. (2018). Nanomedicine development guided by FRET imaging. *Nano Today*, 18, 124-136. doi:10.1016/j.nantod.2017.12.006
4. Danhier, F. (2016). To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *Journal of Controlled Release*, 244(Pt A), 108-121. doi:10.1016/j.jconrel.2016.11.015
5. Davachi, S. M., Davachi, S. M., & Kaffashi, B. (2015). Polylactic acid in medicine. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 54(9), 944-967. doi:10.1080/03602559.2014.979507
6. Elsayy, M. A., Kim, K., Park, J., & Deep, A. (2017). Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 1346-1352. doi:10.1016/j.rser.2017.05.143
7. Gungor, F. S., & Kiskan, B. (2018). Tailoring polyvinyl alcohol with triazines and formaldehyde. *Reactive and Functional Polymers*, 124, 115-120. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2018.01.014
8. Hamad, K., Kaseem, M., Yang, H. W., Deri, F., & Ko, Y. G. (2015). Properties and medical applications of polylactic acid: A review. *Express Polymer Letters*, 9(5), 435-455. doi:10.3144/expresspolymlett.2015.42
9. Kanatt, S. R., Rao, M. S., Chawla, S. P., & Sharma, A. (2012). Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 290-297.
10. Ling, D., Park, W., Park, S., Lu, Y., Kim, K. S., Hackett, M. J. Hyeon, T. (2014). Multifunctional tumor pH-sensitive self-assembled nanoparticles for bimodal imaging and treatment of resistant heterogeneous tumors. *Journal of the American Chemical Society*, 136(15), 5647.
11. Liu, J., Liu, Z., Chen, Q., & Feng, L. (2018). Nanomedicine for tumor microenvironment modulation and cancer treatment enhancement. *Nano Today*, 21, 55-73. doi:10.1016/j.nantod.2018.06.008

12. LIU, Y. B., GAO, X., DEEB, D., BRIGOLIN, C., ZHANG, Y., SHAW, J., . . . GAUTAM, S. C. (2014). Ubiquitin-proteasomal degradation of antiapoptotic survivin facilitates induction of apoptosis in prostate cancer cells by pristimerin. *International Journal of Oncology*, 45(4), 1735-1741. doi:10.3892/ijo.2014.2561
13. Maldonado-Cubas, J., San Martin-Martínez, E., Quiroz-Reyes, C. N., & Casañas-Pimentel, R. G. (2018). Cytotoxic effect of semialarium mexicanum (miers) mennege root bark extracts and fractions against breast cancer cells. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(6), 1185-1201.
14. Mansur, A. A. P., Mansur, H. S., Sadahira, C. M., & Souza, A. N. (2008). FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science & Engineering C*, 28(4), 539-548.
15. Mehrotra A, Pandit JK (2012) Critical Process Parameters Evaluation of Modified Nanoprecipitation Method on Lomustine Nanoparticles and Cytostatic Activity Study on L132 Human Cancer Cell Line. *J Nanomed Nanotechol* 3:149. doi:10.4172/2157-7439.1000149
16. Park, J., & Kim, J. (2018). Pristimerin, a naturally occurring triterpenoid, attenuates tumorigenesis in experimental colitis-associated colon cancer. *Phytomedicine*, 42, 164-171. doi:10.1016/j.phymed.2018.03.033
17. Patole, S. P., Arif, M. F., & Kumar, S. (2018). Polyvinyl alcohol incorporated buckypaper composites for improved multifunctional performance. *Composites Science and Technology*, 168, 429-436. doi:10.1016/j.compscitech.2018.10.010
18. Roussaki, M., Gaitanarou, A., Diamanti, P. C., Vouyiouka, S., Papaspyrides, C., Kefalas, P., & Detsi, A. (2014). Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles. *Polymer Degradation and Stability*, 108, 182-187.
19. Rwei, A. Y., Wang, W., & Kohane, D. S. (2015). Photoresponsive nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*, 10(4), 451-467. doi:10.1016/j.nantod.2015.06.004
20. Shaaban, A. A., El-Kashef, D. H., Hamed, M. F., & El-Agamy, D. S. (2018). Protective effect of pristimerin against LPS-induced acute lung injury in mice. *International Immunopharmacology*, 59, 31-39. doi:10.1016/j.intimp.2018.03.033

21. Seidi, F., Jenjob, R., Phakkeeree, T., & Crespy, D. (2018). Saccharides, oligosaccharides, and polysaccharides nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 284, 188-212.
22. Sun, J., Xu, H., Zhao, L., Zhang, Y., Kang, P., Song, Z., Cui, Y. (2019). Induction of cell-cycle arrest and apoptosis in human cholangiocarcinoma cells by pristimerin. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(7), 12002-12009.
23. Thomas, D., Zhuravlev, E., Wurm, A., Schick, C., & Cebe, P. (2018). Fundamental thermal properties of polyvinyl alcohol by fast scanning calorimetry. *Polymer*, 137, 145-155. doi:10.1016/j.polymer.2018.01.004
24. Van Etten, E. A., Ximenes, E. S., Tarasconi, L. T., Garcia, I. T. S., Forte, M. M. C., & Boudinov, H. (2014). Insulating characteristics of polyvinyl alcohol for integrated electronics. *Thin Solid Films*, 568, 111-116. doi:10.1016/j.tsf.2014.07.051
25. Voronova, M. I., Surov, O. V., Guseinov, S. S., Barannikov, V. P., & Zakharov, A. G. (2015). Thermal stability of polyvinyl alcohol/nanocrystalline cellulose composites. *Carbohydrate Polymers*, 130, 440-447. doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.032
26. Zamora-C., P., Rico-G. V., Barrientos-M., Roberto C., Puc-G., Elda C., Villegas1, P., Domínguez-C. y Gutiérrez-B. C. Estructura y composición florística de la selva mediana subperennifolia en bethania, campeche, México. *Polibotánica*. 43 (2).
27. Zhang, L., Zhu, H., Gu, Y., Wang, X., & Wu, P. (2019). Dual drug-loaded PLA nanoparticles bypassing drug resistance for improved leukemia therapy. *Journal of Nanoparticle Research*, 21(4), 1-13. doi:10.1007/s11051-018-4430-0

Vo. Bo. Del contenido académico



Vo. Bo. Del asesor

Dr. Eduardo San Martín Martínez



Vo. Bo. Del asesor

Dr. Juan Esteban Barranco Florido

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

INFORME DE ACTIVIDADES DE SERVICIO SOCIAL
**“Nano-encapsulación de fitofármacos para su uso en el tratamiento contra
cáncer de mama”.**

PERTENECE AL PROYECTO GENÉRICO

Diseño y desarrollo de formas farmacéuticas

Alumna: Janeth Andrea Campos Díaz

Matrícula: 2143025185

Dirección: Sauces S/N Colonia Rincón Verde C.P. 53219 Municipio Naucalpan de
Juárez

Tel (s): 5586813213 y 53488798

Asesores: Dr. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO

Dr. EDUARDO SAN MARTÍN MARTINEZ

Lugar de realización: Laboratorio de Biomateriales. Centro de Investigación en
Ciencia Aplicada Tecnología Avanzada Unidad Legaríá.

Fecha de inicio y terminación: Enero 2019 -Julio 2019

Septiembre, 2019

Resumen

Las nanopartículas son utilizadas como vehículos de administración de fármacos, generalmente son menores a 100 nm en al menos una dimensión, y consisten en diferentes materiales biodegradables, como polímeros naturales o sintéticos, lípidos o metales. Las nanopartículas son absorbidas por las células de manera más eficiente que las micromoléculas más grandes y, por lo tanto, podrían usarse como sistemas de transporte y entrega efectivos. Para aplicaciones terapéuticas, los fármacos pueden integrarse en la matriz de la partícula o unirse a la superficie de la partícula (Sarabjeet, 2007)

El ácido poli láctico ha sido utilizado desde la década de 1960 en la construcción de implantes quirúrgicos y reparación de tejidos, actualmente tiene varias aplicaciones biomédicas, incluidas suturas, placas óseas, malla abdominal y administración de fármacos de liberación controlada. Este polímero al igual que el PLGA y el PGA, son biocompatibles, biodegradables y no tóxicos. El primer sistema de administración de medicamentos basado en PLGA aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) fue el sistema de administración de medicamentos de Lupron Depot (Byung, et. al., 2016). El PVA es un polímero sintético, soluble en agua, con excelentes propiedades de formación de película, emulsionante y adhesivo. También imparte buena resistencia a la tracción (TS) y biodegradabilidad y, por lo tanto, se ha utilizado en muchas aplicaciones de biomateriales. El USDA también ha aprobado el uso de PVA para envasar productos de carne y aves (Kanatt, et. al. 2012).

La cancerina (*Semialarium mexicanum*) Esta especie se puede encontrar en zonas cálido-húmedas, con temperatura promedio de 27 °C, en el Estado de Campeche (Zamora, et. Al., 2015). Es usada en México para el tratamiento contra el cáncer. Uno de los compuestos presentes en esta planta que se cree tiene actividad citotóxica es la pristimerina (Maldonado, et. Al. 2018). La pristimerina es un triterpenoide que induce citotoxicidad en varias líneas celulares de cáncer (Sun, et. Al. 2019).

El objetivo de este estudio fue elaborar nanopartículas de pristimerina con los polímeros PVA y PLA que sean eficientes estables y con un diámetro hidrodinámico menor a 200 nm.

Se consultó bibliografía para conocer el método a seguir a la hora de elaborar las nano-partículas, una vez determinada se plantearon diferentes formulaciones con distintas cantidades de los polímeros para crear un sistema de encapsulación con la menor pérdida de reactivos para la cual se hizo un análisis con FTIR, además a todos los lotes se les midió el diámetro hidrodinámico, después se procedió a elaborar las partículas cargadas con extracto de pristimerina para esto se plantearon cuatro formulaciones más con cantidades distintas del principio activo, todos los lotes fueron analizados mediante HPLC para determinar su eficiencia de

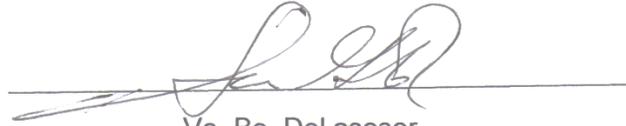
encapsulación y se mantuvieron a temperatura ambiente y en refrigeración para observar su estabilidad, también se midió el tamaño de partícula de cada lote.

Se pudieron obtener nanopartículas sin carga formadas por los polímeros PLA y PVA con diámetros hidrodinámicos entre 80 y 90 nm, la formulación utilizada para obtener este sistema sirvió para elaborar nanopartículas cargadas con pristimerina con tamaños de partícula entre 100 y 110 nm conteniendo 8, 10 y 12 mg del principio activo, de las cuales las que obtuvieron una mejor eficiencia de encapsulación fueron las que contenían 10 mg de pristimerina, la estabilidad de las nanopartículas aumento entre diez y quince nanómetros durante la primera semana y disminuyo entre 2 y 4 nanómetros durante la segunda semana.

Bibliografía

1. Kanatt, S. R., Rao, M. S., Chawla, S. P., & Sharma, A. (2012). Active chitosan–polyvinyl alcohol films with natural extracts. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 290-297.
2. Maldonado-Cubas, J., San Martin-Martínez, E., Quiroz-Reyes, C. N., & Casañas-Pimentel, R. G. (2018). Cytotoxic effect of semialarium mexicanum (miers) menega root bark extracts and fractions against breast cancer cells. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(6), 1185-1201.
3. Zamora-C., P., Rico-G. V., Barrientos-M., Roberto C., Puc-G., Elda C., Villegas1, P., Domínguez-C. & Gutiérrez-B. C. Estructura y composición florística de la selva mediana subperennifolia en bethania, campeche, México. *Polibotánica*. 43 (2).
4. Sun, J., Xu, H., Zhao, L., Zhang, Y., Kang, P., Song, Z., Cui, Y. (2019). Induction of cell-cycle arrest and apoptosis in human cholangiocarcinoma cells by pristimerin. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(7), 12002-12009.

Vo. Bo. Del contenido Académico

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and flourishes, positioned above a horizontal line.

Vo. Bo. Del asesor

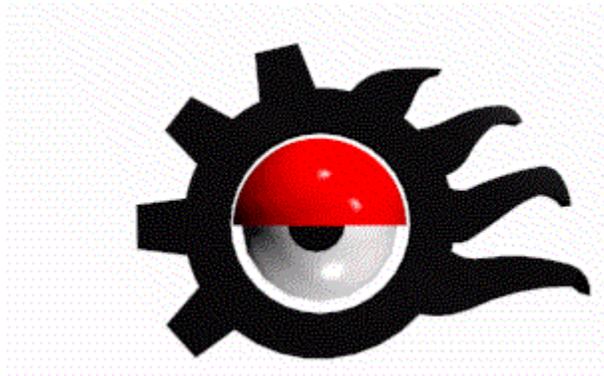
Dr. Eduardo San Martín Martínez

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and flourishes, positioned above a horizontal line.

Vo. Bo. Del asesor

Dr. Juan Esteban Barranco Florido

Anexo 1



**Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología
Avanzada Unidad Legaria**

**Procedimiento Normalizado de Operación para el manejo del
Nano Zeta Sizer Malvern**

Laboratorio de Biomateriales

Elaboró:

Janeth Andrea Campos Díaz

Licenciatura:

Química Farmacéutica Biológica

Reviso:

Dra. Rocío Casañas Pimentel

Aprobó:

Dr. Eduardo San Martín Martínez

Objetivo

Elaborar el procedimiento normalizado de Operación para el manejo del equipo Nano Zetasizer.

Alcance

Aplicación para las personas que utilicen el equipo y el software de Nano Zetasizer.

Campo de aplicación del Nano Zeta-Sizer Malvern

Ingeniería química

Química analítica

Física química

Biología estructural

Aplicaciones importantes del Nano Zeta-Sizer Malvern

Liposomas

- Nanoesferas, Nanocápsulas
- Sistemas coloidales de liberación de fármacos
- Eliminación de materiales tóxicos en las aguas de consumo o residuales
- Nanoemulsiones poliméricas (látex, poliestireno...)
- Quantum dots/Nanocristales (brillo)
- Micelas de surfactantes (estabilidad)
- Nanotoxicidad-nanopartículas
- Oro coloidal
- Dióxido de Titanio (blancura)
- Óxidos metálicos

Responsabilidad

Es responsabilidad del personal del laboratorio de biomateriales acatar lo dispuesto en este documento. Descrito a continuación:

- A) Jefe de departamento: Verificar el apego a lo establecido en este procedimiento en cuanto al uso del equipo, revisarlos, autorizarlos y verificar el control de cambio.
- B) Administrativos del laboratorio de biomateriales: En ausencia del Jefe de departamento vigilar el cumplimiento de los procedimientos y la aplicación de los mismos.
- C) Alumnos: Elaborar los procedimientos que la actividad demande y verificar el cumplimiento de los mismos.

Características del equipo

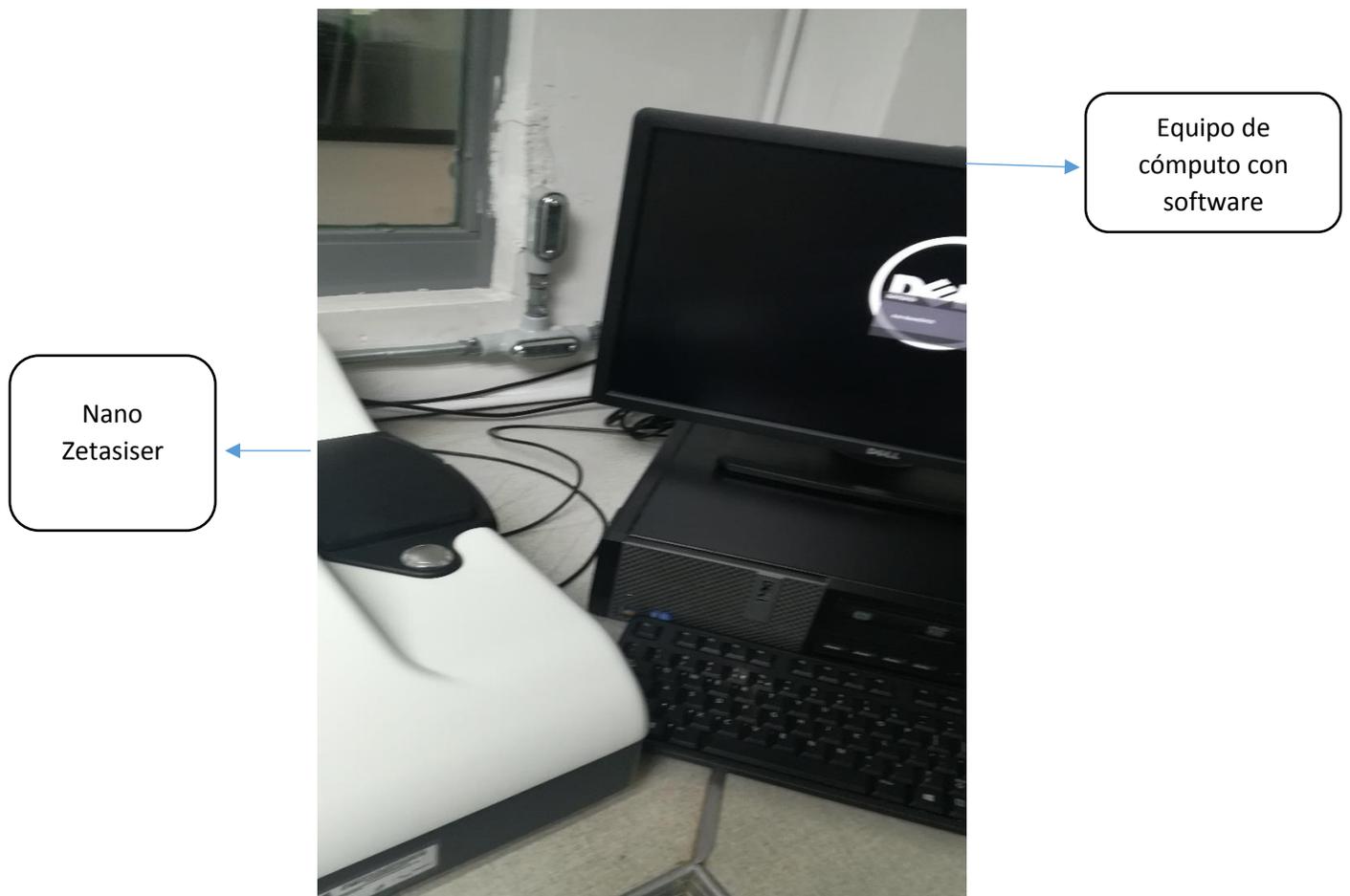


Ilustración 3. Equipo Nano Zeta-Sizer Malvern



Celda para potencial Zeta

Celda para potencial Zeta desechable

Ilustración 2. Celdas para medir potencial Zeta



Celda desechable para diámetro hidrodinámico

Celda de vidrio para medir diámetro hidrodinámico

Ilustración 3. Celdas para medir diámetro hidrodinámico



Celda de alta concentración



Celda de flujo de cuarzo para ser usada con el equipo de cromatografía de exclusión por tamaño

Abrir una nueva carpeta

Al abrir el software Zetasizer, se desplegará la siguiente ventana, dar clic en el botón skip.

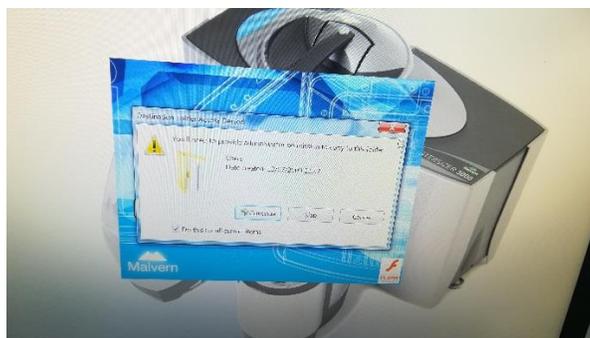


Ilustración 4

Al entrar se desplegará la siguiente ventana, a la que se le debe proporcionar el nombre de usuario y dar clic en ok.

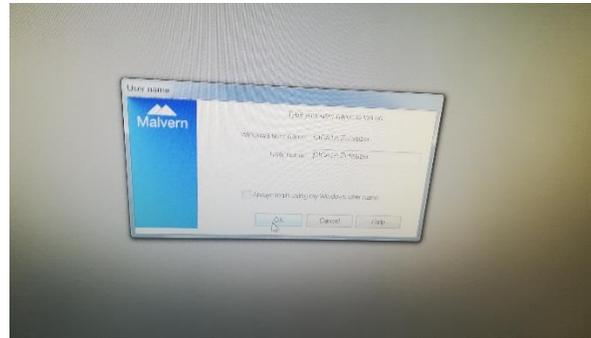


Ilustración 5

Una vez abierto se aparecerá una página con la lista de las últimas mediciones hechas

Record	Type	Sample Name	Measurement Date and Time	T	Z-Ave	PDI	ZP	pH	IEP(s)	IEP Units	IEP Units	IEP Units
1	Size	Original pH 4.36 1										
2	Size	Original pH 4.36 2	20 July 2018 11:20:57	25.0	27.69	0.441	0.00					
3	Size	Original pH 4.36 3	20 July 2018 11:20:10	24.0	29.91	0.372	0.00					
4	Zeta	Original pH 4.36 1	20 July 2018 11:31:42	24.0	80.48	0.208	0.00					
5	Zeta	Original pH 4.36 2	20 July 2018 11:30:20	25.0			-2.20	0.00				
6	Zeta	Original pH 4.36 3	20 July 2018 11:30:42	25.0			-3.83	0.00				
7	Size	pH 5.43 1	20 July 2018 11:48:45	25.0			-2.65	0.00				
8	Size	pH 5.43 2	20 July 2018 11:48:45	25.0	243.8	0.461	0.00					
9	Size	pH 5.43 3	20 July 2018 11:51:18	25.1	268.5	0.605	0.00					
10	Zeta	pH 5.43 1	20 July 2018 11:53:50	25.0	818.0	0.887	0.00					
11	Zeta	pH 5.43 2	20 July 2018 11:54:22	25.0			-6.17	0.00				
12	Zeta	pH 5.43 3	20 July 2018 11:57:22	25.0			-6.21	0.00				
13	Size	pH 6.1 1	20 July 2018 11:58:01	25.1			-6.36	0.00				
14	Size	pH 6.1 2	20 July 2018 12:07:26	25.0	2.170e4	0.400	0.00					
15	Size	pH 6.1 3	20 July 2018 12:09:58	25.0	2.840e4	0.247	0.00					
16	Size	pH 6.1 1	20 July 2018 12:12:31	24.8	2.470e4	0.332	0.00					
17	Zeta	pH 6.1 2	20 July 2018 12:13:03	25.0			-3.50	0.00				
18	Zeta	pH 6.1 3	20 July 2018 12:16:04	24.8			-4.31	0.00				
19	Size	pH 6.71 1	20 July 2018 12:16:52	25.0			-3.00	0.00				
20	Size	pH 6.71 2	20 July 2018 12:27:12	24.8	1.858e4	0.164	0.00					
21	Size	pH 6.71 3	20 July 2018 12:29:24	25.1	5782	0.072	0.00					
22	Zeta	pH 6.71 1	20 July 2018 12:31:36	25.0	3755	0.338	0.00					
23	Zeta	pH 6.71 2	20 July 2018 12:32:40	25.0			-7.36	0.00				
24	Zeta	pH 6.71 3	20 July 2018 12:35:37	24.9			-6.62	0.00				
25	Size	pH 9.6 1	20 July 2018 12:36:18	25.1			-11.0	0.00				
26	Size	pH 9.6 2	20 July 2018 12:46:38	25.0	417.0	0.848	0.00					
27	Size	pH 9.6 3	20 July 2018 12:48:58	25.0	350.3	0.672	0.00					
28	Zeta	pH 9.6 1	20 July 2018 12:51:21	25.0	300.1	0.734	0.00					
29	Zeta	pH 9.6 2	20 July 2018 12:51:57	25.0			-21.4	0.00				
30	Zeta	pH 9.6 3	20 July 2018 12:54:56	25.0			-20.0	0.00				
31	Size	pH 12.61 1	20 July 2018 12:55:37	25.0			-20.1	0.00				
32	Size	pH 12.61 2	20 July 2018 13:06:21	25.0	476.1	0.827	0.00					
33	Size	pH 12.61 3	20 July 2018 13:00:13	25.0	620.1	0.715	0.00					
Mean 3.5			20 July 2018 13:12:06	25.0	336.8	0.742	0.00					
Std Dev				24.8	80.48	0.208	-2.86	0.00				
Ready				0.1			3.0405	0.00				

Ilustración 6

Para crear una nueva carpeta dar clic en el ícono file, seguido de la opción new, elegir el ícono Measurement File.

Record	Type	Sample Name	Measurement Date and Time	T	Z-Ave	PDI	ZP	pH	IEP(s)	IEP Units	IEP Units	IEP Units
1	Size	Original pH 4.36 1										
2	Size	Original pH 4.36 2	20 July 2018 11:20:57	25.0	27.69	0.441	0.00					
3	Size	Original pH 4.36 3	20 July 2018 11:20:10	24.0	29.91	0.372	0.00					
4	Zeta	Original pH 4.36 1	20 July 2018 11:31:42	24.0	80.48	0.208	0.00					
5	Zeta	Original pH 4.36 2	20 July 2018 11:30:20	25.0			-2.20	0.00				
6	Zeta	Original pH 4.36 3	20 July 2018 11:30:42	25.0			-3.83	0.00				
7	Size	pH 5.43 1	20 July 2018 11:48:45	25.0			-2.65	0.00				
8	Size	pH 5.43 2	20 July 2018 11:48:45	25.0	243.8	0.461	0.00					
9	Size	pH 5.43 3	20 July 2018 11:51:18	25.1	268.5	0.605	0.00					
10	Zeta	pH 5.43 1	20 July 2018 11:53:50	25.0	818.0	0.887	0.00					
11	Zeta	pH 5.43 2	20 July 2018 11:54:22	25.0			-6.17	0.00				
12	Zeta	pH 5.43 3	20 July 2018 11:57:22	25.0			-6.21	0.00				
13	Size	pH 6.1 1	20 July 2018 11:58:01	25.1			-6.36	0.00				
14	Size	pH 6.1 2	20 July 2018 12:07:26	25.0	2.170e4	0.400	0.00					
15	Size	pH 6.1 3	20 July 2018 12:09:58	25.0	2.840e4	0.247	0.00					
16	Size	pH 6.1 1	20 July 2018 12:12:31	24.8	2.470e4	0.332	0.00					
17	Zeta	pH 6.1 2	20 July 2018 12:13:03	25.0			-3.50	0.00				
18	Zeta	pH 6.1 3	20 July 2018 12:16:04	24.8			-4.31	0.00				
19	Size	pH 6.71 1	20 July 2018 12:16:52	25.0			-3.00	0.00				
20	Size	pH 6.71 2	20 July 2018 12:27:12	24.8	1.858e4	0.164	0.00					
21	Size	pH 6.71 3	20 July 2018 12:29:24	25.1	5782	0.072	0.00					
22	Zeta	pH 6.71 1	20 July 2018 12:31:36	25.0	3755	0.338	0.00					
23	Zeta	pH 6.71 2	20 July 2018 12:32:40	25.0			-7.36	0.00				
24	Zeta	pH 6.71 3	20 July 2018 12:35:37	24.9			-6.62	0.00				
25	Size	pH 9.6 1	20 July 2018 12:36:18	25.1			-11.0	0.00				
26	Size	pH 9.6 2	20 July 2018 12:46:38	25.0	417.0	0.848	0.00					
27	Size	pH 9.6 3	20 July 2018 12:48:58	25.0	350.3	0.672	0.00					
28	Zeta	pH 9.6 1	20 July 2018 12:51:21	25.0	300.1	0.734	0.00					
29	Zeta	pH 9.6 2	20 July 2018 12:51:57	25.0			-21.4	0.00				
30	Zeta	pH 9.6 3	20 July 2018 12:54:56	25.0			-20.0	0.00				
31	Size	pH 12.61 1	20 July 2018 12:55:37	25.0			-20.1	0.00				
32	Size	pH 12.61 2	20 July 2018 13:06:21	25.0	476.1	0.827	0.00					
33	Size	pH 12.61 3	20 July 2018 13:00:13	25.0	620.1	0.715	0.00					
Mean 3.5			20 July 2018 13:12:06	25.0	336.8	0.742	0.00					
Std Dev				24.8	80.48	0.208	-2.86	0.00				
Ready				0.1			3.0405	0.00				

Ilustración 7

Inmediatamente se abrirán los archivos de la computadora, se deberá escoger la ubicación y dar clic izquierdo para crear una nueva carpeta, la carpeta deberá ser nombrada con el nombre de la persona que utilizará el equipo o en su defecto el método utilizado en la experimentación.

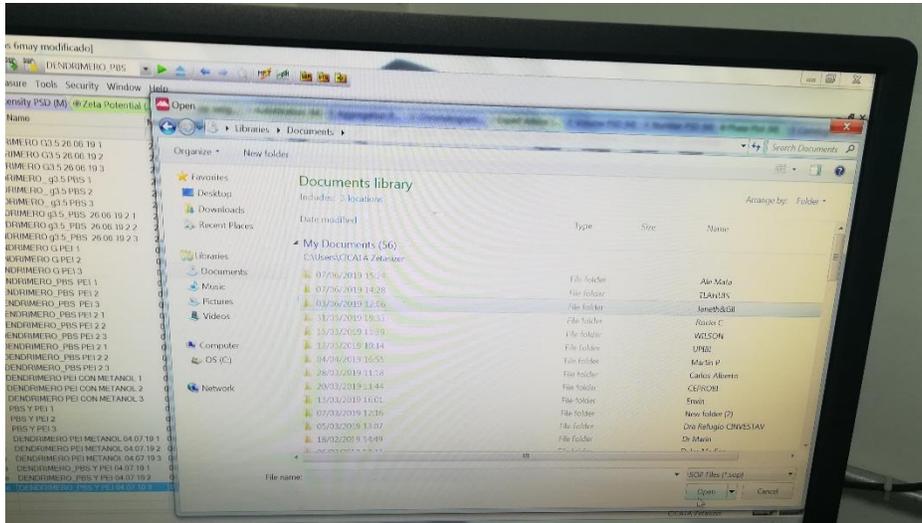


Ilustración 8

Creación de un nuevo SOP de medición

Para crear un nuevo SOP de medición, se comienza dando clic el ícono file, posteriormente se elige la opción SOP.

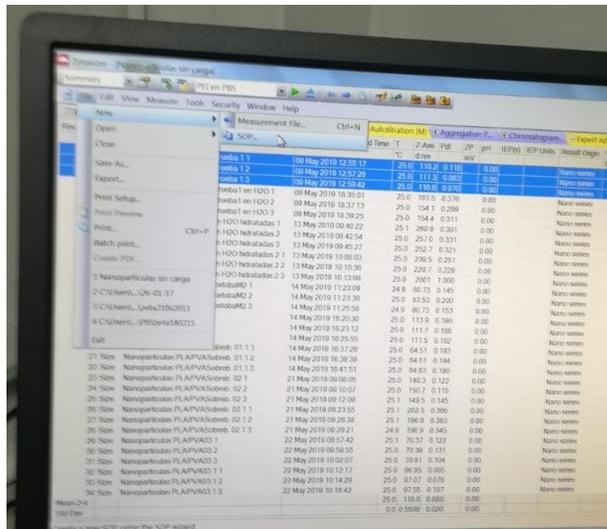


Ilustración 9

Se desplegará la siguiente ventana en la cual puedes elegir si crearas un SOP de potencial Z o de diámetro hidrodinámico.

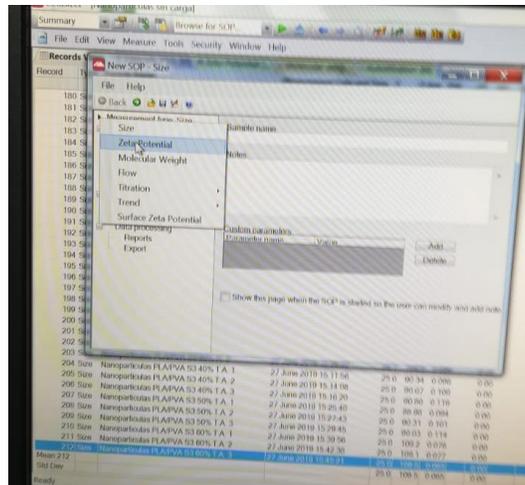


Ilustración 10

Después de haber seleccionado entre esas dos opciones se abrirá una ventana en la cual se deben escoger las características que tiene la muestra a medir como dispersante, temperatura (indispensable para potencial Zeta), celda, entre otras.

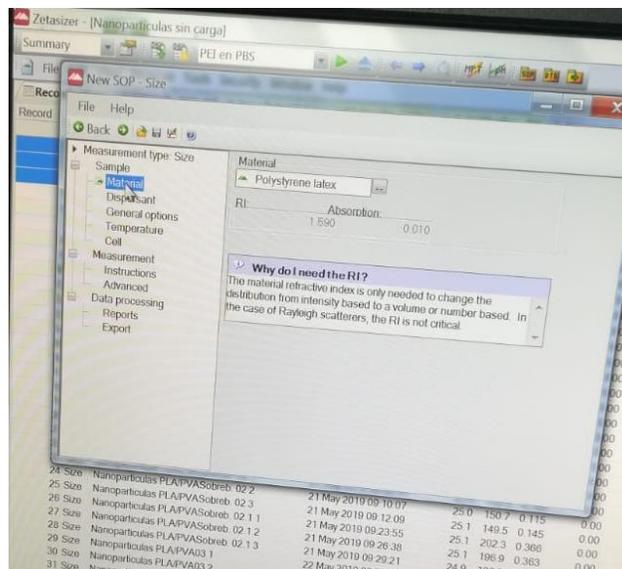


Ilustración 11

Posteriormente seleccionar la opción del dispersante se desplegará la siguiente ventana.

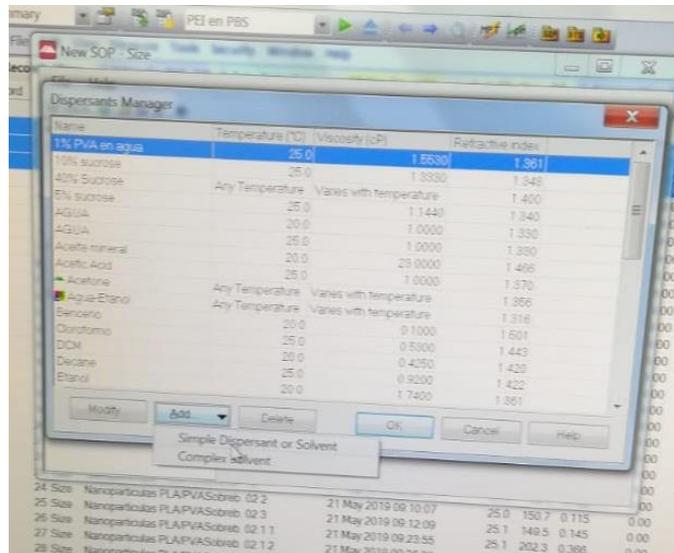


Ilustración 12

Seleccionar de entre las opciones el o los dispersantes utilizados en la experimentación, si no se encuentra en la lista se debe dar clic en el ícono de adicionar y colocar las características que se requieran, como nombre del reactivo, índice de refracción, temperatura, etc.

Nota: al momento de introducir los datos se debe tomar en cuenta la concentración a la que se encuentran los reactivos.

Ejemplo: Índice de refracción y viscosidad de una solución de PVA al 0.1% p/v

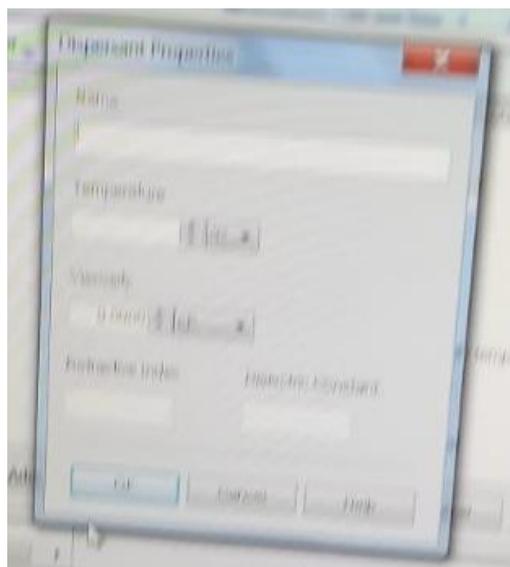


Ilustración 13

Medir muestras

Para medir muestras primero dar clic en la opción measure.

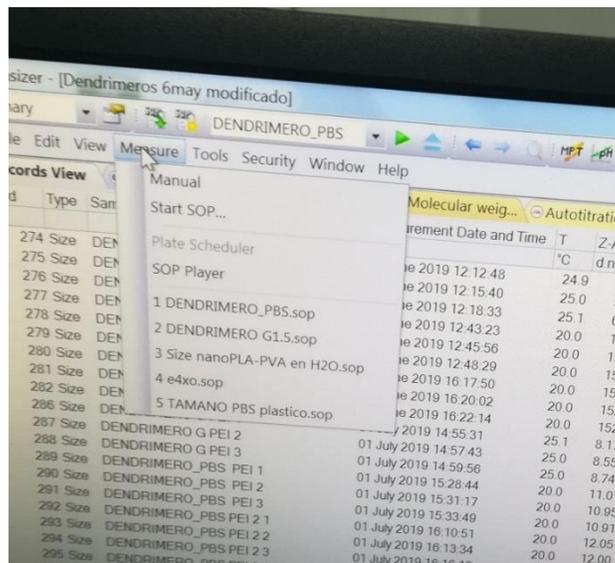


Ilustración 14

Posteriormente elegir el ícono Start SOP o manual dependiendo del caso.

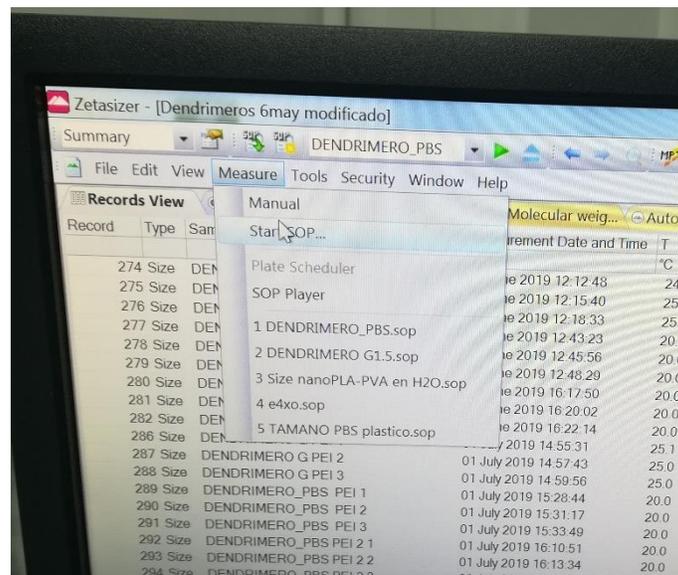


Ilustración 15

Inmediatamente se abrirá la lista de documento de la computadora, se deberá elegir la carpeta correspondiente al SOP creado anteriormente para la medición.

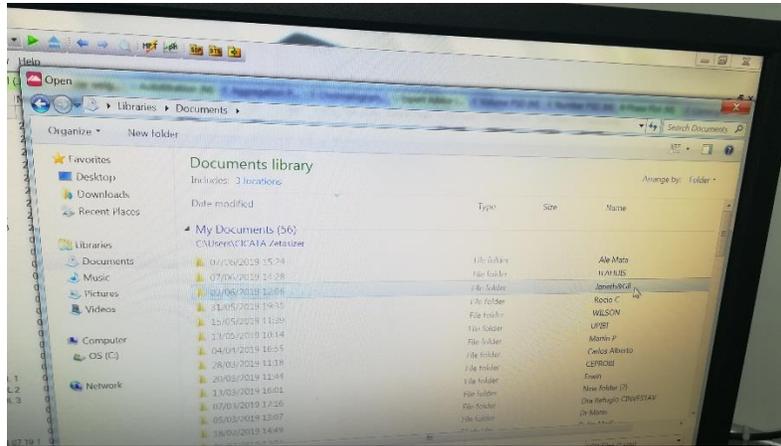


Ilustración 16

Introducir la muestra en el equipo.

Para diámetro hidrodinámico:

La celda ya sea de vidrio o desechable debe ser llenada con 1 mL de la muestra a medir asegurándose de que este bien limpia (cuidar que no caiga polvo sobre la muestra), si es necesario deberá ser filtrada la muestra antes de ser introducida en el equipo, para evitar errores de medición.

Para potencial Z en celda desechable

La celda desechable debe ser llenada por completo ya que los electrodos de dicha celda se encuentran en la parte de arriba, la muestra puede ser introducida mediante una jeringa, al terminar de llenarla no se debe olvidar poner los tapones a dicha celda.



Ilustración 17

Para potencial Z en celda de vidrio

Para la celda de vidrio de potencial Z, se coloca solo un mililitro de la solución a medir ya que al introducir el electrodo este queda cubierto en su totalidad.



Electrodos

Introducir las muestras en el equipo, las celdas de potencial Zeta se deben introducir de manera que los electrodos queden en forma horizontal, la celda de vidrio para medir diámetro hidrodinámico se introduce de manera que las letras de la celda queden en la parte de enfrente.

Nota: La celda deberá ser enjuagada con anterioridad con el disolvente usado como dispersante ya sea agua desionizada o algún disolvente orgánico.



Ilustración 18

El equipo analizará la muestra por triplicada unas 12 a 14 veces por corrida. Posteriormente arrojará los resultados correspondientes en forma de una gráfica de intensidad contra el tamaño en nanómetros.

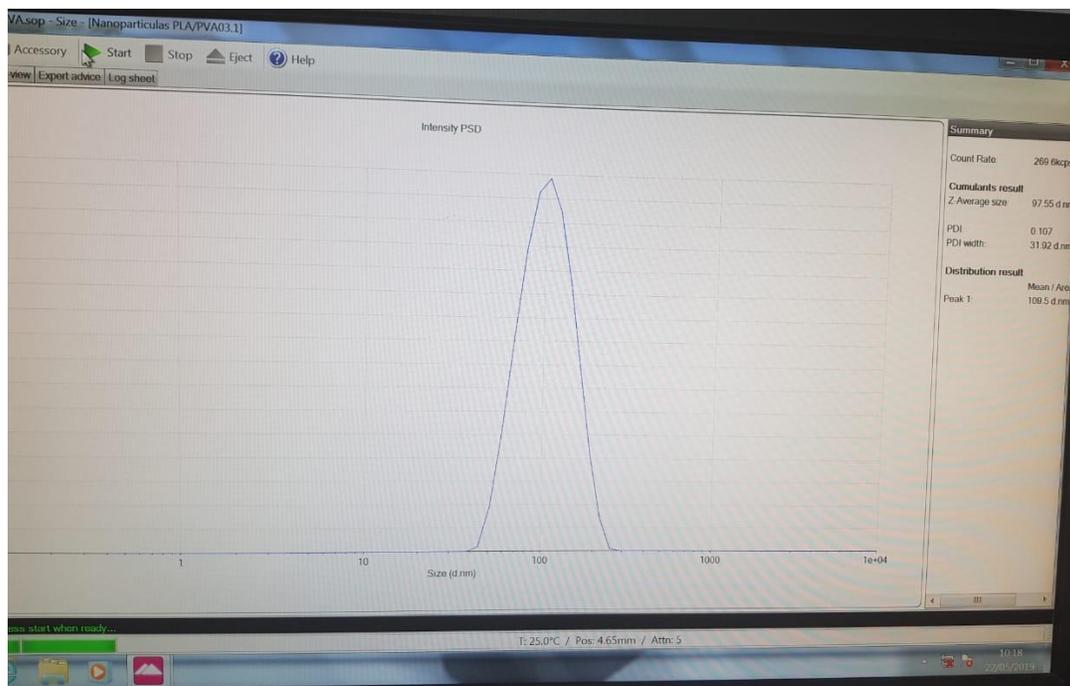


Ilustración 19

Resultados

Diámetro hidrodinámico

También se nos proporciona un análisis específico de la muestras el cual nos proporciona la temperatura a la cual fue leída la muestra, el número de kilo cuentas por segundo (kcps), el número de picos presentes en la muestra (referente a todos las partículas con tamaño de partícula diferente), un promedio del tamaño en el que se encuentran las partículas, presentado como Z-average medido en nm y el índice de polidispersidad.

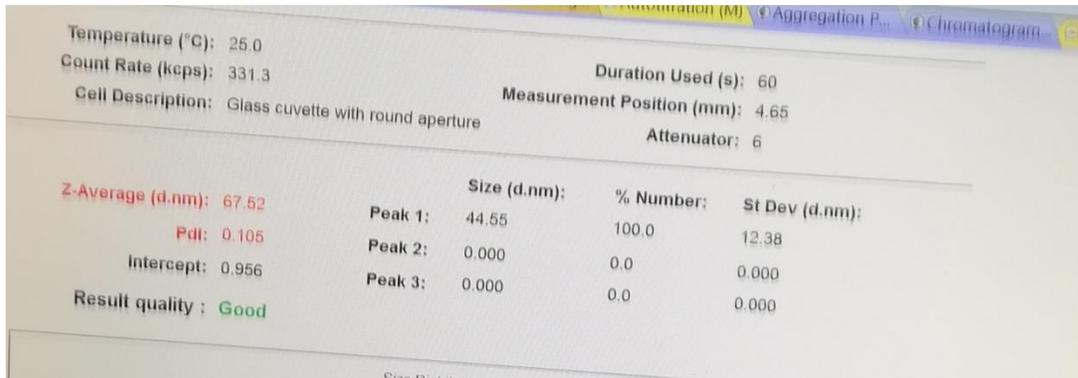
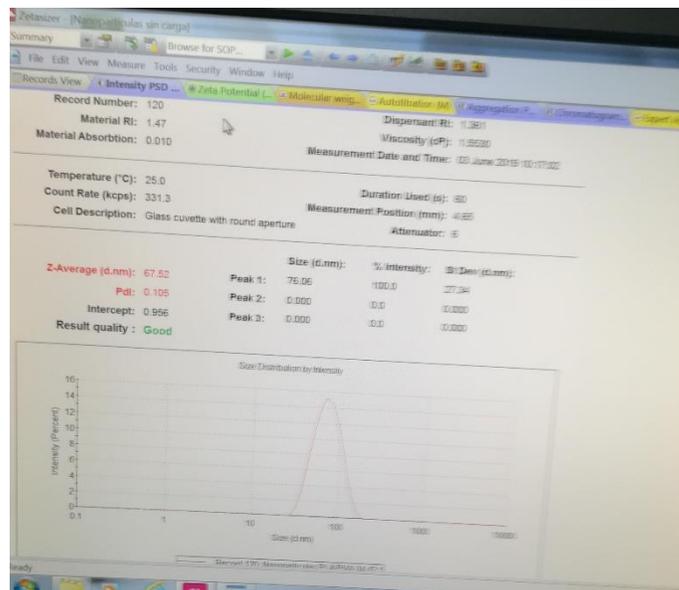


Ilustración 20

Si la mayoría de las partículas presentan tdiámetros hidrodinámicos parecidos los resultados de calidad (result quality), serán presentados como buenos por lo que se nos permitirá ver el análisis en las opciones volumen, número y distribución.



Grafica de intensidad

Ilustración 21

Grafica por número

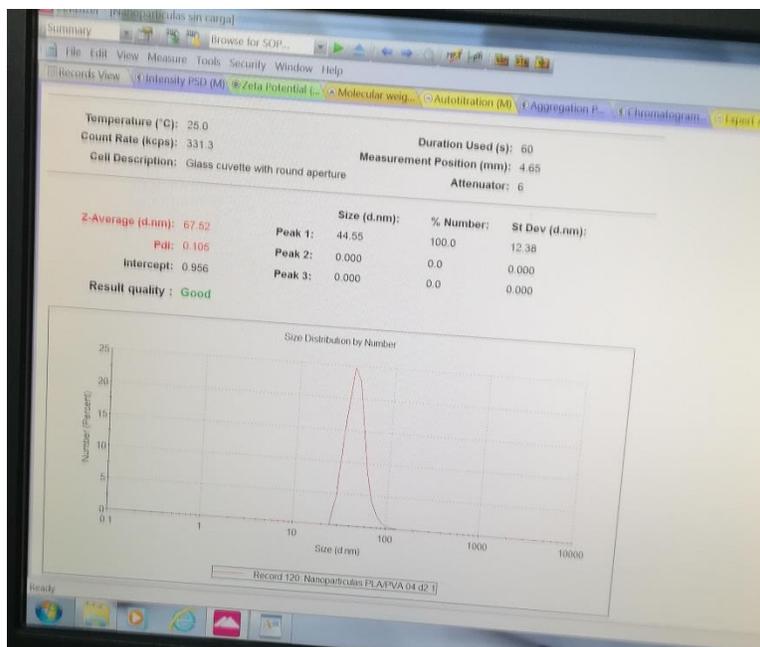


Ilustración 22

Potencial Zeta

La medición de potencial Zeta nos proporciona una gráfica y los mismos datos que se dan en diámetro hidrodinámico.

Nota: La gráfica solo se observa si los resultados de conductividad de la muestra son buenos.

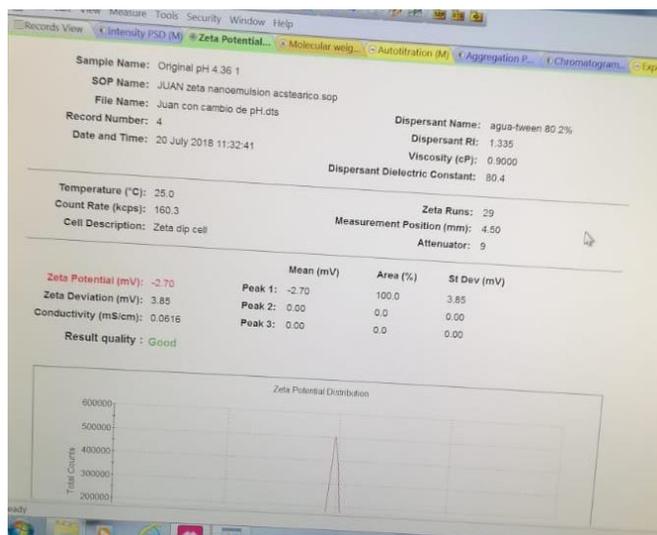


Ilustración 23

Para las muestras a las que el resultado de calidad no sea bueno, deberán ser revisadas las recomendaciones del experto.

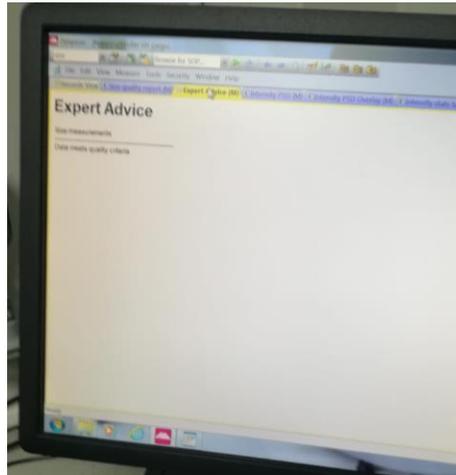


Ilustración 24

Cuidado de las celdas

Al término de medición de muestras las celdas deberán ser lavadas con agua corriente, posteriormente con agua desionizada, dejar la celda completamente seca antes de guardarla.

Todas las celdas deberán ser tocadas con guantes para ayudar a su limpieza se pueden usar telas de microfibra como la siguiente.

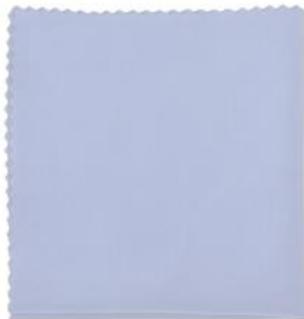


Ilustración 25