



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO



FACULTAD DE INGENIERÍA

**“Diseño de un sistema nanoestructurado
acarreador/liberador de principios activos para combatir la
epilepsia”**

TESIS

Que para obtener el título de:

Ingeniero en nanotecnología

Presenta:

José Antonio Mata Ramírez

Director de tesis:

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Codirectora:

Dra. Argelia Rosillo de la Torre

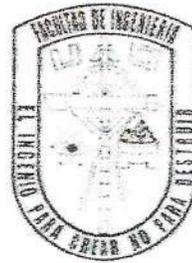
Santiago de Querétaro, Querétaro, 2022



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Ingeniería en Nanotecnología



**"DISEÑO DE UN SISTEMA NANOESTRUCTURADO ACARREADOR/LIBERADOR DE PRINCIPIOS
ACTIVOS PARA COMBATIR LA EPILEPSIA"**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el título de
Ingeniero en Nanotecnología

Presenta:

José Antonio Mata Ramírez

Dirigido por:

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Dra. Argelia Rosillo de la Torre

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña

Presidente

Dra. Argelia Rosillo de la Torre

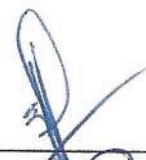
Secretario

Dr. Carlos Guzmán Martínez

Vocal

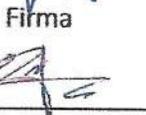
Dra. María Guadalupe Ferreira García

Suplente


Firma


Firma


Firma


Firma

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Abril, 2022

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Eduardo Elizalde, por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto y apoyarme en todo lo que hizo falta, así como a la Dra. Argelia Rosillo que mostró una excelente disposición y me orientó y apoyó en todo momento en que lo requerí.

A la Ing. Tonantzi Pérez Moreno, que me brindó su apoyo siempre durante la realización de esta tesis.

A todos mis profesores durante la carrera y a lo largo de toda mi formación, de cada uno de ellos me he llevado algo.

A mis amigos, que siempre han estado ahí en los buenos y en los malos momentos y me animan a seguir adelante.

A mis sinodales, por tomarse el tiempo de revisar y aprobar esta tesis, además de hacer correcciones y sugerencias y por su apoyo en diferentes momentos.

Al Dr. Juan Francisco Pérez Robles y la M en C. Luz María Avilés Arellano del CINVESTAV, así como a la Dra. Miriam Rocío González Estévez y el M en I. Gerardo A. Fonseca Hernández del CFATA por el apoyo en cuanto a las técnicas de caracterización.

Y a mi familia, porque en ningún momento dejaron de apoyarme y animarme para continuar con esto que tanto me gusta, pero en especial a mis padres, que siempre se han esforzado para que a mis hermanos y a mí no nos falte nada, para ellos es esta tesis.

Resumen

La epilepsia es uno de los trastornos neurológicos más comunes alrededor del mundo, esta se presenta de diferentes maneras y afecta en gran medida la calidad de vida de quienes la padecen, por lo que un adecuado tratamiento es fundamental, sin embargo, la baja biodisponibilidad y la dificultad para alcanzar una dosis efectiva en el cerebro, son algunos de los principales problemas a la hora de su tratamiento con fármacos antiepilépticos.

El diseño y la aplicación de nuevos métodos o sistemas para la entrega de fármacos en el tratamiento de afecciones en el sistema nervioso central, ha tomado fuerza en los últimos años, siendo la nanotecnología uno de los personajes que aparece constantemente, pues las propiedades que los sistemas nanoestructurados pueden aportar a estos son sumamente interesantes.

En el presente proyecto se propone el diseño de un sistema a base de nanopartículas de quitosano, sintetizadas por el método de gelación iónica, que funciona como un acarreador/liberador de fármacos antiepilépticos adheridos superficialmente a las nanopartículas, el cual potencialmente podría representar una alternativa para aumentar la dosis que logra alcanzar realmente al cerebro. El análisis y caracterización del sistema nos indicó la presencia de nanopartículas, las cuales se encuentran interactuando únicamente de manera física, por medio de interacciones intermoleculares con el fármaco, estas nanopartículas presentan una muy buena estabilidad, sobre todo en medio ácido, llegando a formar aglomerados en pH neutro. Por medio de la microscopía electrónica de barrido, se pudo confirmar la forma cuasiesférica de las nanopartículas y tamaños cercanos a los 200 nm. Finalmente, el perfil de liberación nos sugirió que la liberación del fármaco sucede en dos etapas, la primera de ellas muy rápida en la cual se libera cerca del 70% del activo y la segunda de manera lenta y sostenida liberando alrededor de un 20% adicional en 24 h.

Contenido

Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Antecedentes	3
2.1 Padecimientos del Sistema Nervioso Central	3
2.1.1 Barrera hematoencefálica (BHE)	3
2.1.2 Vías de administración	5
2.1.3 Estrategias utilizadas para atravesar la Barrera Hematoencefálica	9
2.2. Epilepsia	12
2.2.1 Panorama general de la epilepsia	12
2.2.2 Tipos de crisis epilépticas	13
2.2.3 Tratamiento para la epilepsia	14
2.2.4 Farmacorresistencia	19
2.2.5 Terapias alternativas	20
2.3 La aplicación de la nanotecnología	21
2.3.1 Nanotecnología	21
2.3.2 Sistemas acarreadores de fármacos	22
2.3.2 Nanopartículas poliméricas.....	24
2.3.3 Nanopartículas poliméricas en el sistema nervioso central	26
2.3.4 Nanopartículas de quitosano	28
Capítulo 3. Hipótesis y objetivos	33
3.1 Hipótesis.....	33
3.2 Objetivos	33
3.2.1 Objetivo general.....	33
3.2.2 Objetivos específicos.....	33
Capítulo 4. Metodología	35
4.1 Materiales y reactivos.....	35
4.2 Síntesis de las nanopartículas de quitosano	35
4.3 Carga por adsorción de los principios activos en las nanopartículas	36
4.4 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas	37
4.5 Determinación de la eficiencia de carga.....	37

4.6 Determinación de la cinética de liberación in vitro	38
Capítulo 5. Resultados y discusión	39
5.1 Nanopartículas de quitosano	39
5.1.1 Tamaño de partícula y potencial Z	39
5.1.2 Espectroscopía infrarroja (FTIR)	42
5.2 Nanopartículas cargadas con fármaco antiepiléptico	45
5.2.1 Tamaño de partícula y potencial Z	45
5.2.1 Espectroscopía infrarroja (FTIR)	46
5.2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	49
5.2.4 Eficiencia de carga	50
5.3 Perfil de liberación del sistema	51
Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas	54
6.1 Conclusiones	54
6.2 Perspectivas	56
Referencias	57
Anexos	64

Índice de figuras

Figura 1. Representación de la BHE y las formas de transporte que se dan en ella (Modificada de Martos-Silván, 2020).	4
Figura 2. Entrada de fármacos al cerebro por medio de diferentes rutas.....	6
Figura 3. Estructura química de algunos de los fármacos antiepilépticos más utilizados. (Tomada de BUSTAMANTE, E., 2003).....	16
Figura 4. Farmacocinética de los FAEs fenitoína y ácido valproico, evaluada en ratones CD1. (Editada de Markowitz et al., 2010)	18
Figura 5. Mecanismos biológicos de la farmacorresistencia en epilepsia. (Modificada de Kwan et al, 2011)	20
Figura 6. Representación de las nanoestructuras (a) orgánicas y (b) inorgánicas para el transporte y liberación de fármacos. (Tomada de Rojas-Aguirre, Y. et al 2016)	23
Figura 7. Algunas maneras cargar los principios activos en las NPs. (Tomada de Calzoni, E. et al, 2018).....	25
Figura 8. Síntesis de NPs de quitosano por el método de emulsión-entrecruzamiento.	30
Figura 9. Síntesis de NPs de quitosano por el método de micelización inversa.	30
Figura 10. Síntesis de NPs de quitosano mediante el método de gelación iónica.	31
Figura 11. Síntesis de NPs de quitosano por el método de coprecipitación química.....	32
Figura 12. Síntesis de NPs de quitosano mediante el método de desolvatación.	32
Figura 13. Distribución de tamaño de partícula, obtenida por DLS, para la muestra J2, A) por intensidad, B) por número.	40
Figura 14. Distribución de tamaño de partícula, obtenida por DLS, para la muestra J3, A) por intensidad, B) por número.	41
Figura 15. Espectro FTIR obtenido de A) quitosano de bajo peso molecular y B) TPP.	43
Figura 16. Espectro FTIR obtenido experimentalmente de A) NPs de quitosano J2 y B) NPs de quitosano J3.....	44
Figura 17. Distribución de tamaño de partícula, obtenida por DLS, para la muestra J2 con ácido valproico, A) por intensidad, B) por número.	46
Figura 18. Espectro FTIR obtenido experimentalmente del ácido valproico.....	47
Figura 19. Espectro FTIR obtenido experimentalmente de las NPs de quitosano cargadas con ácido valproico, incluyendo los blancos correspondientes.....	48
Figura 20. Micrografía de las NPs de quitosano cargadas con ácido valproico obtenida por SEM.	49
Figura 21. Perfil de liberación del sistema formado por nanopartículas de quitosano y ácido valproico, realizado a 24h y por triplicado.	51
Figura 22. Ajuste del perfil de liberación del activo mediante el modelo de Korsmeyer-Peppas.	52

Capítulo 1

Introducción

La epilepsia, uno de los trastornos neurológicos más comunes, es una enfermedad que afecta a personas de todo el mundo y se caracteriza por la generación de movimientos involuntarios del cuerpo, que en ocasiones pueden estar acompañados de la pérdida del conocimiento (Organización Mundial de la Salud, 2019), dichos episodios reciben el nombre de crisis epilépticas y podemos encontrar una vasta variedad de ellas. En México existen alrededor de 3 millones de personas que se ven afectadas por la enfermedad (Divulgación de la Ciencia, 2018), teniendo como algunos de los factores de riesgo más importantes, la edad, malformaciones genéticas, accidentes cerebrovasculares, así como algunas enfermedades como la cisticercosis y el paludismo.

Para tratar este padecimiento existen distintas estrategias, siendo la más común el uso de fármacos que actúan en el foco epiléptico y controlan la aparición de estos episodios, algunos de los más utilizados son el ácido valproico, la carbamacepina, la fenitoína y la gabapentina (Bustamante, 2003); sin embargo, en un gran número de casos, los pacientes presentan resistencia a dichos principios activos y se opta por la combinación de varios de ellos, desafortunadamente, la mayoría de las veces no se obtienen los resultados deseados, por lo que el desarrollo de otras opciones de tratamiento para esta enfermedad resulta de suma importancia.

En la actualidad el mayor problema que se tiene con el uso de los fármacos antiepilépticos es su baja biodisponibilidad en sitio diana, pues al tratarse de afecciones en el cerebro los fármacos destinados a su tratamiento deben atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), que actúa como un filtro a través del cual únicamente los materiales con ciertas características pueden penetrar, entre dichas características se encuentran el tamaño y la lipofilidad (Musumeci et al., 2019), siendo normalmente los más pequeños los más favorecidos.

Utilizando como base este requerimiento, en los últimos años se han desarrollado sistemas a base de nanoestructuras (por su pequeño tamaño), que pueden fungir como acarreadores de diferentes tipos de principios activos, como proteínas o fármacos (Rosillo-De La Torre et al., 2015), los cuales, inclusive pueden ser biodirigidos hacia un tejido específico en el organismo, mejorando así la eficacia de los principios activos y disminuyendo las dosis necesarias para lograrlo.

Estos nanosistemas pueden estar basados en distintos tipos de nanoestructuras, pero en el caso de aquellas con aplicaciones neurológicas parecen ser las nanopartículas (NPs) esféricas las que presentan las características óptimas para atravesar la BHE, es por ello que los sistemas mayormente reportados en la literatura son NPs con el activo cargado, ya sea en la superficie o encapsulado en el interior, pudiendo estar constituidas de materiales orgánicos o inorgánicos, siempre que cumplan con los requerimientos para su uso dentro del organismo.

Para este caso, las NPs poliméricas resultan bastante interesantes, pues por sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad e incluso la capacidad de ser reabsorbidas, además de los variados métodos de síntesis, representan una excelente opción para su aplicación en el sistema nervioso.

El quitosano es un polisacárido natural que se encuentra presente en los caparazones de algunos crustáceos y presenta propiedades biológicas excepcionales, tales como mucoadhesividad, biocompatibilidad y biodegradabilidad (Bento et al., 2015). La síntesis en su forma nanoparticulada puede darse por distintos métodos, algunos de los cuales pueden ser altamente controlables y sencillos.

Es por ello que, en el presente proyecto se plantea una propuesta para el diseño de un sistema nanoparticulado a base de quitosano, cargado con fármacos antiepilépticos en la superficie, el cual pudiera representar una alternativa a los fármacos convencionales y ayudarlos a llegar al foco epiléptico con una mayor eficacia, y potencialmente lograr el control de la epilepsia.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1 Padecimientos del Sistema Nervioso Central

Hoy en día, las enfermedades y desordenes neurológicos se encuentran entre las mayores causas de muerte e invalidez alrededor del mundo. Hasta el día de hoy, el diagnóstico y tratamiento de algunos desordenes neurológicos tales como el Alzheimer, el Parkinson, la enfermedad de Huntington, tumores cerebrales y la epilepsia siguen representando un reto para la comunidad científica (Naqvi et al., 2020).

Uno de los retos más importantes, es la dificultad para entregar agentes como fármacos, ácidos nucleicos, proteínas, agentes de contraste u otras macromoléculas en el sistema nervioso central (SNC) a través de las barreras periféricas, siendo la más importante de ellas, la barrera hematoencefálica (BHE) (Naqvi et al., 2020).

2.1.1 Barrera hematoencefálica (BHE)

La BHE es el cuello de botella en el desarrollo de fármacos de entrega en el cerebro y es sencillamente el factor limitante más importante en el futuro crecimiento de las neuroterapias (Pardridge, 2005). El propósito principal de esta barrera es proteger al sistema nervioso central de sustancias potencialmente peligrosas y es por ello que evita la entrada de un gran número de activos y a su vez, limita la permeabilidad y retención de dichas moléculas en el mismo (Shringarpure et al., 2021).

La BHE se localiza en las células endoteliales que componen los microvasos sanguíneos del cerebro (Figura 1). Ésta representa más de 650 km de intercambio entre la sangre y el cerebro, los cuales son muy heterogéneos. Esta compleja red de microvasos se compone

de arteriolas pre-capilares, capilares y vénulas post-capilares, los cuales presentan diferentes organizaciones anatómicas, tamaños y fenotipos de barrera. Otro punto importante a ser resaltado es la ausencia de fenotipo de barrera en algunos espacios poco vascularizados del cerebro como, por ejemplo, órganos circumventriculares y el plexo coroideo (Gosselet et al., 2021).

En todo lo demás, las células endoteliales de la BHE muestran un fenotipo de barrera representado por una ausencia de fenestraciones, una disminución o ausencia de actividad pinocítica, la presencia de uniones estrechas (tight junctions) asociadas a adherentes y brechas de salida entre células adyacentes (Gosselet et al., 2021).

Debido principalmente a la presencia de esas uniones estrechas entre las células, lo cual mantiene sellado el espacio paracelular, muy pocas moléculas pueden ser difundidas a través de dos células endoteliales de la BHE (Figura 1). Es por ello que, las pequeñas moléculas lipofílicas con un peso molecular menor a 500 Da podrían ser difundidas de manera pasiva a través de las membranas de estas células, siguiendo sus gradientes de concentración (Gosselet et al., 2021).

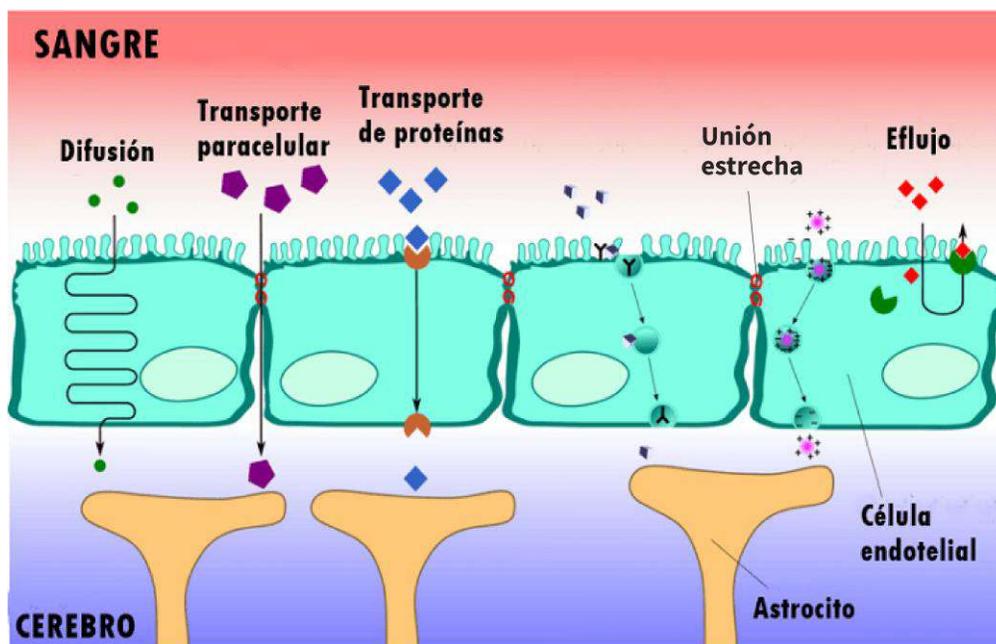


Figura 1. Representación de la BHE y las formas de transporte que se dan en ella (Modificada de (Martos-Silván, 2020)).

Sin embargo, este fenómeno depende altamente de algunos parámetros físico-químicos, como lo son, el peso molecular, su lipofilicidad, la carga, el número de donadores y aceptores de enlace de hidrógeno y el área de superficie polar (Gosselet et al., 2021).

Para el caso de moléculas más grandes, como proteínas, lipoproteínas o péptidos, la ruta transcelular a través de las células endoteliales de la BHE, requiere de su interacción con receptores específicos y mecanismos de transcitosis (Figura 1). Este proceso es altamente específico y requiere de la formación de vesículas de endocitosis. A pesar de eso, el transporte intracelular de este tipo de moléculas entre la sangre y el cerebro aún es muy poco comprendido (Gosselet et al., 2021).

Para lograr mejores resultados en la administración de activos para tratar padecimientos del SNC se han investigado distintos enfoques, siendo uno de ellos, la elección de una vía de administración que resulte beneficiosa para el propósito en particular, entre las más utilizadas se encuentran la vía oral, intravenosa, intramuscular, subcutánea y más recientemente se ha estudiado la vía de administración intranasal para este tipo de aplicaciones.

2.1.2 Vías de administración

Existen distintas vías por las cuales los fármacos pueden ser administrados al organismo (Figura 2) y la elección de la mejor opción dependerá, no solo de la naturaleza del fármaco en cuestión, sino también de algunos factores como las características del paciente, la situación médica que se presente y el tejido diana que se busque alcanzar con el activo.

Cada una de las diferentes vías presenta distintas ventajas y desventajas, dependiendo cual sea el objetivo a alcanzar.

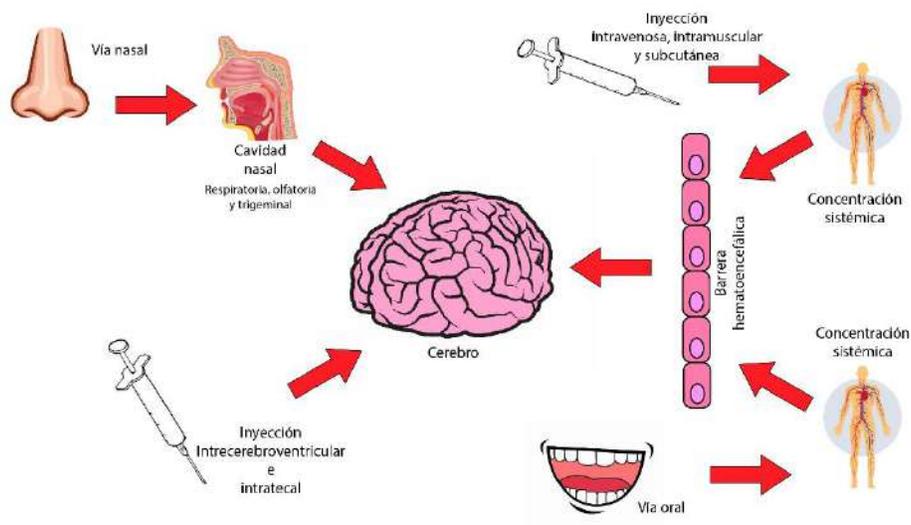


Figura 2. Entrada de fármacos al cerebro por medio de diferentes rutas.

Vía oral

La vía de administración oral es la más sencilla y más conveniente, debido a que puede ser administrada desde casa, los fármacos toman la forma de pastillas, capsulas o líquidos que no requieren de mayores conocimientos para ser ingeridos, debido a esto es la que se utiliza con mayor frecuencia (The Leukemia & Lymphoma Society, 2011).

Sin embargo, tiene algunas limitaciones debidas al trayecto característico que debe seguir el fármaco a lo largo del tracto digestivo. La absorción por vía oral puede comenzar en la boca y el estómago. No obstante, habitualmente el fármaco se absorbe en el intestino delgado. El fármaco atraviesa la pared intestinal y viaja hasta el hígado antes de ser transportado por el torrente sanguíneo hasta el tejido diana, por lo cual su camino se verá intervenido por la BHE (Figura 2). La pared intestinal y el hígado metabolizan muchos fármacos, disminuyendo la cantidad de fármaco que llega al torrente sanguíneo (Le, 2020).

Algunas ocasiones en las cuales debe optarse por otra vía de administración son cuando:

- El paciente no puede ingerir nada.
- Se requiere la administración rápida y en dosis específicas o muy altas.
- El fármaco tiene una absorción errática en el tracto gastrointestinal.

Vía intravenosa, intramuscular y subcutánea

Para la administración por vía intravenosa se inserta una aguja directamente en una vena. La vía intravenosa es la mejor manera de administrar una dosis precisa en todo el organismo de modo rápido y bien controlado. Cuando un fármaco se administra por vía intravenosa se distribuye de inmediato al torrente sanguíneo y tiende a tener un efecto más rápido que cuando se suministra por cualquier otra vía, sin embargo, al igual que en el caso intramuscular y subcutáneo, también deberá sobrepasar la BHE para alcanzar el cerebro (Figura 2).

El efecto de un fármaco administrado por esta vía suele durar menos tiempo. Por lo tanto, algunos medicamentos deben administrarse de modo continuo para mantener constante su efecto. También se utiliza para la administración de soluciones irritantes que producirían dolor o dañarían los tejidos si se utilizaran por vía subcutánea o en inyección intramuscular. Una inyección intravenosa suele ser más difícil de administrar que una inyección subcutánea o intramuscular (Le, 2020).

La vía intramuscular es preferida a la vía subcutánea cuando se requiere administrar mayor volumen de un fármaco. Debido a que los músculos están a mayor profundidad, bajo la piel y los tejidos grasos, se utiliza una aguja más larga. Los fármacos suelen inyectarse en un músculo del brazo, en el muslo o en el glúteo. La rapidez con que el fármaco es absorbido en el torrente sanguíneo depende, en parte, del suministro de sangre al músculo: cuanto menor sea el aporte de sangre, más tiempo necesitará el fármaco para ser absorbido (Le, 2020).

Para la administración por vía subcutánea se inserta una aguja en el tejido adiposo (graso) justo bajo la piel. Una vez inyectado el fármaco, este se desplaza hacia los pequeños vasos sanguíneos (capilares) y es arrastrado por el torrente sanguíneo. Como alternativa, un fármaco llega al torrente sanguíneo a través de los vasos linfáticos. Los fármacos de proteínas de gran tamaño, como la insulina, suelen alcanzar el torrente sanguíneo a través de los vasos linfáticos debido a que se mueven lentamente desde los tejidos hasta el interior

de los capilares. La vía subcutánea es la que se utiliza para la administración de muchos fármacos proteicos, ya que si se suministraran por vía oral serían destruidos en el tracto digestivo (Le, 2020).

Vía intratecal

Para los casos de tratamientos en el sistema nervioso central, en algunas ocasiones suele utilizarse la terapia por vía intratecal, que permite una mayor entrega del activo en el sitio de interés, sin embargo, esta resulta ser invasiva y por ende no se utiliza en la mayoría de los casos.

En esta terapia se lleva a cabo una punción lumbar insertando una aguja dentro del canal espinal, procedimiento que puede llevarse a cabo con anestesia local o general (The Leukemia & Lymphoma Society, 2011).

En este procedimiento se inserta una aguja entre dos vértebras en la parte inferior de la columna vertebral y dentro del espacio que se encuentra alrededor de la médula espinal. El fármaco se inyecta en el conducto raquídeo. Esta vía se utiliza cuando es necesario que un fármaco produzca un efecto rápido o local en el cerebro, en la médula espinal o en las membranas que los envuelven (meninges), ya que se evita el paso por la BHE (Figura 2), por ejemplo para el tratamiento de infecciones en estas estructuras (Le, 2020).

Vía intranasal

Recientemente se ha aplicado esta vía de administración para terapias que involucren el SNC, debido a que se evitan efectos de primer paso, se llega más rápidamente al sitio diana y se piensa que es una buena opción para librar la BHE.

El propósito principal de la administración de fármacos por la vía nasal, cuando el sitio diana es el cerebro, es ayudar a los fármacos a atravesar la BHE con facilidad para llegar a su destino (Figura 2). La administración intranasal puede ser un sustituto positivo y esperanzador en la entrega de fármacos en el tejido cerebral. Esta puede considerarse

como una vía de administración de fármacos beneficiosa debido a su enfoque no invasivo, de igual manera es una vía de administración segura y muy conveniente para los pacientes debido a que es posible aplicarla por sí mismos. (Gangurde et al., 2019).

Las ventajas de los sistemas de administración intranasal son una administración directa al cerebro, la reducción de la dosis del fármaco en comparación con la administración oral para obtener la misma respuesta terapéutica, la reducción de los efectos secundarios experimentados cuando otras vías de administración del fármaco son utilizadas y una mejora en su farmacocinética (Gangurde et al., 2019).

Durante la administración del fármaco por esta vía, es preferible que la formulación se administre por una de las dos fosas nasales. Debido a que la superficie del sitio es mayor, se espera que la absorción del fármaco sea mayor y mejor, lo que aumenta la eficacia del fármaco. La administración del fármaco a través de la cavidad nasal es indolora y de fácil acceso. La presencia de mucosa a lo largo de la cavidad nasal proporciona una buena vascularización y ayuda a evitar el llamado metabolismo de primer paso (Türker et al., 2004).

2.1.3 Estrategias utilizadas para atravesar la Barrera Hematoencefálica

Además de la vía de administración del fármaco, se han explorado distintas estrategias que permitan atravesar de manera satisfactoria la BHE. Dichas estrategias han ido evolucionando a lo largo del tiempo y hacen uso de distintos avances tecnológicos para lograrlo.

Modificar las propiedades fisicoquímicas de los fármacos

Debido principalmente a las uniones estrechas que presentan las células endoteliales de la BHE, la permeabilidad de los fármacos recae en el transporte paracelular a través de la misma, el cual se da, principalmente, mediante transporte pasivo. Es por ello que, con el fin

de mejorar la permeabilidad de estos compuestos, una serie de propiedades fisicoquímicas, específicamente 5 de ellas, deben ser ajustadas previamente.

Entre dichas propiedades se encuentran, el peso molecular, la lipofilidad, el área superficial polar, los enlaces de hidrógeno y la carga. La aplicación de estos 5 parámetros para el diseño de fármacos para el SNC, fue propuesta por Lipinski en el 2001 y recibe el nombre de “la regla de 5”. Esta regla nos dice que habrá problemas de permeabilidad o absorción por difusión pasiva cuando un prototipo presente:

- a) más de 5 donadores de puentes de hidrógeno,
- b) un peso molecular mayor a 500 Da,
- c) un coeficiente de reparto octanol-agua ($C \log P$) mayor a 5,
- d) más de 10 aceptores de puentes de hidrógeno.

Sin embargo, a pesar de la optimización de estas propiedades, podemos encontrar muy pocos casos de éxito, pues la modificación de esas características no solo afecta la permeabilidad a través de la BHE, sino que también afectará todos los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo, y excreción (LADME) dentro del cuerpo humano, pudiendo resultar así en escenarios no deseados (Gosselet et al., 2021).

Abrir la BHE para promover el paso de los fármacos

Otro método utilizado para entregar de manera satisfactoria moléculas a través de la BHE, es la interrupción transitoria de la misma, esta se puede llevar a cabo de diferentes maneras, pero entre las más utilizadas se encuentran dos.

La primera de ellas, es mediante una inyección intracarotídea de una solución hipertónica con activos tales como la arabinosa o el manitol (aunque existen otras alternativas), esto provoca un choque osmótico en las células endoteliales que conforman la BHE, lo cual lleva a una salida excesiva de agua en las células, que deriva en un encogimiento celular. Lo anterior provoca una apertura física en la barrera, que será corregida en algunos minutos (entre 10 y 20), sin embargo, durante ese tiempo, cualquier sustancia podrá ingresar con

facilidad al SNC, lo cual pone en riesgo al paciente, pues cualquier agente patógeno podría ingresar también, por lo que debe ser realizada por neurocirujanos suficientemente calificados y bajo condiciones sumamente controladas (Gosselet et al., 2021).

La otra manera de realizar la apertura de la BHE es mediante el uso de ondas ultrasónicas focalizadas, el desarrollo de este método es relativamente reciente y consiste en someter a la zona craneal del paciente en regiones específicas a las ondas ultrasónicas controladas, estas se transmitirán en forma de microburbujas que se inyectarán en el flujo sanguíneo cerebral llevando a su oscilación y permitiéndoles así interactuar con las células endoteliales, provocando, la interrupción de las uniones estrechas, la sonoporación de las membranas celulares y la estimulación de la transcitosis (Gosselet et al., 2021). Esto resulta ser muy esperanzador, sin embargo, aún es necesario realizar más pruebas y comprender mejor los mecanismos que ocurren en el proceso.

Utilizar nanomateriales como transportadores

Desde hace ya varios años, los nanomateriales (materiales que cuentan con al menos una de sus dimensiones con un tamaño entre 1 y 100 nm, como se verá más adelante) han sido estudiados para mejorar la entrega de fármacos en el cerebro, obteniéndose resultados bastante alentadores. Estos nanomateriales pueden estar contruidos con materiales orgánicos o inorgánicos y pueden tener, o no, algún recubrimiento. El activo que transportan puede estar dispuesto en el interior en forma de núcleo, disperso en la matriz o adherido a la superficie.

La primera molécula en ser diseñada con NPs para entrega en el cerebro fue el dalargin, un hexapéptido con un peso molecular de alrededor de 700 Da y propiedades analgésicas. Se observó que cuando dicho activo se encontraba adherido en la superficie de las NPs de polibutil-cinanoacrilato (PBCA) recubiertas con Polisorbato 80 (PS80), se obtenía un fuerte efecto analgésico en el SNC de ratones, tras su aplicación por vía intravenosa, mientras que dicho efecto no se mostraba al administrar el dalargin en su forma tradicional (Wilson, 2009). Ejemplos como este ahora podemos encontrar una enorme cantidad en la literatura.

El uso de estas NPs resulta bastante prometedor para su aplicación en el SNC, pues no solo permite proteger el cargo de una rápida degradación o eliminación, sino que también es posible funcionalizarlas o modificarlas para que permeen de manera más sencilla la BHE, lo cual podría resultar una excelente opción para el tratamiento de padecimientos como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la epilepsia.

2.2. Epilepsia

2.2.1 Panorama general de la epilepsia

La epilepsia, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es una enfermedad cerebral crónica que afecta a personas de todo el mundo y se caracteriza por convulsiones recurrentes y espontáneas (Organización Mundial de la Salud, 2019). Estas convulsiones son, en la mayoría de los casos, episodios breves de movimientos involuntarios que pueden afectar a una parte del cerebro o a su totalidad y en ocasiones se acompañan de pérdida del conocimiento y del control de los esfínteres, dichos episodios reciben el nombre de crisis epilépticas.

La epilepsia es una de las condiciones neurológicas más comunes a nivel mundial, siendo así que alrededor de 2.4 millones de personas son diagnosticadas cada año (Ngugi et al., 2013). Sin embargo, el número de nuevos casos puede llegar a ser el doble en países semidesarrollados en comparación con países de ingresos altos, lo cual, probablemente se deba al mayor riesgo de enfermedades tales como la neurocisticercosis o el paludismo, pues alrededor del 80% de las personas con algún tipo de epilepsia viven en países de bajos y medianos recursos (Organización Mundial de la Salud, 2019).

En nuestro país cerca de 3 millones de personas padecen epilepsia, de las cuales cerca del 30% no responden al tratamiento farmacológico clásico (Divulgación de la Ciencia, 2018).

Un paciente diagnosticado con epilepsia puede llegar a presentar solo un tipo de crisis durante un episodio epiléptico, sin embargo, también se pueden presentar episodios con una combinación de ellas.

2.2.2 Tipos de crisis epilépticas

De acuerdo con la clasificación más reciente de la Liga Internacional Contra la Epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés), las crisis epilépticas están divididas en tres categorías: generalizadas, focales (también llamadas parciales) y espasmos epilépticos.

Las crisis generalizadas a su vez se dividen en distintos subtipos, los principales son crisis de ausencia, crisis tónico-clónicas generalizadas (GTC), crisis mioclónicas y crisis atónicas. Las crisis de ausencia involucran permanecer mirando un punto fijo sin respuesta alguna a estímulos verbales externos, en ocasiones se pueden presentar tics oculares o cabeceos. Las crisis GTC consisten en movimientos convulsivos bilaterales, es decir sacudidas bruscas del cuerpo de manera inconsciente. Las crisis epilépticas mioclónicas constan de movimientos cortos y repentinos que no se asocian con movimientos conscientes, son contracciones musculares que pueden afectar uno o varios músculos, pueden presentarse de manera generalizada y focal. Por último, las crisis atónicas consisten en la pérdida de tono muscular que a menudo resulta en caídas repentinas (Stafstrom & Carmant, 2015).

Las crisis focales se originan en las redes neuronales que están limitadas a una parte específica de un hemisferio cerebral, mientras que las crisis generalizadas comienzan en redes neuronales distribuidas bilateralmente. Una crisis podría comenzar de manera focal y convertirse en generalizada, éstas pueden originarse en la corteza cerebral o en estructuras por debajo de ella (Stafstrom & Carmant, 2015).

Los espasmos epilépticos, por otro lado, se manifiestan por la repentina extensión o flexión de las extremidades, la cual se mantiene por algunos segundos; estos pueden aparecer a cualquier edad y su origen es aún incierto (Stafstrom & Carmant, 2015).

Aunque dependiendo del tipo de crisis que afecten al paciente puede ser mayor o menor el impacto que estas tienen en la vida diaria del mismo, todas pueden llegar a representar un riesgo para su integridad, por lo que un tratamiento adecuado para controlar las crisis epilépticas es sumamente necesario.

2.2.3 Tratamiento para la epilepsia

El tratamiento de la epilepsia depende de los tipos de crisis que se presenten, además se consideran algunos otros factores que pudieran interferir, algunos de estos son la edad del paciente, la coadministración de otros fármacos, así como los posibles efectos secundarios que el paciente pudiera presentar (Musumeci et al., 2019). Hasta hoy en día no existen terapias que curen la epilepsia, por lo que el tratamiento mantenido con fármacos de control es la primera línea de tratamiento.

Una vez establecido el diagnóstico se debe comenzar el tratamiento con el fármaco antiepiléptico más apropiado, algunos factores a tomar en cuenta en la elección de éste deben ser:

- Tipo de epilepsia y características de las crisis.
- Características propias de los fármacos.
- Características del paciente.

Por ejemplo, algunas crisis pueden empeorar con determinados fármacos, las crisis de ausencia y las mioclónicas pueden verse empeoradas con el uso de carbamacepina, fenitoína, gabapentina, tiagabina o vigabatrina.

Cuando las crisis epilépticas son muy frecuentes, se debe optar por fármacos antiepilépticos (FAE) cuya dosis terapéutica se alcance en pocos días y que permitan iniciar el tratamiento vía parental con el fin de alcanzar concentraciones plasmáticas suficientes en pocas horas (Meca Lallana & Mora, 2009).

Actualmente se cuenta con una amplia variedad de FAEs que actúan bajo diferentes mecanismos de acción y dirigidos a diferentes blancos terapéuticos, algunos de los sitios de acción son los canales iónicos, receptores, enzimas o sistemas de recaptura de neurotransmisores, lo cual permite tener cierta versatilidad al momento de prescribir un tratamiento (Rodríguez et al., 2010).

Fármacos antiepilépticos (FAEs)

En la actualidad se conocen tres mecanismos de acción por los que actúan los fármacos antiepilépticos, estos son:

- 1) modulación de canales iónicos dependientes de voltaje,
- 2) incremento de la acción inhibitoria mediada por el neurotransmisor GABA,
- 3) atenuación de la transmisión excitatoria (particularmente mediada por glutamato).

El objetivo de todos estos mecanismos es disminuir la excitabilidad neuronal. Algunos fármacos pueden actuar a través de más de uno de estos mecanismos, explicando así su amplio espectro de eficacia (Rodríguez et al., 2010).

Algunos de los fármacos antiepilépticos que pueden ser utilizados en casi todas las crisis epilépticas, ya sea de administración simple o combinada, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Fármacos antiepilépticos más utilizados y sus marcas comerciales.

Fármaco	Marca comercial
Carbamazepina (CBZ)	Tegretol
Etosuximida (ESM)	Etosuximida
Gabapentina (GBP)	Neurontín
Fenitoína (PHT)	Epanutin, Neosidantoina, Sinergina
Fenobarbital (PB)	Luminal, Gardenal, Luminaletas
Tiagabina (TGB)	Gabitril
Ácido valproico (VPA)	Depakine
Vigabatrina (VGB)	Sabrillex

En la Figura 3 se pueden observar las estructuras moleculares de algunos de los activos mencionados en la tabla anterior, claramente se observa que una de las moléculas más sencillas es el ácido valproico, pues no contiene ningún ciclo en su estructura, siendo un ácido carboxílico, lo cual podría resultar benéfico al momento de querer cargarlo sobre algún acarreador, esto sin que se aumente demasiado el tamaño del sistema.

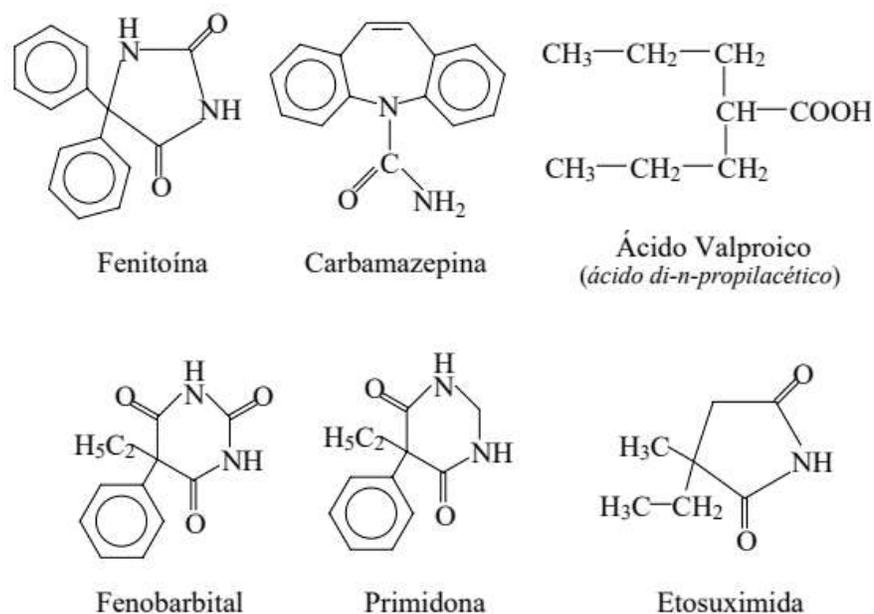


Figura 3. Estructura química de algunos de los fármacos antiepilépticos más utilizados. (Tomada de BUSTAMANTE, E., 2003) (Bustamante, 2003)

Cruzar la BHE representa el principal obstáculo en el desarrollo de medicamentos para enfermedades cerebrales a pesar de décadas de investigación. La BHE está formada por células endoteliales que recubren los microvasos cerebrales, por lo tanto, los medicamentos que actúan en el cerebro, incluidos los FAE, son generalmente lipofílicos, para poder cruzar el endotelio cerebral a través de las membranas lipídicas (Musumeci et al., 2019).

Algunos de los fármacos que resultan interesantes para su posible aplicación en nuevos sistemas de administración, debido a sus propiedades, amplio espectro y fácil acceso son la fenitoína sódica y el ácido valproico o valproato de sodio.

Fenitoína

La fenitoína (PHT) es un fármaco usado desde la década de 1930, por su actividad anticonvulsiva, en el tratamiento de crisis parciales y tónico-clónicas, su mecanismo de acción es el bloqueo de canales de sodio dependientes de voltaje, inhibiendo de esta manera la propagación de descargas del foco epiléptico (Craig, 2005).

Se han reportado algunos otros usos para la fenitoína, como, por ejemplo, en la neuralgia trigeminal, algunos trastornos del comportamiento y como un estabilizador para el trastorno bipolar afectivo (Craig, 2005).

Presenta una absorción oral lenta y variable, con una vida media larga y un metabolismo hepático, con excreción por la orina. Puede llegar a provocar, en algunos casos, alteraciones hematológicas, hiperplasia gingival, náuseas y vómitos (Bustamante, 2003).

Es un ácido débil, el cual precipita en el ambiente ácido gástrico. En dosis terapéuticas, presenta una absorción completa tras la administración oral con un pico de concentración plasmática en 1.5 a 3 h (Figura 4, A); mientras que su vida plasmática media es de aproximadamente 22 h en su estado estable. Este activo se une extensamente (alrededor del 90%) a proteínas plasmáticas, especialmente a la albumina. Solo el fármaco libre es farmacológicamente activo, el porcentaje de unión a proteínas puede reducirse por algunas interacciones farmacológicas o cuando existen ciertas condiciones, como la hipoalbuminemia (Craig, 2005).

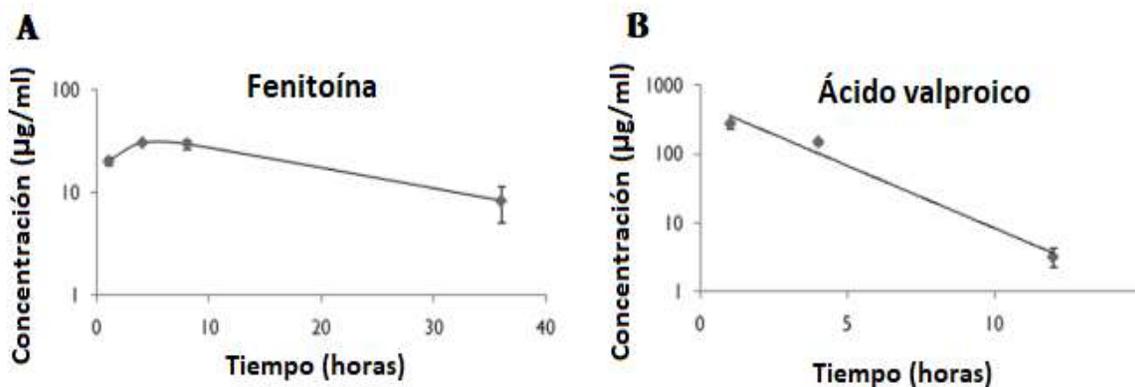


Figura 4. Farmacocinética de los FAEs fenitoína y ácido valproico, evaluada en ratones CD1. (Editada de (Markowitz et al., 2010))

Ácido valproico

El ácido valproico (VPA), a diferencia de los demás antiepilépticos, no actúa sobre un receptor farmacológico, sino que ejerce su acción sobre tres enzimas, inhibe las GABA-transaminasa y semialdehído deshidrogenasa y estimula la glutamato-deshidrogenasa, de esta manera produce un aumento del neurotransmisor inhibitorio GABA, deteniendo la descarga (Bustamante, 2003).

Es utilizado como antiepiléptico, desde su introducción en 1978, en el manejo de crisis parciales y generalizadas, y también como tratamiento para el manejo del trastorno bipolar (Sztajnkrycer, 2002).

El ácido valproico es un ácido carboxílico de cadena ramificada simple (como se ve en la Figura 3). Es un ácido débil con un pK_a de 4.8. Tras ingesta de la dosis terapéutica, presenta una absorción rápida a través del tracto gastrointestinal, con un pico en la concentración plasmática que se alcanza de 1 a 4 h; la vida plasmática ronda entre las 8 y las 21 h, con una vida media de 12.2 h (Figura 4, B). El rango terapéutico de la concentración se encuentra entre los 50 µg/mL y los 150 µg/mL (Sztajnkrycer, 2002).

Su absorción por la vía oral es completa y rápida, presenta un metabolismo hepático y una alta unión a proteínas plasmáticas (Bustamante, 2003).

Lamentablemente, el tratamiento con este tipo de fármacos no siempre es efectivo, pues la mayor parte del activo suministrado no termina por alcanzar el sitio diana (en este caso el cerebro), por lo que se opta por usarlos en combinación con uno o más de los mismos, sin embargo, en un gran número de casos esto aun no es suficiente, pues los pacientes desarrollan una especie de rechazo por los fármacos, lo cual es conocido como farmacorresistencia.

2.2.4 Farmacorresistencia

La Liga Internacional Contra la Epilepsia define la epilepsia farmacorresistente como la falla de los tratamientos adecuados de dos o más esquemas farmacológicos tolerados, elegidos adecuadamente y utilizados, ya sea de manera simple o combinada, para lograr la ausencia de crisis de manera prolongada (Kwan et al., 2010). Cerca de un tercio de los pacientes con epilepsia son diagnosticados como farmacorresistentes.

Es probable que los mecanismos de resistencia a los fármacos sean muy variados y se deban a una amplia gama de diferentes factores, de acuerdo con la causa subyacente y con el sitio de acción del medicamento. La edad también parece afectar los resultados del tratamiento, pues existe una tasa más alta de efectividad en personas mayores que en jóvenes (Kwan et al., 2011).

En el diagrama de la Figura 5 podemos observar las ubicaciones moleculares en las que los mecanismos, se cree, pueden operar. En los sitios marcados con el número 1 se encuentra la sobreexpresión de los transportadores de eflujo en las células endoteliales capilares que constituyen la BHE. En los lugares marcados con el 2, se encuentra una alteración de la expresión o función de los canales iónicos activados por voltaje, que son uno de los objetivos de los fármacos antiepilépticos. Por último, en los sitios marcados con un 3 encontramos mecanismos que no están dirigidos por los fármacos antiepilépticos actuales, como el acoplamiento eléctrico a través de las uniones, la disfunción mitocondrial y los autoanticuerpos contra los receptores de neurotransmisores (Kwan et al., 2011).

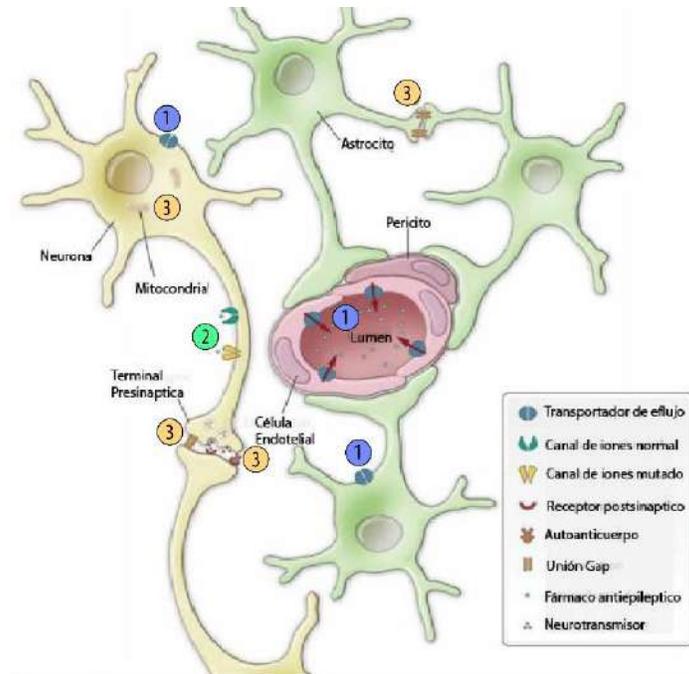


Figura 5. Mecanismos biológicos de la farmacoresistencia en epilepsia. (Modificada de Kwan et al, 2011)

Cuando el tratamiento con un FAE falla, se tiende a optar por el uso de un nuevo fármaco, sin embargo, la probabilidad de que el nuevo tratamiento deje al paciente libre de episodios epilépticos durante un tiempo considerable, disminuye a manera que aumentan los intentos fallidos, llegando a encontrar casos en los cuales es casi imposible controlar las convulsiones del paciente con el uso de los FAEs, por lo que la ciencia ha desarrollado, a lo largo del tiempo, algunas terapias que pueden utilizarse alternativamente, cuando esto sucede.

2.2.5 Terapias alternativas

Se han desarrollado distintas estrategias terapéuticas para el manejo de la epilepsia farmacoresistente. Por ejemplo, cirugías epilépticas (Engel, 1996) y neuromodulación (De Giorgio & Krahl, 2013), las cuales solo en algunas ocasiones resultan en el control completo de las crisis.

Las cirugías epilépticas se realizan con la finalidad de eliminar el área del tejido cerebral donde comienzan las convulsiones o para detener la propagación de la actividad de las

mismas, entre estas se encuentran las lobectomías y las hemisferectomías (Engel, 1996), las cuales buscan la eliminación completa del tejido que representa el foco epiléptico, sin provocar la pérdida de la función cerebral. Sin embargo, todas estas terapias alternativas han sido asociadas con efectos adversos como algunas infecciones e incluso hemorragias, al tratarse de técnicas sumamente complicadas e invasivas (Henry et al., 2004).

Estas técnicas representan una opción de tratamiento para personas con epilepsia que no ha sido posible controlar con medicamentos, sin embargo, no es la única, pues con el desarrollo de nuevas tecnologías es posible diseñar sistemas que, incluso tomando los mismos principios activos usados originalmente, pueden ser llevados directamente al punto en el que se desea que sean entregados, aumentando así su eficiencia, tal podría ser el caso de los nanosistemas acarreadores de fármacos, los cuales pueden ser desarrollados gracias al uso de la nanotecnología.

2.3 La aplicación de la nanotecnología

2.3.1 Nanotecnología

El término nanotecnología se refiere a un campo interdisciplinario que se encarga principalmente del estudio, el diseño, la síntesis y la aplicación de materiales y sistemas funcionales mediante el manejo de la materia en la nanoescala (Nanotechnology, 2016). Se define como el control o la reestructuración de la materia a niveles atómico y molecular en el rango de 1 a 100 nm (Bhushan, 2017). Lo más importante de la nanoescala son las propiedades fisicoquímicas que los materiales pueden adquirir en ésta, pues suelen ser bastante diferentes a aquellas de los materiales macroscópicos, en especial cuando estas bajan de los 100 nm.

El descubrimiento de nuevos materiales, procesos y fenómenos en la nanoescala, así como el desarrollo de nuevas técnicas teóricas y experimentales para la investigación, nos brindan buenas oportunidades para el desarrollo de innovadores nanomateriales y nanosistemas (estructuras compuestas de algún nanomaterial y otro componente que actúan en conjunto para mejorar las propiedades que tienen por separado) que pueden tener aplicaciones en una vasta variedad de campos en la ciencia (Bhushan, 2017).

Al llevar estos nanosistemas a una aplicación en el área médica, nos encontramos con el nacimiento de un nuevo concepto, la nanomedicina, la cual se define como la aplicación de la nanotecnología al diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades y, en consecuencia, al entendimiento de los procesos pato-fisiológicos que intervienen en el origen y curso de una enfermedad determinada (Rojas-Aguirre et al., 2016).

Aunque como lo menciona la definición, esta subdisciplina abarca los campos del diagnóstico y la prevención de enfermedades, el campo más explorado por los científicos, al menos hasta el momento, ha sido el del tratamiento de diversas enfermedades haciendo uso de nanosistemas, con el fin de poder mejorar las propiedades de los tratamientos convencionales, siendo un muy buen ejemplo el de los sistemas acarreadores de fármacos.

2.3.2 Sistemas acarreadores de fármacos

Con el fin de aportar una nueva manera de atacar ciertas enfermedades y haciendo uso de los avances hasta ahora realizados, un gran número de científicos han propuesto el utilizar diferentes tipos de nanomateriales como medios acarreadores de distintos activos, para su entrega en el sitio de interés, tratando así de mejorar lo realizado por métodos de tratamiento convencionales.

Los materiales que se han utilizado para la construcción de nanosistemas acarreadores de fármacos son muy diversos, pero podemos clasificarlos de manera muy general en 2 grandes grupos, nanoestructuras orgánicas y nanoestructuras inorgánicas (Rojas-Aguirre et al., 2016).

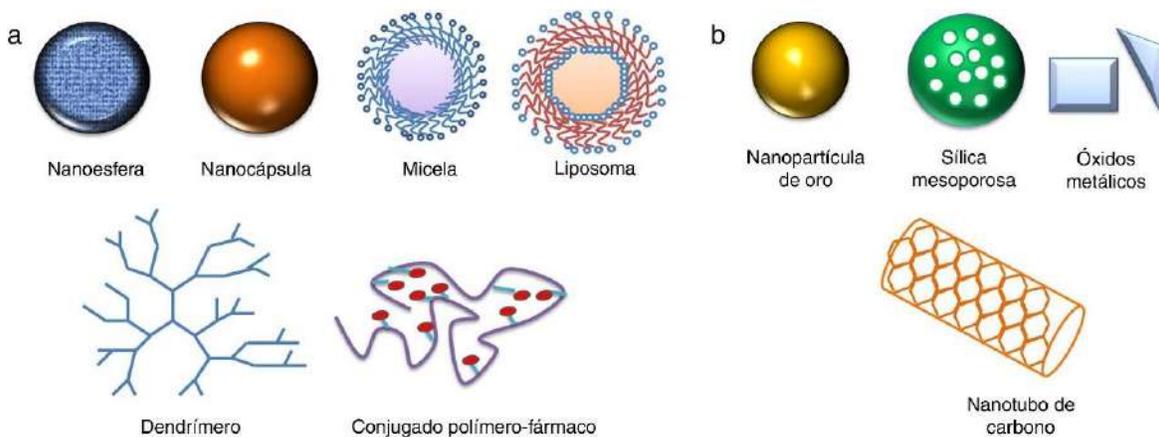


Figura 6. Representación de las nanoestructuras (a) orgánicas y (b) inorgánicas para el transporte y liberación de fármacos. (Tomada de Rojas-Aguirre, Y. et al 2016)

En el grupo de las nanoestructuras orgánicas, podemos encontrar, tal como se observa en la Figura 6 las nanoesferas, nanocápsulas o NPs poliméricas, las micelas, los liposomas, dendrimeros y los conjugados polímero-fármaco.

Por otro lado, en el grupo de las inorgánicas se encuentran los nanotubos de carbono, las NPs metálicas, de óxidos metálicos y de sílice mesoporosa.

Las NPs han recibido mucha atención por sus aplicaciones en el área del diagnóstico y la terapia. Algunas de las características que las hacen atractivas son su pequeño tamaño, alta estabilidad, capacidad para superar barreras orgánicas, como la BHE, y su biocompatibilidad (Rosillo-De La Torre et al., 2015).

Las NPs logran llevar el fármaco hasta las zonas deseadas mediante diferentes mecanismos (por ejemplo, por medio de la unión a algún receptor específico o por difusión a través de membranas), ya que son capaces de ingresar en algunos sitios a los cuales el fármaco carente de nanoacarreador no lograría alcanzar, esto se da gracias a su capacidad de enmascarar los fármacos ante las membranas, ya sea por su tamaño, por los grupos funcionales dispuestos en su superficie o por algún otro fenómeno superficial; una vez en el sitio objetivo, se libera el activo ya sea por desorción, difusión a través de las paredes o por erosión de la nanopartícula (Rojas-Aguirre et al., 2016).

Una gran cantidad de sistemas nanoestructurados para la liberación de fármacos se han desarrollado hasta el día de hoy, los cuales han utilizado distintos tipos de nanoestructuras, para tratar una gran variedad de enfermedades, brindando resultados prometedores.

Algunos ejemplos de estos nanosistemas son: micelas cargadas con doxorrubicina para tratamiento de cáncer resistente a diferentes fármacos (Bao et al., 2016), NPs de óxido de hierro recubiertas de sílice cargadas con fenitoína para tratar crisis convulsivas farmacorresistentes (Rosillo-De La Torre et al., 2015), o un composito de NPs RALA/siFKBPL (FKBPL es la proteína de unión al fármaco FK506, la cual se funcionaliza con RNAsi, mientras que RALA es un péptido anfipático bioinspirado que funge como acarreador) con nanofibras para la curación de heridas (Mulholland et al., 2019).

Tras la administración del sistema, estas nanoestructuras deben interactuar con el cuerpo sin provocar efectos indeseados, por lo que es importante determinar la biocompatibilidad del sistema y de sus posibles productos de degradación, así como evaluar la completa excreción o absorción del mismo sin dañar al organismo.

Aunque existen distintas alternativas que cumplen con estos requerimientos, de manera reciente se ha argumentado que las NPs poliméricas son bastante confiables debido a la biodegradabilidad y biocompatibilidad que, en la mayoría de los casos, presentan, así como algunas otras propiedades que las hacen excelentes candidatos para la aplicación en este tipo de sistemas.

2.3.2 Nanopartículas poliméricas

Recientemente, el uso de materiales biopoliméricos en sus formas nanoestructuradas ha representado una alternativa con un gran potencial para su aplicación en sistemas liberadores de fármacos o algunas macromoléculas en el cuerpo.

Las NPs poliméricas tienen un enorme campo de aplicación para su uso en el cuerpo humano, pues pueden ser utilizadas en el campo de la terapia de remplazo enzimático, o

pueden proveer ciertas moléculas bioactivas en zonas que lo requieran, además de su uso como acarreadores de activos.

Estos principios activos, cualesquiera que sean, pueden ser dispersados, encapsulados, o adsorbidos en la superficie de las NPs, como se observa en la Figura 7 (Calzoni et al., 2019); entre los polímeros más utilizados para estas aplicaciones encontramos el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA) y ácido poliláctico co-glicólico (PLGA), pues incluso si son sintéticos son altamente biocompatibles y biodegradables.

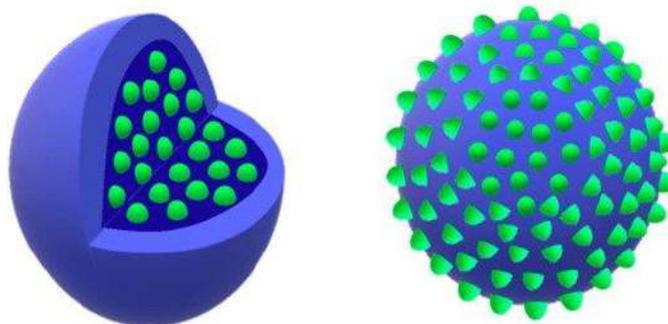


Figura 7. Algunas maneras cargar los principios activos en las NPs. (Tomada de Calzoni, E. et al, 2018)

La ventaja de usar NPs poliméricas radica básicamente en la enorme biocompatibilidad, biodegradabilidad y la posibilidad de reabsorber los productos de degradación de estas NPs para ser aprovechados por el organismo en alguno de sus procesos.

Existen muchas técnicas para lograr la morfología deseada de los nanosistemas. Ampliamente hablando podemos resumirlas en dos grandes grupos, los métodos de reducción de tamaño (top-down) y los métodos de autoensamblado (bottom-up) (Calzoni et al., 2019).

“Top-down” se refiere a los métodos en los que se comienza con una cantidad grande de material y se lo reduce para obtener objetos más pequeños, por lo que estos métodos requieren de una alta energía. De manera general los métodos top-down se originaron como una continuación de las técnicas para microfabricación utilizadas en la industria de semiconductores, y se basan principalmente en métodos ópticos o fotolitográficos y mecánicos, en este grupo encontramos técnicas como la extrusión, molienda mecánica,

fotolitografía, deposición química o descomposición térmica (Ventra, Massimiliano; Evoy, Stephane; Heflin, 2004).

Por el otro lado, las técnicas de autoensamblado (bottom-up) comienzan con materiales a escala atómica o molecular, utilizando grupos de átomos y moléculas como bloques de construcción para formar partículas más grandes, películas delgadas e incluso materiales nanoestructurados. Este tipo de métodos son de baja energía y requieren poca intervención humana, aunque generalmente creamos las condiciones para poner el proceso en marcha, los objetos y nanoestructuras que se forman posteriormente son de efecto local. Se emplean meramente comportamientos físicos, químicos y biológicos para formar de manera automática estructuras ordenadas más grandes a partir de pequeños objetos de menores dimensiones. Las síntesis química y biológica no requieren nuestra intervención directa una vez desencadenadas; en este grupo encontramos técnicas como coacervación, nanoprecipitación, deposición física de vapor, epitaxia de haz de electrones, reducción química, sol-gel o hidrólisis (Ventra, Massimiliano; Evoy, Stephane; Heflin, 2004).

Estos sistemas poliméricos de liberación controlada han ganado interés últimamente como posibles estrategias para el transporte de fármacos al sistema nervioso central, incluido el cerebro. El principal objetivo de estas NPs es entregar un agente terapéutico a un sitio específico, reduciendo de esta manera la dosis administrada, aumentando la biodisponibilidad del agente en el sitio deseado y disminuyendo los efectos adversos periféricos.

2.3.3 Nanopartículas poliméricas en el sistema nervioso central

Como ya se sabe, el sistema nervioso central es una parte muy delicada, por lo que obviamente para poder utilizar un material con aplicaciones dirigidas a tratar padecimientos en éste, se debe hacer una ardua selección del material a emplear; algunas de las propiedades ideales necesarias en los nanomateriales poliméricos, para su uso en la liberación de fármacos en el SNC se listan a continuación:

- Polímero natural o sintético
- No tóxico
- Biodegradable/biocompatible
- Diámetro de partícula ≈ 100 nm
- Estable en sangre
- Que no promueva la activación de neutrófilos
- Que no afecte la agregación plaquetaria
- Que no induzca inflamación
- Que presente un tiempo prolongado de circulación (Lockman et al., 2002)

El método para la síntesis de las NPs depende del tamaño, solubilidad y el tipo de fármaco a encapsular (Bennewitz & Saltzman, 2009) requeridos en cada caso. Para su entrega en el cerebro el tamaño ideal, suficientemente pequeño para viajar por todas las restricciones físicas hacia el mismo, pero suficientemente grande para cargar con la cantidad suficiente de fármaco, podría establecerse alrededor de los 100 nm, sin embargo, partículas de hasta 200 nm pudieran llegar a penetrar a través del tejido cerebral. Otro factor importante es la carga de la nanopartícula, pues se ha encontrado que cargas neutrales o negativas experimentan un mayor volumen de distribución cuando se administran directamente en el cerebro (MacKay et al., 2005), sin embargo, aún no es posible definir la carga ideal para la entrega de fármacos al SNC.

Es posible disminuir la eliminación de las NPs por parte del hígado, bazo y los macrófagos, mediante el recubrimiento con algunos polímeros biocompatibles, como por ejemplo, el polietilenglicol (PEG), lo cual a su vez incrementa su vida plasmática media (Gosselet et al., 2021).

Por otro lado, algunos estudios han reportado partículas de alrededor de 500 nm que logran atravesar satisfactoriamente la BHE, especialmente cuando están recubiertas con PEG o algún otro polímero biocompatible. La forma de las NPs también juega un papel importante, pues las más estudiadas por su facilidad tanto de síntesis como de caracterización, son las

NPs esféricas, sin embargo, algunas partículas planas o en forma de barra también se han reportado como una buena opción (Gosselet et al., 2021).

Sabiendo los requerimientos necesarios, un posible candidato para ser aplicado al SNC como acarreador de fármacos y del cual no se ha hablado mucho, es el quitosano, el cual presenta algunas propiedades que resultan sumamente interesantes, especialmente para estos casos.

2.3.4 Nanopartículas de quitosano

El quitosano es un polímero natural que se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina, la cual se encuentra presente en los exoesqueletos de algunos crustáceos, como cangrejos o camarones. Este es un polisacárido que presenta propiedades biológicas excepcionales, tales como mucoadhesividad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y una baja inmunogenicidad (Bento et al., 2015). Debido a esto las NPs de quitosano han sido utilizadas ampliamente como sistemas de administración para una amplia gama de principios activos mediante administración oral, nasal, parenteral e incluso a través del colon (Caro-León et al., 2019).

La dosis letal media (LD₅₀) del quitosano se encuentra en el mismo rango que la del azúcar o la sal de mesa, por lo cual no representa un riesgo para el ser humano; este polímero cuenta con tres tipos de grupos funcionales reactivos, mediante los cuales se pueden realizar modificaciones químicas, estos son, grupos amino (-NH₂) y grupos hidroxilo (-OH) primarios y secundarios (Yu et al., 2019).

Existe un gran número de ventajas a la hora de utilizar el quitosano para la entrega de fármacos, entre ellas, la capacidad de controlar la liberación, que no se requiere de reactivos tóxicos para su síntesis, que contiene varios grupos amino que están disponibles para ser entrecruzados, además, la carga positiva del quitosano le permite combinarse fuertemente con materiales aniónicos, la superficie celular y la membrana mucosa, lo cual,

beneficia la apertura de las uniones estrechas y mejora la absorción por la membrana, entre otras cosas (Yu et al., 2019).

Las NPs de quitosano, por lo tanto, resultan sumamente llamativas para su aplicación como acarreadoras de fármacos antiepilépticos, en especial para ser aplicadas por la vía intranasal, pues además de ser muy accesibles económicamente, son fáciles de sintetizar y pueden presentar diversos tamaños, por lo que mediante el método de síntesis es posible ajustarlas a los diferentes requerimientos.

La estrategia más utilizada para la síntesis de NPs de quitosano es a partir de los métodos de autoensamblaje o bottom-up, sin embargo, también se han utilizado algunos métodos que siguen el principio de los métodos top-down, reportando buenos resultados.

El planteamiento de diferentes métodos de obtención se relaciona directamente con la búsqueda del mejoramiento de algunas características fisicoquímicas como tamaño, estabilidad y carga superficial, además de la capacidad de incorporación de principios activos con actividad biológica (Caro-León et al., 2019).

Algunos de los principales métodos de síntesis se detallan a continuación.

Método emulsión-entrecruzamiento

Este método, el cual se puede apreciar en la Figura 8 involucra la producción de una emulsión de agua en aceite (W/O), lo cual es el resultado de la mezcla de una solución acuosa de quitosano con una fase orgánica (comúnmente el tensoactivo Span 80). Tras hacer esto, se agrega un agente de entrecruzamiento el cual aumenta la estabilidad de las partículas, debido a su afinidad con los grupos funcionales del quitosano, comúnmente se utiliza el glutaraldehído como agente entrecruzante, el cual es disuelto mediante solventes orgánicos. (Caro-León et al., 2019).

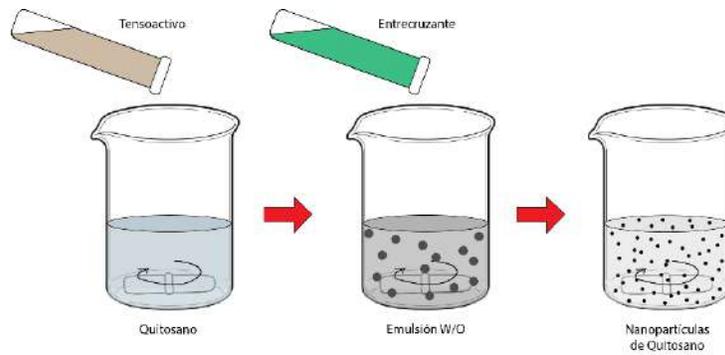


Figura 8. Síntesis de NPs de quitosano por el método de emulsión-entrecruzamiento.

Micelización inversa

Este es un método de obtención de NPs (Figura 9) caracterizado, al igual que el anterior, por la producción de emulsiones de agua en aceite (W/O), pero en este caso se hacen a base de tensoactivos lipofílicos disueltos en un medio orgánico, principalmente el bis-(2-etilhexil) sulfosuccinato sódico (AOT), para posteriormente añadir un agente entrecruzante (glutaraldehído). Este método permite la obtención de NPs con tamaños menores a 100 nm (Caro-León et al., 2019), sin embargo, al utilizar distintos precursores que pueden resultar tóxicos, no es una buena opción para aplicaciones biomédicas.

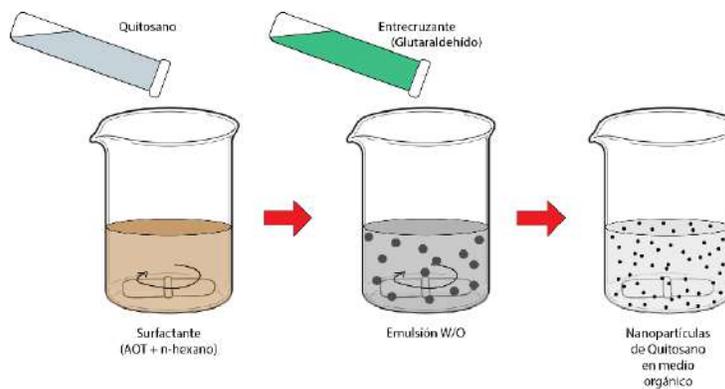


Figura 9. Síntesis de NPs de quitosano por el método de micelización inversa.

Gelación iónica

Este método basa su funcionamiento en la agregación de las moléculas poliméricas por medio de interacciones electrostáticas. En este procedimiento las NPs se forman por la agregación de las moléculas del polímero, tal como se muestra en la Figura 10, la cual es producto de la interacción de un polisacárido cargado positivamente y otras especies con carga negativa (Carmona et al., 2018). El tripolifosfato de sodio (TPP) es el agente entrecruzante más común para este propósito (Caro-León et al., 2019). Es un método sumamente sencillo y por lo tanto el más utilizado en la actualidad, además, mediante la modificación de algunos parámetros como la concentración y el pH de las soluciones, el peso molecular del quitosano o los tiempos de agitación, se puede controlar el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad, así como el potencial Z.

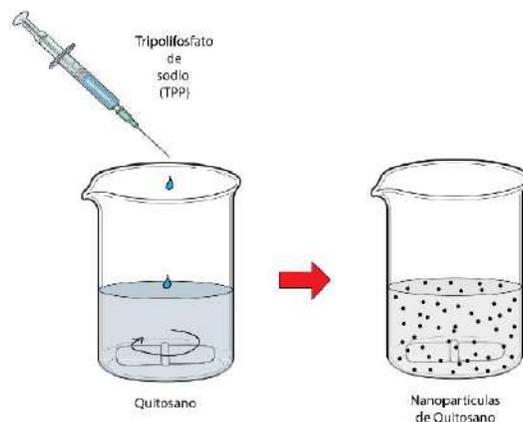


Figura 10. Síntesis de NPs de quitosano mediante el método de gelación iónica.

Coprecipitación química

Está técnica incluye la adición de una solución ácida que contenga el precursor necesario en una solución básica o ligeramente básica o viceversa (Figura 11). Este método es sumamente accesible debido a que no requiere de temperaturas elevadas, de sustancias peligrosas o precursores especiales (Ahn et al., 2012), además, por su naturaleza brinda tamaños de partícula pequeños, aunque en ocasiones con un alto índice de polidispersidad.

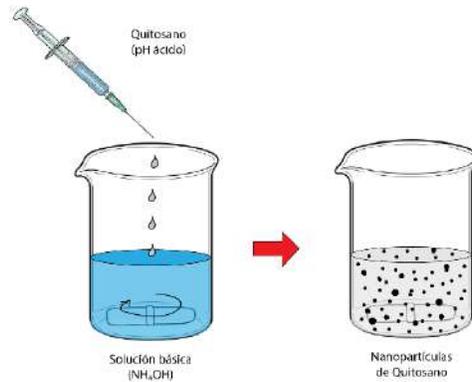


Figura 11. Síntesis de NPs de quitosano por el método de coprecipitación química.

Desolvatación

Este método implica la adición de un agente precipitante a la solución acuosa del polímero, con el fin de disminuir su solubilidad a partir de la generación de interacciones entre las moléculas de disolvente y las del agente precipitante, siendo el sulfato de sodio el más comúnmente utilizado, el proceso se lleva a cabo comúnmente en presencia de un tensoactivo, como Tween 80, como se muestra en la Figura 12 (Caro-León et al., 2019).

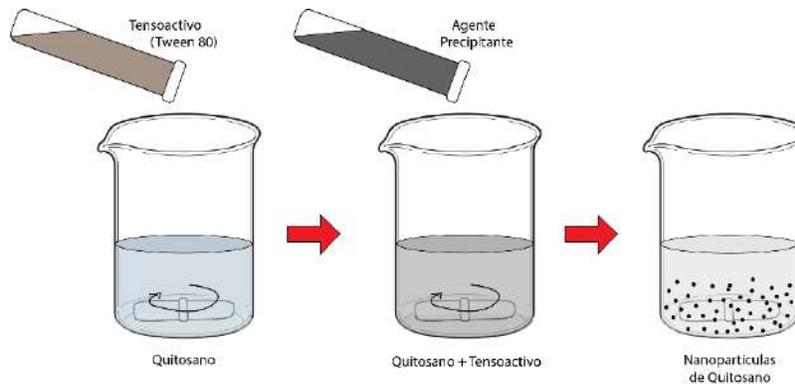


Figura 12. Síntesis de NPs de quitosano mediante el método de desolvatación.

Capítulo 3

Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

El desarrollo de un sistema a base de nanopartículas de quitosano, con un tamaño cercano a los 100 nm, cargadas con un principio activo para tratar la epilepsia (ácido valproico o fenitoína), presentará las propiedades fisicoquímicas necesarias para ser considerado una alternativa en el tratamiento de la epilepsia y la epilepsia farmacorresistente.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

- Desarrollar un sistema acarreador/liberador de activos antiepilépticos, a base de nanopartículas de quitosano para su potencial aplicación en el tratamiento de la epilepsia.

3.2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de quitosano mediante el método de gelación iónica con un tamaño cercano a los 100 nm.
- Caracterizar las nanopartículas y evaluar sus propiedades por medio de diferentes técnicas fisicoquímicas.
- Cargar las nanopartículas sintetizadas con los principios activos correspondientes mediante el método de incubación.

- Calcular la eficiencia de carga, determinando la cantidad de activo libre en la solución mediante espectroscopía de UV-Vis, aplicando la técnica reportada por Saha y col.
- Evaluar la capacidad de liberación de los principios activos de los sistemas, a través de tiempos determinados, mediante la obtención de su perfil de liberación in vitro.

Capítulo 4

Metodología

4.1 Materiales y reactivos

Los reactivos utilizados para llevar a cabo el presente proyecto fueron quitosano de bajo peso molecular (Sigma-Aldrich CAT: 448869-250G), tripolifosfato de sodio (TPP) (Sigma-Aldrich CAT:238503-500G), ácido acético glacial al 99.7% (J. T. Baker CAT: 9508-05), hidróxido de amonio al 28.0-30.0% (J. T. Baker CAT: 9721-03) y ácido clorhídrico al 37% (J. T. Baker CAT: 4218-03), los cuales fueron utilizados sin purificación adicional; además se utilizó agua tridestilada (Tecnología y control) y etanol 96° (nh alcohol). Mientras que los principios activos utilizados fueron el ácido valproico (valproato de sodio) y la fenitoína sódica (Sigma-Aldrich CAT: 1069-66-5 y 630-93-3 respectivamente).

4.2 Síntesis de las nanopartículas de quitosano

Para la síntesis de las NPs de quitosano se optó por el método de gelación iónica, con base en lo reportado por Calvo y col. (Calvo et al., 1997), con ciertas modificaciones en algunos parámetros con base en lo que reportan Hassani y col. (Hassani et al., 2015). Este método consiste en utilizar un agente entrecruzante, en este caso el TPP en diferentes concentraciones, el cual se agregó lentamente a manera de goteo en soluciones de quitosano, dichas soluciones fueron preparadas previamente haciendo uso de una solución de ácido acético al 1% (v/v) y agitación magnética por alrededor de 2 horas; el goteo se realizó con ayuda de una bomba peristáltica y ajustando las velocidades de flujo, las cuales se trabajaron alrededor de los 0.1 mL/min, todo esto mientras se agitaba vigorosamente la solución en cuestión a 750 rpm. Una vez que el goteo había terminado, las muestras se

dejaron reaccionar por 60 minutos más y se llevaron por 5 minutos adicionales al vortex. Al tener las muestras listas, estas fueron puestas en un baño ultrasónico por periodos cortos (de 5 a 10 minutos) a temperatura ambiente, con la finalidad de lograr una buena dispersión y reducir un poco más el tamaño.

La concentración de las soluciones tanto de quitosano como de TPP, así como los parámetros utilizados, se modificaron con el fin de obtener la mejor relación para el tamaño de partícula deseado y se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 2. Parámetros experimentales utilizados para la síntesis de las NPs.

Muestra	Quitosano (Qs)	TPP	Relación Qs:TPP	Velocidad de flujo
J1	1 mg/mL	0.3 mg/mL	3:1	0.1 mL/min
J2	0.5 mg/mL	0.3 mg/mL	3:1	0.1 mL/min
J3	0.1 mg/mL	0.3 mg/mL	3:1	0.1 mL/min
J4	1 mg/mL	0.5 mg/mL	3:1	0.1 mL/min
J5	0.5 mg/mL	0.5 mg/mL	3:1	0.1 mL/min
J6	0.1 mg/mL	0.5 mg/mL	3:1	0.1 mL/min

4.3 Carga por adsorción de los principios activos en las nanopartículas

Para la carga del principio activo se utilizó el método de incubación, en el cual, una vez obtenidas las NPs de quitosano en solución, fueron mezcladas con soluciones que contenían el principio activo en una determinada concentración (2 mg/mL), esto mediante el goteo con la bomba peristáltica. Una vez mezcladas, las soluciones se mantuvieron en agitación generosa durante 60 minutos para que existiera una buena adsorción de los fármacos en la superficie de las NPs (Gan & Wang, 2007). Por este método los principios activos se anclan a las NPs, únicamente por adsorción superficial.

4.4 Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

Para la caracterización de las NPs se realizó el análisis de tamaño de partícula haciendo uso del equipo de dispersión de luz dinámica (Malvern Instruments Zetasizer Nano), así como el análisis de potencial zeta con el equipo Anton Paar Litesizer 500-BM10, esto con el fin de conocer la distribución de tamaño presente en las NPs sintetizadas, así como la carga superficial y con ello la estabilidad que estas presentan.

También se utilizó la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM), haciendo uso de un microscopio (), con el fin de identificar la morfología de las partículas obtenidas y constatar su tamaño y distribución.

Además, se realizó el análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), con el equipo PerkinElmer FT-IR Spectrum Two, para determinar las interacciones que se presentan entre los componentes, tanto de las NPs desnudas, como aquellas con el fármaco cargado y así determinar la manera en que estos interactúan en la estructura.

4.5 Determinación de la eficiencia de carga

Para determinar la eficiencia de carga se precipitaron las NPs con el fármaco cargado (con ayuda de una solución básica de NH_4OH y centrifugación) y se tomó como muestra el medio sobrenadante, posteriormente se determinó por medio de UV-Vis (con ayuda de la ley de Lambert-Beer y una curva de calibración construida a partir de soluciones de concentración conocida a 195 y 218 nm) la cantidad de fármaco libre en la solución (activo no cargado) y de esta manera se calculó la eficiencia de fármaco encapsulado en las NPs con ayuda de la fórmula reportada por Saha y col. (Ecuación (1)) (Saha et al., 2010), en donde se relaciona la cantidad de fármaco utilizado con la cantidad de fármaco libre en la solución.

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \frac{(T_P - T_F)}{T_p} * 100 \quad (1)$$

4.6 Determinación de la cinética de liberación in vitro

Para la evaluación del sistema se realizó un perfil de liberación para determinar la cinética de liberación in vitro, simulando condiciones fisiológicas. Este perfil fue obtenido poniendo el sistema en un medio de liberación (líquido cefalorraquídeo artificial) del cual se tomaron muestras en tiempos determinados para identificar la cantidad de fármaco en el medio y por lo tanto liberado.

Para la preparación del medio se siguió la metodología reportada por Voss y col. (Voss, 2020), por la cual se obtiene un líquido cefalorraquídeo artificial compuesto por 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM NaHCO₃ y 10 mM D-glucosa.

Una cantidad determinada de nuestras NPs secadas en forma de película fue depositada dentro de un vaso de precipitados de 50 mL conteniendo 20 mL del medio, se mantuvo sin agitación y a temperatura ambiente durante 24 h, las muestras fueron tomadas a los 5, 10, 15 y 30 minutos y 1, 3, 6 y 24 h. El ensayo se realizó por triplicado.

Capítulo 5

Resultados y discusión

5.1 Nanopartículas de quitosano

Una vez realizada la síntesis de las NPs de quitosano, se procedió a analizar las muestras por medio de diferentes técnicas de caracterización fisicoquímicas. El primer filtro para la selección de los mejores parámetros para la síntesis, así como la selección de las muestras fue la revisión física, completamente cualitativa, pues ha sido reportado en la literatura que el tamaño de las partículas de quitosano está estrechamente relacionado con la coloración que adquieren las suspensiones que las contienen (Sullivan et al., 2018), siendo más transparentes las que contienen partículas más pequeñas y más opalescentes las de mayor tamaño, por lo que se seleccionaron aquellas que se apreciaban más transparentes.

5.1.1 Tamaño de partícula y potencial Z

Primero se realizó el análisis de tamaño de partícula para las diferentes muestras, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3, en la cual podemos ver que todas las muestras, a excepción de la J5 y J6 presentan dos tamaños de partícula, sin embargo, las que presentan el mejor tamaño, de acuerdo a lo que buscamos, son la J2 y J3, razón por la cual fueron elegidas. Las distribuciones de tamaño de partícula, para dichas formulaciones se muestran en las Figura 13 y Figura 14, respectivamente, el resto de las distribuciones de tamaño de partícula se pueden encontrar en la sección de Anexos, en el Anexo 1, mientras que en el Anexo 2 se encuentra la distribución a pH neutro.

Tabla 3. Tamaños de partícula para las muestras sintetizadas.

Muestra	Tamaños de partícula	Diámetro hidrodinámico promedio
J1	376 y 6299 nm	10738 nm
J2	108 y 669 nm	1242 nm
J3	44 y 342 nm	1126 nm
J4	296 y 12055 nm	6175 nm
J5	391 nm	1229 nm
J6	1782 nm	3445 nm

Para la muestra J2, como se observa en la gráfica (Figura 13, A), existe la presencia de dos señales, de las cuales la de 669 nm es la más intensa, con el 23.5%, mientras que encontramos que la señal en 108 nm solo nos da una intensidad del 4.8%.

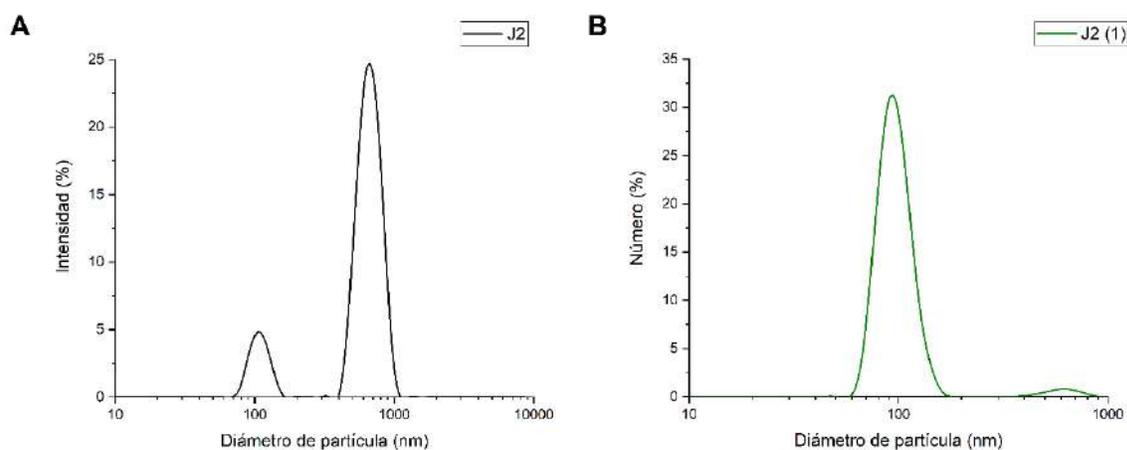


Figura 13. Distribución de tamaño de partícula, obtenida por DLS, para la muestra J2, A) por intensidad, B) por número.

Sin embargo, al observar la distribución por número de partículas (Figura 13, B), nos percatamos de que ahora la señal más intensa se encuentra a los 91.3 nm, con un 31.1% de las partículas, mientras que la señal de los 600 nm casi desaparece, con tan solo un 0.8% de las partículas. De esta manera, nos damos cuenta de qué, aunque existe una mayor intensidad en el rango de los 600 nm, esto se debe principalmente a que esas partículas tienen un tamaño mucho mayor en comparación con las del rango de los 100 nm, pues al

observar la distribución por número de partículas, la diferencia es bastante significativa, por lo que la presencia de NPs en el rango de los 100 nm predomina en la muestra, sin embargo, existen aun así algunas partículas mucho más grandes, las cuales pueden ser partículas per se, cúmulos de NPs o incluso contaminación de la muestra o restos de quitosano sin disolver, pues aunque no se refleja en las gráficas, el programa nos arrojó un tamaño promedio de partícula bastante grande y con un índice de polidispersidad alto, siendo estos 1242 nm y 0.872, respectivamente, por lo que podemos afirmar que nuestra muestra cuenta con la presencia de algunas partículas del rango de los micrómetros que afectan el resultado, sin embargo al analizar las gráficas, la distribución resulta ser buena.

Además, la muestra se comporta de manera estable, pues cuenta con un potencial Zeta de +43.19 mV, esto en un pH de 3, pero al ser llevado a un pH de 7 este se modifica a +5.63 mV, perdiendo así estabilidad y tendiendo a formar cúmulos de partículas, por lo que presentan una mayor estabilidad en su medio ácido que en un medio neutro, lo cual es propio de quitosano del cual se componen las NPs, pues este solo es soluble en medios ácidos.

Por otro lado, la muestra J3 arrojó un resultado similar, aunque con un tamaño un tanto más pequeño, como se observa en la Figura 14, A. Encontramos dos señales, la más intensa a los 342 nm, con un 29.2%, mientras que la segunda se encuentra a los 43.8 nm, con un 5.3%, teniendo así, de nueva cuenta, una mayor intensidad para las partículas más grandes.

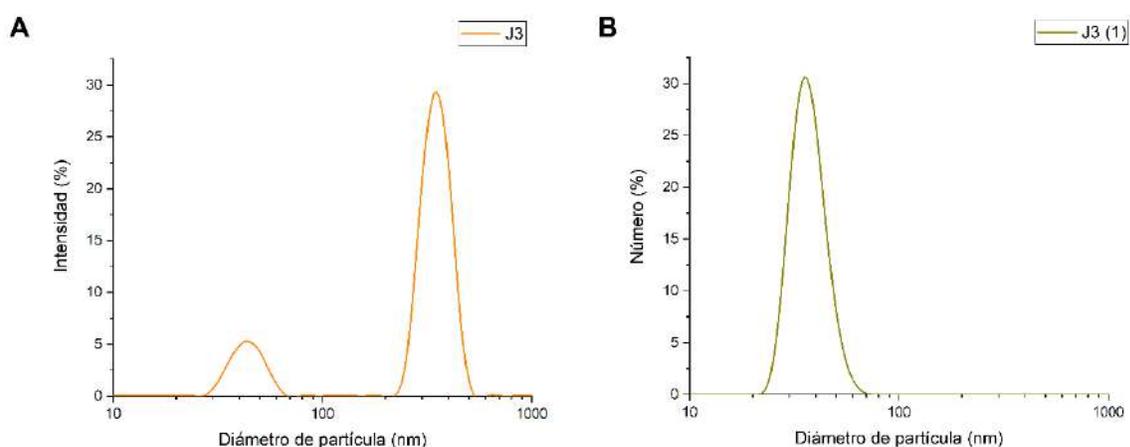


Figura 14. Distribución de tamaño de partícula, obtenida por DLS, para la muestra J3, A) por intensidad, B) por número.

Sin embargo, al analizar la distribución por número de partículas (Figura 14, B), sucede lo mismo que para la muestra anterior, la señales se invierten, y en este caso la señal de las partículas grandes llega incluso a desaparecer, lo cual puede significar que, en cuanto a número de partículas, las del rango de los 350 nm representan muy poco para el total de la distribución. Pero la señal que si se mantiene es la de las NPs, en este caso, por debajo de los 100 nm, más específicamente a los 37.84 nm, con un 29.4% de las partículas, lo cual es un tamaño bastante bueno, lamentablemente, a estos tamaños es un poco más complicado que las NPs presenten una buena estabilidad.

Lo anterior se comprobó con el ensayo de potencial Zeta, pues la muestra presenta solo +18.73 mV a un pH de 3, siendo menos de la mitad que la muestra J2, mientras que, a un pH de 7, el potencial Zeta es de +4.83 mV, por lo que, en este caso, incluso a un pH ácido, la muestra no presentará muy buena estabilidad, tendiendo a la formación de agregados, lo cual pudiera llegar a afectar a sus propiedades.

En este caso, de nueva cuenta, el programa nos arrojó el mensaje de la presencia de partículas grandes en la muestra, las cuales, al no observarse en las gráficas de distribución, es muy probable que se deban a restos de quitosano, contaminación de la muestra o incluso la presencia de algunos cúmulos de partículas, por lo que el tamaño promedio que arrojó el programa fue de 1126 nm y el índice de polidispersidad de 0.799.

5.1.2 Espectroscopía infrarroja (FTIR)

Se realizó el análisis por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier para las distintas muestras de NPs obtenidas, así como para el quitosano de bajo peso molecular y el tripolifosfato de sodio (TPP), los cuales representan los blancos en la síntesis.

Para el caso del quitosano (Figura 15, A), podemos observar las señales características del mismo, en 3359 y 3288 cm^{-1} encontramos las señales propias de los estiramientos simétrico del $-\text{NH}_2$ y asimétrico del $-\text{OH}$; entre 2917 y 2869 cm^{-1} observamos las señales propias del estiramiento de los grupos amida del quitosano, así como en 1652 y 1557 cm^{-1} observamos las vibraciones de los grupos $\text{C}=\text{O}$ de la amida I y $\text{N}-\text{H}$ de la amina I respectivamente; en

1373 cm^{-1} se observa la señal del estiramiento simétrico de los grupos CH_3 y la amida III; en 1058 y 1025 cm^{-1} tenemos la presencia del estiramiento de los enlaces C-O-C y finalmente tenemos la señal característica del enlace glucosídico en las amidas en 894 cm^{-1} , lo cual corresponde con lo que se encuentra reportado en la literatura (Bangun et al., 2018).

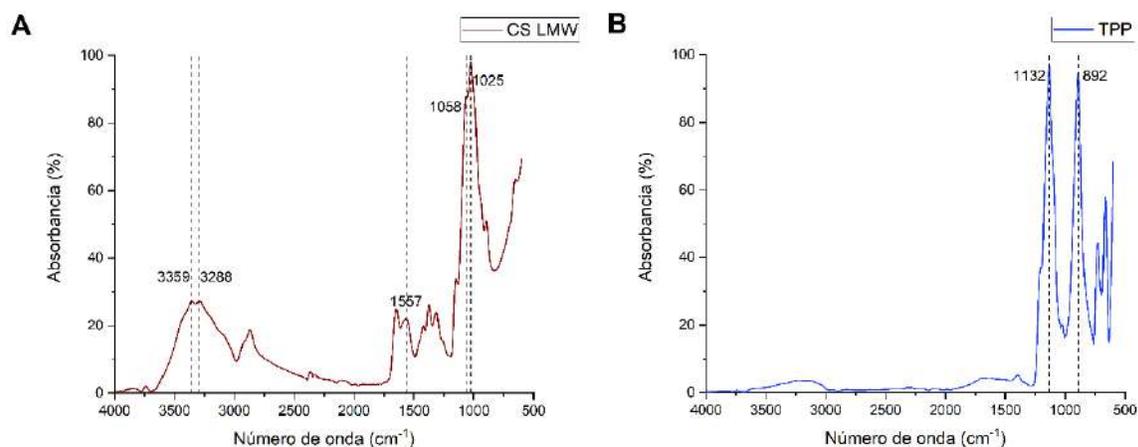


Figura 15. Espectro FTIR obtenido de A) quitosano de bajo peso molecular y B) TPP.

En el caso del TPP (Figura 15, B), las señales que más nos interesan para este caso se encuentran en 1132 y 892 cm^{-1} , las cuales son propias del estiramiento de los enlaces P=O y P-O respectivamente (Bangun et al., 2018), estas señales nos serán de mucha ayuda al revisar la interacción entre el quitosano y el TPP, pues observar estas señales nos podría indicar la presencia del mismo en las NPs.

En cuanto a las NPs, aunque se analizaron las seis muestras obtenidas, se discuten únicamente las dos que fueron seleccionadas (J2 y J3), los espectros FTIR correspondientes a dichas muestras se observan en la Figura 16 (mientras que los espectros del resto de formulaciones se pueden encontrar en el Anexo 3). En ellos podemos apreciar ciertas señales propias del quitosano, sin embargo, en la zona de los 3250 cm^{-1} se observa un ensanchamiento de la señal, así como un aumento en la absorbancia, lo cual puede deberse al aumento de la presencia de enlaces de hidrógeno (entre los grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$) en la estructura de nuestras NPs (Bangun et al., 2018); en el caso de algunas señales como la que se encuentra entre 1637 y 1640 cm^{-1} se observa un desplazamiento, el cual se puede deber a la presencia de los grupos fosfato del TPP, al igual que en la señal de 1538 cm^{-1} (propia de

los grupos amino) se observa también un corrimiento con respecto al quitosano puro, el cual puede ser debido a la interacción con los grupos -OH del TPP (de esta manera se entrecruzan las cadenas de quitosano), sin embargo, también puede ser debido a la protonación de la amina, dado que se tiene el quitosano en medio ácido, formándose así el ion $-NH_3^+$, el cual sería el que permitiría la formación de los mencionados enlaces de hidrogeno entre ambos reactivos (Gierszewska & Ostrowska-Czubenko, 2016); finalmente en 1149 y 889 cm^{-1} observamos las señales que corresponden al estiramiento de los enlaces P=O y P-O, respectivamente, las cuales, como se mencionó anteriormente, son propias del TPP y no se encuentra en la estructura del quitosano puro, por lo que podemos afirmar que tanto el TPP como el quitosano de bajo peso molecular se encuentran interactuando únicamente de manera física en la estructura de las NPs, pues solo existen pequeños corrimientos en las señales de cada uno de los compuestos, seña de que hay interacciones entre ellas pero no hay un enlace formal, definido, entre las estructuras.

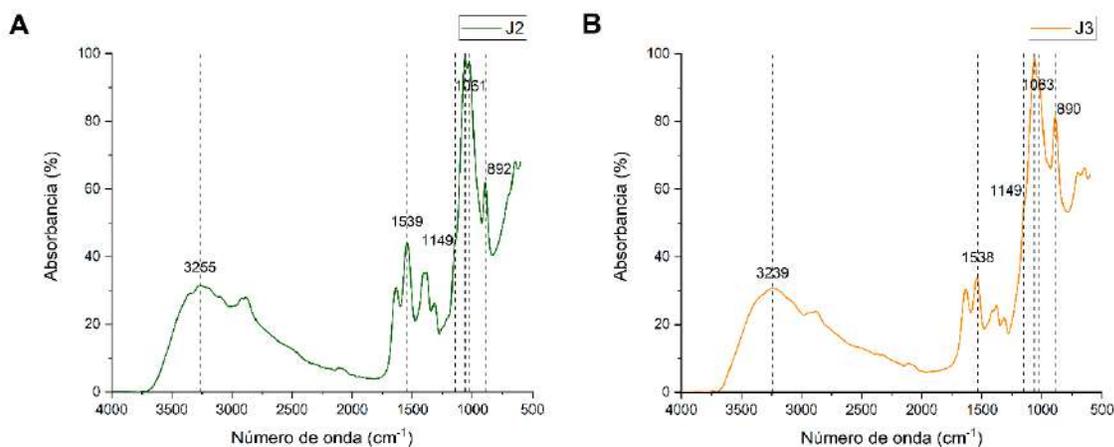


Figura 16. Espectro FTIR obtenido experimentalmente de A) NPs de quitosano J2 y B) NPs de quitosano J3.

Debido a que tanto las muestras J2 y J3 cuentan con NPs del tamaño deseado, además de que no se observaron diferencias considerables entre las interacciones de sus componentes, ambas representan una buena opción para ser cargadas con el fármaco, sin embargo, la estabilidad, representada por el potencial zeta, de cada uno de los sistemas es sumamente distinta, pues tenemos que la J2 está por encima de lo que se considera un sistema estable (30 mV), con +43.19 mV, mientras que la J3 se encuentra por debajo de

dicho valor, con +18.73 mV, razón por la cual se optó por utilizar la formulación J2 para la posterior carga con los activos antiepilépticos.

5.2 Nanopartículas cargadas con fármaco antiepiléptico

Inicialmente se propuso el uso de dos FAEs para el diseño de este sistema, la fenitoína y el ácido valproico, sin embargo, al realizar de manera experimental la carga de los fármacos en las NPs, se observó que para el pH en el que las NPs son más estables, la fenitoína formaba agregados, llegando a precipitar completamente, debido a que este fármaco no presenta buena solubilidad en medios ácidos. Por dicha razón se decidió trabajar únicamente con el ácido valproico, el cual, no presenta esos inconvenientes y puede ser cargado en el medio ácido de las NPs sin mayores complicaciones. Además, la concentración de la solución del fármaco utilizada fue de 2 mg/mL, esto debido a que se realizaron los cálculos para aproximar los grupos funcionales disponibles en las NPs para la unión, por lo que se optó porque hubiera un poco de exceso del fármaco, para que así, no fuera este el que limitara la carga sobre las NPs.

5.2.1 Tamaño de partícula y potencial Z

Para nuestro sistema formado por las NPs de quitosano y ácido valproico se obtuvo la distribución de tamaño de partícula para la muestra J2-AV, la cual se muestra en la Figura 17.

Como se observa en la parte A, la distribución tiene una forma gaussiana, la cual presenta un máximo en los 295 nm, con un 17.8%, para este caso, el tamaño promedio que arrojó el programa es de 300.3 nm, con un índice de polidispersidad de 0.402.

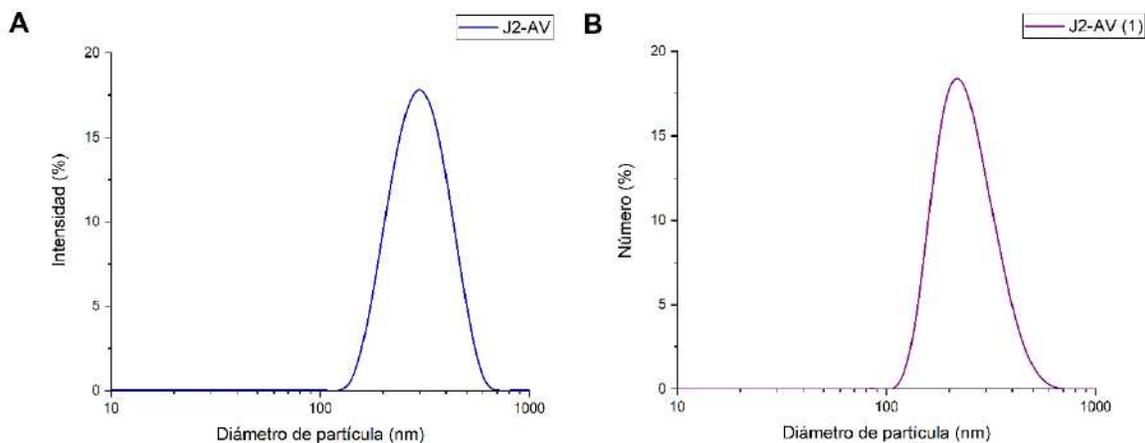


Figura 17. Distribución de tamaño de partícula, obtenida por DLS, para la muestra J2 con ácido valproico, A) por intensidad, B) por número.

Sin embargo, al observar la parte B o la distribución por número de partículas, se observa un pequeño corrimiento del valor máximo a 220 nm, con el 18.4%. En este caso solo vemos una señal, por lo que es un poco más homogénea la distribución, aunque la variedad de tamaños está entre 150 y 500 nm y probablemente se deba a la cantidad de fármaco que se adhiere a la nanopartícula o al tamaño original de la partícula, pero la mayor parte se encuentra cerca de los 220 nm, lo cual significa que el fármaco le está agregando cerca de 100 nm a las NPs en promedio, aunque de igual manera parece dar más estabilidad al sistema, evitando la presencia de aglomerados más grandes.

Para este caso, el potencial zeta se mantiene congruente con aquel obtenido para las NPs desnudas, incrementando incluso un poco, quedando en +46.7 mV, comprobando así la estabilidad del sistema, al menos en su medio original.

5.2.1 Espectroscopía infrarroja (FTIR)

Se realizó el análisis por FTIR del ácido valproico, además del sistema que se compone por las NPs de quitosano cargadas con dicho fármaco.

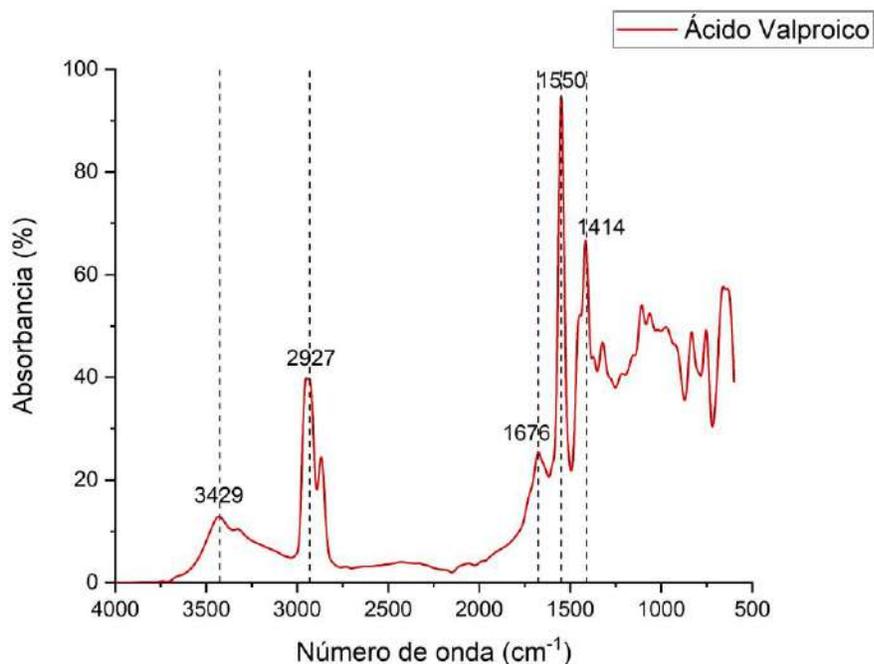


Figura 18. Espectro FTIR obtenido experimentalmente del ácido valproico.

En el caso del ácido valproico o valproato de sodio se pudo obtener el espectro infrarrojo que se muestra en la Figura 18, en el cual se pueden apreciar las señales características del mismo, la señal encontrada en 3429 cm^{-1} es probable que se deba a la presencia de agua en la muestra, pero también puede deberse a las vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H del ácido carboxílico, las señales encontradas en 2927 y 2867 cm^{-1} corresponden al estiramiento de las cadenas alifáticas de C-H, es muy probable que la señal de 1676 cm^{-1} se deba a las vibraciones del enlace C=O, sin embargo, se observa un poco de corrimiento en comparación con lo reportado en la literatura, mientras que las señales encontradas en 1550 , 1452 y 1414 cm^{-1} se atribuyen a los estiramientos simétrico y asimétrico de los grupos -COO, finalmente la señal de 1107 cm^{-1} se puede atribuir a las flexiones de los enlaces O-H presentes en la estructura, todo esto corresponde con lo reportado por Alsarra y col. (Alsarra et al., 2005), tanto para el ácido valproico como para el valproato de sodio.

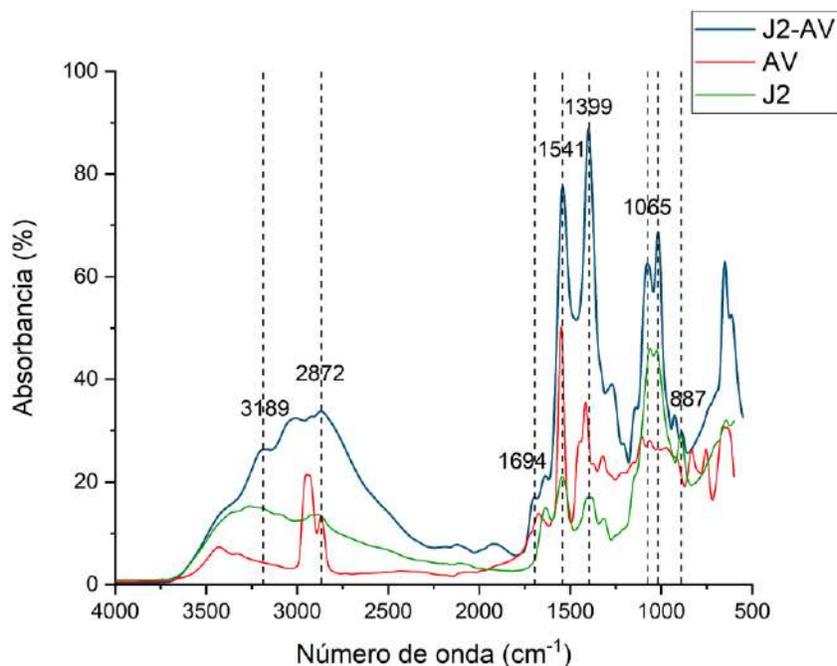


Figura 19. Espectro FTIR obtenido experimentalmente de las NPs de quitosano cargadas con ácido valproico, incluyendo los blancos correspondientes.

Mientras tanto, para las NPs de quitosano con el fármaco cargado (J2-AV) se obtuvo el espectro que podemos observar en la Figura 19, en el cual encontramos, primero, una señal muy ancha y con alta absorbancia en la zona de los -OH y -NH₂, esta puede ser debida a la presencia de agua en la muestra, aunque ésta se trató de secar completamente puede que existan remanentes, sin embargo, como ya lo hemos mencionado antes, en esta zona podemos ver la presencia de enlaces de hidrógeno, y ver una señal más intensa con respecto a aquella de las NPs desnudas nos podría indicar que se están dando interacciones de esta naturaleza entre el fármaco y las NPs, como se piensa que sucede. También encontramos las señales propias de cada componente, observamos pequeñas señales entre 1650 y 1620 cm⁻¹ las cuales corresponden a las que podemos encontrar en las NPs y el ácido valproico por separado, observamos una banda muy intensa en 1541 cm⁻¹ la cual corresponde a las señales tanto de las NPs como del ácido valproico y como no existe un gran corrimiento, podemos decir que la alta intensidad se debe a la presencia tanto de los enlaces N-H en la estructura de las NPs como de los grupos -COO del fármaco; de igual manera sucede con la señal de 1399 cm⁻¹ pues ambos componentes presentan señales en

esta zona, siendo mucho más intensa la del ácido valproico que corresponde también a las vibraciones C-O, finalmente tenemos las señales en 1076, 1017 y 887 cm^{-1} que encontramos en las NPs desnudas, las cuales se presentan sin corrimientos importantes.

De nueva cuenta, la presencia de dichas señales nos confirma que el fármaco se encuentra interactuando únicamente de manera física, por medio de interacciones electrostáticas e intermoleculares, probablemente enlaces de hidrogeno, con las NPs, pues no encontramos la presencia de nuevas señales que nos indiquen una interacción química entre el ácido valproico y las NPs de quitosano.

5.2.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se analizó la morfología de las NPs cargadas con ácido valproico por medio del uso del microscopio electrónico de barrido (SEM), a partir del cual fue obtenida la imagen que se observa en la Figura 20, en la que se puede apreciar una forma cuasiesférica en las partículas, además de cierta homogeneidad en cuanto a la distribución de tamaños.

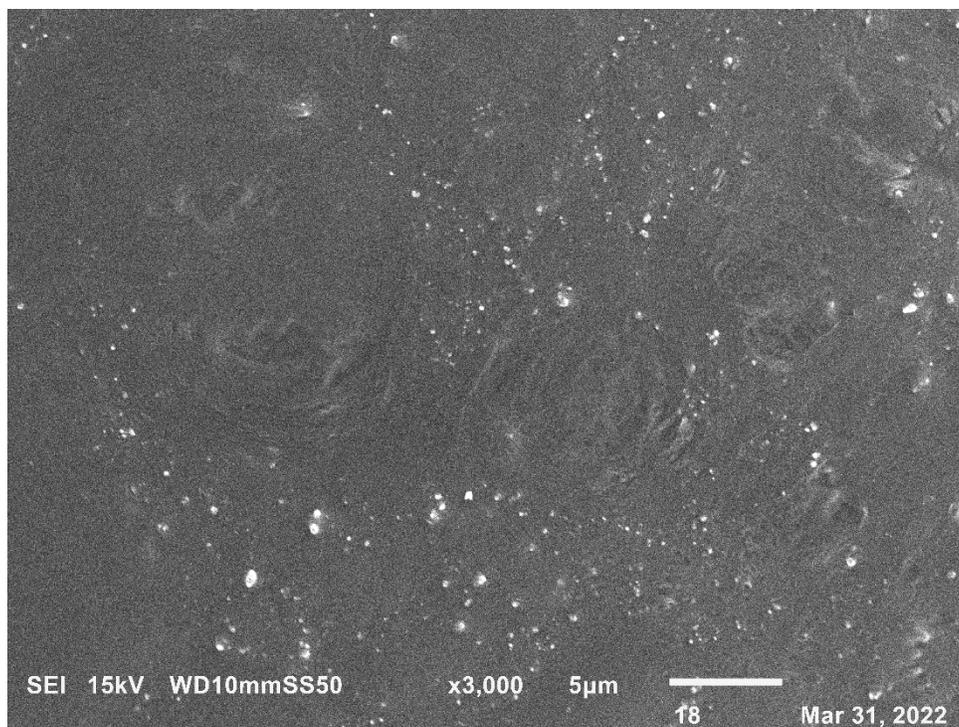


Figura 20. Micrografía de las NPs de quitosano cargadas con ácido valproico obtenida por SEM.

Mediante el uso del software Image J se analizó la imagen para determinar el tamaño de las partículas, se midió el diámetro de un total de 86 partículas, con tamaños rondando entre los 100 y los 500 nm, siendo mayoría las cercanas a 200 nm, obteniendo así un promedio de 189 ± 89 nm, lo cual concuerda muy bien con lo obtenido mediante DLS, por el cual se obtuvo un promedio de 300 nm, pero que mostraba tener la mayoría de las partículas cercanas a 220 nm. Además, se observan con una buena separación entre partículas, sin formar aglomerados, lo cual nos puede dar indicios de su estabilidad.

Por alguna razón la muestra de NPs sin el fármaco no se logró observar al microscopio, pero al obtener para este caso los tamaños mencionados, podemos casi asegurar que para el caso de las NPs desnudas este es más pequeño, con una morfología similar a estas.

5.2.4 Eficiencia de carga

Para la determinación de la eficiencia de carga de fármaco en el sistema, primero se prepararon soluciones con concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 1.5 y 2 mg/mL de ácido valproico en el solvente que contienen nuestras NPs, de manera que se encontrara en las mismas condiciones que el fármaco remanente, con dichas soluciones, se obtuvo curva de calibración para la absorbancia a 195 nm, la ecuación de la recta con la que se ajustaron los puntos tiene una r^2 de 0.989.

Posteriormente se tomaron las muestras del medio sobrenadante de nuestras NPs, en donde se encuentra el fármaco no cargado, y se midió su absorbancia, en este caso la absorbancia fue menor, como era de esperarse, se realizó la medición por triplicado y se tomó el valor promedio para realizar el cálculo, obteniendo así un total de 6.042 mg de ácido valproico en el sobrenadante, en comparación con los 15 mg que fueron añadidos en la síntesis, por lo que al aplicar la fórmula de Saha y col. (Saha et al., 2010) se obtuvo una eficiencia del $59.72\% \pm 0.96$.

$$\%EE = \frac{15 \text{ mg} - 6.042 \text{ mg}}{15 \text{ mg}} * 100 = 59.72\%$$

La cual, si bien no es excelente, puede considerarse buena, pues con ésta tenemos un aproximado de 250 μg de ácido valproico por cada mg de NPs, es decir, una cuarta parte.

5.3 Perfil de liberación del sistema

Finalmente, se realizó la evaluación del sistema por medio de la obtención de su perfil de liberación in-vitro, el cual se puede encontrar en la Figura 21, en este se puede observar que el experimento se realizó por triplicado para la misma formulación y por un tiempo total de 24 h.

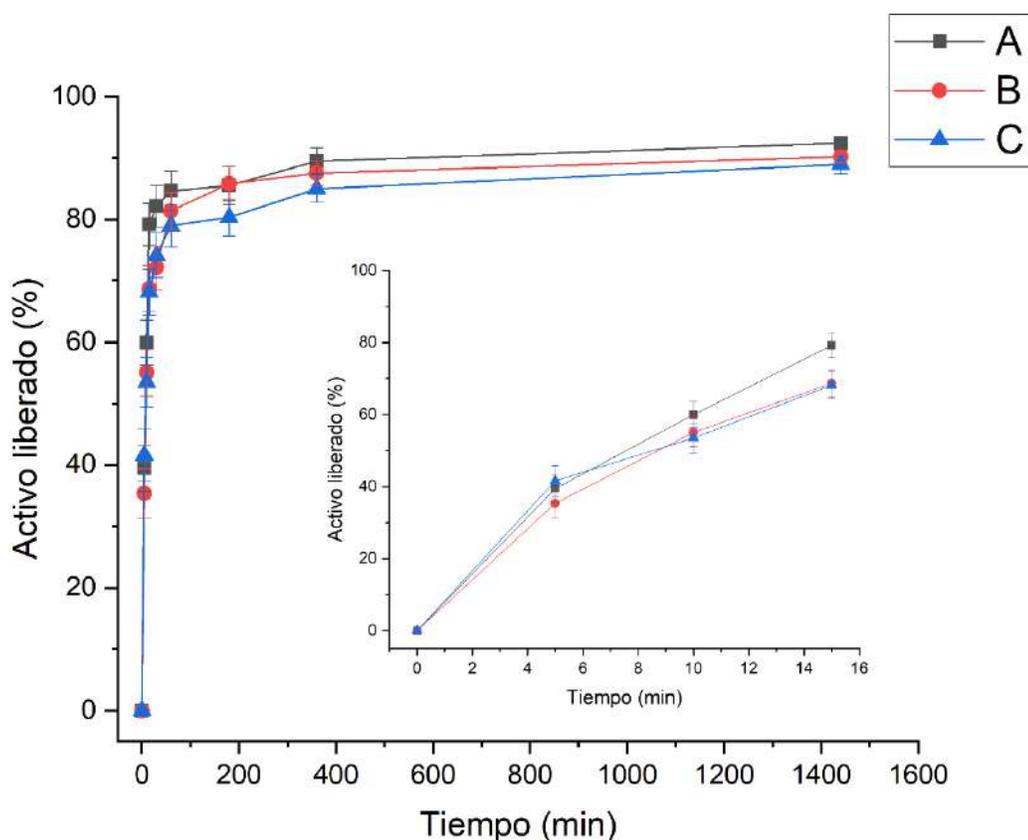


Figura 21. Perfil de liberación del sistema formado por nanopartículas de quitosano y ácido valproico, realizado a 24h y por triplicado.

Se observa como el comportamiento es muy similar en los tres casos, lo cual, valida el experimento, además, se puede observar una liberación rápida de cerca del 70% en los primeros 15 min, presentando un incremento prácticamente lineal, a partir de ese

momento la liberación se ralentiza, llegando a liberar de manera lenta y sostenida solo cerca de un 20% adicional hasta las 24 h, resultando en un 90.53% del activo liberado tras todo el experimento.

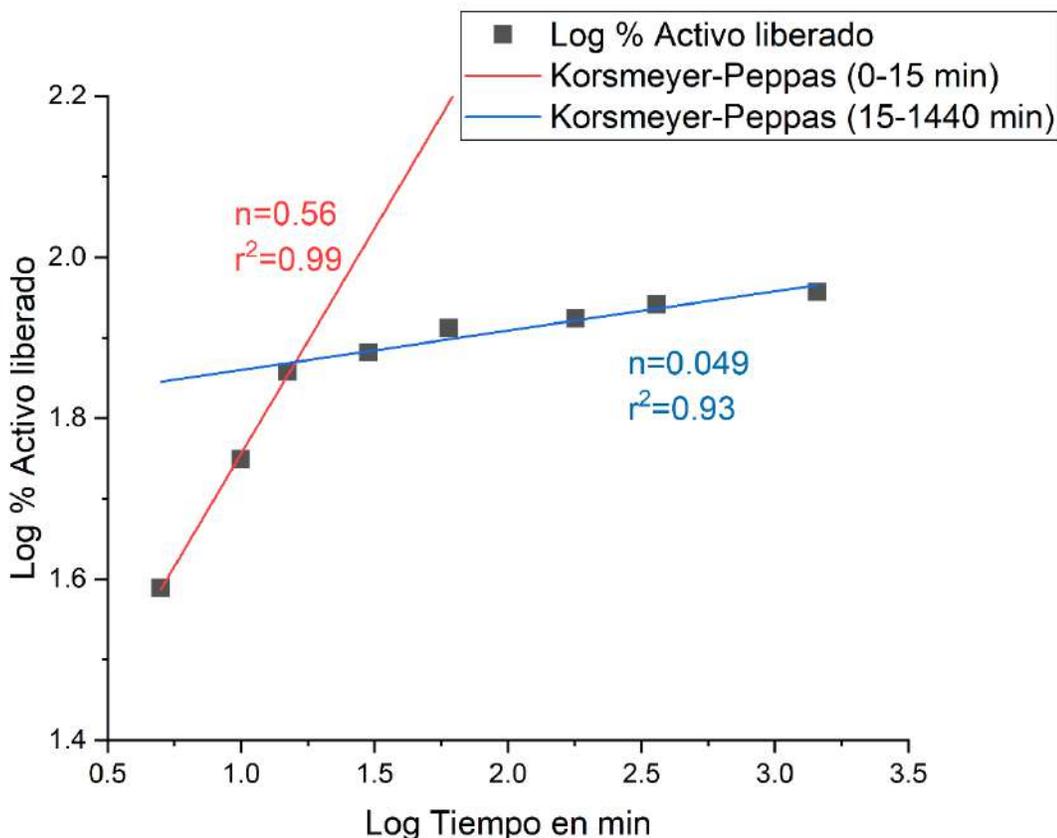


Figura 22. Ajuste del perfil de liberación del activo mediante el modelo de Korsmeier-Peppas.

Posteriormente se trató de determinar la cinética de liberación que sigue el sistema, ajustando la curva obtenida a diferentes modelos propuestos en la literatura, sin embargo, para el que se obtuvo un mejor resultado (considerando la r^2 de la recta obtenida) fue mediante el modelo de Korsmeier-Peppas (Figura 22). Sin embargo, para dicho modelo, se observan claramente dos pendientes diferentes, la primera para el proceso que se lleva a cabo en los primeros 15 min, en donde tiene lugar una liberación rápida, para la cual se obtuvo un exponente de liberación (n) de 0.56, con una r^2 de 0.99, lo cual nos indicaría la presencia de fenómenos de transporte no fickiano o anómalo (Anexo 4) (Paarakh et al., 2019); mientras que, para la segunda, que tiene lugar de los 15 minutos en adelante, se

obtuvo un exponente de liberación mucho menor, siendo de 0.049, en este caso con una r^2 de 0.93, en este caso la n está por debajo de 0.5, por lo que estaríamos hablando de un proceso de difusión cuasi fickiano (Anexo 4), el cual se daría por medio de difusión del fármaco a través de la matriz (Paarakh et al., 2019).

Al analizar un poco, la primera etapa de la liberación en la cual se libera cerca del 70% en un periodo muy corto de tiempo, podría ser causada por la liberación del fármaco que se encuentra unido más superficialmente a las NPs, siendo más sencilla la desorción de las moléculas cuando se encuentra en el medio, mientras que el resto de la liberación, la cual se da de manera lenta y sostenida, podría estar dada por las moléculas del activo que se han unido, aunque aún en la superficie, de manera más interna a las nanopartículas, dificultando un poco más su liberación, haciendo que esta sea mucho más lenta.

Capítulo 6

Conclusiones y perspectivas

6.1 Conclusiones

Cabe mencionar que debido a que este proyecto se vio afectado por la pandemia, en cuanto a la limitación en el acceso a algunas técnicas y equipos, se tuvieron que buscar alternativas, sobre todo al inicio, de manera que se pudiera avanzar al menos poco a poco.

Se lograron sintetizar NPs de quitosano por medio del método de gelación iónica, las cuales se caracterizaron por medio de la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) y se encontró que dichas NPs presentan tamaños de 106 y 669 nm, de las cuales las más pequeñas predominan en cantidad, lo cual es muy importante a la hora de usar NPs en el SNC, con un potencial zeta de +43.19 mV, lo cual nos indica que son estables, al menos en medio ácido.

Con ayuda de los resultados obtenidos por FTIR podemos concluir que los compuestos se encuentran interactuando de manera intermolecular, por medio de interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno, sobre todo entre los grupos amino del quitosano con los hidroxilos de los fosfatos presentes en el TPP, esto tiene relación con el potencial zeta obtenido en las muestras, pues esto nos indica que existen cargas positivas en la superficie de las NPs, las cuales muy probablemente sean debidas a los grupos NH_3^+ , que se dan gracias al medio ácido de la síntesis, lo cual permite la interacción electrostática mencionada anteriormente.

De igual manera, se logró realizar la carga del fármaco sobre la superficie de nuestras NPs, aunque únicamente para uno de los dos activos propuestos (ácido valproico), pues en el caso de la fenitoína, se encontró que precipitaba al ser añadida al medio ácido de las NPs, por lo que, al menos, por la metodología utilizada, no fue posible cargarla; la unión ácido valproico-NPs fue corroborada por medio de FTIR, encontrando que las moléculas del fármaco solo interactúan por medio de interacciones intermoleculares, como enlaces de

hidrógeno, con los grupos funcionales presentes en la superficie de las NPs; para el sistema completo se obtuvo un tamaño promedio de 300 nm, con un potencial zeta de +46.7 mV, lo cual nos indica la estabilidad del mismo, mientras que las micrografías obtenidas por SEM nos muestran una morfología cuasiesférica y una distribución homogénea, la eficiencia de carga obtenida para el sistema fue de $59.72\% \pm 0.96$, la cual, si bien no es excelente, resulta suficientemente buena para tener 250 μg del fármaco por mg de NPs.

El perfil de liberación del fármaco nos indicó que la liberación se lleva a cabo en dos etapas, aparentemente regidas por fenómenos distintos, teniendo una primera con una liberación muy rápida en un corto periodo de tiempo, de alrededor del 70%, mientras que, en la segunda, la cual inicia tras 15 minutos, se libera el fármaco de manera lenta y sostenida, llegando a un total del 90.56% de activo liberado tras 24 h, esto permitiría que al menos ese 20% sea liberado directamente en la zona deseada y potencialmente reducir las dosis necesarias, limitando un poco los efectos adversos.

Finalmente, el sistema cumple con la carga del fármaco y su respectiva liberación, además, muestra buenas propiedades fisicoquímicas, en cuanto a tamaño y estabilidad, por lo que podemos decir que en este caso la hipótesis se cumple, aunque hacen falta muchas pruebas más para determinar su posible aplicación.

6.2 Perspectivas

- Evaluar el uso de ultrasonido a diferentes tiempos en la síntesis de las NPs con el fin de homogeneizar el tamaño obtenido.
- Evaluar la posibilidad de obtener NPs de quitosano estables en medio fisiológico por otros métodos.
- Evaluar el perfil de carga del fármaco para determinar si es posible cargar mayor cantidad a diferentes concentraciones.
- Evaluar la encapsulación del fármaco en el interior de las NPs en lugar de en la superficie.
- Evaluar la bioseguridad del sistema en tiempos cortos y prolongados, sobre todo en células relacionadas a su aplicación.

Referencias

- Ahn, T., Kim, J. H., Yang, H. M., Lee, J. W., & Kim, J. D. (2012). Formation pathways of magnetite nanoparticles by coprecipitation method. *Journal of Physical Chemistry C*, *116*(10), 6069–6076. <https://doi.org/10.1021/jp211843g>
- Alsarra, I. A., Al-Omar, M., & Belal, F. (2005). Valproic Acid and Sodium Valproate: Comprehensive Profile. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, *32*(December), 209–240. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(05\)32008-9](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(05)32008-9)
- Bangun, H., Tandiono, S., & Arianto, A. (2018). Preparation and evaluation of chitosan-tripolyphosphate nanoparticles suspension as an antibacterial agent. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *8*(12), 147–156. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.81217>
- Bao, Y., Yin, M., Hu, X., Zhuang, X., Sun, Y., Guo, Y., Tan, S., & Zhang, Z. (2016). A safe, simple and efficient doxorubicin prodrug hybrid micelle for overcoming tumor multidrug resistance and targeting delivery. *Journal of Controlled Release*, *235*, 182–194. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.003>
- Bennewitz, M. F., & Saltzman, W. M. (2009). Nanotechnology for Delivery of Drugs to the Brain for Epilepsy. *Neurotherapeutics*, *6*(2), 323–336. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2009.01.018>
- Bento, D., Staats, H. F., Gonçalves, T., & Borges, O. (2015). Development of a novel adjuvanted nasal vaccine: C48/80 associated with chitosan nanoparticles as a path to enhance mucosal immunity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *93*, 149–164. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.024>
- Bhushan, B. (2017). Introduction to nanotechnology. In *Springer Handbooks* (pp. 1–19). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54357-3_1

- Bustamante, S. E. (2003). *Fármacos antiepilépticos y anticonvulsivantes 2003-Reservados todos los derechos Permitido el uso sin fines comerciales*.
<https://www.biblioteca.org.ar/libros/8871.pdf>
- Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997).
Calvo1997_Article_ChitosanAndChitosanEthyleneOxi.pdf (pp. 1431–1463).
- Calzoni, E., Cesaretti, A., Polchi, A., Di Michele, A., Tancini, B., & Emiliani, C. (2019).
Biocompatible polymer nanoparticles for drug delivery applications in cancer and neurodegenerative disorder therapies. *Journal of Functional Biomaterials*, *10*(1).
<https://doi.org/10.3390/jfb10010004>
- Carmona, E. R., Plaza, T., Recio-Sánchez, G., & Parodi, J. (2018). Generation of a protocol for the synthesis of chitosan nanoparticles loaded with florfenicol through the ionic gelation method. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *29*(4), 1195–1202.
<https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15203>
- Caro-León, F. J., López-Martínez, L. M., Lizardi-Mendoza, J., Argüelles-Monal, W., Goycoolea-Valencia, F. M., Carvajal-Millán, E., López-Franco, Y. L., & para correspondencia, A. (2019). Preparation methods of chitosan nanoparticles: a review. *Revista de Ciencias Biológicas y de La Salud*, *XXI*, 13–25. <http://biotecnia.unison.mx>
- Craig, S. (2005). Phenytoin poisoning. *Neurocritical Care* 2005 3:2, *3*(2), 161–170.
<https://doi.org/10.1385/NCC:3:2:161>
- De Giorgio, C. M., & Krahl, S. E. (2013). Neurostimulation for drug-resistant epilepsy. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology*, *19*(3), 743–755.
<https://doi.org/10.1212/01.CON.0000431397.61970.2b>
- Divulgación de la Ciencia, U. (2018). *Epilepsia y su complejo tratamiento | Fundación UNAM*. <https://www.fundacionunam.org.mx/unam-al-dia/epilepsia-y-su-complejo-tratamiento/>
- Engel, J. (1996). Surgery for Seizures. *New England Journal of Medicine*, *334*(10), 647–653.

<https://doi.org/10.1056/nejm199603073341008>

- Gan, Q., & Wang, T. (2007). Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 59(1), 24–34.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.04.009>
- Gangurde, P. K., Ajitkumar B, N., & Kumar, L. (2019). Lamotrigine Lipid Nanoparticles for Effective Treatment of Epilepsy: a Focus on Brain Targeting via Nasal Route. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 14(2), 91–111. <https://doi.org/10.1007/s12247-018-9343-z>
- Gierszewska, M., & Ostrowska-Czubenko, J. (2016). Chitosan-based membranes with different ionic crosslinking density for pharmaceutical and industrial applications. *Carbohydrate Polymers*, 153, 501–511.
<https://doi.org/10.1016/j.CARBPOL.2016.07.126>
- Gosselet, F., Loiola, R. A., Roig, A., Rosell, A., & Culot, M. (2021). Central nervous system delivery of molecules across the blood-brain barrier. *Neurochemistry International*, 144, 104952. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104952>
- Hassani, S., Laouini, A., Fessi, H., & Charcosset, C. (2015). Preparation of chitosan-TPP nanoparticles using microengineered membranes - Effect of parameters and encapsulation of tacrine. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 482, 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.04.006>
- Henry, T. R., Bakay, R. A. E., Pennell, P. B., Epstein, C. M., & Votaw, J. R. (2004). Brain blood-flow alterations induced by therapeutic vagus nerve stimulation in partial epilepsy: II. Prolonged effects at high and low levels of stimulation. *Epilepsia*, 45(9), 1064–1070. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2004.03104.x>
- Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Hauser, W. A., Mathern, G., Moshé, S. L., Perucca, E., Wiebe, S., & French, J. (2010). Definition of drug resistant epilepsy: Consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic

Strategies. *Epilepsia*, 51(6), 1069–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x>

Kwan, P., Schachter, S. C., & Brodie, M. J. (2011). *Drug-Resistant Epilepsy*. 919–926.

Le, J. (2020, October). *Administración de los fármacos - Fármacos o sustancias - Manual MSD versión para público general*. <https://www.msmanuals.com/es-mx/hogar/fármacos-o-sustancias/administración-y-cinética-de-los-fármacos/administración-de-los-fármacos>

Lockman, P. R., Mumper, R. J., Khan, M. A., & Allen, D. D. (2002). Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(1), 1–13. <https://doi.org/10.1081/DDC-120001481>

MacKay, J. A., Deen, D. F., & Szoka, F. C. (2005). Distribution in brain of liposomes after convection enhanced delivery; Modulation by particle charge, particle diameter, and presence of steric coating. *Brain Research*, 1035(2), 139–153. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.12.007>

Markowitz, G. J., Kadam, S. D., Boothe, D. M., Irving, N. D., & Comi, A. M. (2010). The pharmacokinetics of commonly used antiepileptic drugs in immature CD1 mice. *NeuroReport*, 21(6), 452–456. <https://doi.org/10.1097/WNR.0B013E328338BA18>

Martos-Silván, C. (2020). *Barrera hematoencefálica: estructura, funciones, enfermedades*. <https://www.lifeder.com/barrera-hematoencefalica/>

Meca Lallana, V., & Mora, J. V. (2009). *Fármacos antiepilépticos Puntos clave*.

Mulholland, E. J., Ali, A., Robson, T., Dunne, N. J., & McCarthy, H. O. (2019). Delivery of RALA/siFKBPL nanoparticles via electrospun bilayer nanofibres: An innovative angiogenic therapy for wound repair. *Journal of Controlled Release*, 316, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.10.050>

Musumeci, T., Bonaccorso, A., & Puglisi, G. (2019). Epilepsy disease and nose-to-brain delivery of polymeric nanoparticles: An overview. *Pharmaceutics*, 11(3).

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030118>

Nanotechnology, N. (2016). *What Is Nanotechnology?* | *nano.gov*.

<https://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>

Naqvi, S., Panghal, A., & Flora, S. J. S. (2020). Nanotechnology: A Promising Approach for Delivery of Neuroprotective Drugs. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00494>

Ngugi, A. K., Bottomley, C., Kleinschmidt, I., Wagner, R. G., Kakooza-Mwesige, A., Aengibise, K., Owusu-Agyei, S., Masanja, H., Kamuyu, G., Odhiambo, R., Chengo, E., Sander, J. W., & Newton, C. R. (2013). Prevalence of active convulsive epilepsy in sub-Saharan Africa and associated risk factors: cross-sectional and case-control studies. *The Lancet. Neurology*, 12(3), 253. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70003-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70003-6)

Organización Mundial de la Salud. (2019, June 20). *Epilepsia*.

<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>

Paarakh, M. P., Jose, P. A. N. I., Setty, C. M., & Peter, G. V. (2019). Release Kinetics – Concepts and Applications. *International Journal of Pharmacy Research & Technology*, 8(1), 12–20. <https://doi.org/10.31838/ijprt/08.01.02>

Pardridge, W. M. (2005). The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*, 2(1), 3–14. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.3>

Rodríguez, C., Guevara, B., & Lobo, G. (2010). *Mecanismo de Acción de los Fármacos Antiepilépticos*. 12(6), 321.

Rojas-Aguirre, Y., Aguado-Castrejón, K., & González-Méndez, I. (2016). La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educacion Quimica*, 27(4), 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>

Rosillo-De La Torre, A., Zurita-Olvera, L., Orozco-Suárez, S., Garcia Casillas, P. E., Salgado-Ceballos, H., Luna-Bárceñas, G., & Rocha, L. (2015). Phenytoin carried by silica core

- iron oxide nanoparticles reduces the expression of pharmacoresistant seizures in rats. *Nanomedicine*, 10(24), 3563–3577. <https://doi.org/10.2217/nnm.15.173>
- Saha, P., Goyal, A. K., & Rath, G. (2010). Formulation and evaluation of chitosan-based ampicillin trihydrate nanoparticles. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9(5), 483–488. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v9i5.61061>
- Shringarpure, M., Gharat, S., Momin, M., & Omri, A. (2021). Management of epileptic disorders using nanotechnology-based strategies for nose-to-brain drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 18(2), 169–185. <https://doi.org/10.1080/17425247.2021.1823965>
- Stafstrom, C. E., & Carmant, L. (2015). Seizures and epilepsy: An overview for neuroscientists. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(5), 1–19. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022426>
- Sullivan, D. J., Cruz-Romero, M., Collins, T., Cummins, E., Kerry, J. P., & Morris, M. A. (2018). Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 83, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.05.010>
- Sztajnkrzyca, M. D. (2002). Valproic acid toxicity: Overview and management. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*, 40(6), 789–801. <https://doi.org/10.1081/CLT-120014645>
- The Leukemia & Lymphoma Society. (2011). *Methods to Administer Drugs | Leukemia and Lymphoma Society*. <https://www.lls.org/treatment/types-of-treatment/chemotherapy-and-other-drug-therapies/methods-to-administer-drugs>
- Türker, S., Onur, E., & Ózer, Y. (2004). Nasal route and drug delivery systems. *Pharmacy World and Science*, 26(3), 137–142. <https://doi.org/10.1023/B:PHAR.0000026823.82950.ff>
- Ventra, Massimiliano; Evoy, Stephane; Heflin, J. R. (2004). *Nanostructure science and technology - Introduction to nanoscale science and technology*. Kluwer Academic

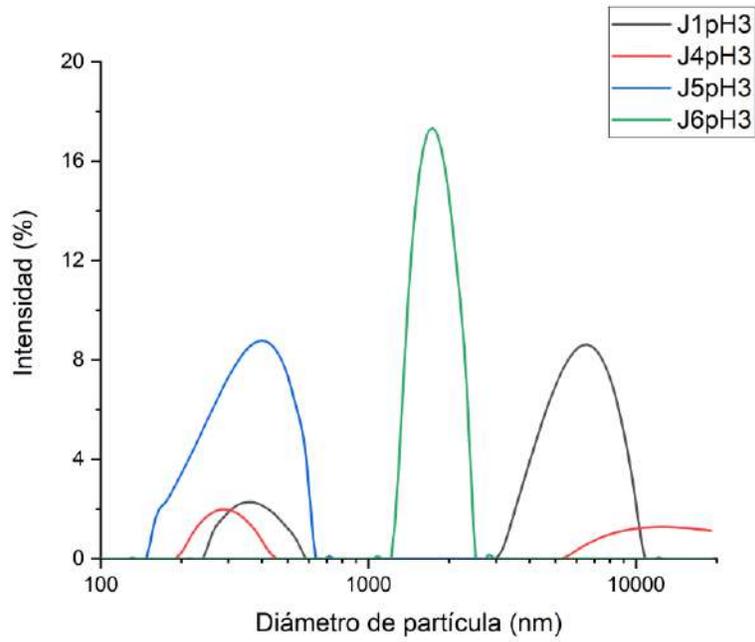
Publishers.

Voss, L. J. (2020). Relationship between artificial cerebrospinal fluid oxygenation, slice depth and tissue performance in submerged brain slice experiments. *Neuroscience Letters*, 736(May), 135275. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135275>

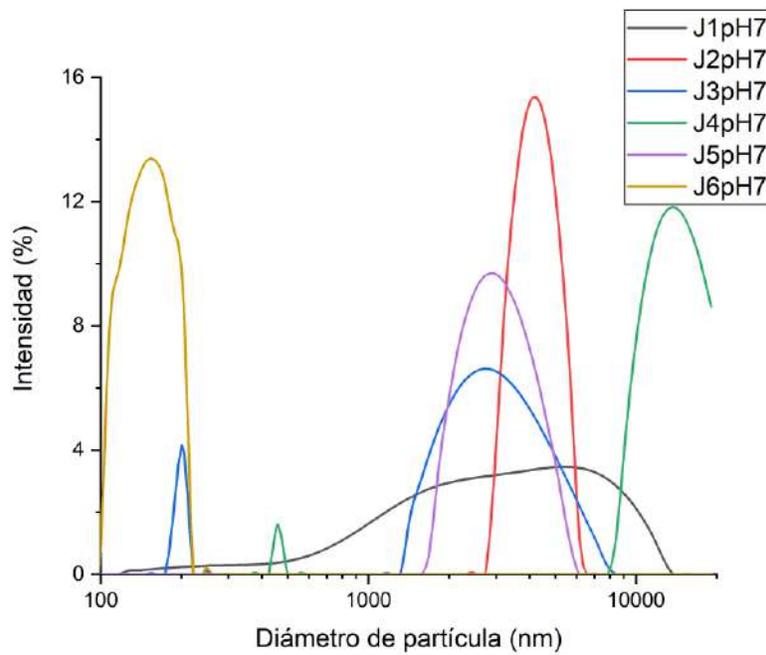
Wilson, B. (2009). Brain targeting PBCA nanoparticles and the blood–brain barrier. *Https://Doi.Org/10.2217/Nnm.09.29*, 4(5), 499–502.
<https://doi.org/10.2217/NNM.09.29>

Yu, S., Xu, X., Feng, J., Liu, M., & Hu, K. (2019). Chitosan and chitosan coating nanoparticles for the treatment of brain disease. *International Journal of Pharmaceutics*, 560(February), 282–293. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.012>

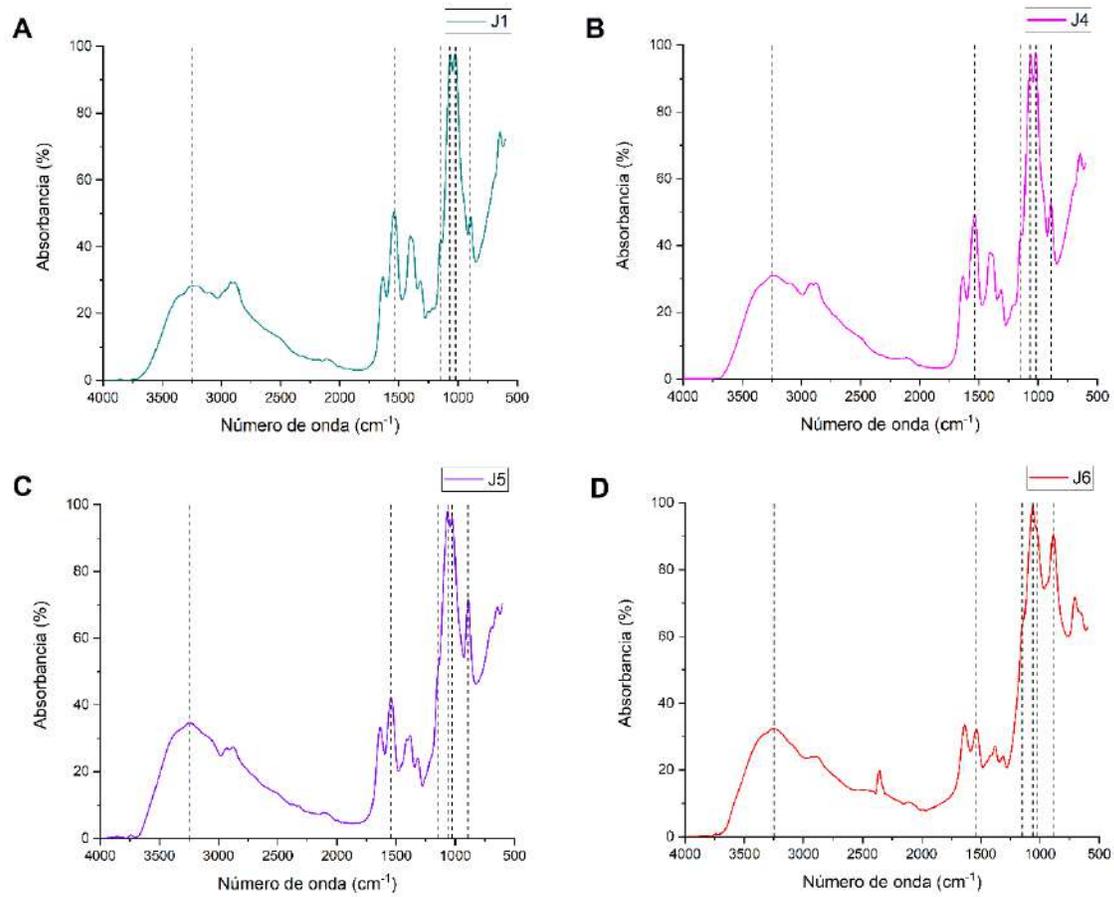
Anexos



Anexo 1. Distribución de tamaño de partícula para el resto de muestras de NPs de quitosano en medio ácido.



Anexo 2. Distribución de tamaño de partícula para las NPs de quitosano en medio neutro.



Anexo 3. Espectros FTIR del resto de las muestras de NPs de quitosano obtenidas A) J1, B) J4, C) J5 y D) J6.

Anexo 4. Tabla de tipos de mecanismos de liberación y transporte de fármacos según el modelo de Korsmeyer-Peppas (Tomada de (Paarakh et al., 2019)).

Exponente de Liberación (n)	Mecanismo de transporte del fármaco	Mecanismo de liberación
$n < 0.5$	Difusión cuasi-Fickiana	Difusión
0.5	Difusión Fickiana	
$0.5 < n < 1.0$	Anomalo (transporte no Fickiano)	Difusión y relajación (erosión)
1.0	Transporte Caso II	Liberación de orden cero
$n > 1.0$	Transporte super Caso II	(Relajación/erosión)