

### **3. ANTECEDENTES**

### **3.1 Agentes antimicrobianos**

#### **3.1.1 Generalidades**

Los agentes o fármacos antimicrobianos son moléculas naturales, es decir, producidas por un organismo vivo como bacterias u hongos, sintéticas o semi-sintéticas capaces de inducir la muerte o inhibir el crecimiento de bacterias, virus u hongos. Actualmente el uso de moléculas de origen natural no es una práctica común, razón por la que ya no se hace tan evidente la diferenciación entre los antimicrobianos sintéticos y sus derivados (Seijam y Vignoli, 2008). Los agentes antimicrobianos que matan microorganismos son denominados como agentes bactericidas, fungicidas o virucidas, según sea el caso. Los agentes antimicrobianos que no matan a los microorganismos pero que inhiben su crecimiento se denominan bacteriostáticos, fungistático y virustáticos respectivamente.

Los agentes antimicrobianos son diferentes de acuerdo a su toxicidad selectiva. Cuando estos agentes son de toxicidad no selectiva, quiere decir que actuarán de manera similar sobre todas las células, sin diferenciar entre ellas. Por otra parte, cuando un agente antimicrobiano es de toxicidad selectiva, tiene la capacidad de matar al microorganismo causante de la enfermedad sin afectar al resto de las células del hospedador (Madigan et al, 2009).

#### **3.1.2 Efecto de los agentes antimicrobianos**

Los agentes antimicrobianos se clasifican como bacteriostáticos, bactericidas o bacteriolíticos dependiendo del efecto que causan al añadirlos a un cultivo bacteriano. Los agentes bacteriostáticos suelen ser inhibidores de la síntesis proteica y generalmente actúan

uniéndose a alguna de las subunidades de los ribosomas. Cuando la concentración del agente antimicrobiano disminuye, las subunidades de los ribosomas quedan nuevamente libres y pueden continuar con la síntesis proteica que conlleva a crecimiento y reproducción bacteriana (Madigan et al, 2009).

Los agentes bactericidas se unen fuertemente a las células diana, de manera que provocan la muerte de la misma. No obstante, las células muertas no se destruyen y el número total de células permanece igual. Algunos de los agentes bactericidas son bacteriolíticos también, que quiere decir que provocan la muerte de la célula por medio de lisis. La lisis celular conlleva a que se libere el contenido de la misma y que el recuento de células totales disminuya. Entre este grupo de agentes podemos encontrar a aquellos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular, como es el caso de la penicilina y compuestos detergentes que rompen la membrana de las células (Barboza, 2011).

### **3.1.3 Cuantificación de la actividad antimicrobiana**

La herramienta más importante para poder determinar la actividad antimicrobiana de un agente es la cuantificación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMI se define como la mínima concentración de antimicrobiano en microgramos por mililitro que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C. Este método es el principalmente utilizado para evaluar la susceptibilidad antimicrobiana, además de confirmar resistencias bacterianas inusuales (Horna Quintana et al, 2005).

Otro parámetro importante para esta cuantificación es la concentración mínima bactericida (CMB), que se define como la mínima concentración de antimicrobiano que

elimina más de 99.9% de los microorganismos viables después de 24 horas de incubación. Aunque es menos importante determinar la CMB, para algunos casos se hace indispensable, como cuando se dará tratamiento a endocarditis, osteomielitis, meningitis o infecciones en pacientes que padecen algún tipo de inmunosupresión (Horna Quintana, G. et al, 2005). De cualquier manera, para todos los casos es importante determinar la CMI de los antimicrobianos para poder proveer un tratamiento efectivo con la posología más adecuada posible.

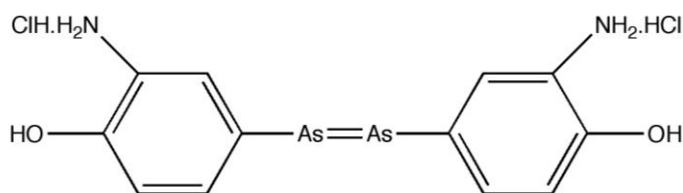
Otro método que es muy útil para determinar si las bacterias presentan sensibilidad a un determinado antibiótico es el método de Kirby-Bauer de difusión en agar. Este método utiliza un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a fármacos específicos para medir dicha sensibilidad. Consiste en inocular una cantidad de bacterias en una placa con agar Mueller Hinton y colocar discos impregnados con concentraciones de antibióticos. Se incuba durante 18-24 horas y posteriormente se miden los halos de inhibición generados para interpretarlos como sensibles, intermedios o resistentes de acuerdo a las tablas de sensibilidad establecidas por la literatura.

#### **3.1.4 Antimicrobianos sintéticos**

Los fármacos antimicrobianos se dividen en dos importantes categorías: los agentes sintéticos y los antibióticos. Los agentes antimicrobianos sintéticos son aquellos que se sintetizan en el laboratorio con la finalidad de eliminar un agente infeccioso, pero que, a diferencia de los antibióticos naturales, no fueron aislados por primera vez de microorganismos. El desarrollo de este grupo de antimicrobianos comenzó en el siglo XX

con el alemán Paul Erlich, quien desarrolló el concepto de toxicidad selectiva (Madigan et al, 2009).

Durante sus investigaciones, Erlich determinó la toxicidad selectiva de una serie de colorantes químicos y descubrió los primeros fármacos antimicrobianos eficaces, de los cuales destaca el Salvarsán (Véase Figura 1) que es un compuesto con alto contenido en arsénico y que se empleaba en el tratamiento contra la sífilis. A partir de esto, se empiezan a desarrollar un gran número de fármacos antimicrobianos con diferentes propiedades y para el tratamiento de diferentes infecciones.



**Figura 1.** Estructura química del Salvarsán

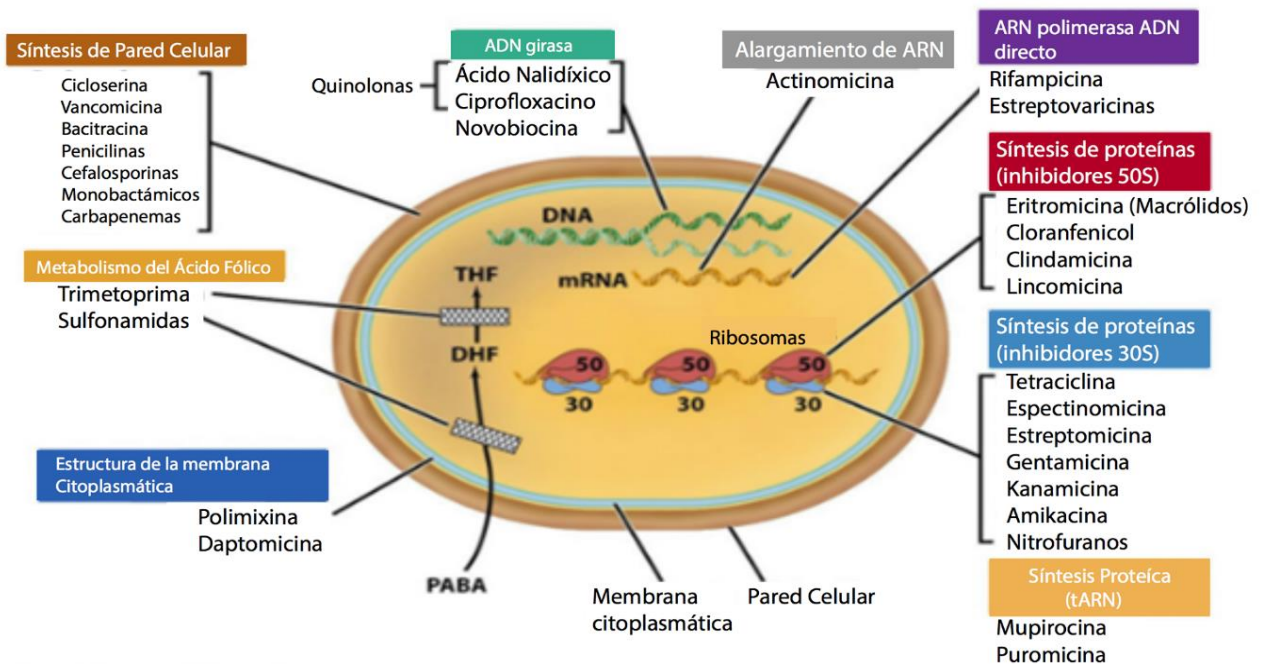
Obtenida de Wordpress, 2013

### 3.1.5 Antibióticos: concepto actual.

- **Antibióticos.**

Los antibióticos constituyen un grupo de sustancias con diversas características que presentan un comportamiento farmacocinético y farmacodinámico diferente. Además, todas ellas ejercen una acción específica contra una célula diana y tienen actividad antimicrobiana. El objetivo que se busca al utilizarlos es disminuir el número de células bacterianas viables, de manera que sea más fácil para el sistema inmune eliminarlas del organismo (Seija y Vignoli, 2008).

Los antibióticos pueden clasificarse según el espectro de acción como de espectro amplio, aquellos que son activos sobre numerosas especies y géneros diferentes, o como de espectro reducido, aquellos que solo son activos sobre un grupo reducido de especies. Generalmente, los que se clasifican como de espectro reducido son más selectivos, mientras que los de espectro amplio actúan con menor especificidad y pueden llegar a dañar un mayor número de células hospederas (Seija y Vignoli, 2008). Los antibióticos también pueden clasificarse según su mecanismo de acción. Algunos son inhibidores de la síntesis de la pared celular, inhibidores de la síntesis proteica, antimetabolitos, inhibidores de la replicación, de la síntesis de lípidos o de la membrana (Ver Figura 2).



**Figura 2.** Clasificación de algunos antibióticos según dónde ejercen su acción

Obtenida de Brock Biology of Microorganisms. Pearson Prentice Hall, 2006.

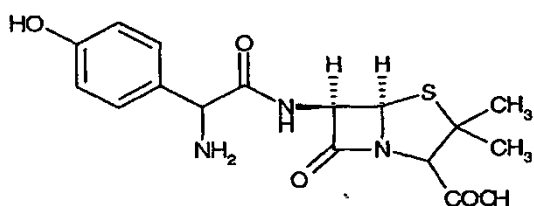
Finalmente, también pueden clasificarse según su farmacocinética y farmacodinamia. Cada clase de antibiótico se metaboliza de una forma distinta dentro de nuestro organismo.

A estos procesos de absorción, distribución y eliminación se les conoce como farmacocinética, y cada grupo de fármacos los llevan a cabo de diferentes formas. Por ello, surge como una clasificación pertinente. La farmacodinamia estudia los efectos y acción que tienen los medicamentos en el organismo, de manera que los antibióticos pueden ser clasificados de acuerdo a su acción (bactericidas, bacteriostáticos, bacteriolíticos) o por los efectos que generan en el hospedador (Seija y Vignoli, 2008).

En el presente trabajo se estudiaron dos antibióticos en particular: la amoxicilina y el ciprofloxacino. Ambos pertenecen a grupos y clasificaciones distintas, pero se eligieron por cuestiones de accesibilidad y disponibilidad. En los siguientes dos apartados se describen algunas de sus propiedades fisicoquímicas, su mecanismo de acción, indicaciones terapéuticas, efectos adversos y algunas otras características de su farmacocinética y farmacodinamia.

### 3.1.6 Amoxicilina

La amoxicilina es un antibiótico semi-sintético derivado de la penicilina. Químicamente, se trata de una amino-penicilina (Ver Figura 3) cuya fórmula química es  $C_{16}H_{19}N_3O_5S$  y cuyo peso molecular es de 365.4 g/mol. Su vida media estimada en el organismo es de 60-75



**Figura 3.** Estructura de la Amoxicilina

Obtenida de European Patent Office, Patent Specification EP 1 292 598 B1 (2001)

minutos y puede ser administrada por vía oral, intravenosa o intramuscular profunda. Fue probada por primera vez en 1972 y comercializada por GaxoSmithKline bajo el nombre comercial de Amoxil®. Después de que la patente expirara, muchos otros

laboratorios a nivel mundial empezaron a comercializarla alrededor del mundo (Mensa et al, 2008).

La amoxicilina es un antibiótico de amplio espectro perteneciente al grupo de las penicilinas y que es utilizado en el tratamiento contra infecciones bacterianas. Generalmente es utilizado para tratar diferentes tipos de infecciones causadas por bacterias como tonsilitis, bronquitis, neumonía, gonorrea, infecciones localizadas en oídos, nariz, garganta, piel o tracto urinario. También es administrada concomitantemente con otros antibióticos para el tratamiento de otras infecciones como úlceras estomacales causadas por *Helicobacter pylori* (Drugs.com, 2017).

Está principalmente indicada en el tratamiento contra infecciones causadas por bacterias beta-lactamasa negativas, como lo son algunas cepas de *Streptococcus*, *Staphylococcus* o *Haemophilus influenzae* que infectan garganta, oído y nariz, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* o *Enterococcus faecalis*, que infectan tracto genitourinario y *Helicobacter pylori* que es causante de úlceras gástricas (Drugs.com, 2017).

La amoxicilina es un antibiótico beta-lactámico, por lo que se clasifica como bactericida. Actúa inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular de las bacterias. Para ello se une a unas proteínas llamadas Proteínas de Unión a Penicilina (PBPs por sus siglas en inglés) que se localizan en la pared celular bacteriana. Como la síntesis de la pared celular no puede llevarse a cabo completamente, se provoca la lisis de la bacteria y su muerte. La amoxicilina no resiste la acción de las beta-lactamasas, por lo que no se usa en el tratamiento de muchas estafilococias (Vademecum, 2017).



Es estable en medio ácido en presencia de los jugos gástricos, por lo que puede ser usada vía oral sin problemas. Se absorbe rápidamente por esta vía y alcanza sus niveles máximos de biodisponibilidad en 1-2.5 horas. Se distribuye adecuadamente entre los tejidos y órganos, pero no atraviesa membrana cerebral ni se dispersa en el líquido cefalorraquídeo. La mayor parte del antibiótico es excretado por orina, cerca del 75%. Puede excretarse en dosis muy pequeñas en la leche materna, pero no atraviesa placenta (Vademecum, 2017).

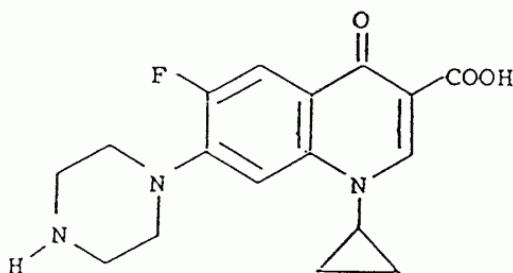
Los principales efectos adversos asociados a amoxicilina son dolor abdominal, dolor estomacal de espalda o piernas, heces oscuras o negras, sangre en encías, sangre en orina, sangrado en la nariz, dolor en el pecho, escalofríos, tos, orina oscura, diarrea, dificultad para respirar o tragar, náusea y vómito. Algunos efectos secundarios de menor importancia son agitación, mal sabor de boca, confusiones, convulsiones, entre otros. Este antibiótico está contraindicado en pacientes alérgicos a las penicilinas por el alto riesgo de anafilaxis (Drugs.com, 2017).

Aunque la amoxicilina ha demostrado eficacia en el tratamiento contra un amplio número de bacterias, muchas cepas han desarrollado resistencia a este antibiótico, por lo que su uso ya no es efectivo para muchas infecciones. Por ello, se ha recomendado realizar un antibiograma en cada caso de infección antes de utilizar amoxicilina para determinar la sensibilidad de la bacteria ante este medicamento (Vademecum, 2017).

### **3.1.7 Ciprofloxacino**

El Ciprofloxacino o Ciprofloxacina es un antibiótico de amplio espectro perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas. Las quinolonas son un grupo de agentes antimicrobianos

sintéticos, numerosos y químicamente muy heterogéneas. La primera quinolona que se descubrió fue el ácido nalidíxico, a principios de 1960, que había demostrado eficacia en el tratamiento de diversas infecciones. Veinte años después, en la época de los 80s se introdujo un átomo de flúor en la posición número 6 y un anillo de piperazina en el carbono número 7, lo que llevó al origen de las fluoroquinolonas como el ciprofloxacino, cuya fórmula química es  $C_{17}H_{18}N_3FO_3$  (Ver



**Figura 4.** Estructura del Ciprofloxacino

Obtenida de Patentados.com, modelos de Alberto Palomo Coll (2005)

Figura 4). El nacimiento de las fluoroquinolonas representó una mejora en la actividad biológica y en las propiedades farmacocinéticas de este grupo de antibióticos, convirtiéndolas en primera línea frente a numerosas infecciones (Leyva y Leyva, 2008).

Es un agente antibacteriano de efecto rápido con actividad biológica frente a un amplio espectro de bacterias gramnegativas aerobias como *Pseudomonas*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus mirabilis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Vibrium*. También es activo frente a grampositivos como *Staphylococcus aureus*, *pyogenes* y *pneumoniae* y *Streptococcus faecali*. No ha demostrado eficacia contra microorganismos anaerobios estrictos y se utiliza en combinación con otros antibióticos, en el tratamiento de las infecciones causadas por micobacterias. Actualmente se ha detectado resistencias en cepas de *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus aureus* y *Pneumococcus* (Vademecum, 2017).

Está indicado en el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias como bronconeumonía, neumonía lobar, bronquitis aguda, bronquiectasias y empiema. Se utiliza en el tratamiento de infecciones genitourinarias como uretritis complicadas, pielonefritis, prostatitis y gonorrea. También se utiliza para infecciones gastrointestinales como diarrea infecciosa y fiebre entérica. Finalmente, está indicado para su uso en infecciones sistémicas graves como septicemias, bacteriemias, infecciones de vías biliares, pélvicas y otorrinolaringológicas (PR Vademecum, 2014).

Actúa inhibiendo la replicación bacteriana al unirse con una enzima llamada ADN-girasa. La ADN-girasa es la encargada de deshacer el superenrollamiento de la doble cadena de ADN, permitiendo que otras enzimas puedan proceder con la replicación. Si la doble cadena de ADN no se desenrolla, la replicación no puede llevarse a cabo y la célula muere sin proliferar. Así, cuando el ciprofloxacino se une a la enzima encargada de desenrollar al ADN, la inhibe e impide que se lleve a cabo la replicación. Debido a que mata a la bacteria, este antibiótico se clasifica como bactericida (PR Vademecum, 2014).

El ciprofloxacino puede ser administrado por vía oral e intravenosa. Cuando se administra por vía oral, se absorbe rápidamente en el estómago y alcanza sus concentraciones plasmáticas máximas en el organismo a las 0.5-2.5 horas. Este antibiótico experimenta un mínimo metabolismo de primer paso. La concentración plasmática del antibiótico se mantiene durante aproximadamente 12 horas por encima de las concentraciones mínimas inhibitorias para la mayoría de las bacterias. La mayor parte del fármaco es excretado por vía renal sin haber sido metabolizado. La semivida de ciprofloxacino es de 3-5 horas, pero puede aumentar a 12 horas en sujetos con insuficiencia renal (Vademecum, 2017).

Los efectos secundarios que se presentan con mayor frecuencia en el tratamiento con ciprofloxacino son diarrea, náuseas y vómito. También puede producir alteraciones del sistema nervioso central como vértigo, cefaleas, cansancio, insomnio y temblor. Puede haber reacciones anafilactoides como edemas faciales, vasculares o laríngeos. Con menor porcentaje, puede presentarse heces negras o sanguinolentas, cambio en el color de piel, dolor de pecho, fiebre, confusión, tos, convulsiones y otras (Drugs.com, 2017).

### **3.1.8 Resistencia bacteriana a los antibióticos**

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un tema muy amplio que ha tomado importancia a nivel mundial puesto que muchos microorganismos patógenos han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia que provocan que ahora no respondan adecuadamente a muchos de los tratamientos utilizados en la práctica clínica. La resistencia bacteriana se puede clasificar dentro de tres perspectivas: resistencia individual, resistencia poblacional y resistencia poblacional en microorganismos patógenos.

La resistencia individual se refiere a la interacción molecular que puede existir entre una célula bacteriana y un antibiótico determinado, considerando que la célula bacteriana posee un amplio arsenal genético y metabólico. Es importante denotar que, en muchos casos, no es suficiente con que el microorganismo posea un gen que codifica un mecanismo de resistencia particular para que se presente la resistencia ante un antibiótico en la práctica clínica. Los genes deben expresarse en cantidad y calidad suficiente para poder contrarrestar la eficacia del antibiótico (Vignoli y Seija, 2012).

La resistencia poblacional es el comportamiento de una población bacteriana enfrentada ante una determinada concentración de antibiótico por un tiempo determinado. Este tipo de resistencia es la que generalmente se mide a nivel laboratorio por medio de antibiogramas. Los resultados obtenidos de estos estudios son los que determinan cuál será el tratamiento más eficaz para una determinada infección (Vignoli y Seija, 2012).

Finalmente, la resistencia poblacional en microorganismos patógenos que está relacionada con la eficacia terapéutica del antibiótico, el sitio de infección, las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del principio activo, el estado inmunológico del hospedador y las propiedades de la bacteria. En este caso, la resistencia juega un papel menos importante y la recuperación del estado de salud del paciente es el parámetro que determina el éxito terapéutico (Vignoli y Seija, 2012).

Existen diferentes tipos de resistencia: natural o intrínseca y adquirida. Cuando la resistencia se presenta de manera natural o intrínseca, que es propia de cada familia, especie o grupo de bacterias, que les confieren resistencia a determinados grupos de antibióticos. Por ejemplo, en el caso de las bacterias gramnegativas, todas son resistentes a vancomicina y esto no cambia entre este grupo de bacterias. Por otra parte, la resistencia adquirida es aquella que puede desarrollarse o transferirse entre los microorganismos. Generalmente es la resistencia adquirida la que lleva al fracaso terapéutico en el tratamiento de antibióticos (Madigan et al, 2009).

Una de las complicaciones más importantes conocidas por el mal uso de antibióticos es el desarrollo de resistencia bacteriana. Un problema que no es exclusivo en nuestro país, sino en todo el mundo. La Organización Mundial de la salud (OMS) establece que la

resistencia antimicrobiana constituye una amenaza creciente para la salud pública mundial que requiere la adopción de medidas a corto y largo plazo. Además, afecta a todas partes del mundo, y los nuevos mecanismos de resistencia se extienden a escala internacional. (OMS, 2015)

En el estado de Puebla, en un estudio realizado en la población universitaria en 2004, se confirmó la automedicación como un recurso utilizado por dicha población. De los resultados, se obtuvo que 96% de los individuos entrevistados utilizaban la automedicación como un medio para aliviar síntomas. De los medicamentos reportados que fueron consumidos sin receta médica, el 61% fueron Antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y combinaciones, 10% antidiarreicos, 10% mucolíticos, 9% antiparasitarios, 8% antibióticos, 1% anticonceptivos orales y 1% fármacos tópicos para el acné. De los antibióticos utilizados, el 60% correspondió a Bactrim, el 31% a Amoxicilina y 9% a Ciprofloxacino.

Resulta impresionante que los individuos que participaron en el estudio se automedicaran con tanta frecuencia (cada vez que presentaran síntomas) y con tan poco conocimiento de las consecuencias. Asimismo, es impactante que fueran capaces de automedicarse con antibióticos como el Ciprofloxacino que es un antibiótico de última generación y de uso restringido. En el estudio también se les preguntó con qué criterio elegían los medicamentos para los síntomas. Al 76% los fármacos se los recetan los familiares, 15% elegían ellos mismos los fármacos, 4% recibía recomendaciones de amigos y 4% recibía recomendaciones de otras fuentes. De los resultados, surgió la conclusión de que la población universitaria en Puebla se automedica sin responsabilidad ni conocimiento pleno de las consecuencias. (Soto y Roa, 2004)

El caso que se presenta anteriormente no es exclusivo para la población universitaria de Puebla. El acceso y el control de los antibióticos es un tema que debe tratarse con cuidado. Actualmente la venta libre de antibióticos ya fue restringida en nuestro país, pero esto, aunque fomenta una mejora en la situación, no soluciona completamente el problema. Con las clínicas propias de las farmacias, la corrupción y otros factores, el problema del mal uso de medicamentos sigue agrandándose y se mantiene como una preocupación a nivel internacional.

### **3.1.8.1 Mecanismos de resistencia a penicilinas y sus derivados**

Hay tres mecanismos principales por los que las bacterias pueden generar resistencia a antibióticos del grupo de las penicilinas. Primero, por medio de trastornos de la permeabilidad, que están asociados a la disminución de la expresión de los genes que codifican para la síntesis de porinas. Este mecanismo disminuye la cantidad de fármaco que atraviesa la membrana bacteriana y, por ende, puede generar una disminución en su eficacia. No es el mecanismo que promueve los más altos niveles de resistencia bacteriana, pero que en conjunto con los otros dos pueden ser importante (Vignoli y Seija, 2012).

El segundo mecanismo es la alteración del sitio blanco de acción. Para el caso de las penicilinas y sus derivados, como la amoxicilina, el sitio blanco de acción son las PBP a las que se unen. Se ha encontrado que algunas bacterias, después de haber sido expuestas ante algún antibiótico del grupo de las penicilinas, empiezan a expresar alternativas de PBP que presentan una menor afinidad por los antibióticos. Esta expresión alternativa puede ser mediada tanto por el genoma bacteriano como por la presencia de plásmidos propios o adquiridos por medio de mecanismos de conjugación, aunque es importante resaltar que los

genes que codifican para la expresión de las PBPs se encuentran en el ADN bacteriano y no en el plásmido (Sussman et al., 2006).

Finalmente, el tercer mecanismo mediante el cual pueden presentar resistencia bacteriana a este grupo de antibióticos es por medio de hidrólisis enzimática. Este mecanismo inactiva los betalactámicos a través de la activación de la enzima betalactamasa, cuya función principal es la degradación de los betalactámicos. Este es el principal mecanismo de resistencia conocido a las penicilinas y sus derivados. Estas enzimas demuestran la gran plasticidad y adaptabilidad del genoma bacteriano, y son la razón por la que los antibióticos del grupo de las penicilinas sean cada vez menos exitosos terapéuticamente (Vignoli y Seija, 2012).

### **3.1.8.2 Mecanismos de resistencia a quinolonas**

En el caso del grupo de antibióticos pertenecientes a las quinolonas, se conocen dos mecanismos de resistencia: alteración del sitio blanco y alteración de la permeabilidad. Se ha descrito un mecanismo de resistencia que depende de la presencia del gen *qnr* que codifica para una proteína específica cuya función consiste en bloquear el sitio blanco de acción. Para las quinolonas el sitio blanco de acción es la enzima ADN girasa, que está constituida por dos subunidades. Las alteraciones del sitio blanco se producen por la alteración en la síntesis de alguna de las dos subunidades, con lo que el antibiótico será menos afín a ellas. De esta manera, el mecanismo de resistencia provoca una disminución en la efectividad terapéutica de la quinolona (Sussman et al., 2006).



Para el mecanismo de resistencia mediado por alteraciones de permeabilidad, se incluye la modificación de la expresión de las porinas, como para el caso de las penicilinas. Asimismo, se genera un sistema de bombas de eflujo cuya acción promueve la excreción del fármaco de la célula bacteriana. Este tipo de mecanismo mediado por bombas se ha descrito principalmente en bacterias grampositivas, aunque se ha observado en algunas gramnegativas también (Vignoli y Seija, 2012).

### **3.1.9 Vectorización**

El concepto vectorización es relativamente novedoso. De acuerdo a la Doctora Ana I. Torres Suárez, se refiere a la “liberación selectiva de principios activos a nivel de órganos, tejidos o células sobre los que han de ejercer su acción, mediante la utilización de transportadores”. En otras palabras, lo que se busca con la vectorización de los fármacos es que el objetivo terapéutico sea el órgano blanco o incluso la célula blanco, de manera que el tratamiento sea más específico y se dañen menos células del hospedador. Para ello, se han buscado utilizar sistemas de liberación controlada, que permiten un mayor control sobre la velocidad y el lugar de la liberación (Torres Suárez, 2010).

Las ventajas que ofrece un sistema de fármacos vectorizado, es que permite disminuir la presencia de efectos secundarios indeseables, pues al interactuar mínimamente con células diferentes a las células diana, genera menos efectos adversos a los deseados. Asimismo, aumenta la eficacia del principio activo, pues permite una mayor biodisponibilidad del mismo en el sitio afectado y permite que su actividad se potencia en la diana terapéutica. Finalmente, se busca también evitar la biodegradación del fármaco durante su distribución, es decir, que

una menor cantidad del fármaco sea metabolizada y excretada antes de llegar a su blanco terapéutico y ejercer su acción (Torres Suárez, 2010).

Los sistemas de liberación controlada se pueden clasificar como monolíticos o matriciales, reservorio de almacenamiento, activados por disolvente y controlados químicamente. Los sistemas monolíticos o matriciales pueden ser sistemas homogéneos, constituidos de un solo polímero que pueden ser matrices hidrofílicas o lipofílicas, o sistemas heterogéneos, constituidos por matrices inertes o porosas. Cuando se trata de sistemas reservorio o de almacenamiento se refiere a el uso de membrana semipermeables que permiten la salida del fármaco por presión externa, por lo que, si no se encuentra con las condiciones favorables, no se lleva a cabo su liberación (Contreras Merino, S. 2017).

Cuando se habla de sistemas activados por disolvente se hace referencia a sistemas de liberación trifásicos, que son activados por la presencia de un disolvente que por lo general es un agente osmótico y que va a aumentar la presión osmótica del medio, favoreciendo la liberación del fármaco a través de la membrana. Finalmente, los sistemas controlados químicamente son aquellos que se activan por medio de la presencia de ciertos compuestos químicos que interactúan con el sistema y favorecen la liberación del fármaco (Contreras Merino, 2017)

Actualmente algunos de los transportadores o vectores que están siendo más ampliamente estudiados son las macromoléculas hidrosolubles, que pertenecen a la clasificación de sistemas controlados químicamente, los liposomas, las nanopartículas y micropartículas, microemulsiones, células y virus. La vectorización, a su vez, puede clasificarse según la selectividad del destino como pasiva o activa. Cuando la vectorización

es pasiva, el sistema de liberación controlada es capaz de llegar a la célula u órgano blanco gracias a las propiedades de su estructura. Por otro lado, en la vectorización activa la estructura del sistema favorece el reconocimiento de receptores celulares específicos y la captación selectiva del sistema de liberación (Sousa, et al, 2015).

Considerando esto, la vectorización activa siempre es mejor que la pasiva, pues de esta manera se logra una liberación más selectiva y eficaz del fármaco. Para evitar la vectorización pasiva se pueden hacer algunas acciones en el sistema como aumentar la hidrofilia, controlar el tamaño de partícula y la incorporación de identificadores, que generalmente son estructuras reconocidas selectivamente por la célula blanco (Torres Suárez, 2010).

Así, la vectorización es una herramienta farmacéutica muy importante que permitirá que los tratamientos farmacológicos sean más selectivos y eficaces de manera que se consiga una liberación más controlada del principio activo en la diana farmacéutica deseada. Con ello, disminuirán las concentraciones del fármaco en otras zonas del organismo donde no son requeridas, y los efectos adversos podrían disminuirse considerablemente también.

## **3.2 Nanotecnología**

### **3.2.1 ¿Qué es la nanotecnología?**

Alguna vez, el Dr. George M. Whitesides, Profesor de Química en Harvard University mencionó en un ciclo de conferencias:

*Nanotechnology is in an interesting state. It's a word, not a field. The science of nanotechnology is basically that of looking at phenomena that become apparent when*

*one goes to very small scales. Out of that, I believe, important technologies will emerge. I believe it will be important in studying quantum phenomena. As you make things small enough you begin to see quantum behavior at room temperature. It's interesting science, and I'm sure it will become interesting technology.*

Hoy en día, la nanotecnología aún no es conocida por una gran mayoría de la población, y como lo menciona el Dr. Whitesides, es una rama muy prometedora para la humanidad. Nanotecnología es la ciencia que estudia las propiedades de la materia en la nanoescala (Drexler, 1986)

El prefijo *nano* viene de la palabra griega que significa enano. Nanotecnología es el estudio de átomos individuales, moléculas o compuestos con estructuras que generan materiales y equipos con propiedades novedosas y especiales en la nanoescala. La nanoescala comprende los tamaños de 1-100nm, y de acuerdo a los estudios realizados, la materia puede adquirir nuevas propiedades eléctricas, químicas, ópticas, magnéticas y físicas cuando se encuentra en este rango de tamaño (Nikalje, 2015).

El nanómetro es la unidad que se utiliza para medir las estructuras en esta escala. En la escala nanométrica, las propiedades dependen del tamaño y de la forma en la que se acomodan los átomos. Una estructura geométrica distinta, dará propiedades diferentes, aun cuando se trate del mismo compuesto, químicamente hablando. Otro concepto importante para el estudio de la nanotecnología es la *nanopartícula*. Las nanopartículas son “agrupaciones de átomos de uno o varios compuestos que miden varios nanómetros de diámetro” (Antúnez García et al, 2016). Las propiedades de estas nanopartículas dependerán

del tamaño y geometría de las mismas, por lo que pueden obtenerse nanopartículas con una amplia variedad de propiedades fisicoquímicas.

Los nanomateriales son aquellos materiales que son estudiados en la nanoescala. En la actualidad existe un amplio número de ellos que han podido ser estudiados para el desarrollo de diferentes aplicaciones en la electrónica, farmacéutica, energía, medicina, sensores, entre otras. Los que han adquirido mayor importancia en las áreas de la salud son el oro, los dendrímeros, nano-gel y nano-emulsiones.

### **3.4 Nanofarmacéutica**

#### **3.4.1 ¿Qué es la nanofarmacia?**

La nanofarmacia es una rama de la nanotecnología que se define como “la aplicación de la nanotecnología en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades para mejorar la salud del organismo humano y de otros seres vivos” (Ballesteros, 2015). La nanotecnología es un área multidisciplinaria donde convergen varias disciplinas científicas y tecnológicas, que ha permitido que se logre una manipulación, control y caracterización más preciso de las diferentes sustancias y estructuras de sustancias que se estudian en la escala nanométrica, tal como vimos en el apartado anterior. Actualmente se han desarrollado una serie de bases y diseños experimentales que permiten la optimización de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos (Sousa, et al, 2015).

Con esta optimización, se puede lograr reducir la exposición sistémica a compuestos tóxicos, disminuir la presencia de efectos adversos a los medicamentos, mejorar el índice terapéutico, aumentar la biodisponibilidad del fármaco en el sitio de acción, controlar la

liberación, entre muchas otras. Las aplicaciones de la nanofarmacia, entre muchas otras, incluyen el descubrimiento de nuevos agentes farmacéuticos y el desarrollo de sistemas de transporte y liberación controlados (Sousa, et al, 2015).

Los avances en el campo de la nanofarmacia y nanomedicina han revolucionado al siglo veintiuno. Gracias al acercamiento altamente selectivo y al uso reducido de recursos materiales, la nanofarmacia ha resultado en la disminución de costos para la manufactura del sistema de liberación farmacéutico y en el dolor de administración a los pacientes. Actualmente casi todos los nanomateriales, mencionados en el apartado anterior, pueden ser aplicados al desarrollo de sistemas de liberación de fármacos.

Los dendrímeros y otros materiales porosos se utilizan para la encapsulación de fármacos y para el transporte especializado. Las nanopartículas de oro o hierro se utilizan en el tratamiento contra el cáncer. Todos ellos, como fármacos selectivos, disminuyen la dosis requerida para el tratamiento y los costos del mismo, al mismo tiempo de que logran aumentar la efectividad (Nikalje, 2015).

Los nanofármacos, gracias a su tamaño y propiedades conferidas por su estructura y componentes químicos, brindan un nuevo enfoque de combate a las infecciones, debido a los procesos de liberación de los antibióticos, que se llevan a cabo en la nanoescala (1 a 100 nm). Todas las propiedades y ventajas que la nanotecnología ofrece, hacen posible una mejor aproximación y una novedosa alternativa para reducir el problema y las consecuencias del mal uso de los antibióticos.

Como vemos, los sistemas de liberación controlada son diseñados para mejorar las propiedades farmacológicas y terapéuticas de los fármacos administrados *in vivo*. Estos sistemas de liberación controlada incluyen partículas que actúan como transportadores y como reservorios del fármaco. Permiten la liberación selectiva en el sitio de acción, y como lo mencionamos antes, alteran sus propiedades farmacocinéticas y de biodistribución generando mejoras considerables.

### **3.3.2 Nanomateriales obtenidos a base de polímeros.**

#### **3.3.2.1 Nano-gel**

Los hidrogeles son usados en la práctica clínica y medicina experimental en diversas aplicaciones incluyendo ingeniería de tejidos y como sistemas de liberación de fármacos. Su alta biocompatibilidad proviene de su alto contenido de agua y de su similitud fisicoquímica con las matrices extracelulares nativas. Sin embargo, algunas desventajas de este tipo de sistemas es que su alto contenido de agua y sus grandes tamaños de los poros resultan en la liberación rápida del fármaco (Molinos et al., 2012).

Si es funcionalizado correctamente y hecho a una escala nanométrica para evitar el problema de los poros grandes, se puede obtener un nano-gel que sea responsivo a condiciones biológicas específicas como temperatura, pH, luz, estímulo químico, entre otros (Wu et al., 2000). Los nano-geles son redes tri dimensionales de cadenas poliméricas entrecruzadas. Se ha descubierto que los nano-geles entre 10 y 200nm son eficientes para desempeñarse en liberación intravenosa de fármacos. Los nano-geles permiten atrapar un gran número de moléculas de agua dentro de la red promoviendo así una alta biocompatibilidad debido a que presentan una constante de Hamaker similar al agua. Esto se

ve reflejado en la alta dispersibilidad acuosa en fluidos biológicos. La red polimérica de los hidrogeles también permite la inserción de moléculas bioactivas como DNA, RNA, fármacos, proteínas, etc.

Los hidrogeles se clasifican, según su estructura, en redes reticuladas químicas o físicas. Las químicas son sintetizadas vía micro o mini emulsiones o de nano-agregados auto ensamblados. Los nano-geles físicamente reticulados se forman por interacción secundaria o por reconocimiento molecular entre nanos paquetes. Los nano-geles reticulados químicamente atrapan más eficientes moléculas de fármaco sin la necesidad de un control de difusión comparado a los reticulados físicamente.

Alguna de las desventajas de los químicamente reticulados es el bajo número de grupos funcionales para modificación química, así como la necesidad de purificar el nano-gel después de su preparación debido a grupos químicos tóxicos. Los nano-geles reticulados físicamente son inteligentemente funcionalizados para responder a estímulos como pH, fuerza iónica, temperatura, reducción, magnetismo o luz. Los responsivos a luz son de particular atención ya que dependiendo de la intensidad y la exposición del nano-gel a la luz es la degradación de la red y por ende la cantidad de fármaco liberado. Este tipo de nano-geles son de los más investigados en la actualidad (Panja et al., 2016).

En resumen, los nano-geles o hidrogeles son interesantes debido a su capacidad de ser sistemas acarreadores de carga biomolecular lábil con una permeabilidad que puede ser variada conforme se necesite utilizando diferentes métodos de síntesis ya sean físicos o químicos (Morimoto et al, 2000).



### 3.3.2.2 Nanoemulsiones

Una emulsión se compone por dos o más líquidos que no pueden ser mezclados, generalmente compuestos por una fase acuosa y una fase oleosa. Uno de éstos líquidos está comúnmente dispersado en forma de gotas inmerso en el otro. El componente que está presente en menor proporción se denomina fase dispersa, y al componente que está presente en mayor proporción se denomina fase dispersante. Cuando la fase oleosa se encuentra en menor proporción, se trata de una emulsión aceite en agua (O/W por sus siglas en inglés). Cuando la fase oleosa se encuentra en mayor proporción, se habla de una emulsión agua en aceite (W/O por sus siglas en inglés) (Estrada Arreola, 2016).

Generalmente las emulsiones son inestables y suelen permanecer separadas en dos fases bien definidas. Existen sustancias denominadas emulsionantes, que generalmente son surfactantes, que al añadirlas a la emulsión son capaces de estabilizarla e impedir la aglomeración de las partículas de la fase en menor proporción. De esta manera, las pequeñas “gotas” que se forman de la fase dispersa, se mantienen individualizadas y pueden ser estudiadas con mayor precisión sin que formen floculación, cremación o coalescencia.

Las nanoemulsiones son dispersiones creadas típicamente a partir de la ruptura de gotas microscópicas a gotas subnanométricas (100nm) contando con altas proporciones área-volumen que utilizan un flujo extremo para sobrepasar tensión interfacial. Se crean utilizando diferentes composiciones, por ejemplo, aceites en agua o su contraparte, agua en aceite. Debido al pequeño tamaño de las gotas, tienen aplicación en la industria alimenticia, higiene personal, y farmacéutica. También han sido identificadas por su potencial en química verde para la descontaminación de material orgánico tóxico. Al entrar al plano nanoscópico

se deben de cuidar varios aspectos que juegan un papel en la estabilidad de la emulsión (Fryd et al., 2010).

Las nanoemulsiones han atraído gran atención debido a su alta estabilidad cinética y una mejor biodisponibilidad en comparación a las emulsiones convencionales. En general las características como el tamaño de partícula, la forma y los mecanismos de liberación, así como la eficiencia de encapsulación y la estabilidad son gobernadas por el tipo de emulsificador y la técnica de emulsificación. Se tienen técnicas de alta energía como la homogenización alta-presión/velocidad, microfluidización, y ultrasonificación. En el apartado dedicado a nanocápsulas se mencionan algunos métodos de síntesis para las nanoemulsiones.

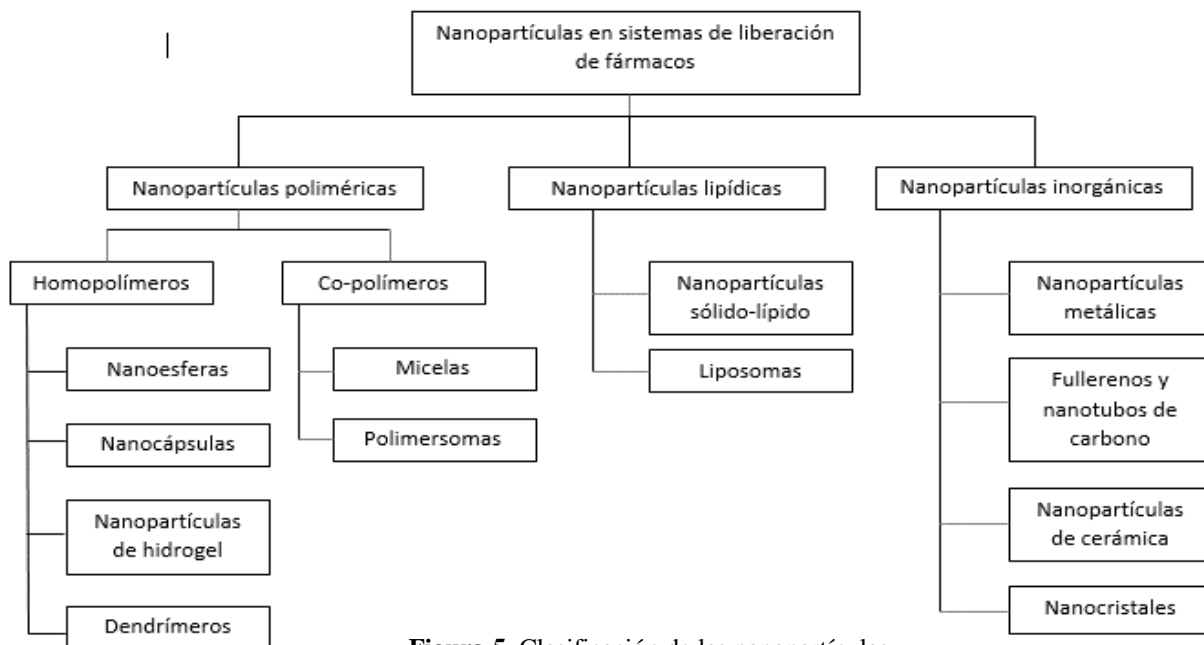
### **3.3.2.3 Nanopartículas poliméricas**

Las nanopartículas poliméricas, como lo indica su nombre, son partículas elaboradas a partir de diferentes materiales poliméricos. Los polímeros son los materiales más estudiados para el desarrollo de sistemas de liberación controlada. Para que un polímero pueda ser útil en la elaboración de transportes farmacéuticos, debe presentar nula toxicidad, ser inerte y libre de impurezas. Las nanopartículas pueden ser sintetizadas a partir de polímeros naturales o polímeros sintéticos. Es importante que los polímeros utilizados para su fabricación sean capaces de encapsular al fármaco sin la necesidad de realizar modificaciones químicas de ningún tipo (Gómez-Gaete, 2014).

Las principales ventajas de utilizar nanopartículas poliméricas son que generalmente permiten aumentar la estabilidad de agentes farmacéuticos volátiles y que son fáciles y baratas de fabricar en grandes cantidades por medio de una gran variedad de métodos. El fármaco es atrapado, unido o encapsulado dentro o sobre la matriz del polímero. Así,

dependiendo del método de síntesis utilizado, se pueden controlar las características de liberación del fármaco en mayor o menor proporción. Este tipo de sistemas poliméricos son atractivos para la liberación intracelular o *in situ* específica del fármaco (Kumar et al, 2013).

Las nanopartículas poliméricas se clasifican de acuerdo al número diferente de polímeros que poseen. Así, pueden ser homopoliméricas, como las nanoesferas, nanocápsulas, dendrímeros o nanopartículas de hidrogel, o pueden ser co-poliméricas como las micelas y los polymersomas (Ver Figura 5). De las nanocápsulas hablaremos en el siguiente capítulo, pues son el tema central de esta investigación. Los dendrímeros, de los que hemos hablado un poco en el apartado de nanomateriales, son estructuras sintéticas cuya estructura y tamaño puede ser eficazmente controlado para diseñar un sistema de transporte de fármacos muy específico. En cuanto a las nanopartículas de hidrogel, están constituidas de polisacáridos hidrofóbicos capaces de encapsular el principio activo (Kumar et al, 2013).

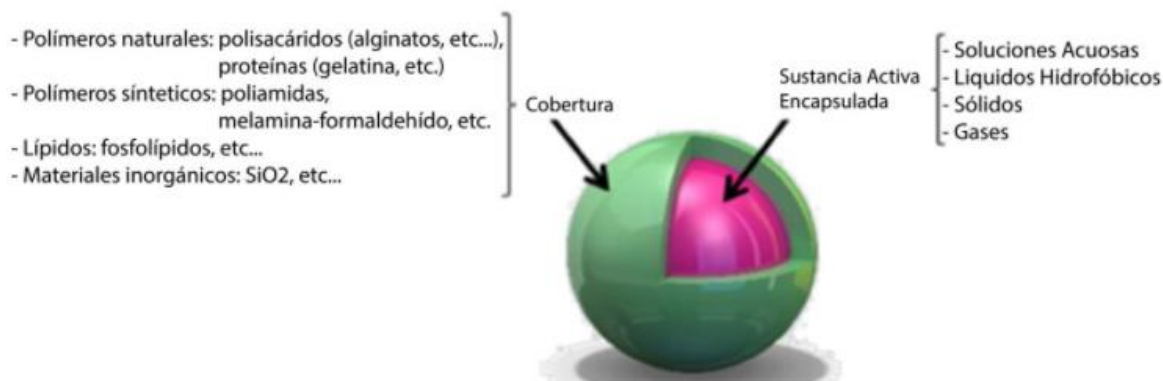


**Figura 5.** Clasificación de las nanopartículas

Traducido del libro *Nanomedicine in Drug Delivery* de Kumar, A. et al

Las micelas poliméricas son estructuras de autoensamblaje supramolecular en el que los co-polímeros se unen entre sí por medio de interacciones no covalentes. Generalmente forman una especie de capa que permite solubilizar el fármaco. La estructura deseada para una micela es esférica con capas hidrofóbicas. Este tipo de sistemas son excelentes en la liberación de fármacos por su gran capacidad de carga, por su alta versatilidad, su fácil funcionalización y la potencial acumulación del fármaco en su sitio de acción. Por otro lado, los polymersomas son generalmente compuestos anfifílicos constituidos por co-polímeros que se unen por fuertes interacciones físicas. Este tipo de estructuras tienen una permeabilidad reducida, que puede ser útil en la liberación de fármaco pues se reduciría la velocidad de la misma (Kumar et al, 2013).

### 3.3.3. Nanocápsulas



**Figura 6.** Estructura clásica de una nanocápsula

Obtenida de *Carbon Inspired* (2014)

Las nanocápsulas son una pequeña porción de fármaco o sustancia activa que están rodeados por un agente de encapsulación y cuyas dimensiones se encuentran dentro de la escala nanométrica. El agente encapsulante aísla a la sustancia activa del medio externo. Las

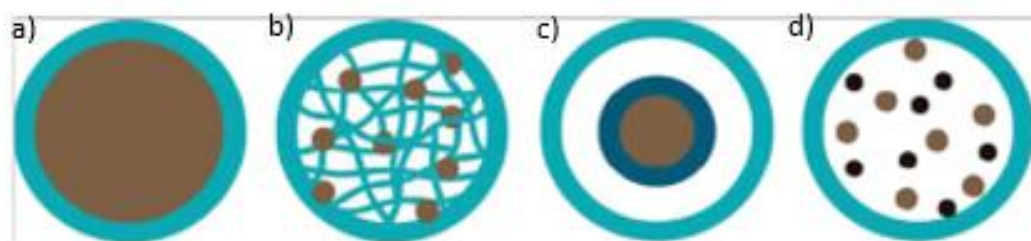
nanocápsulas son sistemas de tipo reservorio, en los que el fármaco se encuentra en una cavidad interna, que es generalmente una membrana o matriz polimérica, que controla la cinética de liberación de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas del polímero en cuestión (Gómez-Gaete, 2014).

La liberación del fármaco puede ser por difusión continua o en respuesta a un estímulo externo, como un cambio de pH, la acción de alguna enzima o la detección de un solvente. Esto permite que la liberación del fármaco sea controlada y específica de su sitio blanco de acción. En la Figura 6 se muestra la estructura básica de una nanocápsula y los componentes que pueden conformar su capa externa y su contenido.

El diámetro de las nanocápsulas va de 1-100nm (la nanoescala) y su forma puede variar enormemente dependiendo del material utilizado y del método de síntesis. Gracias a su tamaño, que se encuentra rondando la escala nanométrica, tienen una permeación intermembranal mucho más sencilla, y pueden alcanzar su sitio de acción intracelular más fácilmente. Dependiendo del material que constituye a la cápsula, se pueden clasificar en dos categorías principales: nanocápsulas con un núcleo que está rodeado por el material de la matriz y nanocápsulas con un núcleo que está atrapado dentro de una red continua de material de la matriz polimérica, también conocidas como nanoesferas (Carbon Inspired, 2014).

Las variaciones en estas morfologías pueden observarse en la Figura 7, y que dependen del material y método de síntesis utilizado para su fabricación. De cualquier manera, la característica más significativa de las nanocápsulas es su tamaño nanoscópico que aumenta el área superficial y permite la incorporación de estructuras que aumentarán la bioespecificidad por medio de la funcionalización (Gómez-Gaete, 2014). En síntesis, las

nanocápsulas funcionan como un excelente sistema de liberación controlada con un área superficial amplia para funcionalización, liberación específica en el sitio blanco de acción, aumento de la biocompatibilidad y en la biodisponibilidad del fármaco en el sitio afectado, potencial disminución de la toxicidad y mayor eficacia terapéutica como consecuencia de todo lo anterior.



**Figura 7.** Morfologías de las nanocápsulas a) Cápsula de un solo núcleo. El principio activo está encapsulado dentro del núcleo y se representa de color café, b) Principio activo disperso en una red polimérica, c) Nanocápsula multicapa, d) Nanocápsula con doble núcleo.

Obtenida de *Carbon Inspired* (2014)

### 3.3.4 Métodos de síntesis

Existe una gran variedad de métodos para la síntesis de nanopartículas cargadas con fármacos. Todos estos métodos cambian de acuerdo al desarrollo de nuevas tecnologías y técnicas que optimizan la obtención de estos productos. De acuerdo a las propiedades y características requeridas del nanomaterial, que se asocian a la finalidad clínica que se desea darle, se usan métodos de síntesis distintos ya que a partir de cada uno de ellos las propiedades obtenidas de la nanoestructura varían.

Los métodos pueden clasificarse en dos grupos: químicos y físicos. Los métodos químicos principales son la emulsión polimérica y la polimerización interfacial. En cuanto a los métodos físicos, lo que destacan son los métodos plasma, deposición por vapor, síntesis

hidrotermal y síntesis por spray. En el presente apartado se describen brevemente estas técnicas de síntesis. Cabe destacar que en el presente trabajo de investigación se trabajó con el método de emulsificación polimérica cruzada, del que se habla en los métodos de emulsión polimérica.

### 3.3.4.1 Métodos químicos

#### 3.3.4.1.1 Emulsión polimérica

La emulsión polimérica es uno de los métodos de síntesis de nanopartículas más rápidos y sencillos. Este método puede clasificarse en dos grupos de acuerdo al solvente que se usa en la fase continua como de fase orgánica o de fase acuosa. Cuando se trata de una fase orgánica

la metodología consiste en

dispersar un monómero en una

emulsión o en un material en

el que el monómero no sea

soluble. En este sentido, las

nanopartículas de fase orgánica

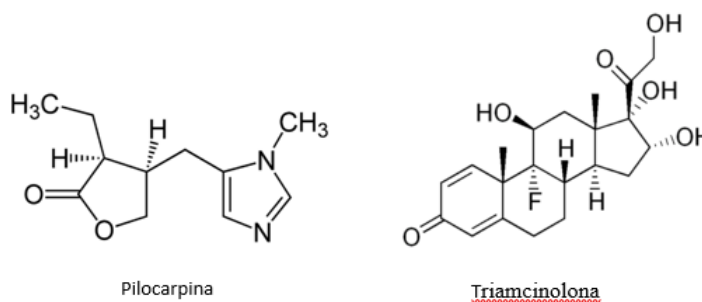
continua pueden ser fácilmente

sintetizadas emulsionando un monómero en solventes como el ciclohexano o tolueno. Este

tipo de emulsión puede requerir de surfactantes o emulsionantes para que se establezca el

monómero en solución. Algunos fármacos que se encapsulan sintetizando este método son

la pilocarpina y la triamcinolona, cuyas estructuras se muestran en la Figura 8 (Kumar et al, 2013).



**Figura 8.** Estructura de pilocarpina y triamcinolona

Obtenida de *Wikipedia* (2016)

Cuando se trata de una fase continua acuosa, las nanopartículas son sintetizadas disolviendo el monómero en la solución acuosa. Generalmente el uso de surfactante o emulsionantes no es necesario en este tipo de emulsión. Este método de síntesis es principalmente utilizado para fabricar adyuvantes de vacunas o de entrega de genes (Kumar et al, 2013). Es utilizado en menor medida que el método de fase continua orgánica, pero la polimerización suele ser altamente eficaz, además de que utiliza una menor cantidad de recursos y no requiere de solventes que pueden ser potencialmente tóxicos.

El método de síntesis de emulsificación cruzada es en realidad un método de fase continua orgánica. Consiste en la emulsión de un monómero en un solvente en el que es insoluble. La polimerización se lleva a cabo por medios mecánicos de agitación, generando como producto final nanocápsulas cuyo núcleo consiste de una red polimérica. La emulsión cruzada o *cross-linking* en inglés, hace referencia a los enlaces que se forman entre una cadena polimérica y otra, de manera que forman una red unida por enlaces que pueden ser iónico o covalentes, dependiendo de la naturaleza del monómero. Este método es el que se utiliza para la síntesis de los nanofármacos estudiados en el presente trabajo de investigación (Uveges, 2008).

#### **3.3.4.1.2 Polimeración interfacial**

La polimerización interfacial es un método de síntesis a baja temperatura. Con este método de síntesis se lleva a cabo una reacción entre dos monómeros en la interfase de dos líquidos miscibles (o parcialmente miscibles). Generalmente uno de los dos líquidos es agua. La velocidad a la que se lleva a cabo la reacción es sorprendentemente rápida. En control de la reacción se hace por difusión. La adición de surfactantes y el aumento de la velocidad de



agitación se traducen en una mayor accesibilidad a la interfase. Esto es gracias a que se disminuye la tensión superficial de los líquidos en cuestión y se aumenta la superficie interfacial de la solución. Un ejemplo de fármaco que es encapsulado utilizando este método es la insulina (García Pérez, 1995).

### **3.3.4.2 Métodos Físicos**

#### **3.3.4.2.2 Deposición de vapor**

El método de deposición de vapor es utilizado para crear películas delgadas y recubrimientos para diferentes aplicaciones. Asimismo, es un método que ha sido utilizado para crecer partículas en la nanoescala. El proceso generalmente produce nanopartículas de formas indefinidas y muy variadas, cuyo tamaño se encuentra entre los 80-120nm. Las nanopartículas resultantes pueden variar en peso, tamaño, distribución, forma, energía superficial y dureza, propiedades que van a afectar el flujo de los sólidos. Asimismo, las fuerzas de van der Waals presentes entre las partículas resultantes van a afectar la separación de las mismas y, por lo tanto, el flujo de los sólidos.

En este tipo de metodología es necesaria realizar las modificaciones necesarias en la superficie de las partículas para asegurar su separación y de esta manera optimizar la entrega del fármaco que encapsulan. Se puede hacer disminuyendo el área de contacto entre partículas adyacentes tratando de controlar la forma de partícula. En algunos estudios se ha demostrado que las superficies esféricas tienen una menor energía superficial y disminuyen las interacciones entre las partículas. Las etapas principales de este método son la vaporización del precursor, seguida de la nucleación y finalmente la etapa de crecimiento.

Los resultados suelen tener rendimientos considerablemente altos, y controlando los factores antes mencionados, se pueden obtener sistemas de liberación muy eficaces (Kumar, et al, 2013). Las ventajas de este método son su simplicidad, reducidos costos de producción y la capacidad de síntesis continua (a gran escala).

### **3.3.5 Métodos de caracterización**

La caracterización de las nanoestructuras es crucial para establecer el entendimiento y control de la síntesis de nanopartículas y de sus aplicaciones potenciales. Existe una amplia gama de herramientas y técnicas de caracterización que ofrecen diferentes funciones y una gran variedad de ventajas y desventajas. Es importante poder entender el potencial y el uso adecuado de cada una de estas herramientas de caracterización para poder elegir la más adecuada y apropiada para el nanomaterial que desea estudiarse.

En este apartado se revisan algunas de las técnicas de caracterización más utilizadas para el estudio de nanopartículas cargadas con fármacos. Aunque son las más importantes y mayormente utilizadas, las técnicas de caracterización no se limitan solamente a las que se presentan aquí. El estudio de métodos, equipos y técnicas de caracterización ha ido tomando una gran importancia y se siguen desarrollando grandes avances en el área.

#### **3.3.5.1 Microscopía electrónica**

El límite de resolución se define como la distancia observable entre dos puntos. Esta es la base de la microscopía. En un microscopio óptico el límite de resolución se ubica alrededor de los 300nm, por lo que es imposible estudiar la nanoescala utilizando uno de estos. Así, la meta de poder observar átomos parecía imposible, pues la resolución requerida era de 0.15-

0.5nm, bastante distanciada de los 300nm que ofrece un microscopio óptico. Fue hasta 1925 que el físico francés Louis de Broglie postula que objetos como los electrones también poseen un comportamiento característico de ondas, postulación a partir de la que surge la idea de la microscopía electrónica. El primer microscopio electrónico fue construido por Ruska y Knoll en 1932. Este microscopio permitía observar la materia en una escala nanométrica por medio del barrido de electrones (UNAM, 2013)

Los microscopios electrónicos utilizan electrones en lugar de luz visible para formar imágenes de una escala muy pequeña. La longitud de onda de los electrones alcanza una escala mucho menor a la de los fotones, por lo que la amplificación obtenida utilizando los electrones es mucho mayor a la obtenida con un microscopio óptico. Existen dos tipos principales de microscopía electrónica, aunque ambos funcionan de un modo similar: Se hace pasar un haz de electrones por la muestra, generando una amplia cantidad de señales medibles de manera que los electrones pueden transmitirse difractados o dispersados. A continuación, se describen los dos tipos de microscopía electrónica principales (Kumar et al, 2013).

#### **3.3.5.1.1 Microscopio Electrónico de Transmisión**

El microscopio electrónico de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) es un microscopio que utiliza un haz de electrones que interactúan con la muestra para poder visualizarla. Aprovecha los fenómenos que se producen cuando un haz de electrones acelerado interactúa con una muestra, generalmente delgada. La transmisión de electrones es la que forma la imagen final, cuya definición y aumento es muy elevado. La transmisión de electrones se refiere a que, en función del grosor y tipo de muestra, algunos electrones la atravesarán y otros serán dispersados selectivamente, lo que permite generar la imagen del material en

cuestión. La imagen generada con el TEM ofrece información referente a la estructura de la muestra y permite un estudio más preciso de la misma (UPV, 2012).

#### **3.3.5.1.2 Microscopio Electrónico de Barrido**

El Microscopio Electrónico de Barrido (SEM por sus siglas en inglés) permite generar imágenes con alta resolución. También utiliza un haz de electrones que interactúan con la muestra para generar la imagen. A diferencia del TEM, el SEM utiliza la dispersión de los electrones y su comportamiento para producir la imagen de la muestra estudiada. Su funcionamiento consiste en hacer colisionar los electrones contra la muestra, generando interacciones electrones-átomos, y provocando que algunos electrones y rayos-X sean emitidos de la muestra. Los detectores del microscopio miden los electrones dispersados, la emisión de rayos-X y los electrones secundarios despedidos para formar la imagen final (CIMAV, 2013).

#### **3.3.5.2 Dispersión dinámica de luz**

La Dispersión Dinámica de Luz (DLS por sus siglas en inglés) es una técnica de caracterización utilizada para determinar el tamaño distribución de partículas en una suspensión o polímero en solución. Es la técnica más comúnmente utilizada porque no modifica la muestra, es fácil y rápida. La medición la hace en base a la idea de que el tamaño de una partícula puede ser determinado midiendo la intensidad de los cambios en la dispersión de luz de una suspensión o solución. Básicamente, la muestra es bombardeada con haces de luz de diferentes longitudes de onda, generando dispersiones en la luz dependiendo del tamaño de partícula. Los detectores recolectan las fluctuaciones y determinan el tamaño

y distribución de las partículas presentes en la muestra. Las ventajas de esta técnica es que no es invasiva, hace mediciones en tiempo real y generalmente son hechas en un solo ángulo (Kumar et al, 2013).

### **3.3.5.3 Otras**

La espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X, la espectroscopia de Transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés), la resonancia magnética nuclear (RMN), Interferometria de Polimerización Dual (DPI por sus siglas en inglés) y la espectroscopia UV son algunas otras técnicas de caracterización de nanopartículas (Kumar et al, 2013).