

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



CAMPUS GUANAJUATO  
DIVISION DE CIENCIA NATURALES Y EXACTAS  
POSGRADO EN QUÍMICA

**Nanopartículas magnéticas con recubrimientos  
poliméricos sensibles al pH para la liberación controlada  
de fármacos.**

TESIS  
Para obtener el título de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta:

I. Q. Fernando Enrique Espinola Portilla

Guanajuato, Gto., Julio de 2018

Por medio de la presente, me responsabilizo de la autenticidad y la originalidad del presente trabajo de investigación titulado:

**“Nanopartículas magnéticas con recubrimientos poliméricos sensibles al pH para la liberación controlada de fármacos”**

Director y Coasesores de tesis para obtener el título de Maestría en Ciencias  
Químicas presenta el I. Q. Fernando Enrique Espinola Portilla:

---

Dra. Silvia Gutiérrez Granados  
Director

---

Dr. Gonzalo Ramírez García  
Coasesor

---

Dr. Juan Manuel Peralta Hernández  
Coasesor

Guanajuato, Gto., Julio de 2018

Miembros del Jurado del Examen Profesional para obtener el título Maestría en  
Ciencias Químicas presenta el I. Q. Fernando Enrique Espinola Portilla:

---

Dr. Gustavo Cruz Jiménez  
Presidente

---

Dr. Oracio Serrano Torres  
Secretario

---

Dra. Sophie Griveau  
Vocal

---

Dr. Fethi Bedioui  
Suplente

Guanajuato, Gto., Julio de 2018

## **RESUMEN:**

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial provocando tan solo en 2015 8.8 millones de defunciones. Los métodos actuales para su tratamiento tienen efectos secundarios nocivos y limitaciones desagradables para los pacientes. En este trabajo de investigación se propone una nueva herramienta terapéutica basada en nanomateriales capaces de servir como transportadores sitio-dirigidos de principios activos anticancerígenos.

Se llevó a cabo la funcionalización de nanopartículas magnéticas (NPM) con polímeros sensibles al efecto del pH, aprovechando las diferencias de pHs entre tumores (pH ácido) y células sanas (pH fisiológico). Los polímeros que se probaron fueron, uno lineal (Poli-4-vinilpiridina), uno ramificado (poli(metacrilato de 3-trimetoxisilil propil)), así como la mezcla de ambos. Se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica de los nanomateriales obtenidos después de las distintas etapas de funcionalización por medio de microscopía electrónica (STEM y SEM), espectroscopía infrarrojo (IR), dispersión de luz dinámica (DLS) y electroforesis laser-doppler (LDE); observando tamaños adecuados (30-35 nm) de las NPM y comprobando la funcionalización de estas. Así mismo, se realizó mediante voltametría cíclica (V.C.) y voltametría de onda cuadrada (V.O.C) la caracterización electroquímica del fármaco modelo Doxorubicina (Dox) comprobando una buena cuantificación a los pHs de interés. Posteriormente se determinó mediante V.O.C. el atrapamiento de la Dox en los 3 tipos de nanomateriales, y finalmente se realizaron pruebas de liberación a distintos valores de pH (4, 6 y 7,4).

El atrapamiento de Dox en las NPM se dio de manera efectiva teniendo eficiencias de carga aceptables (20-40 %). Solo las NPM-3TTPM y NPM-P4VP' retuvieron el fármaco adecuadamente a pH fisiológico (7,4). Los 3 tipos de nanopartículas cumplieron su objetivo de liberación a valores de pH ácidos, determinándose a pH 4 una mayor concentración de Dox liberada. Por lo tanto, la utilización de estos nanomateriales resultaría en una buena alternativa para el tratamiento contra el cáncer.

## **AGRADECIMIENTOS:**

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I: Cáncer y su tratamiento mediante la liberación controlada de fármacos a través de nanomateriales.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN:.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 ANTECEDENTES: .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.1 El cáncer.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.2 Tratamientos actuales.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.3 Nanomateriales.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.4 Nanotransportadores de medicamentos: .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.5 Nanopartículas magnéticas.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1.5 Recubrimientos poliméricos inteligentes en NPM (gatekeepers): .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO: .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3 HIPÓTESIS:.....</b>	<b>14</b>
<b>1.4 OBJETIVOS: .....</b>	<b>14</b>
<b>1.4.2 Objetivo General: .....</b>	<b>14</b>
<b>1.4.2 Objetivos Específicos: .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5 REFERENCIAS CAPÍTULO I:.....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO II: Funcionalización y Caracterización de nanopartículas magnéticas con polímeros sensibles al pH.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 FUNCIONALIZACIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.1 Etapa 1: Hidroxilación (NPM-OH). .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2 Amino-Silanización (NPM-APTÉS). .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.3 Polimerización ramificada (NPM-3TMPPM).....</b>	<b>21</b>
<b>2.1.4 Polimerización Lineal (NPM-P4VP).....</b>	<b>22</b>
<b>2.1.5 Mezcla de los polímeros (NPM-P4VP').....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 CARACTERIZACIÓN. ....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.1 SEM-STEM: Morfología y tamaño de las nanopartículas.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.2 DLS: Tamaño Hidrodinámico .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.3 Efecto de concentración de polímero en DLS:.....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.4 FT-IR: Acoplamiento de grupos funcionales.....</b>	<b>33</b>
<b>2.2.5 Efecto de concentración de polímero en FT-IR: .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2.6 LDE: Potencial <math>\xi</math>.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2.7 Efecto de concentración de polímero en LDE: .....</b>	<b>39</b>

<b>2.3 CONCLUSIONES PARCIALES CAPÍTULO II.</b>	41
<b>2.4 REFERENCIAS CAPÍTULO II.</b>	43
<b>CAPÍTULO III: Estudio electroquímico de Doxorubicina.</b>	44
<b>3.1 DOXORUBICINA.</b>	45
<b>3.2 METODOLOGÍA.</b>	47
<b>3.2.1 Voltamperometría Cíclica.</b>	47
<b>3.2.2 Voltamperometría de Onda Cuadrada.</b>	48
<b>3.2.3 Cuantificación de Dox a distintos pHs.</b>	48
<b>3.3 RESULTADOS.</b>	49
<b>3.3.1 Voltamperometría Cíclica.</b>	49
<b>3.3.2 Voltametría de onda cuadrada.</b>	50
<b>3.3.3 Cuantificación de Dox a distintos pHs.</b>	52
<b>3.4 CONCLUSIONES PARCIALES CAPÍTULO III.</b>	55
<b>3.5 REFERENCIAS CAPÍTULO III.</b>	56
<b>CAPÍTULO IV: Estudio de captura y liberación de Doxorubicina en NPM funcionalizadas.</b>	58
<b>4.1 INSERCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN NP.</b>	59
<b>4.2 METODOLOGÍA.</b>	61
<b>4.2.1 Captura de Dox.</b>	61
<b>4.2.2 Liberación de Dox.</b>	62
<b>4.3 RESULTADOS.</b>	63
<b>4.3.1 Captura de Dox en NPM-3TMPM.</b>	63
<b>4.3.2 Captura de Dox en NPM-P4VP.</b>	66
<b>4.3.3 Captura de Dox en NPM-P4VP’.</b>	67
<b>4.3.4 Liberación de Dox para NPM cargadas.</b>	70
<b>4.3.7 Perfiles de liberación de Dox para NPM a los distintos pHs.</b>	79
<b>4.4 CONCLUSIONES PARCIALES CAPÍTULO IV.</b>	81
<b>CONCLUSIONES GENERALES.</b>	85

# **CAPÍTULO I: Cáncer y su tratamiento mediante la liberación controlada de fármacos a través de nanomateriales.**



## INTRODUCCIÓN:

El cáncer ha alcanzado proporciones pandémicas, mientras que los investigadores buscan curas a través de la sofisticación de la medicina moderna. El tipo más común de cáncer es el de pulmón, teniendo 1.61 millones de casos nuevos identificados en 2008. Juntos, el SIDA, la tuberculosis y la malaria matan menos personas cada año que los diferentes tipos de cáncer. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que tan solo en 2012 había 14,1 millones de nuevos pacientes con cáncer, 8,2 millones de muertes por cáncer y 32,6 millones de pacientes con cáncer en todo el mundo. Con base en estos números y las estadísticas de crecimiento, se predijo un aumento anual continuo en el número de nuevos pacientes con cáncer con una expectativa de 9 millones en 2015, y alrededor de 11,4 millones en 2030 [1].

Por otro lado, los métodos actuales para el tratamiento contra el cáncer tienen efectos secundarios nocivos y limitaciones como el riesgo que involucra tener una edad avanzada, debido al decaimiento de varios órganos y funciones del sistema corporal [2]. Esto provoca que el paciente con cáncer padezca durante el tratamiento.

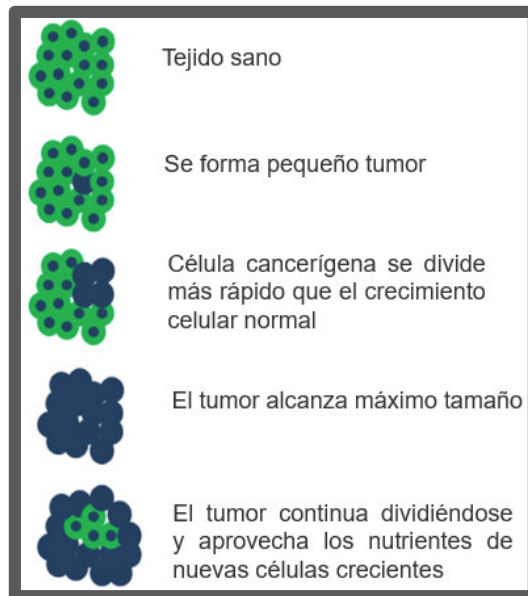
Para superar los inconvenientes de los tratamientos actuales contra el cáncer, la nanotecnología ha proporcionado nuevas alternativas para el suministro controlado y específico de medicamentos. Éstas presentan características farmacocinéticas más alentadoras en comparación con los fármacos actuales. Además, los nanomateriales pueden acumular principios activos durante periodos prolongados en el cuerpo, pueden tener cinéticas continuas de descarga del fármaco [3]. Recientemente, estos nanomateriales portadores de fármacos han mejorado su capacidad para encapsular mediadores terapéuticos y coordinar su administración a células cancerosas. Aunque en su mayoría todavía se encuentren en ensayos preclínicos, pueden ser usados como nuevos métodos de tratamiento menos nocivos, lo cual conllevaría a tratamientos más efectivos para esta enfermedad. Cabe mencionar que la mayor parte de los nanoacarreadores son inespecíficos, por lo que se busca contar con mecanismos que permitan la liberación controlada “*in situ*”, discriminando entre células sanas y cancerosas.

## **1.1 ANTECEDENTES:**

### **1.1.1 El cáncer**

En una división celular normal, las células humanas crecen y se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. Cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren, y células nuevas las reemplazan. Sin embargo, en el cáncer este proceso ordenado se descontrola. A medida que las células se hacen más y más anormales, las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían de morir, y células nuevas se forman cuando no son necesarias. Estas células adicionales pueden dividirse sin interrupción y pueden formar masas que se llaman tumores (FIGURA 1.1) [4]. Entonces, las células sanas tienen que competir con las células cancerosas que consumen rápidamente los nutrientes suministrados por el torrente sanguíneo. El entorno de las células sanas finalmente estará sobrepoblado por las células tumorales, hasta el punto en que las células cancerosas están diseminadas. Sin embargo, la alta demanda de nutrientes requeridos por las células cancerosas no puede ser sostenida por la vasculatura existente. Debido a esta razón, algunas de las células cancerosas mueren, pero la mayoría de ellas sobrevivirán y aún se dividirán continuamente en un ambiente que carece de nutrientes. En una etapa posterior del desarrollo de las células cancerígenas, las células sanas eventualmente serán reemplazadas por las células cancerígenas, que crecerán hasta alcanzar un tamaño estacionario. La mayoría de las células cancerosas permanecen en el tamaño limitado por difusión, hasta que se les concede acceso a más nutrientes. Las células cancerosas pueden existir en todo el cuerpo [4].

Fisiológicamente una forma de discriminar entre células sanas y cancerosas se da por la diferencia de pH. Una célula sana presentará un pH neutro que oscila entre 7,35 y 7,45. En cambio, el pH de una célula cancerosa es más ácido. Por ejemplo, la pared celular se encuentra a aproximadamente un pH de 6 [5], y los lisosomas a un pH de 4 [6].



**FIGURA 1.1** Representación esquemática de la formación del cáncer.

### 1.1.2 Tratamientos actuales

Encontrar la cura para el cáncer ha sido uno de los grandes desafíos para médicos y científicos en las últimas décadas. Los tratamientos que se utilizan actualmente contra el cáncer incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y terapia hormonal. A continuación, se dará una ligera descripción de los tratamientos más frecuentes (cirugía, radioterapia, quimioterapia), cada uno describiendo sus ventajas y desventajas.

La cirugía es el método más antiguo y más común. Esta puede reducir la probabilidad de formación de cáncer porque se puede eliminar la etapa inicial de la carcinogénesis. Sin embargo, la cirugía rara vez se utiliza como único tratamiento y generalmente se combina con quimioterapia o radioterapia. Además, la cirugía no puede curar el cáncer, pero se puede eliminar el cáncer localizado [7].

En la radioterapia, las partes del cuerpo afectadas están expuestas a altas radiaciones como los rayos X o los rayos gamma. Por lo general, el objetivo de la radioterapia es reducir el tamaño del tumor, facilitar la extirpación quirúrgica o prevenir el crecimiento del tumor una vez que se completa la cirugía. El efecto directo de la radioterapia es el daño del

ADN celular, que afecta a las células sanas junto con las cancerígenas, dando lugar a efectos secundarios indeseables, que pueden incluir sequedad, náuseas, fatiga y descamación de la piel [8].

El tratamiento con medicamentos (quimioterapia) ha demostrado ser efectivo contra las células cancerosas, y es particularmente valioso para el tratamiento de tumores inoperables. Se puede usar solo o en combinación con radiación y o cirugía [9]. Se han realizado muchos tipos de investigación sobre la producción de diversos medicamentos para tratar el cáncer. El problema prevaleciente de la actual quimioterapia es que los medicamentos afectan también a los tejidos sanos. Además, los medicamentos contra el cáncer tienen una baja solubilidad en agua, lo que reduce considerablemente su biodisponibilidad.

Por lo tanto, para resolver los problemas de especificidad y solubilidad en agua, así como la reducción de los efectos secundarios nocivos al cuerpo, se ha propuesto una variedad de sistemas de soporte con la capacidad de transportar los medicamentos: los nanoacarreadores.

### **1.1.3 Nanomateriales**

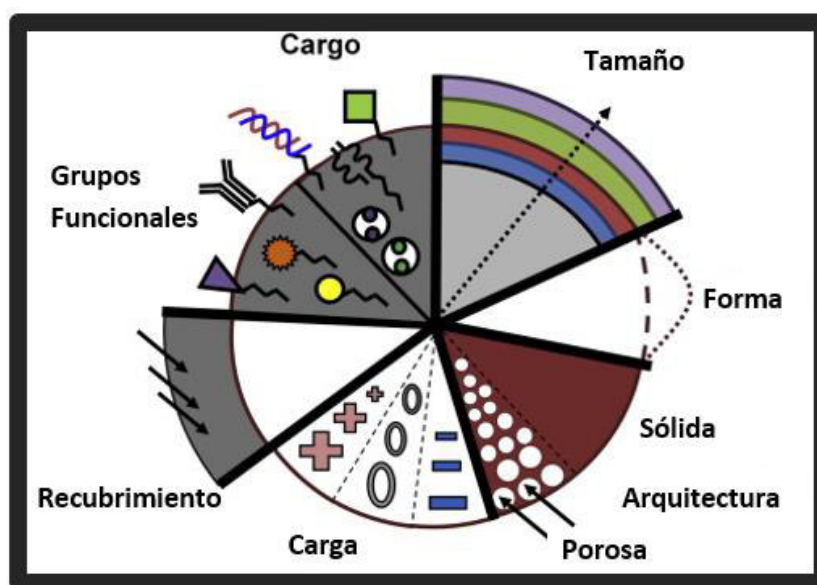
El entusiasmo e interés científico actual por los objetos a escala nanométrica ha llevado a una búsqueda de conexiones entre estos materiales, la biología y la tecnología [10].

Los nanomateriales representan plataformas multifuncionales altamente personalizables y robustas para el transporte no invasivo de prácticamente cualquier tipo de carga química o biológica diseñada para marcar, aumentar o suprimir la actividad funcional endógena en una población de células [11].

El enorme potencial de los nanomateriales en la biomedicina surge de una serie de características que favorecen su uso en la investigación y en el contexto clínico. En primer lugar, su tamaño, comparable con el tamaño de las biomoléculas, permite la integración

directa en procesos celulares fisiológicos, tales como el paso a través de la membrana plasmática. En segundo lugar, los nanomateriales se caracterizan intrínsecamente por una alta estabilidad, lo que da lugar a una acción de larga distancia, y por lo tanto, un potencial de administración sistemática. Por último, la versatilidad y la inmensa capacidad de carga de los nanomateriales permiten el acoplamiento y la entrega de grandes volúmenes de carga útil.

Como se muestra en la FIGURA 1.2, los nanomateriales representan estructuras altamente versátiles con propiedades físicas y químicas notables. Los cambios en su tamaño, forma, arquitectura, carga superficial y recubrimiento permiten su interacción con las células, mejorando así su actividad [12].

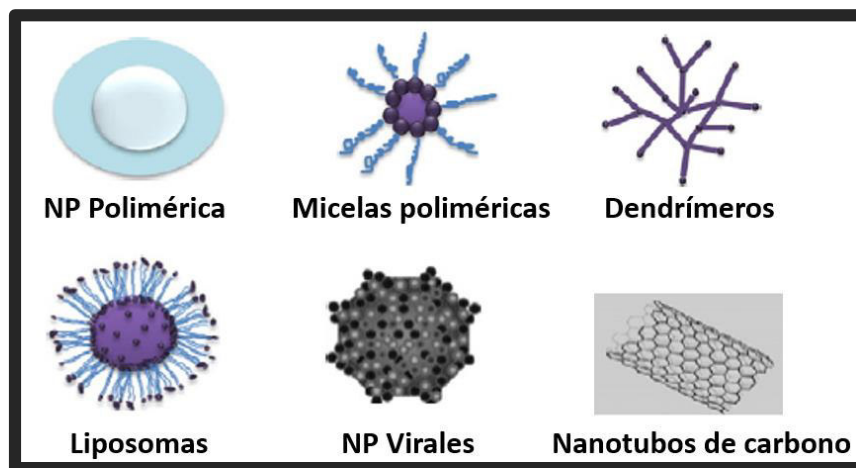


*FIGURA 1.2 Versatilidad de los nanomateriales.*

#### **1.1.4 Nanotransportadores de medicamentos**

En las últimas décadas, los nanotransportadores se han usado para la administración de fármacos en el tratamiento contra el cáncer, para aumentar la eficacia y reducir los efectos secundarios de los medicamentos [13]. Las NP poseen características estructurales, propiedades fisicoquímicas y de superficie que pueden ser modificadas con diversas moléculas bioactivas. Todas estas características apuntan a lograr una focalización eficiente

y específica. En la actualidad, se usa una variedad de sistemas de soporte (FIGURA 1.3); estos incluyen nanopartículas poliméricas, micelas poliméricas, dendrímeros, liposomas, nanopartículas virales y nanotubos de carbono, como transportadores de medicamentos [14].



**FIGURA 1.3** *Nanomateriales transportadores de medicamentos.*

*Las NP poliméricas* comprenden un núcleo sólido, lleno o cubierto superficialmente de polímeros, y son adecuadas para cargas de medicamentos hidrofóbicos. La construcción de las NP aumenta la eficacia de la quimioterapia al proporcionar una tasa constante de administración de fármacos [15], contornos manejables de descarga de fármacos y una mayor posibilidad de mantener el mismo tamaño a través de la circulación interna del cuerpo. Además, la encapsulación del fármaco en NP poliméricas se puede lograr de manera simple reuniendo una solución de polímero y el fármaco.

*Las micelas* son estructuras de moléculas anfifílicas ordenadas con las partes hidrófobas orientadas hacia adentro y las hidrófilas hacia afuera, formando una especie de caparazón nanométrico. La región del núcleo hidrofóbico actúa como un depósito de fármacos no acuosos, mientras que la región del caparazón soluble en agua estabiliza el la partícula completa en agua, lo que hace a las micelashidrófilas. Esto da como resultado la formación de partículas alternativas para la administración de fármacos. Hay dos maneras de inmovilizar drogas en la micela polimérica: enlace químico covalente y encapsulación física. Su principal inconveniente es su falta de selectividad, es decir, que suele ser complicado dirigirlas hacia el tumor canceroso u otros sitios de interés [16].

*Los dendrímeros* son macromoléculas sintéticas mono dispersas fáciles de conjugar y modificar para diversas funciones. También son biocompatibles y solubles en agua. Además, las partes internas comparativamente hidrófobas de los dendrímeros permiten la encapsulación física de fármacos hidrófobos. Su morfología funge como su principal desventaja [17].

Un liposoma es una vesícula pseudo esférica compuesta de una bicapa lipídica. Se han preparado diversas formulaciones de este tipo, incluyendo fármacos como daunorrubicina y doxorubicina. El inconveniente para este tipo de nanomateriales es específicamente que no mantienen su geometría por tiempos prolongados [18].

Las nanopartículas virales (VNP) se derivan de las cápsides de virus o bacteriófagos. Se pueden transformar en nanoacarreadores de forma natural mediante el uso de protocolos químicos y genéticos, y pueden llegar a ser biocompatibles y biodegradables. En consecuencia, numerosos anticuerpos o ligandos, que incluyen ácido fólico, transferrina y anticuerpos monocatenarios, se han conjugado a virus con precisión para la selección de tumores *in vivo*. La complejidad de su desarrollo suele ser su principal desventaja [19].

Los nanotubos de carbono (CNT) son pequeños tubos de láminas de carbono enrolladas que poseen un gran potencial para aplicaciones en los campos biológico y biomédico. Las cubiertas protectoras de carbono a las que se adhiere la droga aseguran que ésta no tenga contacto con los tejidos del cuerpo, y el contenido puede transferirse de forma segura a la ubicación adecuada y dirigirse a las células correctas. Los CNT son completamente insolubles, lo que genera problemas de toxicidad. La modificación química de los CNTs puede propiciar la solubilidad en agua y la funcionalización. Sus inconvenientes principales son el control de tamaño, y la falta de geometría definida [20].

### **1.1.5 Nanopartículas magnéticas**

Las nanopartículas magnéticas han atraído un gran interés no solo en el campo de la física, sino también en las áreas de atención médica y detección magnética. Especialmente

las nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), como las que se muestran en la FIGURA 1.4, han sido ampliamente utilizadas para numerosas aplicaciones biomédicas [21].



**FIGURA 1.4** *Nanopartículas magnéticas de hierro (magnetitas) en suspensión reaccionando al campo magnético de un imán.*

Para su fabricación se han descrito varios métodos químicos diferentes que incluyen la coprecipitación, la pirólisis láser, la descomposición térmica, la reducción asistida, así como la electrosíntesis mediante diversas técnicas electroquímicas [22].

Todas las aplicaciones biomédicas y de bioingeniería requieren que estas nanopartículas tengan valores de magnetización elevados y un tamaño inferior a 100 nm con una distribución estrecha de tamaño de partícula, de modo que las propiedades físicas y químicas sean uniformes. Además, se necesitan recubrimientos de superficie especiales que no solo deben ser no tóxicos y biocompatibles, sino que también deben permitir una entrega dirigida en un área específica. Las nanopartículas magnéticas tienen una tendencia a aglomerarse; por lo tanto, están recubiertas con surfactantes o polímeros que minimizan este fenómeno [23].

### **1.1.5 Recubrimientos poliméricos inteligentes (gatekeepers):**

Estos polímeros en aplicaciones biomédicas se comportan como “atrapadores” de compuestos activos. Se denominan “gatekeepers” por ser sensibles a estímulos que les permite tener la capacidad de controlar la liberación del principio activo.



Estos “gatekeepers” poliméricos podrían lograr la liberación controlada de fármacos por medio de diversos estímulos externos como el cambio de pH [24], cambios de temperatura [25], reacciones redox [26], irradiación luminosa [27] y actividad enzimática [28]. Estos polímeros, al reaccionar mediante estos estímulos, sufren una “gelación” o disociación polimérica en la cual las cadenas de los polímeros pueden interactuar entre ellas para atrapar o liberar el principio activo [29].

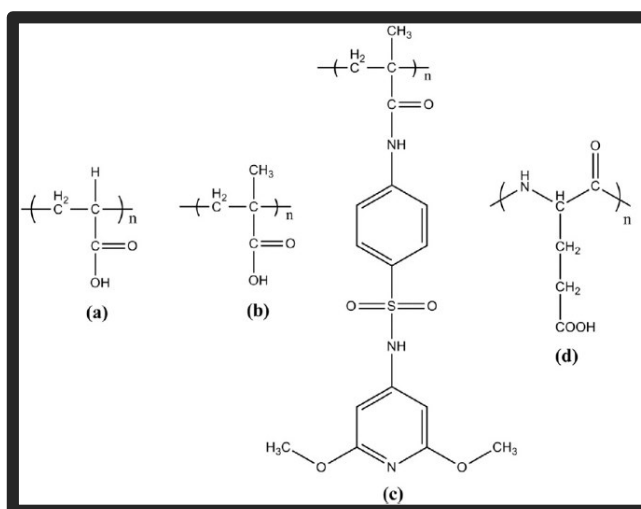
La TABLA 1.1 muestra una compilación de polímeros biodegradables sensibles a distintos estímulos externos reportados para usos biomédicos. Igualmente, se muestra su modo de entrecruzamientos polimérico y su forma de disociación [29].

**TABLA 1.1. Compilación de distintos polímeros biodegradables sensibles a estímulos diversos para su “gelación” o deformación [27].**

Polímero	Modo de entrecruzamiento	Estimulo de disociación
Colágeno	Enredamiento	Temperatura
Poli (L-licina)	Interacción iónica	pH
Poli (ácido láctico)	Formación por estereocomplejos	pH
Ácido algínico	Interacción iónica	pH
Agarosa	Enredamiento	Hidrólisis
Quitosano	Interacción iónica	pH
Poli (N-isoprpicrilamida)	Interacción hidrofóbica	Temperatura
Alcohol de polivinilo	Puentes de hidrógeno	Temperatura
Poli (etelin glicol)	Interacción biológica	Proteasa
Polímero de 2-metacrilooxietyl fosforicolina	Puentes de hidrógeno	pH
Poli (metil acrilato)	Puentes de hidrógeno	pH

Entre estos sistemas sensibles a los estímulos, los sistemas sensibles al pH han recibido interés específico, particularmente para terapias contra el cáncer, ya que se ha demostrado que las células cancerosas tienen un ambiente ácido significativamente más bajo que el de las células sanas. En consecuencia, estos hallazgos han alentado a los investigadores a diseñar y preparar nanomateriales sensibles al pH como portadores de fármacos para liberación controlada.

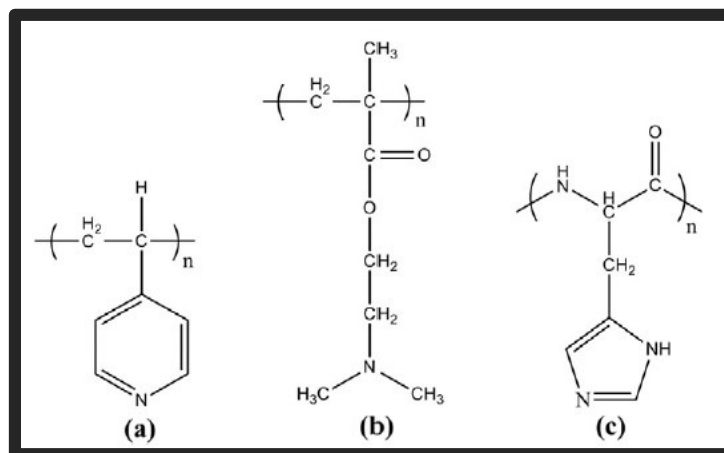
El PAA (poli-ácido acrílico) y el PMAA (poli-ácido metacrílico), son polímeros aniónicos de uso común en la construcción de nanoformulaciones sensibles al pH (FIGURA 1.5). Los grupos de ácido carboxílico en estos polímeros son susceptibles de ser protonizados con una transición de fase rápida desde el estado hidrófilo (pH ácido) al estado hidrófobo (pH neutro) [30].



**FIGURA 1.5** Polímeros aniónicos sensibles al pH: (a) poli (ácido acrílico) (PAAc); (b) poli (ácido metacrílico) (PMAAc); (c) grupos sulfonamida; (d) poli (ácido glutámico).

Por otro lado, los polímeros de grupos catiónicos en nanotransportadores siempre son propensos a protonarse en un entorno ácido, lo que conduce a la disociación de nanoestructuras, dando pie a la liberación del fármaco. En general, la poli (4-vinilpiridina) (PVP) (FIGURA 1.6 a), que contiene el grupo piridina, y el poli (dimetilaminoetil metacrilato) (PDMAEMA) (figura 3 (b)), que incluye el grupo de amina terciaria, son dos

polímeros catiónicos típicos que se usan comúnmente para construir nanoportadores responsivos al pH [30].



**FIGURA 1.6** Polímeros catiónicos sensibles al pH: (a) poli (4vinilpiridina) (PVP); (b) poli (metacrilato de N, N-dimetilaminoetilo) (PDMAEMA); y (c) poli (histidina).

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Dentro del cuerpo humano existen de manera natural diversos gradientes de pH. Las células y tumores cancerosos pueden ser discriminados de las células y tejidos sanos debido a la fisiopatología única de los tumores y las peculiaridades de las células malignas y transformadas. Las células cancerosas difieren de las células normales en su morfología, elasticidad, permeabilidad y propiedades químicas. El pH extracelular en los tumores sólidos tiende a ser significativamente más ácido que el pH de la sangre (7,4).

Con base en esta observación, se explorará en este trabajo la funcionalización de nanopartículas magnéticas a fin de crear una estrategia de liberación controlada y sitio-digida de fármacos, cuya distribución en el organismo pueda ser controlada por campos magnéticos, y la liberación del medicamento activada por el ambiente ácido propio de las células cancerosas. Dos polímeros que han demostrado sensibilidad al pH son el Poli-4-vinilpiridina (P4VP) y el Poli(metacrilato de 3-trimetoxisilil propil) (P3TMPPM).

Se ha demostrado que en ambos polímeros a valores de pH cercanos a 7 (7,4 para el pH de sangre), las cadenas poliméricas están en su forma desprotonada, haciendo que las cadenas del polímero se vuelvan hidrófobas, evitando su disolución en medios fisiológicos sanos. En cambio, al estar a un pH ácido, las cadenas de los polímeros se protonan, volviéndose hidrófilas, con lo que se puede activar el mecanismo de liberación de fármacos en la superficie de las nanopartículas. Por otro lado, ambos polímeros poseen diferente naturaleza en cuanto a su estructura, ya que el polímero 4-vinil-piridina tiene una estructura lineal, mientras que el polímero 3-(trimetoxisilil) propil metracrilato tiene una estructura ramificada. Por lo que en este trabajo se comparará de manera adicional la captación del principio activo en función de la naturaleza química de los polímeros en la superficie de las nanopartículas, esperando optimizar su composición para lograr una forma farmacéutica útil para el tratamiento de cáncer.

### **1.3 HIPÓTESIS**

El recubrimiento de las nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}^{(2+/3+)}_2\text{O}_4$ ) con los polímeros sensibles al pH ser formados a partir de 3-(trimetoxisilil) propil metracrilato o 4-vinil piridina serán adecuados para el transporte y liberación controlada de principios activos en tumores malignos.

### **1.4 OBJETIVOS**

#### **1.4.2 Objetivo General**

Funcionalizar y caracterizar nanomagnetitas con polímeros sensibles al pH para la liberación controlada de principios activos de manera sitio-dirigida.

#### **1.4.2 Objetivos Específicos**

- Funcionalizar y caracterizar nanopartículas magnéticas recubiertas con polímeros sensibles al pH.
- Efectuar la caracterización electroquímica del compuesto activo (Doxorubicina).
- Determinar mediante voltamperometría de onda cuadrada las concentraciones de doxorubicina captadas y liberadas por las nanopartículas magnéticas funcionalizadas a diferentes pH de interés.

## 1.5 REFERENCIAS CAPÍTULO I:

- [1] Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer*, 127(12), 2893-2917.
- [2] Cancer.Net, Cancer Treatment, American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2012. <http://www.cancer.net/navigating-cancer.care/older-adults/cancer-tratement>.
- [3] Hu, C. M. J., & Zhang, L. (2009). Therapeutic nanoparticles to combat cancer drug resistance. *Current drug metabolism*, 10(8), 836-841.
- [4] Jeffrey, G. (2005). CANCER AND GENETIC MEDICINE. *HEALTH PROGRESS*, 3, 1.
- [5] Karimi, M., Ghasemi, A., Zangabad, P. S., Rahighi, R., Basri, S. M. M., Mirshekari, H., ... & Ghosh, D. (2016). Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chemical Society Reviews*, 45(5), 1457-1501.
- [6] Cheng, B., Thapa, B., Remant, K. C., & Xu, P. (2015). Dual secured nano-melittin for the safe and effective eradication of cancer cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(1), 25-29.
- [7] <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/cancer/in-depth/cancer-surgery/art20044171> Aug 22, 2014.
- [8] Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences*, 9(3), 193.
- [9] <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types> Apr 29, 2015.
- [10] Alivisatos, P. (2004). The use of nanocrystals in biological detection. *Nature biotechnology*, 22(1), 47.
- [11] Salata, O. V. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of nanobiotechnology*, 2(1), 3.
- [12] Barkalina, N., Charalambous, C., Jones, C., & Coward, K. (2014). Nanotechnology in reproductive medicine: emerging applications of nanomaterials. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(5), e921-e938.
- [13] Sachdeva, M. S. (1998). Drug targeting systems for cancer chemotherapy. *Expert opinion on investigational drugs*, 7(11), 1849-1864.

- [14] José A. Barreto , William O'Malley , Manja Kubeil , Bim Graham, Holger Stephan, Leone Spiccia . (2011). *Nanomaterials: Applications in Cancer Imaging and Therapy*. *Advanced Healthcare Materials*, 23, 18-40. 2018, De Material Views Base de datos.
- [15] Bei, D., Meng, J., & Youan, B. B. C. (2010). Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises. *Nanomedicine*, 5(9), 1385-1399.
- [16] Batrakova, E. V., Dorodnych, T. Y., Klinskii, E. Y., Kliushnenkova, E. N., Shemchukova, O. B., Goncharova, O. N., ... & Kabanov, A. V. (1996). Anthracycline antibiotics non-covalently incorporated into the block copolymer micelles: in vivo evaluation of anti-cancer activity. *British journal of cancer*, 74(10), 1545.
- [17] Majoros, I. J., Myc, A., Thomas, T., Mehta, C. B., & Baker, J. R. (2006). PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: synthesis, characterization, and functionality. *Biomacromolecules*, 7(2), 572-579.
- [18] Girard, P. M., Bouchaud, O., Goetschel, A., Mukwaya, G., Eestermans, G., Ross, M., ... & Saimot, A. G. (1996). Phase II study of liposomal encapsulated daunorubicin in the treatment of AIDS-associated mucocutaneous Kaposi's sarcoma. *AIDS (London, England)*, 10(7), 753-757.
- [19] Steinmetz, N. F. (2010). Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(5), 634-641.
- [20] Liu, Z., Tabakman, S., Welsher, K., & Dai, H. (2009). Carbon nanotubes in biology and medicine: in vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano research*, 2(2), 85-120.
- [21] Iida, H., Takayanagi, K., Nakanishi, T., & Osaka, T. (2007). Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with various sizes and magnetic properties by controlled hydrolysis. *Journal of colloid and interface science*, 314(1), 274-280.
- [22] Zarschler, K., Rocks, L., Licciardello, N., Boselli, L., Polo, E., Garcia, K. P., ... & Dawson, K. A. (2016). Ultrasmall inorganic nanoparticles: state-of-the-art and perspectives for biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(6), 1663-1701.
- [23] Zhang, Y., Kohler, N., & Zhang, M. (2002). Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. *Biomaterials*, 23(7), 1553-1561.
- [24] Cui, L., Lin, H., Guo, W., Xiang, D., Zhou, D., Zhang, T., & Qu, F. (2014). A novel pH-responsive controlled release system based on mesoporous silica coated with hydroxyapatite. *Journal of sol-gel science and technology*, 72(1), 106-113.

- [25] Fu, Q., Rama Rao, G. V., Ward, T. L., Lu, Y., & Lopez, G. P. (2007). Thermoresponsive transport through ordered mesoporous silica/PNIPAAm copolymer membranes and microspheres. *Langmuir*, 23(1), 170-174.
- [26] Wang, Y., Han, N., Zhao, Q., Bai, L., Li, J., Jiang, T., & Wang, S. (2015). Redox-responsive mesoporous silica as carriers for controlled drug delivery: a comparative study based on silica and PEG gatekeepers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72, 12-20.
- [27] Ferris, D. P., Zhao, Y. L., Khashab, N. M., Khatib, H. A., Stoddart, J. F., & Zink, J. I. (2009). Light-operated mechanized nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 131(5), 1686-1688.
- [28] Bernardos, A., Aznar, E., Marcos, M. D., Martínez- Máñez, R., Sancenón, F., Soto, J., ... & Amorós, P. (2009). Enzyme- responsive controlled release using mesoporous silica supports capped with lactose. *Angewandte Chemie*, 121(32), 5998-6001.
- [29] Kunugi, S., & Yamaoka, T. (Eds.). (2012). *Polymers in nanomedicine* (Vol. 247). Springer Science & Business Media.
- [30] Liu, M., Du, H., Zhang, W., & Zhai, G. (2017). Internal stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery: design strategies and applications. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 1267-1280.

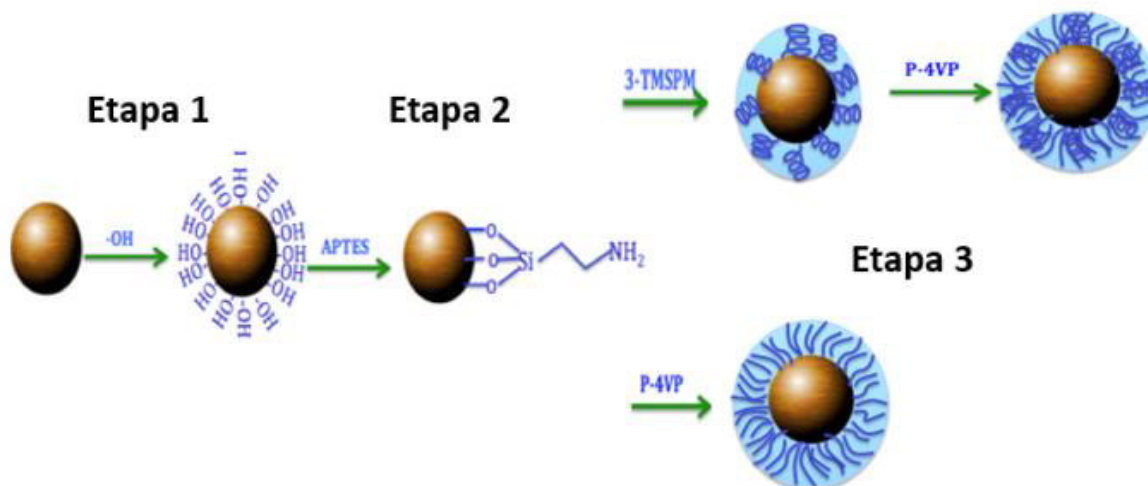


**CAPÍTULO II: Funcionalización y caracterización de nanopartículas magnéticas con polímeros sensibles al pH.**

## 2.1 FUNCIONALIZACIÓN

En esta sección se explicarán de manera detallada las reacciones que se llevaron a cabo para lograr la funcionalización de las nanopartículas magnéticas (NPM), siendo magnetita ( $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}$ )<sub>2</sub>O<sub>4</sub> suministrada por Sigma Aldrich.

La funcionalización, como se muestra en la FIGURA 2.1, se lleva a cabo en tres etapas, partiendo por la hidroxilación (Etapa 1), y siguiendo con la reacción de amino-silanización (Etapa 2). La etapa final es la reacción de polimerización (Etapa 3). Se probó la polimerización de un compuesto ramificado, el 3-(trimetoxisilil) propil metacrilato (3-TMSPM, Sigma Aldrich), un compuesto lineal, la 4-vinil-piridina (P-4VP, Sigma Aldrich), y la combinación de ambos compuestos para obtener un polímero mixto.

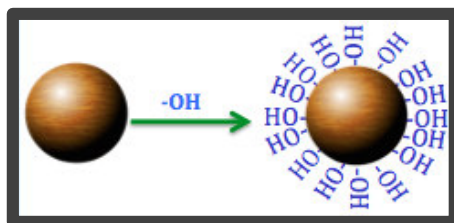


*FIGURA 2.1 Representación esquemática de la funcionalización de las nanopartículas.*

A continuación, se describirán detalladamente cada una de esas etapas de reacción.

### 2.1.1 Hidroxilación (NPM-OH).

Esta reacción (FIGURA 2.2) se realizó con el fin de activar la superficie mediante la adición de grupos hidroxilos.



**FIGURA 2.2** Representación esquemática de la hidroxilación NPM-OH.

Inicialmente las NPM se mezclaron en un matraz de bola 6ml de la disolución de NaOH con 3mg de nanopartículas (NPM) magnéticas. Se realizaron pruebas a diferentes concentraciones de NaOH (Merck), 5mM, 50mM, 250mM, 500mM y 1M con el objetivo de obtener una mejor estabilidad coloidal, observada mediante mediciones del diámetro hidrodinámico y el mayor valor de potencial  $\zeta$ .

La mezcla fue sometida a sonicación por 5 minutos para permitir una buena dispersión de las NPM y después se dejó en agitación mecánica durante 24 horas a temperatura ambiente. Es importante destacar que la agitación con el uso de un agitador magnético no es preferida para este tipo de nanopartículas debido a que son atraídas por el agitador, evitando una dispersión adecuada. Al finalizar el tiempo de reacción, las NPM-OH (Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con  $-OH$ ) fueron lavadas dos veces en agua. Enseguida se llevó a cabo su caracterización (Tamaño hidrodinámico y potencial  $\zeta$ ), mostrando los resultados en la TABLA 2.1.

**TABLA 2.1.** Diámetro hidrodinámico y potencial  $\zeta$  de las NPM hidroxiladas mediante el tratamiento a distintas concentraciones de NaOH

Concentración OH	DLS Diámetro (nm)	Potencial $\zeta$ (mV)
5 mM	467.3	-30.9
50 mM	363.4	-33.2
250 mM	409.6	-32.2
500 mM	388.1	-27.8
1 m	615	-33.1

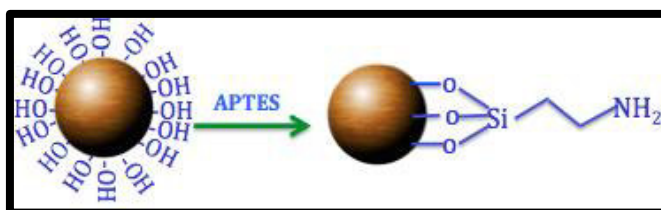
Las mediciones del diámetro hidrodinámico y del potencial  $\zeta$  indicaron que la concentración más adecuada a utilizar es la de 50 mM de NaOH al obtenerse valores de 360 nm y -33 mV respectivamente (menor tamaño hidrodinámico y mayor potencial  $\zeta$ ). Se

consideraron las NPM-OH obtenidas con esa concentración de NaOH para los siguientes pasos de funcionalización de las NPM.

Finalmente las NPM-OH son lavadas dos veces en Dimetilformamida (DMF - Sigma Aldrich) para continuar con la etapa siguiente.

### 2.1.2 Amino-Silanización (NPM-APTES).

Esta etapa de funcionalización (FIGURA 2.3) se realizó con el fin de que el polímero se logre anclar de manera adecuada a las NPM.



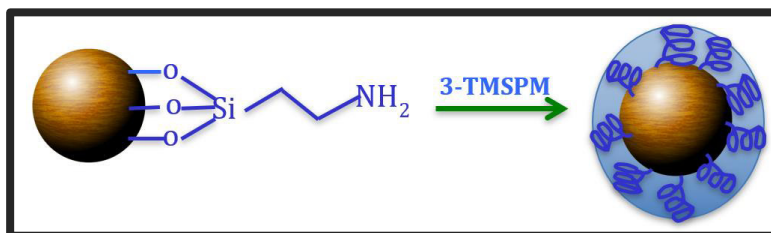
**FIGURA 2.3** Representación esquemática de la funcionalización por amino-silación NPM-APTES.

La funcionalización se realizó siguiendo la metodología de Rafi, A. A. y col. [31]. Brevemente, 3mg de NPM hidroxiladas (NPM-OH) fueron concentradas en 1.2ml de DMF. Se agregaron entonces 12 $\mu$ l de APTES ((3-Aminopropil)triethoxisilano - Sigma Aldrich) a la mezcla. Ésta se sonicó durante 2 minutos para propiciar la dispersión, y después se dejó en agitación mecánica durante 5 horas a temperatura ambiente. Al finalizar la reacción, las nanopartículas obtenidas (NPM-APTES) se lavaron 3 veces con DMF y 2 veces con Tolueno sin sonicación, ya que, si se realiza sonicación el APTES se desprende parcialmente y las NPM-APTES tienden a aglomerarse.

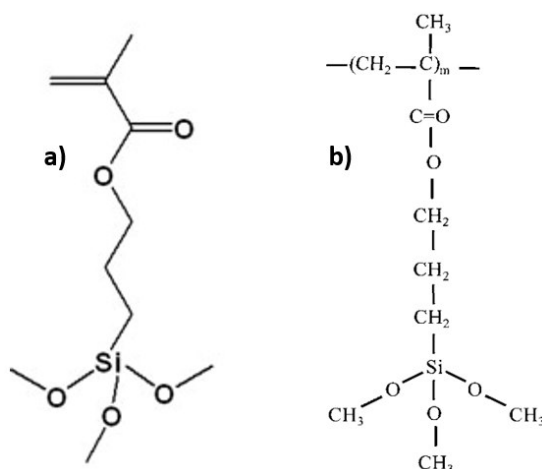
### 2.1.3 Polimerización ramificada (NPM-3TMPM).

La polimerización de las NPM (FIGURA 2.4 se realizó siguiendo la metodología de Rafi, A. A. y colaboradores [31]. La reacción fue llevada a cabo en 2 mL de tolueno anhidro. Se añadieron 3mg de NPM-APTES bajo atmósfera de nitrógeno y en seguida

lentamente 6μL de 3-(Trimetoxisilil)propilmetacrilato (3-TMSPM - Sigma Aldrich). La estructura química del monómero de este compuesto, así como su estructura polimerizada se presentan en la FIGURA 2.5. La reacción se continuó durante 72 horas a 50-55°C. Al final de la reacción se dejó enfriar. Después se recuperaron las nanopartículas (NPM-3TMPM) por centrifugación durante 10 minutos. Finalmente fueron lavadas con tolueno y etanol para su posterior caracterización.



**FIGURA 2.4** Representación esquemática de la reacción de polimerización de un compuesto ramificado NPM-3TMPM.

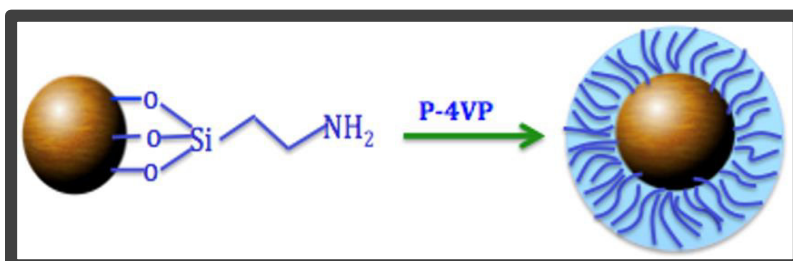


**FIGURA 2.5** a) estructura química del monómero de 3-(Trimetoxisilil)propilmetacrilato) y b) estructura química de poli(metacrilato de 3-trimetoxisilil propil)

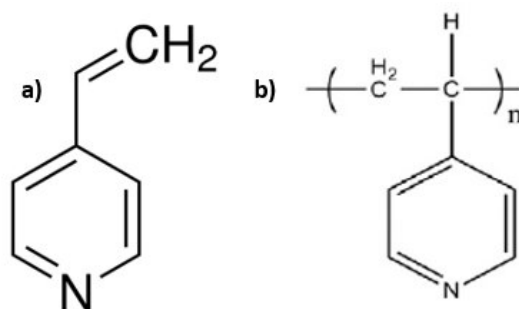
#### 2.1.4 Polimerización Lineal (NPM-P4VP).

La polimerización de NPM-P4VP (FIGURA 2.6) se realizó igualmente siguiendo la metodología de Rafi, A. A. y colaboradores [31]. La reacción se llevó a cabo con tolueno seco (2ml) como solvente. Se mezclaron 3mg de NPM-APTES con 7.8μl de monómero 4-VP (FIGURA 2.7-a) y 1.8μl de AIBN (Azobisisobutironitrilo - Sigma Aldrich) (0,48 mg) como iniciador, en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se mantuvo a una temperatura

de 70-80 °C por 48 horas. Al finalizar las NPM-P4VP (ver estructura del polímero en la FIGURA 2.7-b), éstas fueron separadas por centrifugación a 9000 rpm y se sometieron sucesivamente a lavados con tolueno, THF (Tetrahidrofurano - Sigma Aldrich), metanol, agua y acetona para eliminar los residuos. Finalmente se dejó secar.



**FIGURA 2.6** Representación esquemática de la polimerización lineal NPM-P4VP.

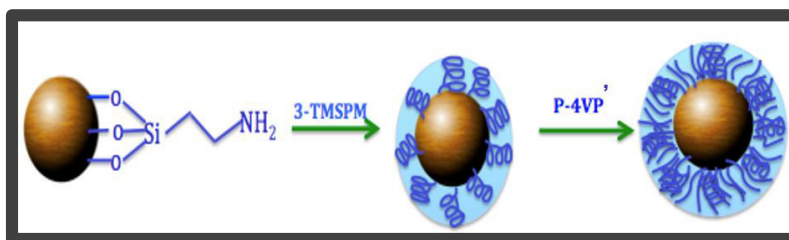


**FIGURA 2.7** a) estructura química de 4-vinilpiridina y b) estructura química de poli(4-vinilpiridina)

### 2.1.5 Mezcla de los polímeros (NPM-P4VP’).

La incorporación del polímero mixto (FIGURA 2.8) se realizó acoplado primeramente el 3-TMSPM y enseguida la 4-VP Partiendo de las NPM-APTES, se realizó la polimerización de un compuesto ramificado, mezclados los 3mg de NPM-APTES en 2ml de Tolueno seco, se añadieron lentamente y agitando manualmente 6µl de 3-(Trimetoxisilil)propilmetacrilato (3-TMSPM). Se dejó la reacción durante 72 horas a 50-55°C en agitación mecánica. Después de ese periodo de tiempo, las NPM (NPM-3TMSPM) se dejaron enfriar y se recuperaron mediante centrifugación durante 10 minutos a 14000 rpm. Se realizaron lavados con tolueno y etanol. En seguida, las NPM-3TMSPM se

mezclaron con 7.8 $\mu$ l 4-VP y 1.8 $\mu$ l AIBN (Azobisisobutironitrilo), en atmosfera de nitrógeno. La mezcla se mantuvo a una temperatura de 70-80 °C por 48 horas en agitación mecánica. Al finalizar, las NPM-P4VP' fueron separadas por centrifugación a 14000rpm por 10 minutos y se sometieron sucesivamente a lavados con tolueno, THF, etanol, agua y acetona para eliminar los residuos. Finalmente se dejaron secar.



**FIGURA 2.8** Representación esquemática de la reacción de funcionalización binaria de NPM con -3TMSPM y -P4VP.

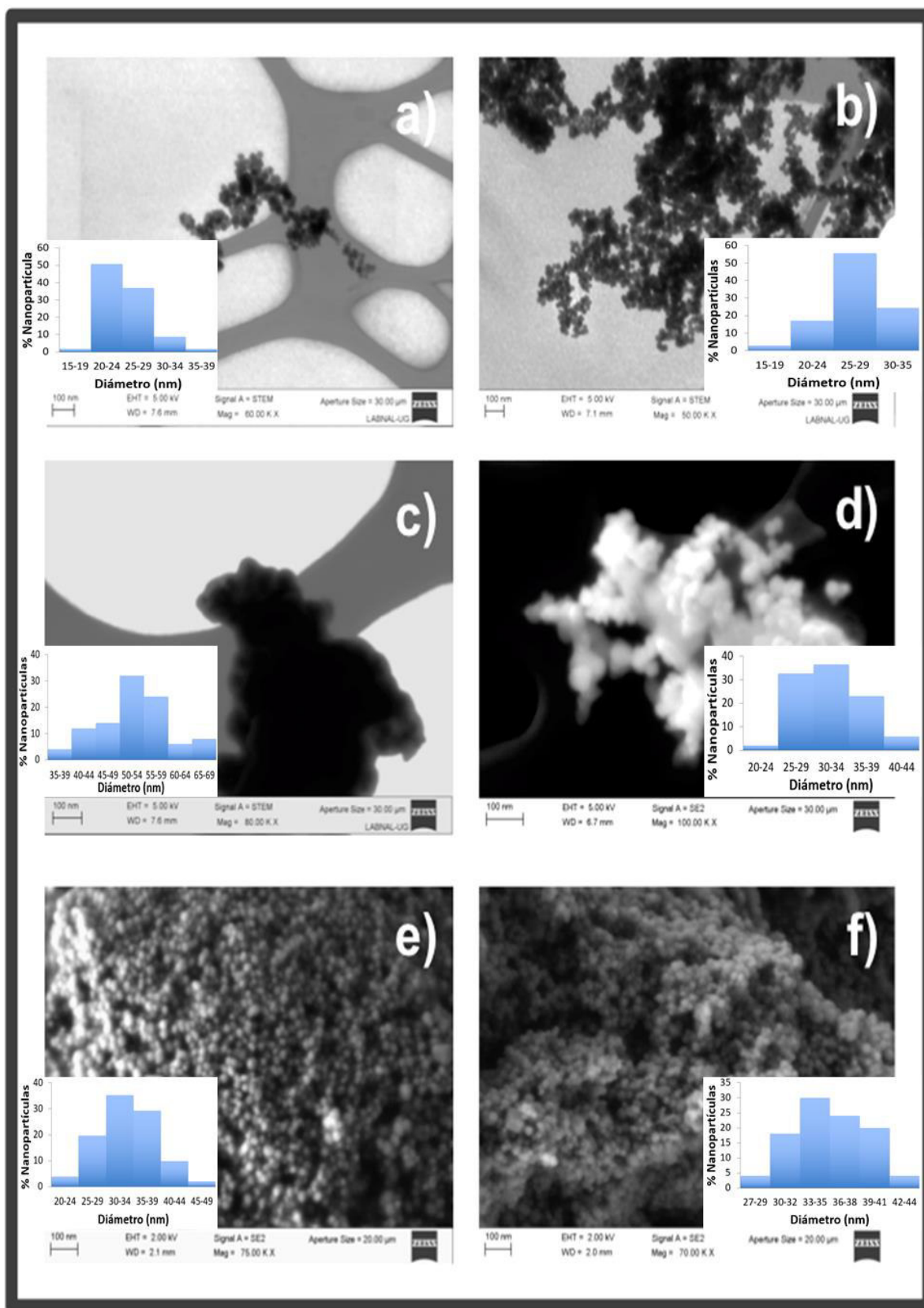
## 2.2 CARACTERIZACIÓN.

En esta sección del capítulo se presenta la evaluación del acoplamiento de los compuestos en cada una de las etapas de funcionalización. Para ello se realizaron las siguientes pruebas: microscopía electrónica (STEM y SEM), espectroscopía infrarrojo (FT-IR) acoplado a ATR, dispersión de luz dinámica (DLS) y electroforesis laser-doppler (LDE).

### 2.2.1 SEM-STEM: Morfología y tamaño de las nanopartículas

La microscopía electrónica (STEM y SEM) nos permite ver la morfología de las nanopartículas, su tamaño, y su estado de aglomeración. Se muestran las imágenes SEM y STEM de las nanopartículas sin funcionalizar, y después de cada etapa de reacción con los compuestos correspondientes.

En la FIGURA 2.9 se observan las imágenes tomadas por la técnica de SEM o STEM de las nanopartículas junto con los histogramas de tamaño de nanopartículas.



**FIGURA 2.9** Fotografías STEM de a) NPM, b) NPM-OH, c) NPM-APTES y fotografías SEM de d) NPM-3TMPM, e) NPM-P4VP y f) NPM-P4VP'.



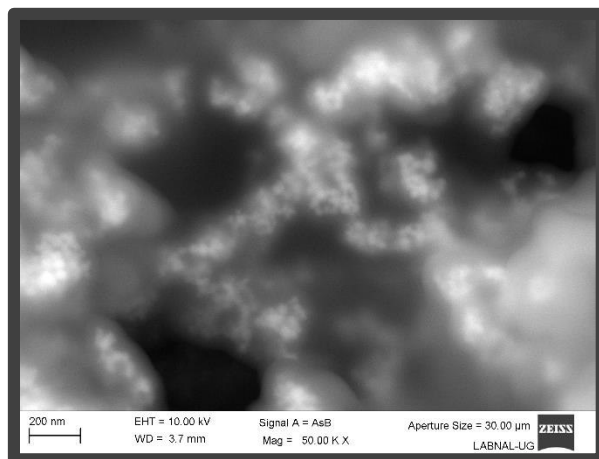
En la imagen de la FIGURA 2.9 a) se presentan las NPM sin funcionalizar obtenidas mediante STEM y el histograma de las nanopartículas. Se observa que las NPM se encuentran de forma dispersa con una morfología esférica. En este histograma notamos que existe un rango de tamaños de diámetro de entre 15nm y 40nm, pero las nanopartículas se encuentran con mayor concentración es un tamaño con diámetro de 20nm a 24nm.

La imagen de la FIGURA 2.9 b) se observan las nanopartículas con la funcionalización de hidroxilación NPM-OH realizada por la técnica de STEM. En esta imagen podemos observar nuevamente nanopartículas con una morfología esférica y una buena dispersión. En el histograma notamos que no existe gran diferencia del rango de tamaños de diámetro respecto a las NPM. Para este caso, el rango se encuentra entre 15nm y 35nm, encontrándose las nanopartículas con mayor concentración es un tamaño con diámetro de 25nm a 29nm.

No existe una diferencia significativa observada a partir de las micrografías STEM entre las NPM (FIGURA 2.9 a)) y las NPM-OH (FIGURA 2.9 b)), ya que las dos comparten la misma morfología con una estructura esférica.

En la FIGURA 2.9 c), observamos las nanopartículas con la funcionalización de amino-silanización NPM-APTES realizada por la técnica de STEM. En esta figura no se logra apreciar la morfología de las nanopartículas. Esto es de debido una alta aglomeración de las provocada por el compuesto (3-aminopropil) trietoxisilano.

Por esta razón se decidió obtener también imágenes por la técnica de SEM, la cual se muestra en la FIGURA 2.10.



**FIGURA 2.10** Fotografía SEM de las NPM-APTES.

En la imagen del SEM de la FIGURA 2.10 se logran apreciar los núcleos de las nanopartículas, y la capa que las recubre (APTES). De esta manera logramos determinar los distintos tamaños de nanopartículas ligeramente aisladas que se encuentran representados en el histograma de la FIGURA 2.9-c. En el histograma se constata que el rango en el diámetro fue entre 35nm a 70nm, con tamaño centrado en 50nm a 54nm.

Comparando estas NPM-APTES con NPM y NPM-OH, la diferencia entre ellas es una mayor aglomeración y un tamaño de partícula aumentando casi al doble debido a la capa de APTES.

Aunque estas imágenes muestran agregación de las nanopartículas, se debe mencionar que la adición de APTES es sólo una etapa intermediaria de reacción necesaria para incorporar otras moléculas. El APTES es inestable y, además, causa aglomeraciones al deshidratarse, sin embargo, si las NPs modificadas con este compuesto se mantienen en DMF, su estabilidad química y coloidal se conserva.

La FIGURA 2.9 d) de las nanopartículas funcionalizadas con el polímero ramificado 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato fue obtenida mediante la técnica SEM. El histograma de distribución de tamaño se muestra en el inserto de la misma figura. En esta imagen podemos observar nuevamente unas nanopartículas con una morfología esférica. Una

notable disminución de aglomeración existe con respecto a la FIGURA 2.9 c), pero a comparación con la Figura 2.9 d), se tiene con una definición más estable en su morfología

Observando el histograma, se observa que los tamaños de las nanopartículas se redujeron respecto a NPM-APTES, siendo la capa que recubre a las nanopartículas más delgada. El tamaño determinado está en un rango de 20nm a 45nm, teniendo un diámetro centrado en 30nm a 34nm, aunque también existe una alta población de nanopartículas con un diámetro de 25nm a 29nm.

En la FIGURA 2.7 e) se muestran las nanopartículas funcionalizadas con el polímero lineal Poli(4-vinilpiridina) junto con su respectivo histograma. En la imagen no se observa una aglomeración tal del polímero que no nos permita observar la morfología de las nanopartículas comparadas con la imagen c) de la misma figura. Comprobamos de esta manera que nuevamente unas nanopartículas con una morfología esférica. El histograma muestra que la mayor concentración de nanopartículas se encuentra en tamaño de diámetro de 30nm a 34nm al igual que las NPM-3TMPM. El rango de tamaño de las NPM-P4VP es de 20nm a 50nm, se redujeron el tamaño con respecto a NPM-APTES nuevamente, siendo más delgada la capa de este polímero que recubre a las nanopartículas.

Es notable que entre las NPM-3TMPM y las NPM-P4VP no existe una diferencia notable, tanto en la morfología, como en los tamaños de nanopartícula.

Finalmente la FIGURA 2.7 f) muestra la imagen obtenida por la técnica SEM y su histograma correspondiente de tamaño de nanopartículas, siendo para este caso la imagen de las nanopartículas funcionalizadas con los dos tipos de polímero (NPM-P4VP'), el ramificado (3-(trimetoxisilil)propil metacrilato) y el lineal (Poli(4-vinilpiridina)). En la imagen no se observa una diferencia significativa en la morfología entre estas nanopartículas y las NPM-P4VP. Igualmente notamos nanopartículas con una morfología esférica sin la presencia de residuos de la reacción que impiden la observación adecuada, como en NPM-APTES. El histograma se encuentra un rango de tamaño de las NPM-P4VP' entre 27nm a 45nm, con diámetro centrado entre 33nm a 35nm.

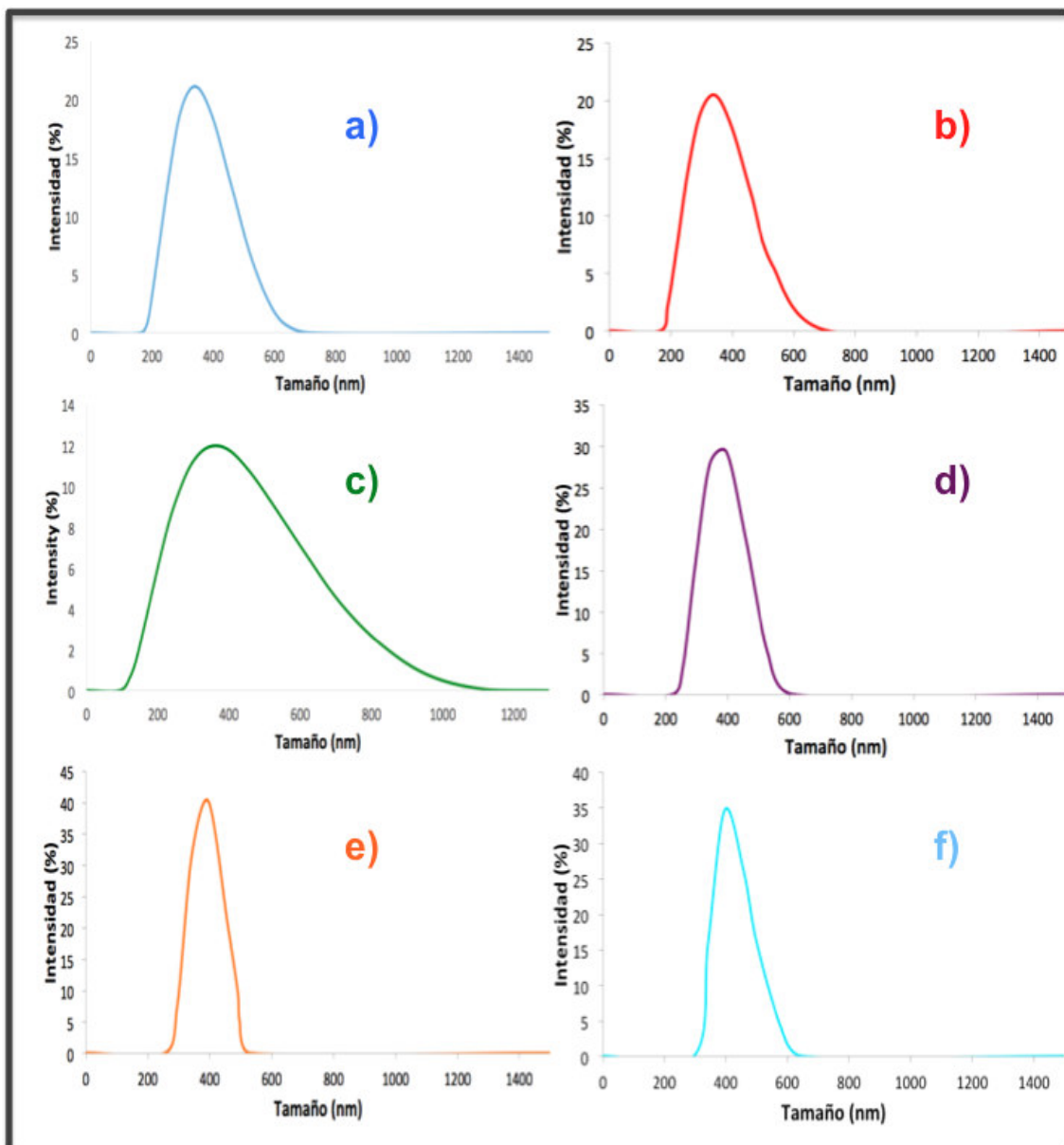
### 2.2.2 DLS: Tamaño Hidrodinámico

Para los análisis de dispersión de luz dinámica (DLS) se utilizó un equipo Zetasizer Nano de Malvern, que nos permitió medir el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas en suspensión, pudiendo el crecimiento en el tamaño indicar la incorporación de capas adicionales de polímeros o grupos funcionales.

Cuando una partícula dispersada se mueve a través de un medio líquido, una fina capa de dipolo eléctrico del disolvente se adhiere a su superficie. Esta capa influye en el movimiento de la partícula en el medio. Así, el diámetro hidrodinámico nos da información del núcleo inorgánico, es este caso la magnetita, junto con cualquier material de recubrimiento y la capa de disolvente que se une a la partícula cuando se mueve bajo la influencia del movimiento browniano [32] (movimiento aleatorio que se observa en las partículas que se hallan en un medio fluido [33]).

La caracterización adecuada de NPs por DLS, así como LDE (Electroforesis laser doppler) para la obtención del potencial  $\xi$  en soluciones fisiológicamente relevantes son importantes debido a que las superficies de las NPs son modificadas por distintos grupos funcionales para proporcionar estabilidad, biocompatibilidad, selectividad y funcionalidad para aplicaciones biológicas. Es necesario conocer y controlar así su estabilidad coloidal y propiedades fisicoquímicas desde la etapa de formulación antes de la administración.

La FIGURA 2.11 muestra los gráficos de distribución de tamaño hidrodinámico para cada una de las etapas de funcionalización de las nanopartículas. Los valores medios son resumidos en la TABLA 2.2, incluyendo el índice de polidispersidad (PDI). Este parámetro da una indicación de la anchura de la distribución global así como sobre la agregación o aglomeración que llega a existir entre las nanopartículas en un medio específico.



**FIGURA 2.11.** Distribución del Tamaño hidrodinámico de las distintas etapas de funcionalización en una solución de buffer de fosfatos a un pH de 7,4 y fuerza iónica de 3mM. a)NPM, b)NPM-OH, c)NPM-APTES, d)NPM-3TMPM, e)NPM-P4VP y f)NPM-P4VP'.

**TABLA 2.2.** Valor central del Tamaño hidrodinámico de NPM, NPM-OH, NPM-APTES, NPM-3TMPM, NPM-P4VP, NPM-P4VP' en una solución de buffer de fosfatos a un pH de 7,4 y fuerza iónica DE 3mM.

NP	DLS Diámetro (nm)	PDI
NPM	376	0.431
NPM-OH	363.2	0.376
NPM-APTES	342	0.793
NPM-3TMPM	330	0.485
NPM-P4VP	396	0.770
NPM-P4VP'	396	0.778

El diámetro hidrodinámico de todas las nanopartículas estuvo en el rango de 330 y 400 nm. Las nanopartículas con mayor diámetro hidrodinámico fueron las P4VP y las P4VP' con un valor de 396 nm. En seguida fueron las NPM sin funcionalizar. Esto es debido principalmente a la dificultad para dispersarlas, aún por ultrasonificación. En seguida le siguieron las NPM-OH y NPM-APTES, con un valor de 363 y 342 nm respectivamente. Al funcionalizarlas con el polímero 3-trimetoxisilil propil metacrilato, obtuvimos el valor más pequeño de diámetro hidrodinámico con un valor de 330nm.

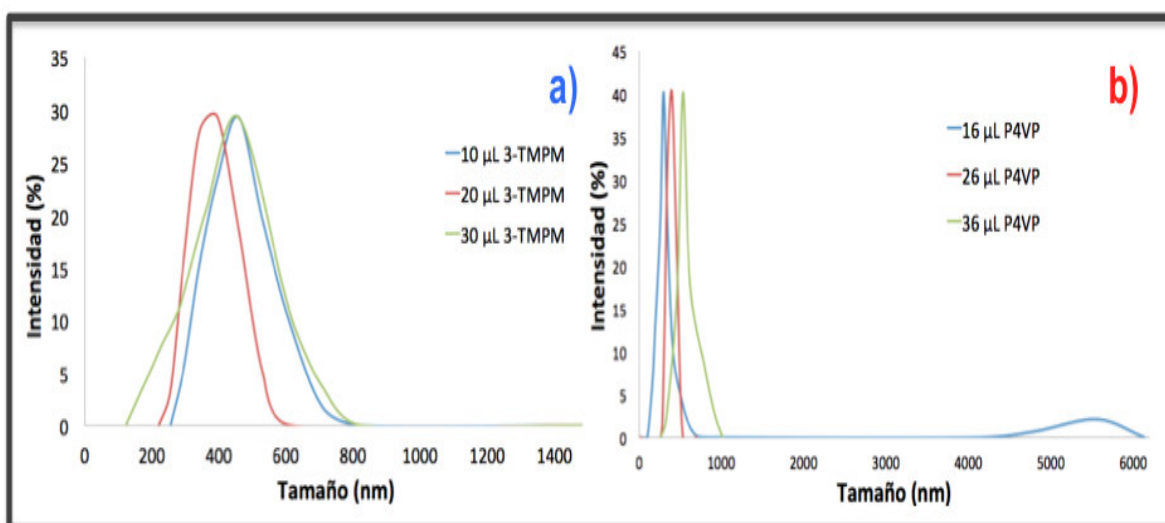
Por otro lado, debido a varios factores tales como la presencia de partículas grandes o aglomeraciones, la alteración del índice de refracción (es decir, por fluorescencia de la muestra) o la absorción de la luz láser incidente (muestras coloreadas), los resultados son inválidos debido a que no cumplen con los criterios de calidad. Las nanopartículas que son utilizadas en esta investigación son de un color café oscuro, por lo que presenta una absorción de luz del láser haciendo que las muestras no se cumplan los criterios de calidad de acuerdo a esta técnica. Un PDI mayor a 0.2 nos indica una distribución amplia de tamaño, o la influencia de alguno de los factores mencionados, por lo que a partir de la utilización de otras técnicas como el SEM o STEM, se puede llegar a tener una mejor visión del tamaño real.

En la FIGURA 2.11 podemos determinar que las NPM con una menor dispersión de tamaño fueron las funcionalizadas, es decir, 3TMPM, P4VP y P4VP' indicándonos que no varía en su tamaño hidrodinámico a comparación de, por ejemplo, NPM-APTES, la cual presenta una distribución mayor. La reacción con APTES da como resultado productos inestables que se aglomeran si no se realizan reacciones ulteriores como la incorporación de grupos funcionales adicionales, como los polímeros en este trabajo.

Los valores de diámetro hidrodinámico en este trabajo se encontraron entre 330nm y 400nm, siendo comparables con lo observado en la literatura para NPs magnéticas con diámetros sólidos inferiores a 100 nm, los cuales presentan diámetros hidrodinámicos de entre 100-600 nm [31, 34].

### 2.2.3 Efecto de concentración de polímero en DLS:

También se determinó el tamaño hidrodinámico de las NPM-3TMPM Y NPM-P4VP a diferentes concentraciones de polímero, 10, 20 y 30  $\mu\text{L}$  de 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato y 16, 26 y 36  $\mu\text{L}$  de Poli(4-vinilpiridina). Esto para optimizar, tanto la absorción, como la liberación del medicamento. Entonces se muestran aquí las gráficas de intensidad contra tamaño hidrodinámico obtenida de los resultados de las pruebas de DLS (FIGURA 2.12), así como una tabla (TABLA 2.3) con sus valores correspondientes:



**FIGURA 2.12.** Comparación de la distribución del Tamaño hidrodinámico de diferentes concentraciones de a) NPM-3TMPM y b) NPM-P4VP en una solución de buffer de fosfatos a un pH de 7,4 y fuerza iónica de 3mM.

**TABLA 2.3.** Distribución del Tamaño hidrodinámico de NPM-3TMPM y NPM-P4VP a diferentes concentraciones de polímero en una solución de buffer de fosfatos a un pH de 7,4 y fuerza iónica DE 3mM

NP	DLS Tamaño (nm)	PDI
<b>NPM-3TMPM 10</b>	458	0.528
<b>NPM-3TMPM 20</b>	396	0.485
<b>NPM-3TMPM 30</b>	458	0.590
<b>NPM-P4VP 16</b>	295	0.463
<b>NPM-P4VP 26</b>	396	0.664
<b>NPM-P4VP 36</b>	531	0.331

En la FIGURA 2.12 a) se observa la distribución de tamaño de las NPM-3TMPM a concentraciones de polímero de 10, 20 y 30  $\mu\text{L}$ . Los tamaños varían de 458nm, 386nm y 458nm respectivamente, teniendo valores de PDI altos. Para este tipo de nanopartículas, los valores de PDI fueron también altos [c]. Ahora bien, podemos percatarnos que las NPM-3TMPM10 y NPM-3TMPM30 son las que tienen una curva más ancha, por lo que la distribución de tamaño es grade, siendo las NPM-3TMPM30 las que tienen una distribución de tamaño mayor. Las nanopartículas que tiene una mejor distribución de tamaño más estable y menor son las NPM-3TMPM26.

Por otro lado, en la FIGURA 2.12 b) se observa la distribución de tamaño de las NPM-P4VP a concentraciones de polímero de 16, 26 y 36  $\mu\text{L}$ . Los tamaños, para este caso, variaron de 295nm, 396nm, y 531nm respectivamente. Observando las NPM-P4VP16 notamos dos picos, en los cuales nos indican que existen dos familias de NPM. Como se mencionó anteriormente en los distintos pasos de la síntesis de NPM, las reacciones se realizaban, ya sea con una agitación mecánica o sin ésta, teniendo en cuenta que no se utiliza un agitador magnético. Para el caso de la síntesis de NPM-P4VP16 se decidió realizar la agitación en la reacción de polimerización utilizando un agitador magnético. Esto nos resultó contraproducente, ya que se forman dos poblaciones de NPM-P4VP16 con tamaños distintos, 295nm y 556nm. Las NPM-P4VP16 y NPM-P4VP36 presentan la mayor distribución de tamaño. La curva de las NPM-P4VP26 indica la menor polidispersidad.

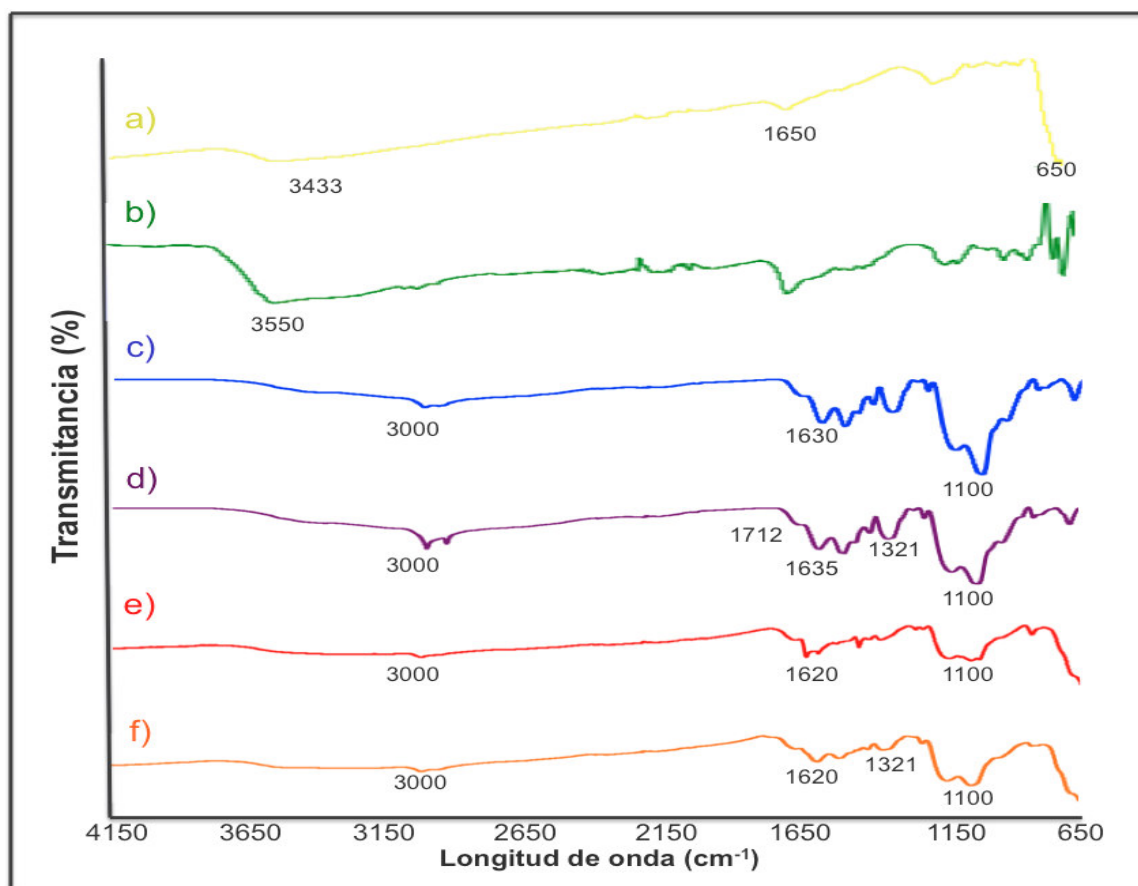
#### **2.2.4 FT-IR: Acoplamiento de grupos funcionales**

La espectroscopía infrarroja (IR) acoplada a ATR (reflectancia total atenuada) permite verificar el acoplamiento superficial de los diferentes grupos funcionales específicos de los compuestos utilizados en las diferentes etapas de funcionalización.

Se utilizó el ATR ya que éste tiene como ventajas la simplicidad de la preparación de la muestra, bajo consumo de material, no se requiere preparación adicional, su limpieza es rápida y fácil, y además, las muestras se miden en su estado natural.



Los espectros obtenidos para cada muestra son presentados en la FIGURA 2.11, señalando los picos más relevantes para mayor claridad.



**FIGURA 2.13** Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier acoplado a ATR para a) NPM, b) NPM-OH, c) NPM-APTES, d) NPM-3TMPM, e) NPM-P4VP, f) NPM-P4VP'.

Para el espectro de NPM (nanopartículas magnéticas) (FIGURA 2.13 a)) podemos encontrar las bandas en 650-630  $\text{cm}^{-1}$  representativas de la vibración del enlace Fe-O [35], así como las bandas en 1650  $\text{cm}^{-1}$  y 3433  $\text{cm}^{-1}$  también representativas de ese enlace.

En el espectro de NPM-OH (FIGURA 2.13 b)) se observa la banda característica del enlace -OH en aproximadamente 3550  $\text{cm}^{-1}$ , comprobando así que existe el acoplamiento del grupo hidroxilo en la superficie de las NPs después de la activación con NaOH. Esta banda disminuye considerablemente la funcionalización de NPM-APTES, NPM-3TMPM, NPM-P4VP y NPM-P4VP', debido a la reacción de los hidroxilos con el APTES para acoplar los aminosilanos.

Para NPM-APTES (FIGURA 2.13 c)), la región entre 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones simétricas y asimétricas del enlace C-H. En la región entre 1680-1620  $\text{cm}^{-1}$ , la banda a 1630  $\text{cm}^{-1}$  es característica del enlace N-H. La banda en 1100  $\text{cm}^{-1}$  representa el estiramiento del enlace Si-O [36].

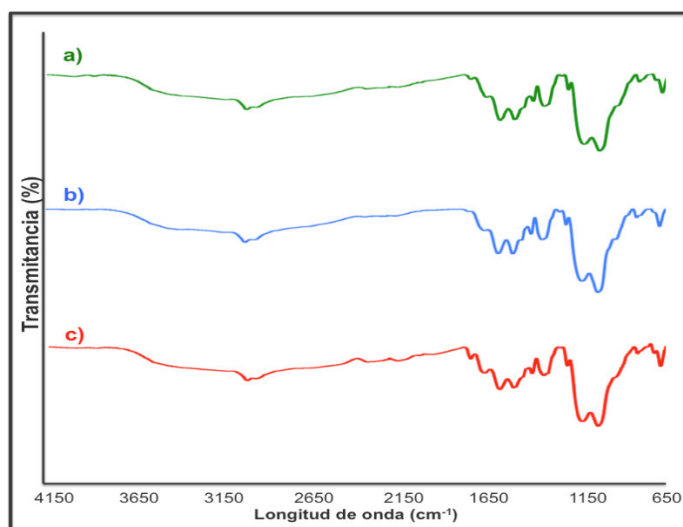
Para NPM-3TMPM (FIGURA 2.13 d)), encontramos las bandas del enlace C=O a 1712  $\text{cm}^{-1}$ , C=C a 1635  $\text{cm}^{-1}$ , C-O a 1321  $\text{cm}^{-1}$  y C-H a 3000-2900  $\text{cm}^{-1}$ , por ser un compuesto de tipo éster [37]. De igual forma encontramos a 1100  $\text{cm}^{-1}$  el pico específico de Si-O un poco más largo que en el espectro de NPM-APTES, ya que ese enlace, para este caso es proporcionado, tanto por el compuesto (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES) y el polímero ramificado 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato (3-TMPM). De igual manera encontramos la banda del enlace N-H en 1630  $\text{cm}^{-1}$  proveniente del APTES, comprobando así un buen acoplamiento.

En el espectro de NPM-P4VP (FIGURA 2.13 e)), específico de Poli(4-vinilpiridina) (polímero lineal) encontramos dos bandas características, la banda 1620  $\text{cm}^{-1}$  atribuida específicamente a la piridina [38] y la banda a 1100  $\text{cm}^{-1}$  específico del enlace Si-O. Con esto se comprueba un buen acoplamiento tanto del APTES, así como del P4VP.

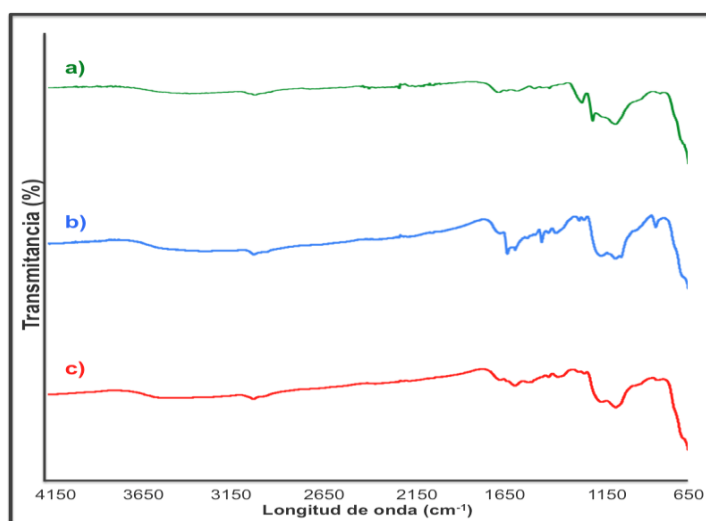
Finalmente, en el espectro de NPM-P4VP' (FIGURA 2.13 f)), el cual comprende las reacciones de 3-TMPM y P4VP, logramos observar un ligero incremento de las bandas entre 3000 $\text{cm}^{-1}$  y 2900 $\text{cm}^{-1}$  relacionadas con las vibraciones de C-H  $\text{cm}^{-1}$ , así como de las bandas C=O a 1712  $\text{cm}^{-1}$ , C=C a 1635  $\text{cm}^{-1}$ , C-O a 1321  $\text{cm}^{-1}$ , siendo esta prueba del éster del compuesto 3-TMPM. De igual forma encontramos a 1100  $\text{cm}^{-1}$  el pico específico del enlace Si-O, siendo este considerablemente más largo en el espectro f) de NPM-P4VP' que para el espectro e) de NPM-P4VP debido a la presencia del compuesto 3-TMPM. También encontramos la banda 1620  $\text{cm}^{-1}$  atribuida específicamente a la piridina, siendo está un poco menos notoria que en la NPM-P4VP.

## 2.2.5 Efecto de concentración de polímero en FT-IR:

Para optimizar las concentraciones de NPM-3TMPM y NPM-P4VP, se probaron los siguientes volúmenes de reacción: 10, 20 y 30  $\mu\text{L}$  de 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato y 16, 26 y 36  $\mu\text{L}$  de Poli(4-vinilpiridina). Los espectros de FT-IR para NPM-3TMPM son mostrados en la FIGURA 2.14 y para NPM-P4VP son mostrados en la FIGURA 2.15 con el fin de comparar los espectros en cada figura.



**FIGURA 2.14** Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier acoplado a ATR para de NPM-3TMPM a diferentes concentraciones de polímero, a) 10 $\mu\text{L}$ , b) 20 $\mu\text{L}$  y c) 30 $\mu\text{L}$  de 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato.



**FIGURA 2.15** Espectros de infrarrojo con transformada de Fourier acoplado a ATR para de NPM-P4VP a diferentes concentraciones de polímero, a) 16 $\mu\text{L}$ , b) 26 $\mu\text{L}$  y c) 36 $\mu\text{L}$  de Poli(4-vinilpiridina).

En la FIGURA 2.14 se puede observar para el polímero 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato que todas las bandas características son concordantes a las ya explicadas anteriormente. Igualmente se observa que no existen diferencias significativas en la intensidad de los espectros, indicando que las concentraciones analizadas no generan cambios apreciables en la estructura final de los nanocompuestos. Esto puede ser debido a que en todos los casos anteriores el precursor del polímero se encuentra ya en exceso, mientras que la superficie de la partícula es limitada.

En la FIGURA 2.15, a diferencia de los espectros de NPM-3TTPM (FIGURA 2.12), se observaron diferencias significativas como efecto de los diferentes volúmenes de reacción. En el caso del espectro FT-IR de NPM-P4VP16 se pueden percibir algunas bandas muy pequeñas, sin embargo, no se logran observar las bandas características del polímero Poli(4-vinilpiridina). En cambio, en los espectros de las NPM-P4VP26 y NPM-P4VP36 si se logran observar las bandas características ya mencionadas anteriormente. Comparando estos dos espectros, observamos que el que tiene mejor definidas las bandas características es el de las NPM-P4VP26. Esto demuestra que con un exceso de reactivo no se logra polimerizar de manera correcta el compuesto en la superficie de las nanopartículas.

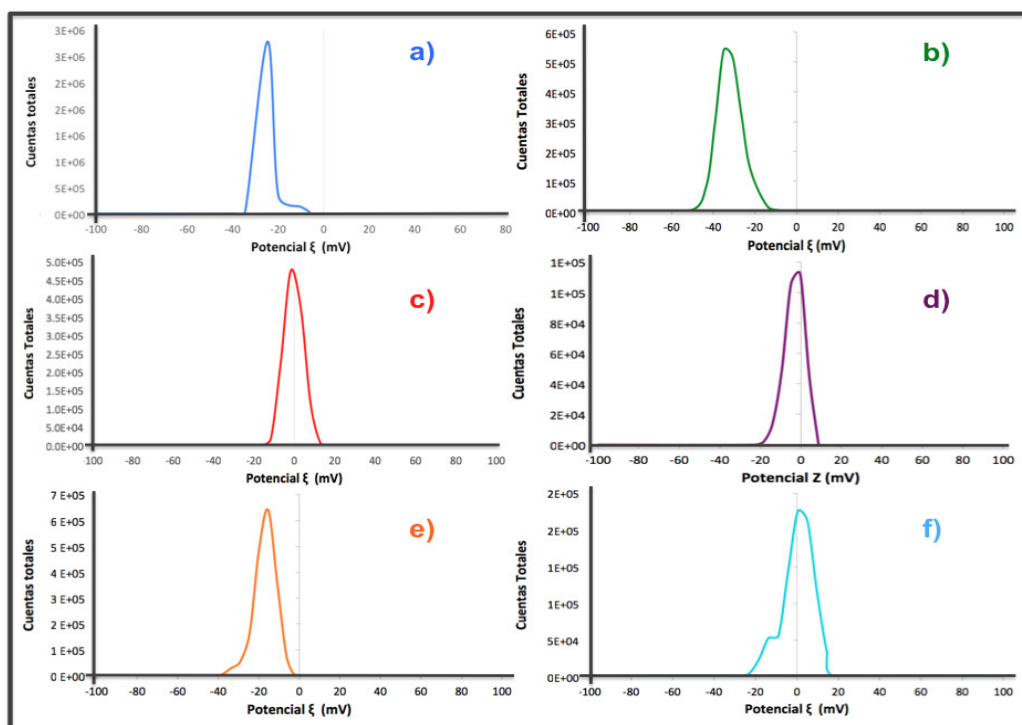
### **2.2.6 LDE: Potencial $\xi$**

Finalmente, la electroforesis laser-doppler (LDE) también se realizó en un equipo zetasizer para estimar el potencial  $\zeta$  para las nanopartículas en cada una de las etapas de funcionalización. Los valores diferentes después de cada etapa de reacción también pueden representar un indicio de que existe una funcionalización adecuada.

El potencial  $\xi$  nos indica la carga superficial de las NPs, lo cual puede ser relacionado con el grado de repulsión electrostática existente entre ellas. Los valores relativos de potencial  $\xi$  mayores a 30mV, son comúnmente considerados como capaces de brindar estabilidad coloidal a las nanopartículas mediante repulsiones electrostáticas. Es posible también obtener estabilidad coloidal de nanopartículas con valores de potencial  $\xi$  entre -30mV y 30mV, tratándose de un mecanismo de estabilización mediante repulsiones

estéricas. Entonces, de manera indirecta, los valores de potencial  $\xi$  nos indican el grado de estabilidad de las nanopartículas en suspensiones.

Los valores del potencial  $\xi$  obtenidos se muestran en la tabla (TABLA 2.4), así como en la FIGURA 2.16 agrupando de esta manera los resultados para facilitar su descripción.



**FIGURA 2.16. Valores de potencial  $\xi$  a) NPM, b) NPM-OH, c) NPM-APTES, d) NPM-3TMPM, e) NPM-P4VP y f) NPM-P4VP' en una solución de buffer de fosfatos a un pH de 7,4 y fuerza iónica 3mM.**

**TABLA 2.4. Valor de potencial  $\xi$  de NPM, NPM-OH, NPM-APTES, NPM-3TMPM, NPM-P4VP, NPM-P4VP' en una solución de buffer de fosfatos a un pH de 7,4 y fuerza iónica DE 3mM.**

NP	Potencial $\xi$ (mV)
NPM	-19
NPM-OH	-35
NPM-APTES	-1,79
NPM-3TMPM	0.334
NPM-P4VP	-15
NPM-P4VP'	0.457

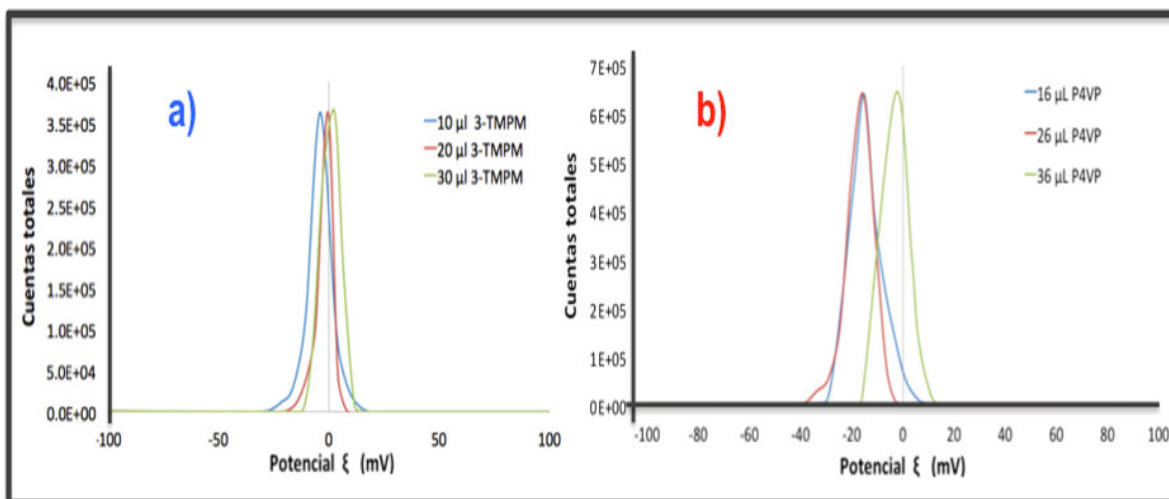
En varios estudios, se informó de una diferenciación clara en los valores de potencial zeta de nanopartículas recubiertas y no recubiertas, con valores de potencial zeta altamente negativos para nanopartículas no recubiertas y valores de potencial zeta menos negativos, neutros o positivos para nanopartículas recubiertas dependiendo de la sustancia unida a la

superficie. El recubrimiento de nanopartículas con algunos polímeros anfífilicos normalmente disminuye el potencial zeta, debido a que las capas de revestimiento protegen la carga superficial. Entonces, las mediciones de potencial zeta también son un indicativo de la incorporación de nuevos grupos funcionales alrededor de las NPs.

Observando la tabla (TABLA 2.4) y la FIGURA 2.16, los valores de potencial  $\xi$  más negativos fueron los de a) NPM (sin funcionalizar), b) NPM-OH y e) NPM-P4VP. Los valores fueron de -19mV, -35mV y -15mV respectivamente. Estos resultados son concordantes con los valores de potencial  $\xi$  de nanopartículas comparadas en diferentes estudios para nanopartículas sin recubrimiento polimérico [39]. El valor de -35mV dado por las NPM-OH es mayor al de las NPM sin funcionalizar debido a la carga más negativa que proporciona el grupo OH. El valor para NPM-P4VP de -15mV es debido al grupo funcional de 4-vinilpiridina. Ahora, para las demás nanopartículas, c) NPM-APTES, d) NPM-3TMPM y f) NPM-P4VP', obtenemos resultados de potencial  $\xi$  más neutros, de entre -1.48mV a 0.46mV. Estos resultados son igualmente concordantes con los valores de potencial  $\xi$  de nanopartículas comparadas en diferentes estudios para nanopartículas con recubrimiento polimérico donde dicen que disminuye el valor debido a que las capas de revestimiento protegen la carga superficial.

### **2.2.7 Efecto de concentración de polímero en LDE:**

También se determinó el potencial  $\xi$  de las NPM-3TMPM Y NPM-P4VP a diferentes concentraciones de polímero, 10, 20 y 30  $\mu$ L de 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato y 16, 26 y 36  $\mu$ L de Poli(4-vinilpiridina), como en el caso del tamaño hidrodinámico. Entonces se muestran aquí las gráficas en la FIGURA 2.17 de intensidad contra tamaño hidrodinámico obtenidas mediante LDE, así como una TABLA 2.5 con los valores para cada uno.



**FIGURA 2.17.** Comparación del potencial  $\xi$  de diferentes concentraciones de NPM-3TMPM (izquierda) y NPM-P4VP (derecha) en una solución de buffer de fosfatos a un pH de 7,4 y fuerza iónica de 3mM.

**TABLA 2.5.** Valores de potencial  $\xi$  de NPM-3TMPM y NPM-P4VP a diferentes concentraciones de polímero en una solución de buffer de fosfatos a un pH de 7,4 y fuerza iónica DE 3mM.

NP	Potencial $\xi$ (mV)
NPM-3TMPM 10	-3.84
NPM-3TMPM 20	-0.335
NPM-3TMPM 30	2.7
NPM-P4VP 16	-15.1
NPM-P4VP 26	-15.4
NPM-P4VP 36	2.9

En la gráfica a) de la FIGURA 2.17 observamos los valores de potencial  $\xi$  de las NPM-3TMPM a concentraciones de polímero de 10, 20 y 30  $\mu\text{L}$  son de un valor neutro. Estos resultados son concordantes con valores de potencial  $\xi$  para nanopartículas recubiertas como ya se mencionó anteriormente [31, 34].

En la gráfica b) de la FIGURA 2.17 se observan los valores de potencial  $\xi$  de NPM-P4VP a concentraciones de polímero de 16, 26 y 36  $\mu\text{L}$ , con valores entre -15.1mV, -15.4mV, y 2.9mV, respectivamente, concordantes también con valores para nanopartículas recubiertas.

## 2.3 CONCLUSIONES PARCIALES CAPÍTULO II.

Se verificaron y optimizaron mediante estudios de microscopía SEM y STEM, DLS, LDE y espectrometría FT-IR las condiciones de reacción para obtener NPM funcionalizadas con un polímero lineal (NPM-P4VP), uno ramificado (NPM-3TTPM), y uno mixto (P4VP').

Mediante SEM y STEM no se observaron diferencias significativas ni en morfología ni tamaño después de cada etapa de funcionalización. Esto puede ser debido a la presencia de capas delgadas de las moléculas funcionalizantes. Por otro lado, a reserva de factores como la composición, estado de agregación, grupos funcionales en la superficie, dureza del material, etc., su método de eliminación del cuerpo podría ser llevado a cabo por el sistema fagocito mononuclear [40].

Por otro lado, los valores obtenidos de diámetro hidrodinámico y PDI fueron muy elevados para todas las muestras. Esto es debido a distintos factores presentes en las muestras que pueden alterar las mediciones mediante DLS, notablemente la absorción elevada de la luz del láser incidente. Eso invalida los valores numéricos, y en este trabajo se conservan sólo como indicativos de la realización de cada etapa de reacción.

Mediante las mediciones de potencial  $\zeta$  se predijo buena estabilidad coloidal por medio de repulsiones electrostáticas o estéricas.

La caracterización de por medio de espectrometría de infrarrojo ayudó a demostrar la presencia de las moléculas esperadas después de cada reacción, comprobando cada una de las etapas de funcionalización alrededor de las nanomagnetitas.

Mediante esas técnicas se logró determinar la concentración óptima de NaOH para la etapa de hidroxilación, siendo 50mM (menor tamaño hidrodinámico (360nm) y mayor valor de potencial  $\zeta$  (-35mV)). No se observaron efectos significativos de las concentraciones de precursores para la formación del polímero ramificado (NPM-3TTPM),



pues no existieron diferencias significativas en la intensidad de los espectros. De otro modo, para la implementación del polímero lineal (NPM-P4VP) si se observó efecto de ese parámetro, ya que con un exceso o falta de reactivo no se logra polimerizar de manera correcta el compuesto en la superficie de las nanopartículas. Las mejores concentraciones de precursores para la polimerización fueron 20 $\mu$ L del polímero ramificado 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato y 26 $\mu$ L de Poli(4-vinilpiridina).

Durante la etapa de polimerizaciones, el control de la temperatura fue también indispensable para evitar la formación de productos no deseados.

Los productos obtenidos en esta etapa del trabajo son prometedores para la aplicación de acarreamiento controlado de fármacos, por lo que sus propiedades de captura y liberación deben ser estudiados.

## 2.4 REFERENCIAS CAPÍTULO II.

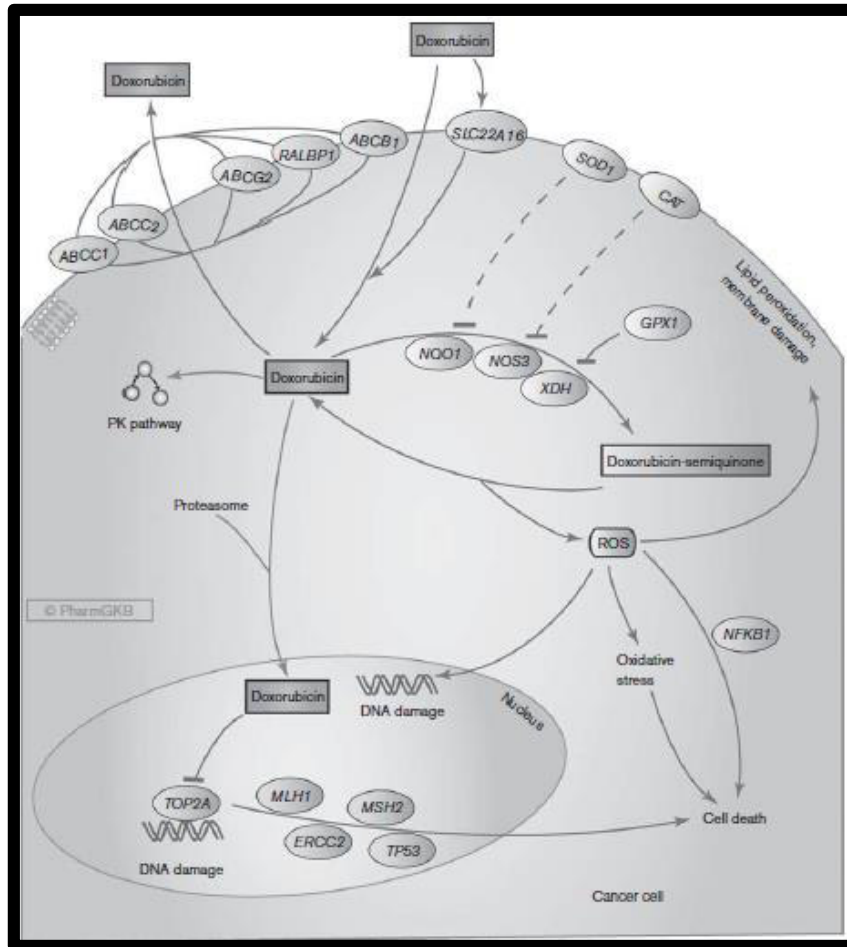
- [31] Rafi, A. A., Mahkam, M., Davaran, S., & Hamishehkar, H. (2016). A smart pH-responsive nano-carrier as a drug delivery system: a hybrid system comprised of mesoporous nanosilica MCM-41 (as a nano-container) & a pH-sensitive polymer (as smart reversible gatekeepers): preparation, characterization and in vitro release studies of an anti-cancer drug. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, 64-73.
- [32] Marven Instruments. (2003). Size Theory. *En Zetasizer Nano Series User Manual*(1-6). Reino Unidos: Marven Instruments.
- [33] Cook, R. J., Fearn, H., & Milonni, P. W. (1995). Fizeau's experiment and the Aharonov-Bohm effect. *American Journal of Physics*, 63(8), 705-710.
- [34] Reger, N. A., Meng, W. S., & Gawalt, E. S. (2017). Surface modification of PLGA nanoparticles to deliver nitric oxide to inhibit *Escherichia coli* growth. *Applied Surface Science*, 401, 162-171.
- [35] Raman, A., Kuban, B., & Razvan, A. (1991). The application of infrared spectroscopy to the study of atmospheric rust systems—I. Standard spectra and illustrative applications to identify rust phases in natural atmospheric corrosion products. *Corrosion Science*, 32(12), 1295-1306.
- [36] Sharma, R. K., Sharma, S., Gulati, S., & Pandey, A. (2013). Fabrication of a novel nano-composite carbon paste sensor based on silica-nanospheres functionalized with isatin thiosemicarbazone for potentiometric monitoring of Cu<sup>2+</sup> ions in real samples. *Analytical Methods*, 5(6), 1414-1426.
- [37] Apperley, D. C., Evans, P. J., Slade, R. C., Varcoe, J. R., & Young, K. E. (2000). Realisation of ORMOSIL ionomers by the crosslinking of propyl methacrylate siloxane and a protected styrenesulfonic acid. *Journal of Materials Chemistry*, 10(4), 849-858.
- [38] Rodrigues, A. S., Aguiar, A. P. D., de Aguiar, M. R., & Santa Maria, L. C. D. (2007). Quaternization reaction of 2-vinylpyridine and 4-vinylpyridine network copolymers for 4-nitrophenol adsorption. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(2), 431-436.
- [39] Doane, T. L., Chuang, C. H., Hill, R. J., & Burda, C. (2011). Nanoparticle  $\zeta$ -potentials. *Accounts of chemical research*, 45(3), 317-326.
- [40] Chowdhury, S., Yusof, F., Salim, W. W. A. W., Sulaiman, N., & Faruck, M. O. (2016). An overview of drug delivery vehicles for cancer treatment: nanocarriers and nanoparticles including photovoltaic nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 164, 151-159.

# **CAPÍTULO III: Estudio de propiedades electroquímicas de Doxorubicina.**

### 3.1 DOXORUBICINA.

El compuesto “Doxorubicina” es un antibiótico de antraciclina extraído de *Streptomyces peucetius var. Casius* en los años de 1970 [41]. Este principio activo es utilizado en el tratamiento por quimioterapia para tratar enfermedades como: leucemia, sarcoma de hueso, cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, cáncer de hígado, riñón, ovarios, tiroides, vejiga, pulmón, sarcoma de tejido blando, de células transicionales, sarcoma uterino, tumor de Wilms y macroglobulinemia de Waldenström [42].

Hay dos mecanismos propuestos por los cuales la doxorubicina (Dox) actúa en la célula cancerosa (FIGURA 3.1): (i) la intercalación en el ADN y la interrupción de la reparación del ADN mediada por topoisomerasa II y (ii) la generación de radicales libres y su daño a las membranas celulares, ADN y proteínas [43]. La doxorubicina se oxida para formar la semiquinona, un metabolito inestable, que se convierte de nuevo en doxorubicina en un proceso que libera especies reactivas de oxígeno. Las especies de oxígeno reactivo pueden conducir a la peroxidación de lípidos y daño a la membrana, daño al ADN, estrés oxidativo y desencadena vías apoptóticas de muerte celular [44]. Alternativamente, la doxorubicina puede ingresar al núcleo y envenenar la topoisomerasa-II, lo que también da como resultado daño en el ADN y muerte celular [45].

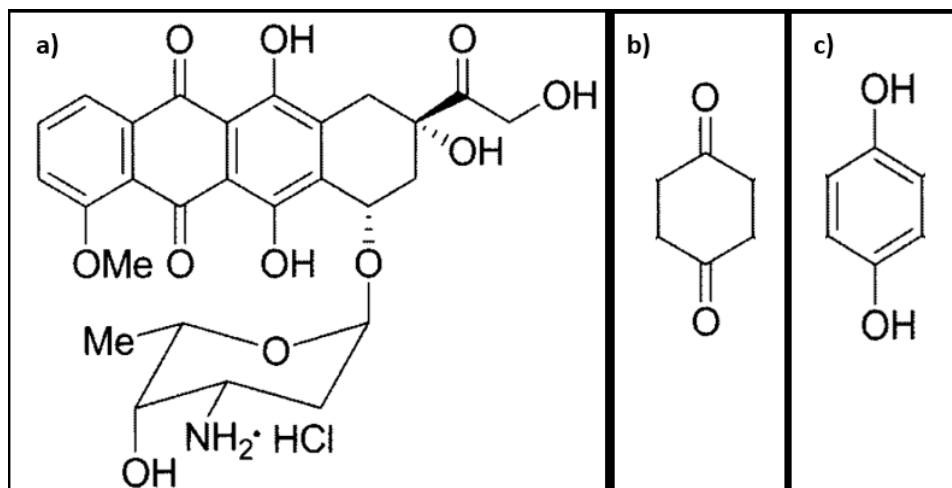


**FIGURA 3.1** Representación gráfica de la farmacodinámica de la Doxorubicina en una célula cancerígena [41].

La Dox es un vesicante (sustancia química que causa daño extenso a los tejidos y formación de ampollas si se escapa de la vena) que por su toxicidad tiene efectos secundarios adversos como: mielosupresión grave y mucositis en la mayoría de los casos, así como náuseas, vómitos, alopecia y ocasionalmente casos de insuficiencia cardíaca congestiva [42].

Los métodos convencionales de detección de Dox son mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [46], electroforesis capilar [47], detección fluorimétrica [48], espectroscopia de masas [49], y electroquímicamente [50]; siendo las primeras dos las más utilizadas.

En la FIGURA 3.2 a) encontramos la estructura química de Dox. En ella podemos observar que tiene en su estructura la molécula de la quinona mostrada en la imagen b) y la hidroquinona mostrada en la imagen c). Ambas moléculas tienen la capacidad de participar en una reacción de óxido-reducción. Por tal razón, resulta ser una especie electroactiva capaz de ser estudiada mediante técnicas electroquímicas como voltametría cíclica y voltametría de onda cuadrada.



**FIGURA 3.2** a) Estructura de la Doxorubicina hidroclicorada. b) Estructura de la quinona. c) Estructura de la hidroquinona.

## 3.2 METODOLOGÍA.

### 3.2.1 Voltamperometría Cíclica.

Primeramente, se realizó una prueba de V.C. para determinar la electroactividad del fármaco modelo Dox. Se identificarán todos los picos de oxidación y reducción, y se asignó a que parte de la molécula corresponden cada uno de ellos.

Se utilizó una solución de Dox en un medio electrolítico de buffer citratos a pH 6 con una fuerza iónica (F.I.) de 100 mM a una concentración de 100  $\mu$ M. Se determinó una ventana de potencial de -1 V a 1 V, con una velocidad de barrido de 50 mV/s. La celda electroquímica estuvo constituida por un electrodo de trabajo de carbón vitreo, como electrodo de referencia uno de plata / cloruro de plata (Ag/AgCl) y como contraelectrodo uno de platino.

Se analizó como blanco la V.C. de la solución del mismo buffer citratos sin Dox bajo las mismas condiciones.

### **3.2.2 Voltamperometría de Onda Cuadrada.**

Con base en los resultados de la V.C., se realizó el estudio mediante V.O.C. Se utilizaron disoluciones de Dox preparadas bajo las mismas condiciones que para V.C. Se utilizarán como parámetros un voltaje de -1 V a 1 V, un potencial de pulso ( $\Delta E_{sw}$ ) de 35 mV, un potencial de paso ( $\Delta E_s$ ) de 5 mV, y una frecuencia de 80 Hz. De igual manera se realizó la V.O.C. de una disolución blanco.

### **3.2.3 Cuantificación de Dox a distintos pHs.**

Se realizarán pruebas de V.O.C. para distintas concentraciones y diferentes valores de pH (1, 4, 6 y 7,4). Cabe mencionar nuevamente que se eligieron estos valores ya que a un pH aproximado de 6 se encuentra la pared celular de un tumor cancerígeno [51], los lisosomas en un tumor cancerígeno se encuentran a un pH aproximado de 4 [52], y el pH fisiológico es de 7,4. Mediante las curvas de calibración se determinó la ecuación de la recta que permitirá la determinación de las concentraciones de Dox en los estudios de inserción y liberación del fármaco. Las soluciones que se utilizaron para pH 1 son HCl 0.1M, para pH 4 una solución de buffer citratos, para pH 6 igualmente una solución de buffer citratos, y para pH 7,4 una solución de buffer fosfatos, todas a una fuerza iónica de 100 mM. Cada prueba se comenzó con una solución del buffer al pH específico y se combinó con el principio activo para tener una concentración de 80  $\mu$ M. Mediante diluciones sucesivas se prepararon concentraciones de 80, 60, 50, 40, 20, 10, 1 y 0 nM de Dox. Que fueron posteriormente analizadas mediante V.O.C. Se trabajó a un voltaje de -1 V a 1 V, un potencial de pulso ( $\Delta E_{sw}$ ) de 35 mV, un potencial de paso ( $\Delta E_s$ ) de 5 mV, y una frecuencia de 80 Hz.

Posteriormente se obtuvieron las curvas de calibración correspondientes graficando el pico de corriente máximo ( $I_p$ ) correspondiente a la reducción de la quinona, contra el valor de la concentración. Asimismo, se obtuvieron los límites de cuantificación (LOQ) y de detección (LOD) mediante las ecuaciones Ec. 3.1 y Ec. 3.2 respectivamente.

$$\text{Ec. 3.1} \quad \text{Límite de cuantificación (LOQ)} = \frac{10 S_{blc}}{P}$$

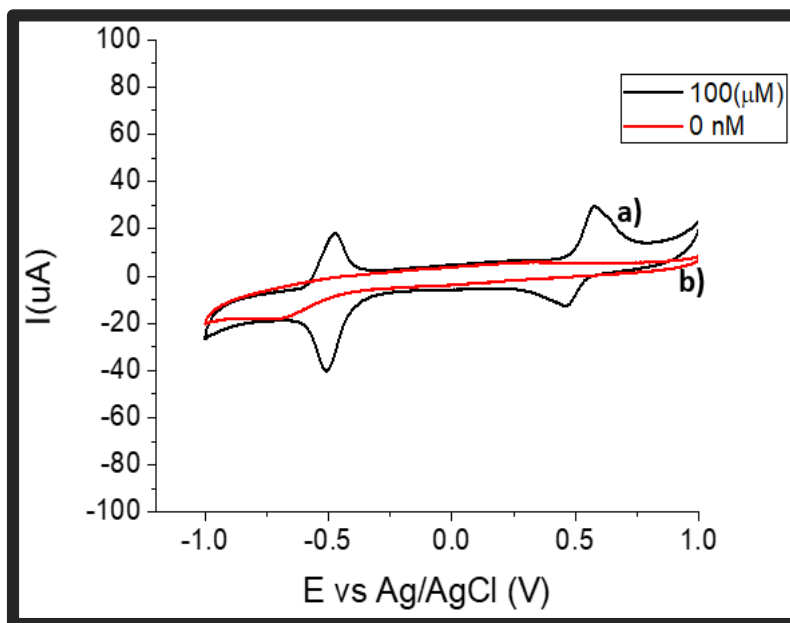
$$\text{Ec. 3.2} \quad \text{Límite de detección (LOD)} = \frac{3 S_{blc}}{P}$$

Donde  $S_{blc}$  es la desviación estándar del blanco y  $P$  es la pendiente de la curva de calibración

### 3.3 RESULTADOS.

#### 3.3.1 Voltamperometría Cíclica.

En la FIGURA 3.3 se muestra el voltamperograma de a) la solución con el fármaco y b) sin el fármaco con el objetivo de identificar los picos de corriente específicos de la Dox.

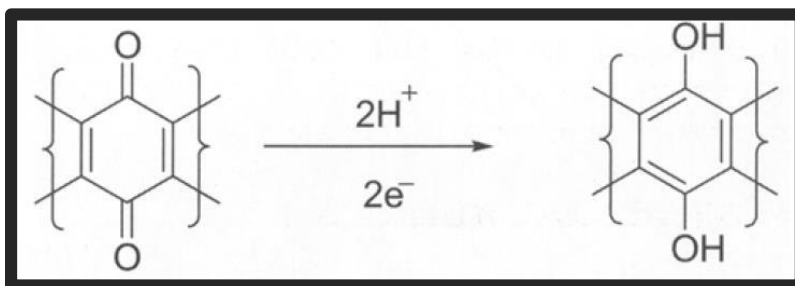


**FIGURA 3.3** a) voltamperograma de la solución de Dox a  $100 \mu\text{M}$  en buffer citratos a una F.I. de  $100 \text{ mM}$  y un  $\text{pH}$  de 6. b) voltamperograma de la solución buffer citratos citratos a una F.I. de  $100 \text{ mM}$  y un  $\text{pH}$  de 6.



En la curva a) de la FIGURA 3.3 se observan dos sistemas reversibles a  $-0.5$  V y a  $+0.55$  V. En cambio, la curva b) de la misma figura no muestra ondas de oxidación o reducción.

El primer sistema reversible en aproximadamente  $-0.5$  V tiene la característica de un intercambio reversible de dos electrones con componentes oxidados y reducidos que son fuertemente adsorbidos en el electrodo. Este conjunto de ondas anódicas y catódicas se debe a la reducción reversible del centro de la quinona de la Dox a la hidroquinona y la reoxidación del resto de hidroquinona producida en la superficie del electrodo [53]. El mecanismo de electroreducción de se propone en la FIGURA 3.4 [54].



**FIGURA 3.4** Mecanismo de electroreducción de la benzoquinona en la molécula de Dox.

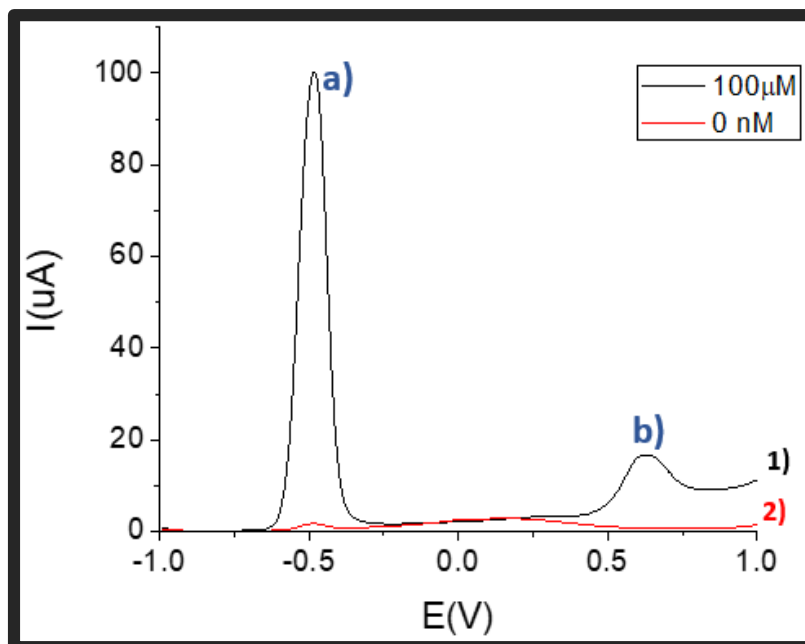
El segundo sistema reversible aproximadamente en  $+0.6$  V corresponde a la oxidación de la hidroquinona. Sin embargo, en los estados totalmente oxidados y totalmente reducidos, la doxorubicina contiene dos restos de quinona e hidroquinona idénticos, respectivamente. Entonces, uno esperaría un voltamograma cíclico simple de dos electrones. La respuesta observada puede explicarse suponiendo que los intermediarios de la semiquinona se estabilizan mediante enlaces de hidrógeno [55].

### 3.3.2 Voltimetría de onda cuadrada.

La principal ventaja de las técnicas voltamperométricas de pulso como la voltimetría de onda cuadrada, es su capacidad para discriminar la corriente de carga (capacitancia). Como resultado, las técnicas de pulso son más sensibles a las corrientes de oxidación o

reducción (corrientes faradaicas) que la voltametría cíclica. Por ello, esta técnica es preferida con fines de determinación de compuestos.

En la FIGURA 3.5 se muestra el voltamperograma de onda cuadrada de 1) la solución buffer con Dox a  $100 \mu\text{M}$  y 2) la solución buffer sin Dox.



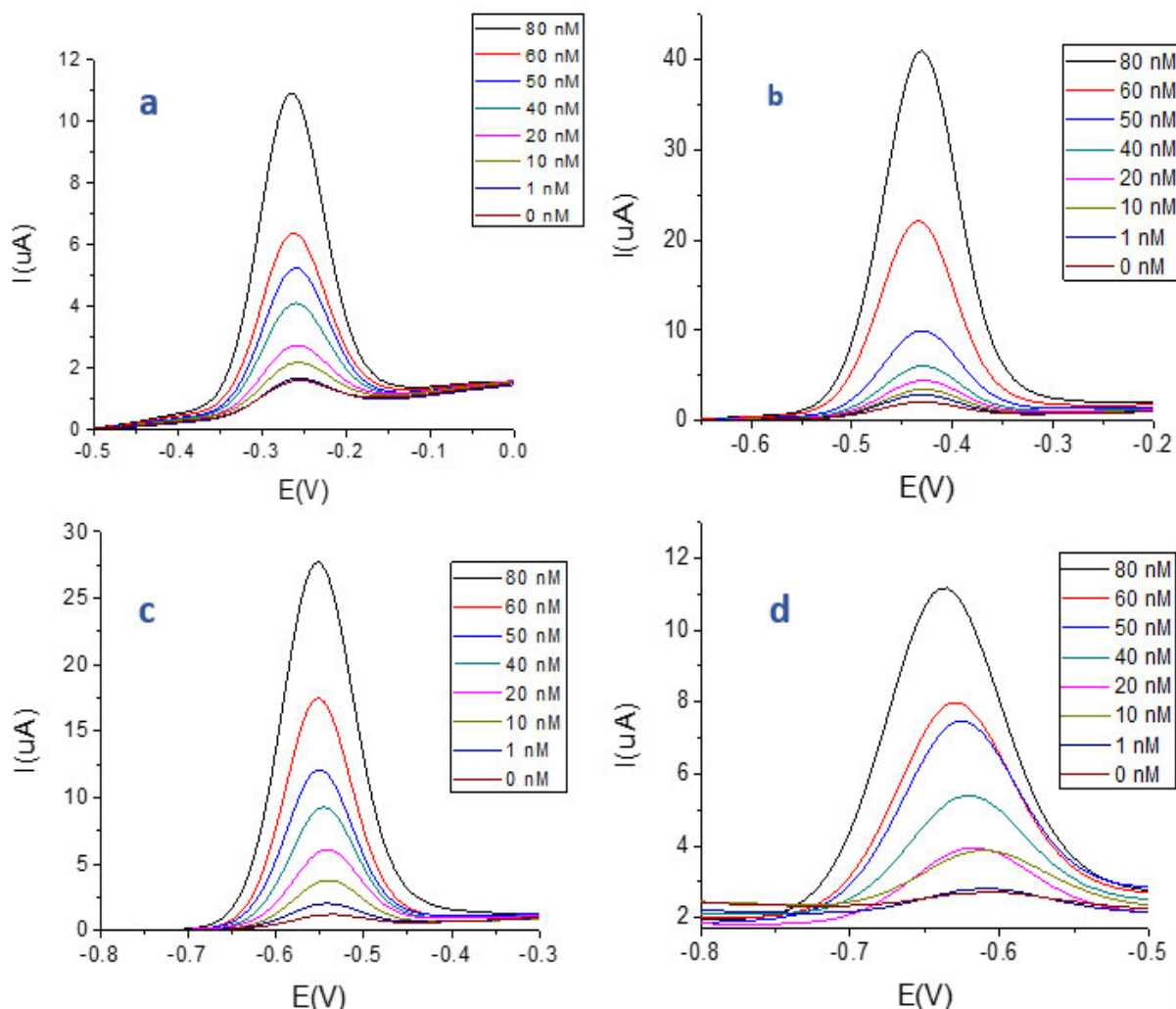
**FIGURA 3.5** 1) voltamperograma de la solución de Dox a  $100 \mu\text{M}$  en buffer citratos a una F.I. de  $100 \text{ mM}$  y un pH de 6. 2) voltamperograma de la solución buffer citratos a una F.I. de  $100 \text{ mM}$  y un pH de 6.

En la curva 2) de la FIGURA 3.5 no encontramos ningún pico de oxidación o reducción para este rango de voltaje, resultado esperado al no existir presencia del analito a cuantificar. En cambio, la curva 1) muestra dos picos definidos en a) a  $-0.5 \text{ V}$  y en b) a  $+0.55 \text{ V}$  proporcionados por el compuesto Dox. El pico a) con mayor corriente de  $95 \mu\text{A}$  corresponde a la reducción de la quinona y el pico b) a una corriente de  $16 \mu\text{A}$ , menor al pico a), corresponde a la oxidación de la hidroquinona.

Por ser el pico de la reducción de la quinona (a) mayor a la de la oxidación de la hidroquinona (b), la primera señal fue escogida para las pruebas de cuantificación de Dox a distintos pHs, logrando mejores límites de detección y cuantificación.

### 3.3.3 Cuantificación de Dox a distintos pHs.

En la FIGURA 3.10 se muestran los voltamogramas por V.O.C. de la detección de la reducción de la molécula quinona en Dox a diferentes concentraciones y en distintos valores de pH.



**FIGURA 3.6** Voltamperogramas de V.O.C. de Dox a una concentración de 80 nM a 0 nM a pH de a) 1, b) 4, c) 6 y d) 7,4.

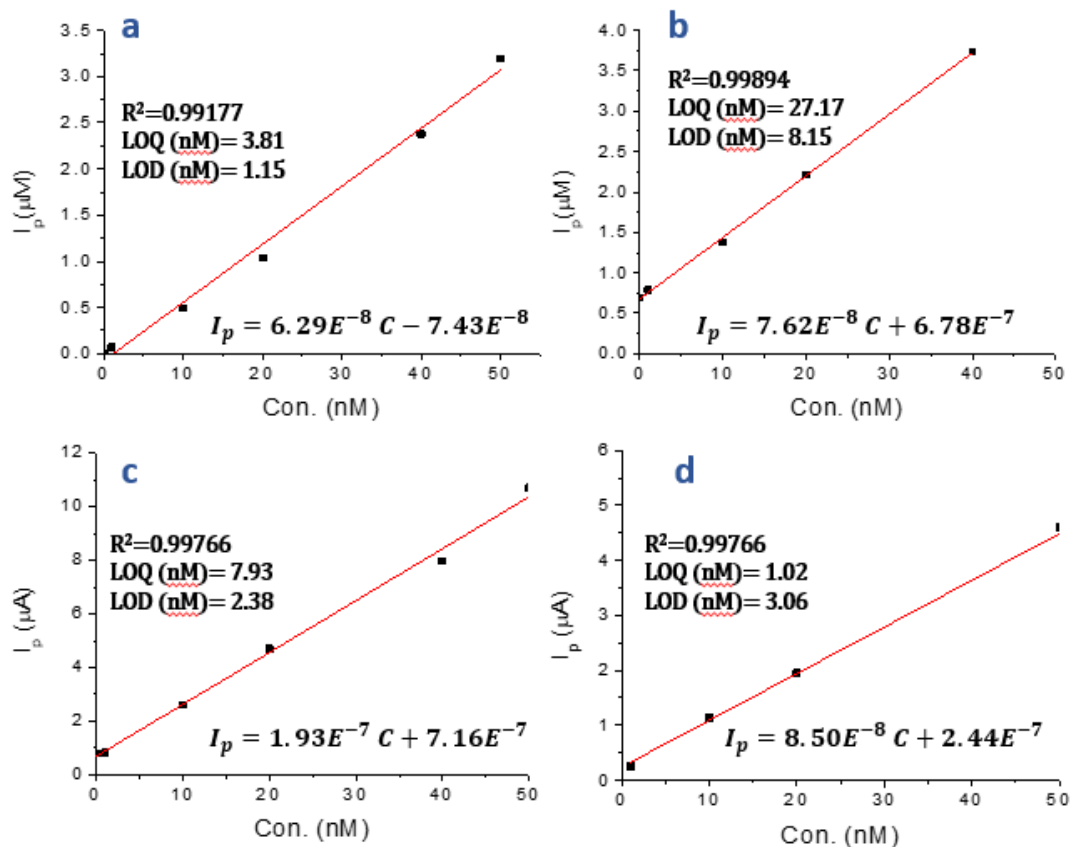
En la FIGURA 3.6 a) se muestran los voltamogramas a pH 1 para la detección de Dox. Partiendo de una concentración de fármaco de 80 nM, el cual tiene un pico de corriente a 11  $\mu\text{A}$ . La intensidad de corriente de este pico disminuyó gradualmente conforme la concentración del fármaco fue menor. Dichos picos se observan a un potencial de -0.25 V, y dicho valor no fue afectado por el efecto de la concentración de analito.

Para los demás valores de pH fue observada la misma tendencia de disminución de los picos de corriente al existir menor concentración de Dox. Se observa que a medida que el pH aumentó, los valores de potencial del pico de corriente se desplazaron hacia valores más negativos; a pH 1 el potencial fue de -0.25 V, para un pH 4 de -0.43 V, a pH 6 el potencial fue de -0.5 V y a pH 7,4 de -0.63 V. Esto es entendido mediante la ecuación de Nerst (EC. 3), en la cual se puede estimar el efecto de la concentración de H en los potenciales de oxidación [56].

$$Ec. 3 \quad E = E_{1/2} - \frac{0.0592}{2} \log \frac{[H_2Q]}{[Q]} - 0.0592pH$$

Los picos generados por la reacción de reducción de la quinona fueron muy intensos, lo que permitió medir concentraciones de Dox muy bajas, logrando incluso captar la presencia de Dox hasta concentraciones tan bajas como 1nM. En cambio, la reacción de oxidación de la hidroquinona en Dox, al mostrar un pico de corriente más bajo que el de la reducción, permitió determinar solamente concentraciones más elevadas.

Al relacionar los valores de concentración de Dox con la intensidad de corriente medidos en los voltamperogramas de onda cuadrada, obtenemos las curvas de calibración mostradas en la FIGURA 3.7.



**FIGURA 3.7** Curvas de calibración (■) con Recta de tendencia para la determinación de Dox a diferentes pHs. a) 1, b) 4, c) 6 y d) 7,4.

Como podemos observar, todas las curvas de calibración presentan buena correlación lineal. Al obtener la recta de tendencia, es posible recoger los valores de pendiente de las rectas (m), el valor del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y los valores de LOQ y LOD representados en la TABLA 3.1 a continuación.

**TABLA 3.1.** LOQ y LOD calculados a partir de las curvas de calibración a distintos valores de pH.

pH	1	4	6	7,4
LOQ (nM)	3.81	27.17	7.93	1.02
LOD (nM)	1.15	8.15	2.38	3.06

Las cuatro curvas de calibración obtenidas nos dan coeficientes de correlación cercanos a la unidad, por lo se estiman mediciones confiables para la determinación de las concentraciones de Dox con base en las corrientes de oxidación.

### 3.4 CONCLUSIONES PARCIALES CAPÍTULO III.

Se realizó una ligera descripción de la respuesta electroquímica de la Doxorubicina Hidroclorada (Dox.). Se identificó a la fracción de benzoquinona como la molécula con mayor respuesta electroactiva.

En los voltamperogramas cíclicos de la Dox se identificaron dos procesos redox, en potenciales de  $-0.5\text{ V}$  y  $+0.5\text{ V}$ , respectivamente. Se determinó que el primer proceso fue debido a la reducción reversible de la molécula de la quinona, mientras que el segundo se debió a la oxidación de la hidroquinona.

Se determinaron las condiciones para el análisis de Dox mediante voltimetría de onda cuadrada a diferentes valores de pH. Se identificaron también los picos de corriente obtenidos mediante esa técnica.

Se realizaron las mediciones de distintas concentraciones de Dox mediante V.O.C, con las cuales se obtuvieron curvas de calibración a los distintos valores de pH de interés: 1, 4, 6 y 7,4. Las correspondientes ecuaciones de las rectas nos ayudaran a determinar las concentraciones de Dox captadas y liberadas por las NPM modificadas. Dichos resultados se presentan en el siguiente capítulo.

### 3.5 REFERENCIAS CAPÍTULO III.

- [41] Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(7), 440.
- [42] Benjamin, R. S., Wiernik, P. H., & Bachur, N. R. (1974). Adriamycin chemotherapy—efficacy, safety, and pharmacologic basis of an intermittent single high- dosage schedule. *Cancer*, 33(1), 19-27.
- [43] Gewirtz, D. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical pharmacology*, 57(7), 727-741.
- [44] Doroshow, J. H. (1986). Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(12), 4514-4518.
- [45] Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. D., & Liu, L. F. (1984). Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*, 226(4673), 466-468.
- [46] Brenner, D. E., Galloway, S., Cooper, J., Noone, R., & Hande, K. R. (1985). Improved high-performance liquid chromatography assay of doxorubicin: detection of circulating aglycones in human plasma and comparison with thin-layer chromatography. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 14(2), 139-145.
- [47] Anderson, A. B., Gergen, J., & Arriaga, E. A. (2002). Detection of doxorubicin and metabolites in cell extracts and in single cells by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 769(1), 97-106.
- [48] Liu, Y., & Danielsson, B. (2007). Rapid high throughput assay for fluorimetric detection of doxorubicin—Application of nucleic acid–dye bioprobe. *Analytica chimica acta*, 587(1), 47-51.
- [49] Sardi, I., La Marca, G., Giovannini, M. G., Malvagia, S., Guerrini, R., Genitori, L., ... & Aricò, M. (2011). Detection of doxorubicin hydrochloride accumulation in the rat brain after morphine treatment by mass spectrometry. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 67(6), 1333-1340.
- [50] Hahn, Y., & Lee, H. Y. (2004). Electrochemical behavior and square wave voltammetric determination of doxorubicin hydrochloride. *Archives of pharmacal research*, 27(1), 31-34.

- [51] Karimi, M., Ghasemi, A., Zangabad, P. S., Rahighi, R., Basri, S. M. M., Mirshekari, H., ... & Ghosh, D. (2016). Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chemical Society Reviews*, 45(5), 1457-1501.
- [52] Cheng, B., Thapa, B., Remant, K. C., & Xu, P. (2015). Dual secured nano-melittin for the safe and effective eradication of cancer cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(1), 25-29.
- [53] Baldwin, R. P., Packett, D., & Woodcock, T. M. (1981). Electrochemical behavior of adriamycin at carbon paste electrodes. *Analytical Chemistry*, 53(3), 540-542.
- [54] Hahn, Y., & Lee, H. Y. (2004). Electrochemical behavior and square wave voltammetric determination of doxorubicin hydrochloride. *Archives of pharmacal research*, 27(1), 31-34.
- [55] Komorsky-Lovrić, Š., & Lovrić, M. (2007). Electrode reaction of adriamycin interpreted as two consecutive electron transfers with stabilization of the intermediate. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 72(10), 1398-1406.
- [56] Portero, M. J. M. (2011). Características y usos de los diagramas de Pourbaix.



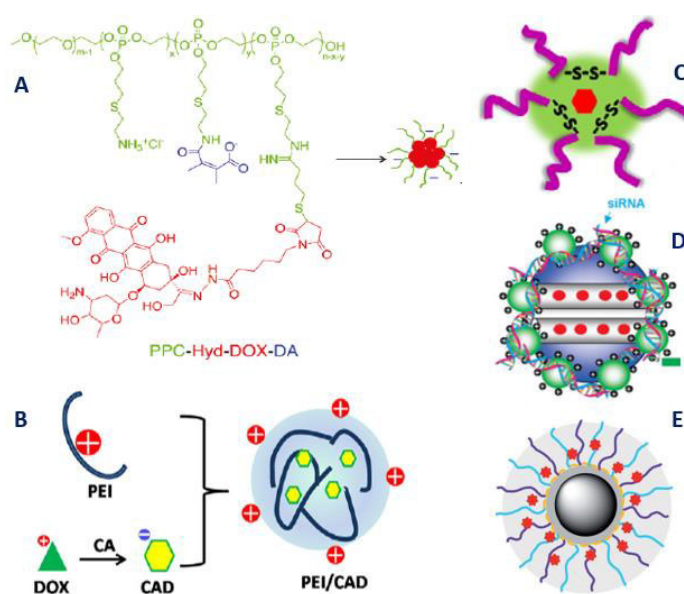
## **CAPÍTULO IV: Estudio de captura y liberación de Doxorubicina en NPM funcionalizadas.**

### Estudio de captura y liberación de Doxorubicina en NPM funcionalizadas.

En este capítulo se presenta inicialmente una breve descripción de los distintos métodos de inserción de fármacos a NP. Enseguida se abordará la inserción de Doxorubicina (Dox) en las NPM-3TMPM (polímero ramificado), NPM-P4VP (polímero lineal) y NPM-P4VP' (combinación de ambos polímeros). Asimismo, se presentará el estudio de la liberación de la Dox como fármaco modelo a tres distintos valores de pH, 4 (pH de los lisosomas en tumor), 6 (pH pared celular en tumor) y 7,4 (pH fisiológico). La concentración insertada y la liberada de Dox fue medida y calculada por las ecuaciones de las curvas de calibración y los datos obtenidos por los resultados de los voltamperogramas de V.O.C.

#### 4.1 INSERCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS EN NP.

Dentro de los distintos tipos de nanopartículas que se utilizan para el acarreamiento de principios activos, cada una de ellas tiene su método de incorporación específico. La inserción de la Dox puede ser dada principalmente por 4 distintos métodos. Como se muestra en la FIGURA 4.1, estos métodos son: autoensamblaje (a), acoplamiento (b), encapsulamiento (c y d) y atrapamiento (e) [57].



**FIGURA 4.1 Tipos de inserción de doxorubicina a las nanopartículas. a) autoensamble, b) acoplamiento, c) y d) encapsulamiento y e) atrapamiento.**

Para el método de autoensamblaje, observamos en la imagen a) de la FIGURA 4.1 como se realiza la síntesis de la NP, mediante la conjugación del polímero funcionalizado con sulfhidrilo y la Doxorubicina (Dox), y debido a la naturaleza hidrofóbica del residuo Dox, el conjugado PPC-Hyd-DOX-DA se autoensambla en NP en solución acuosa [58].

Para el método de acoplamiento observamos en la imagen b) de la FIGURA 4.1 la formación del complejo entre la Dox y la polietilenamina. Para ello, la molécula de Dox tuvo que ser previamente enlazada a una molécula de cis-aconitilo para formar un complejo negativo y pudiera acoplarse al polímero y formar la NP [59].

El método de encapsulamiento se presenta en la imagen c) de la FIGURA 4.1, en donde los enlaces disulfuros provenientes de las interacciones entre las cadenas poliméricas de la NP encapsulan a las moléculas Dox [59]. Otro ejemplo se presenta en la imagen d) de la FIGURA 4.1, en donde las moléculas de Dox son insertadas a nanopartículas de sílice mesoporosas y encapsuladas por el complejo entre la poliaminoamida y un interferente de ARN corto [60].

El método de atrapamiento, observando la imagen e) de la FIGURA 4.1, se lleva a cabo mediante la funcionalización de NPs (lantano, estroncio y óxido de manganeso) con copolímeros ramificados, polióxido de etileno-bloque-poli(L-lisina) y poli(óxido de etileno-co-óxido de propileno)-bloque-poli(L-lisina), en donde la molécula Dox será atrapada debido a que las cadenas poliméricas son ramificadas [57].

Ahora bien, estudiando los ejemplos anteriores, nos llega el cuestionamiento de ¿cómo es que la molécula Dox puede incorporarse a nuestros tres tipos de NPs de estudio? Por las características de las NPs (NPM-3TMPM, NPM-P4VP y NPM-P4VP') descartamos los métodos de encapsulamiento y autoensamblaje. Por tal, la inserción del principio activo solo podrá realizarse mediante el atrapamiento o el acoplamiento.

Suponiendo que existe un atrapamiento, Dox simplemente se quedará atrapado entre los entrelazamientos que sufrirán los polímeros (3-TMSPM o P4VP) al cambiar el pH. Por otro lado, suponiendo que existe un acoplamiento, si deberá inducir una interacción entre la estructura de la NP y la Dox.

Por consiguiente, se realizarán las pruebas de inserción de Dox a las NPs determinando la concentración inicial de la solución de Dox y la concentración final de esta mediante estudios de VOC.

## **4.2 METODOLOGÍA.**

### **4.2.1 Captura de Dox.**

Con base en el procedimiento presentado por Rafi, A. A. y col. [61], las NPM (NPM-3TMSPM, NPM-P4VP y NPM-P4VP') se dispersaron mediante ultrasonicación en una solución tampón ácida de pH 1. Luego, se añadió Dox a la mezcla para una proporción de nanomaterial a fármaco de 7:1 p/p. En este caso, se mezcló 5 mg de cada una de las NPM con 0.715 mg de Dox en una solución de ácido clorhídrico (HCl) a pH 1. Posteriormente, la mezcla de carga se sometió nuevamente a ultrasonicación durante 15 minutos y se mantuvo bajo agitación mecánica a temperatura ambiente durante 24 horas.

Antes de realizar la mezcla de la solución Dox con NPM, se midió la corriente de pico ( $I_p$ ) por voltametría de onda cuadrada (VOC) a un rango de voltajes de -0.6 V a 0 V, debido a que, a ese rango de voltajes, a pH 1, se produce la reducción reversible de la benzoquinona en la molécula Dox. Cabe destacar que, como las pruebas de liberación se realizan a 3 pHs diferentes (4, 6 y 7,4), se realizaron 3 veces los experimentos de captura para cada nanomaterial. Con ayuda de la ecuación de la curva de calibración a pH 1 obtenida en el capítulo pasado y el valor de  $I_p$  medido, se logró obtener la concentración inicial ( $C_i$ ) de Dox en la solución.

Después de las 24 horas de mezclado, se separó el sobrenadante mediante centrifugación para realizar la separación de las NPM. El sobrenadante final recolectado fue medido nuevamente mediante VOC obteniendo la  $I_p$  y con ello, nuevamente con ayuda de la Ec. 3, adquirir el valor de la concentración final ( $C_f$ ) de Dox en la mezcla.

Finalmente, mediante la relación  $C_i - C_f$ , se encontró el valor de la concentración de Dox ( $C_n$ ) que se insertó en cada nanomaterial. Por otro lado, con la Ecuación 7 (Ec. 4) y la Ecuación 8 (Ec. 5), se obtiene la eficiencia de carga y la capacidad de carga. La eficiencia de atrapamiento nos dice que tan buena es la inserción del activo en las NPs, y la capacidad de carga nos dice que porcentaje de peso es de Dox., con respecto a la NPM cargada.

$$Ec. 4 \quad Eficiencia \ de \ carga = \left( \frac{C_n}{C_i} \right) \times 100$$

$$Ec. 5 \quad Capacidad \ de \ carga = \left( \frac{\frac{C_n}{C_i}}{5 \ mg} \right) \times 100$$

#### 4.2.2 Liberación de Dox.

Posterior a la extracción del sobrenadante de Dox y recuperar las NPM, inmediatamente se les realizó dos lavados con una solución de NaOH a un pH de 14 para provocar el atrapamiento definitivo de la molécula Dox mediante la “gelación” de los polímeros provocada por la contracción de las cadenas poliméricas en las NPM.

En seguida de los lavados, las NPM fueron mezcladas con 30 mL de una solución buffer de un pH específica, buffer de citratos a un pH de 4, buffer de citratos a un pH de 6 y buffer fosfatos a pH de 7,4. Cabe mencionar nuevamente que se eligieron estos pHs ya que la pared celular de los tumores cancerígenos se encuentra a un pH aproximado de 6 [62], los lisosomas en un tumor cancerígeno a un pH aproximado de 4 [63], y el pH fisiológico es de 7,4.

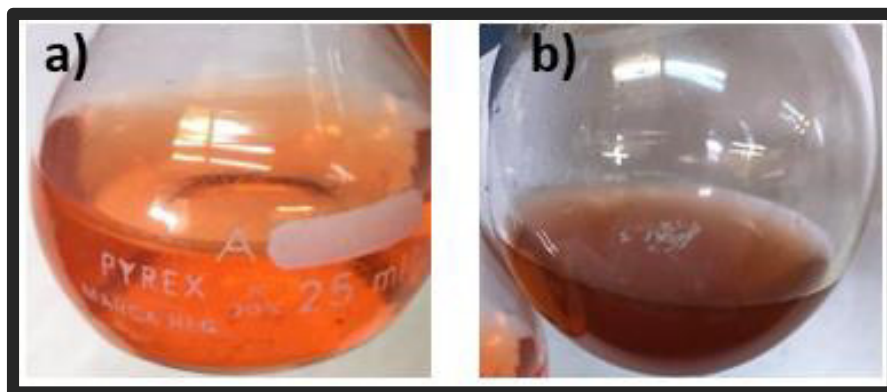
Inmediatamente después de realizar la mezcla Buffer-NPM, se realizó la medición de la corriente de pico ( $I_p$ ) mediante VOC, en 10 mL de la mezcla a un tiempo 10 min de liberación. Como se describe en el capítulo 3. Enseguida de la medición, los 10 mL de la solución medida se reincorporaron a la mezcla completa. Posteriormente, la solución buffer con las NPM se mantuvo en agitación mecánica continua y cada hora, por 7 horas se realizó una medición similar de la  $I_p$  por VOC de 10 mL de la mezcla.

Con la ayuda de las ecuaciones de las curvas de calibración a pH 4, 6 y 7,4, se obtuvieron los valores de las concentraciones para las distintas mediciones de muestra. Con esos valores se realizaron gráficas de perfiles de liberación para cada nanomaterial con el fin de discutir finalmente los resultados del comportamiento de la dosificación de Dox.

## **4.3 RESULTADOS.**

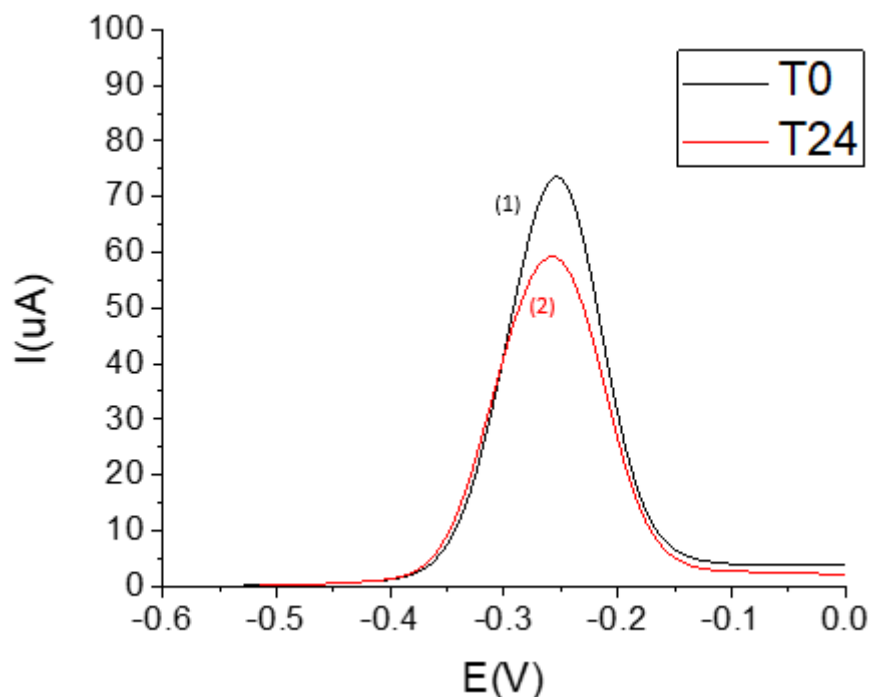
### **4.3.1 Captura de Dox en NPM-3TMPM.**

En la FIGURA 4.2-a se muestra la solución de Dox en HCl, y la imagen b) muestra la mezcla entre Dox y las NPM-3TMPM en HCl. La solución de la doxorubicina en una solución HCl pH 1, como ya se mencionó anteriormente, tiene una tonalidad de color anaranjado transparente. En cambio, al mezclar las NPM con la solución y ultrasonificarla, se puede observar que la coloración cambia de un anaranjado transparente, a un café turbio, color proporcionado por la dispersión de las NPM. No se muestran más imágenes de las soluciones de las demás NPM (NPM-P4VP y NPMP4VP') ya que son de las mismas características descriptivas.



**FIGURA 4.2 a) Disolución de Dox (0.715 mg) en HCl pH 1. b) Mezcla de Dox (0.715 mg) y NPM (0.5 mg), en HCl pH 1.**

En la FIGURA 4.3 se muestra un voltamperograma obtenido mediante la técnica VOC representativo para las pruebas de carga de Dox en las NPM-3TMPM. Se prepararon 3 muestras similares de NPM-3TMPM, y se realizó en ellas el proceso de carga mencionado. En todos los casos la carga se determinó mediante VOC. Cada una de esas muestras se destinó para las pruebas de liberación a pH 4, 6 ó 7,4, respectivamente.



**FIGURA 4.3 Voltamperograma por VOC para la carga de Dox en NPM-3TMPM a pH de 1. Línea negra (1) corresponde a  $t_{0\text{min}}$  y la línea roja (2) a  $t_{24\text{horas}}$ .**

En el voltamperograma, la curva 1 de color negro representa la medición a un tiempo cero ( $t_0$ ) para la mezcla de captura. En cambio, la curva 2 roja representa la medición 24 horas después de la mezcla de captura ( $t_{24\text{horas}}$ ), es decir, cuando termina el tiempo necesario para cargar el medicamento. Como se verificó en el capítulo anterior, el pico de reducción en la Dox se encuentra en un potencial de a -0.25 V.

En la TABLA 4.1 se muestran los valores promedio de  $I_p$  a  $t_0$  y  $t_{24}$  junto con los valores promedio de las concentraciones  $C_i$ ,  $C_f$ , y  $C_n$

**TABLA 4.1. Valores de  $I_p$  a  $t_0$  y  $t_{24}$  y las concentraciones inicial, final, y de carga de Dox para las pruebas con NPM-3TPM.**

<b>T (h)</b>	<b><math>I_p</math> (<math>\mu\text{A}</math>)</b>	<b><math>C_i</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b><math>114.01 \pm 6.39</math></b>
<b>0</b>	<b><math>71.63 \pm 4.02</math></b>	<b><math>C_f</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b><math>88.52 \pm 6.82</math></b>
<b>24</b>	<b><math>55.60 \pm 4.29</math></b>	<b><math>C_n</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b><math>25.48 \pm 2.97</math></b>

A  $t_{0\text{min}}$  el pico presenta en promedio una corriente de  $71.631 \pm 4.02 \mu\text{A}$ . En las mediciones realizadas a  $t_{24\text{horas}}$ , la corriente disminuyó en promedio hasta  $55.603 \pm 4.29 \mu\text{A}$ . Esta considerable disminución en la  $I_p$  de  $t_{0\text{min}}$  a  $t_{24\text{horas}}$  indica que hay una menor concentración de Dox en la solución 24 horas después de la mezcla. Los valores de las concentraciones son  $114.01 \pm 6.39$ ,  $88.52 \pm 6.82$  y  $25.48 \pm 2.87 \mu\text{M}$  inicial, final, y de carga respectivamente. Por lo que la inserción de Dox en las NPM se presenta durante este periodo de tiempo.

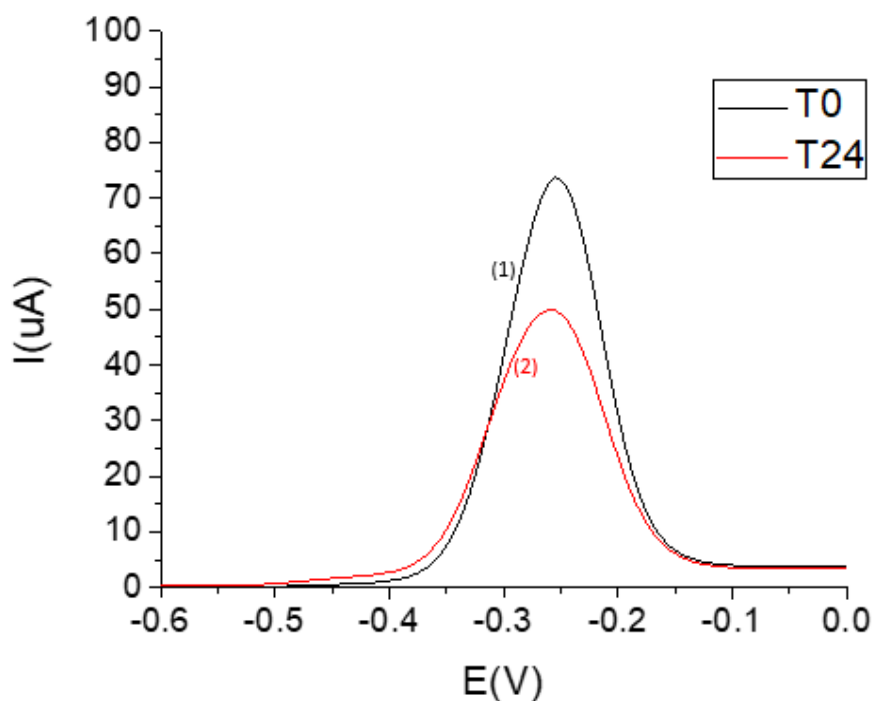
A partir de las ecuaciones Ec. 7 y Ec. 8, se calculó la eficiencia de carga y la capacidad de carga. Los valores de eficiencia de carga para estos nanomateriales (NPM-3TPM) se encuentran en un promedio de  $22.39 \pm 2.74 \%$ , y la capacidad de carga en un promedio de  $4.48 \pm 0.55 \text{ gDox/gNPM}$ . Al comparar estos resultados con distintos nanomateriales reportados en la bibliografía para nanopartículas recubiertas o a base de polímeros (60 nm – 90 nm), se encontraron valores moderadamente bajos, ya que en su mayoría estos valores suelen ser de entre 50% a 95% [64-67]. Aunque, por el tamaño de las NPM-



3TMPM (30 nm – 35 nm), los valores de eficiencia de carga pueden considerarse adecuados [68-69].

#### 4.3.2 Captura de Dox en NPM-P4VP.

Para las pruebas de carga de Dox en las NPM-P4VP, en la FIGURA 4.4 se muestra un voltamperograma representativo obtenidos mediante la técnica VOC.



**FIGURA 4.4** Voltamperograma por VOC para la carga de Dox en NPM-P4VP a pH de 1. Línea negra (1) corresponde a  $t_{0min}$  y la línea roja (2) a  $t_{24horas}$ .

Nuevamente se puede verificar que el pico de reducción en la Dox se encuentra en un potencial de a -0.25 V. Asimismo se muestra un decremento en la línea 2 con respecto a la línea 1.

En la TABLA 4.2 se muestran los valores promedio de  $I_p$  a  $t_0$  y  $t_{24}$  junto con los valores promedio de las concentraciones  $C_i$ ,  $C_f$ , y  $C_n$

**TABLA 4.2. Valores de  $I_p$  a  $t_0$  y  $t_{24}$  y las concentraciones inicial, final, y de carga de Dox para las pruebas con NPM-P4VP.**

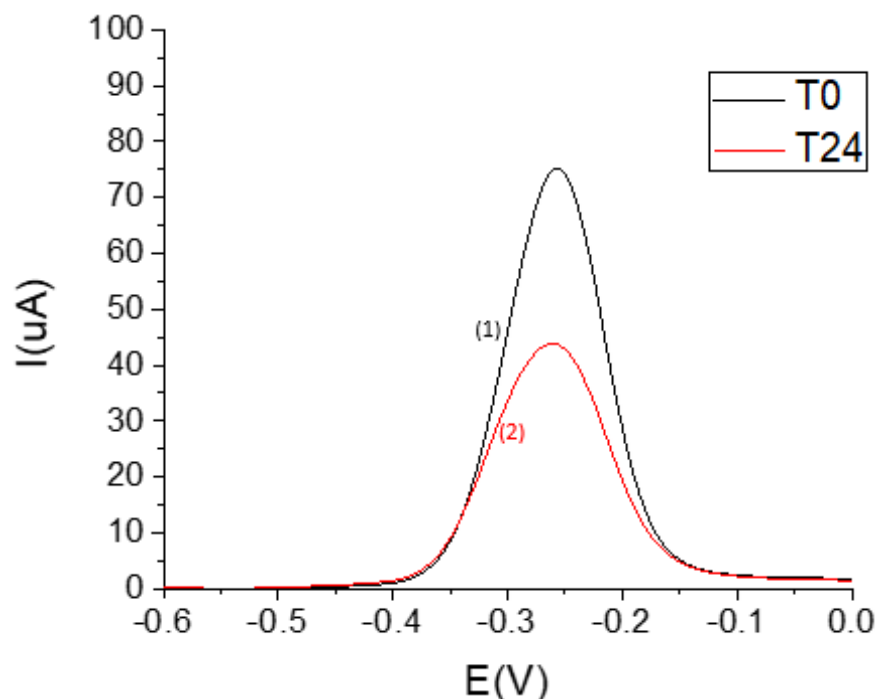
<b>T (h)</b>	<b><math>I_p</math> (<math>\mu</math>A)</b>	<b><math>C_i</math> (<math>\mu</math>M)</b>	<b><math>107.42 \pm 28.88</math></b>
<b>0</b>	<b><math>67.48 \pm 18.16</math></b>	<b><math>C_f</math> (<math>\mu</math>M)</b>	<b><math>79.83 \pm 18.98</math></b>
<b>24</b>	<b><math>50.14 \pm 11.93</math></b>	<b><math>C_n</math> (<math>\mu</math>M)</b>	<b><math>27.58 \pm 9.94</math></b>

Teniendo en promedio una corriente de  $67.48 \pm 18.16 \mu\text{A}$  a  $t_{0\text{min}}$  y en promedio una corriente de  $50.14 \pm 11.93 \mu\text{A}$  a  $t_{24\text{horas}}$ , se indica que hay una menor concentración de Dox en la solución 24 horas después de la mezcla, obteniendo así un valor de concentración de carga de  $27.58 \pm 9.94$  Por lo que la inserción de Dox en estas NPM es notable.

Calculando los valores de eficiencia de carga para NPM-P4VP se obtiene un promedio de  $25.17 \pm 2.95 \%$ , y una capacidad de carga con promedio de  $5.03 \pm 0.59 \text{ gDox/gNPM}$ , siendo ligeramente mayores que los de NPM3TMPM. Entonces, nuevamente podemos decir que estos valores de eficiencia son moderadamente bajos, pero por el tamaño de las NPM-P4VP (30 nm – 35 nm), los valores de eficiencia de carga pueden considerarse adecuados [68-69].

#### **4.3.3 Captura de Dox en NPM-P4VP’.**

En la FIGURA 4.5 se muestra un voltamperograma representativo obtenidos mediante la técnica VOC para las pruebas de carga de Dox en las NPM-P4VP’.



**FIGURA 4.5** Voltamperograma por VOC para la carga de Dox en NPM-P4VP' a pH de 1. Línea negra (1) corresponde a  $t_{0min}$  y la línea roja (2) a  $t_{24horas}$ .

El pico de reducción en la Dox se encuentra nuevamente en un potencial de a -0.25 V. Asimismo se muestra un decremento en la línea 2 con respecto a la línea 1.

Los valores promedio de  $I_p$  a  $t_0$  y  $t_{24}$  junto con los valores promedio de las concentraciones  $C_i$ ,  $C_f$ , y  $C_n$  se muestran en la TABLA 4.3

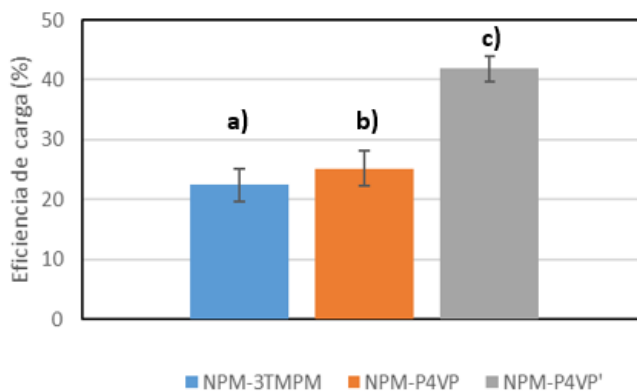
**TABLA 4.2.** Valores de  $I_p$  a  $t_0$  y  $t_{24}$  y las concentraciones inicial, final, y de carga de Dox para las pruebas con NPM-P4VP'.

T (h)	$I_p$ ( $\mu A$ )	$C_i$ ( $\mu M$ )	$127.59 \pm 8.43$
0	$80.17 \pm 5.30$	$C_f$ ( $\mu M$ )	$74.24 \pm 5.46$
24	$46.61 \pm 3.43$	$C_n$ ( $\mu M$ )	$53.35 \pm 4.62$

Con los valores promedio de pico corriente de  $80.17 \pm 5.30 \mu A$  a  $t_{0min}$  y de  $46.61 \pm 3.43 \mu A$  a  $t_{24horas}$ , comprobamos nuevamente que hay una menor concentración de Dox en la

solución 24 horas después de la mezcla, obteniendo un valor de concentración de carga de  $53.35 \pm 4.62$ . Por lo que la inserción de Dox en estas NPM es verificada nuevamente.

El valor de eficiencia de carga para NPM-P4VP' promedio resulta ser de  $41.81 \pm 2.08$  %, y la capacidad de carga promedio es de  $8.36 \pm 0.41$  gDox/gNPM, siendo considerablemente mayores con respecto a las NPM-3TMPM y NPM-P4VP como se muestra en la FIGURA 4.6.



**FIGURA 4.6** Comparación de eficiencias de carga entre a) NPM-3TMPM, b) NPM-P4VP y c) NPM-P4VP'

Esto puede ser ocasionado por el aumento de espacio intersticial que provoca la combinación de los dos polímeros poli(propil-metacrilato-siloxano) y poli(4-vinil piridina), generando un sinergismo entre los polímeros y su funcionalización en las NPM debido a discontinuidades en el crecimiento de los polímeros, las cuales dan lugar a espacios que pueden servir como reservorios para el fármaco.

Entonces, teniendo en cuenta los valores  $C_i$ ,  $C_f$ , y  $C_n$ , así como la eficiencia y la capacidad de carga para los tres nanomateriales sintetizados, se demostró su capacidad para retener en su interior principios activos.

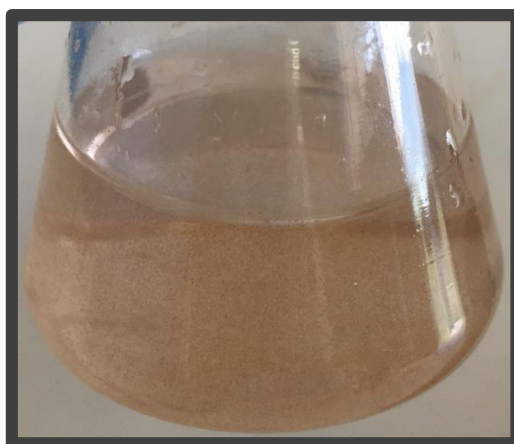
Aunque para las NPM-3TMPM y NPM-P4VP las eficiencias de carga son algo bajas comparadas con las reportadas en bibliografía, los resultados son moderadamente aceptables por el tamaño de las NPM. Para las NPM-P4VP' encontramos un aumento en la eficiencia de carga, pudiendo decir que, para la inserción de principios activos, estas NPM resultan ser las más educadas de los tres nanomateriales.

Por otro lado, se puede considerar que la carga de la Dox se da por el atrapamiento de la molécula Dox entre las cadenas poliméricas, ya sean ramificadas o lineales. Una ventaja de este método es que no es necesario realizar reacciones o modificaciones previas a la molécula de Dox para su inserción en los nanomateriales mediante el método de atrapamiento.

#### **4.3.4 Liberación de Dox para NPM cargadas.**

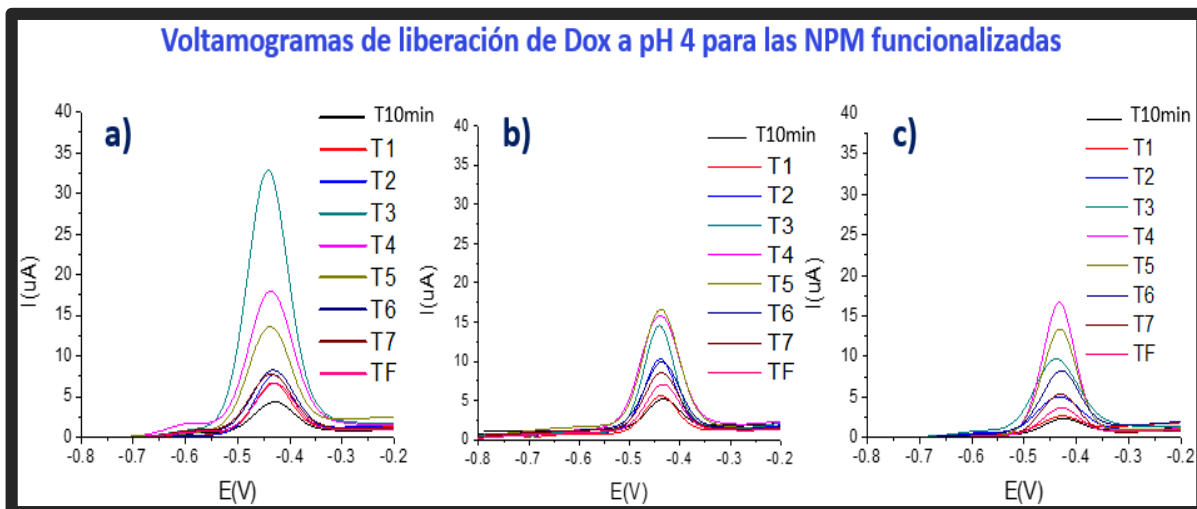
##### **pH 4**

En la FIGURA 4.6 se muestra la imagen de la mezcla de las NPM-3TPMP en el buffer citratos de pH 4. Como podemos observar, la solución es de un color café muy ligero lo que provoca un poco de turbidez. No se muestran más imágenes de las soluciones de las demás NPM en las demás soluciones de buffer ya que son de las mismas características descriptivas. Es preciso enfatizar que todas las NPM en los distintos buffers se encuentran completamente dispersas al inicio de las pruebas de dosificación de Dox.



**FIGURA 4.6** *Suspensión de NPM-3TPMP en Buffer Citratos a pH 4.*

La FIGURA 4.7 muestra los voltamperogramas obtenidos mediante la técnica VOC para las pruebas de liberación de Dox a pH 4 para los tres nanomateriales, a) NPM-3TPMP, b) NPM-P4VP y c) NPM-P4VP' respectivamente.



**FIGURA 4.7 Voltamogramas por VOC de la liberación de Dox en la solución de Buffer Citratos a pH 4. a) NPM-3TMPM, b) NPM-P4VP y c) NPM-P4VP'.**

Como podemos observar los 3 voltamperogramas muestran la señal de Dox a un potencial de -0.45 V. Esto provocado por que a pH 4 a este voltaje se da la reducción reversible de la fracción de benzoquinona en Dox.

También podemos observar que a un tiempo 10min, ya existe un ligero aumento en la corriente, incrementando poco a poco mientras avanza el tiempo hasta llegar a un pico máximo de corriente, para NPM-3TMPM a un tiempo de 3 horas, para NPM-P4VP a un tiempo de 5 horas y para NPM-P4VP' a un tiempo de 4 horas. A partir de estas horas, los picos de corriente empiezan a disminuir hasta llegar a un tiempo final (TF) de 24 horas, donde ya no la  $I_p$  ya no varía. Específicamente observamos que para las NPM-3TMPM, el pico máximo de corriente es de aproximadamente 32  $\mu\text{A}$ , para NPM-P4VP es de 16  $\mu\text{A}$ , y para NPM-P4VP' es de 16  $\mu\text{A}$  también.

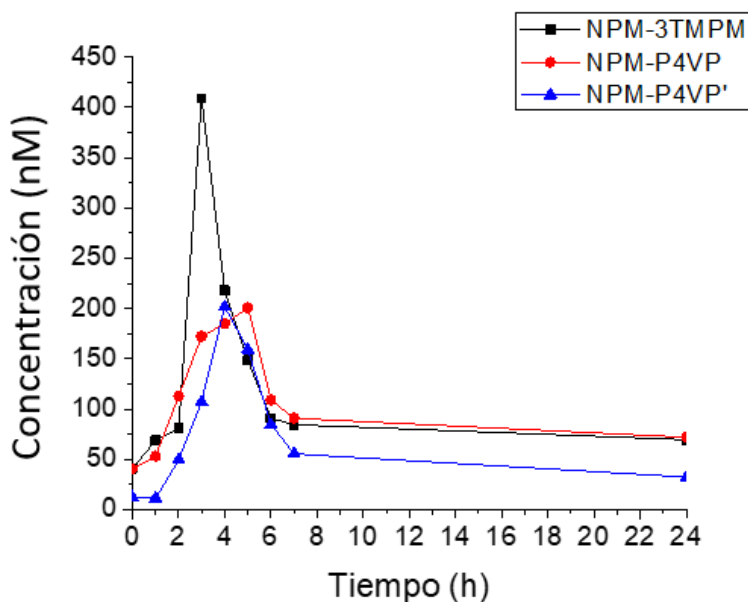
En la TABLA 4.10 se muestran los valores de las  $I_p$  y los valores de las concentraciones de Dox liberada por las NPM para cada prueba calculados.

**TABLA 4.10.** Valores de  $I_p$  y de concentración de la molécula de Dox liberada en la solución Buffer Cítratos a pH 4 para las NPM funcionalizadas a distintas mediciones de tiempos.

T (h)	NPM-3TMPM		NPM-P4VP		NPM-P4VP'	
	$I_p$ ( $\mu$ A)	C (nM)	$I_p$ ( $\mu$ A)	C (nM)	$I_p$ ( $\mu$ A)	C (nM)
10 min	3.786	40.83	3.76	40.49	1.53	11.19
1	5.912	68.76	4.717	53.06	1.63	12.50
2	6.836	80.90	9.264	112.80	4.459	49.67
3	31.78	408.60	13.808	172.49	8.847	107.32
4	17.292	218.26	14.74	184.74	16.043	201.86
5	11.99	148.61	15.963	200.80	12.803	159.29
6	7.627	91.29	8.979	109.05	7.14	84.89
7	7.105	84.43	7.607	91.03	4.897	55.42
24	5.975	69.59	6.164	72.07	3.141	32.35

Con base en esto se comprueba que para los tres nanomateriales existe un incremento en la concentración de fármaco evidenciando así su liberación desde el contacto con la solución a pH 4.

En la FIGURA 4.8 se presenta la gráfica de la concentración de Dox liberada a pH 4 con respecto al tiempo, comparando los 3 nanomateriales.



**FIGURA 4.8 Liberación de Dox a pH 4 de 10 minutos a 24 horas para ■ NPM-3TMPM, ●NPM-P4VP y ▲ NPM-P4VP'.**

Se observa que después de 3 horas, en las NPM-3TMPM se alcanza la concentración máxima liberada de Dox (408 nM). A partir de 3 horas en adelante, la concentración de Dox baja gradualmente hasta 84 nM a las 7 horas y a 70 nM 24 horas después de iniciada la liberación. Esto puede ser provocado por un proceso de reatrapamiento, degradación del Dox, o aglomeración de las NPM-3TMPM.

Para las NPM-P4VP y NPM-P4VP' encontramos el mismo comportamiento de aumento de concentración de Dox y a cierto tiempo un decremento. Ambas NPM logran tener una liberación máxima de 201 nM, solo que para NPM-P4VP se da a un tiempo de 5 horas y para NPM-P4VP' se da a 4 horas. 24 horas de empezada la reacción de liberación, las NPM-P4VP tuvo una concentración final de 72 nM y las NPM-P4VP' de 32 nM.

Por otro lado, se hace notar que, 24 horas después de iniciada la prueba de liberación, las NPM modificadas con los diversos polímeros se encontraron aglomeradas y precipitadas (Figura 4.9).



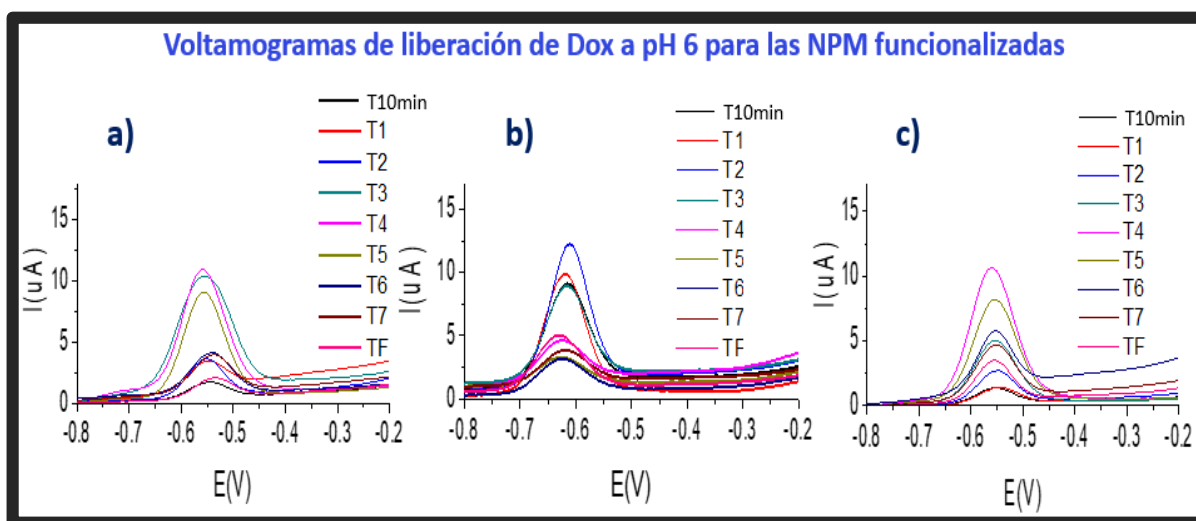
**FIGURA 4.9 Mezcla de NPM-3TMPM en solución Buffer de Citratos pH 4 posterior a 24 horas de prueba de dosificación de Dox.**

Por lo tanto, se demostró la capacidad de los 3 materiales para liberar una concentración máxima de principio activo a pH de 4 en un tiempo determinado.



## pH 6.

En la FIGURA 4.10 se muestran los voltamperogramas obtenidos para las pruebas de liberación de Dox a pH 6 para los tres nanomateriales, a) NPM-3TMPM, b) NPM-P4VP y c) NPM-P4VP' respectivamente.



**FIGURA 4.10** Voltamogramas por VOC de la liberación de Dox en la solución de Buffer Citratos a pH 4. a) NPM-3TMPM, b) NPM-P4VP y c) NPM-P4VP'.

Los 3 voltamperogramas muestran sus señales a un potencial de  $-0.55$  V. Como ya se comprobó en el capítulo anterior, a un pH de 6, a este voltaje se da la reducción reversible de la benzoquinona en Dox.

Podemos observar que existe también un ligero aumento en la corriente a un tiempo 10 min, teniendo un incremento continuo hasta llegar a un pico máximo de corriente a cierto tiempo específico. Para NPM-3TMPM a un tiempo de 4 horas, para NPM-P4VP a un tiempo de 2 horas y para NPM-P4VP' a un tiempo de 4 horas. Después de haber alcanzado esos tiempos, los picos de corriente empiezan a disminuir hasta llegar a un valor constante en un tiempo final (TF) de 24 horas, donde ya no existe variación de  $I_p$ . Comparando con la

liberación a pH 4, el comportamiento es muy similar salvo la altura máxima de picos de corriente, donde es mayor para todas las NPM a pH 4 que a pH 6.

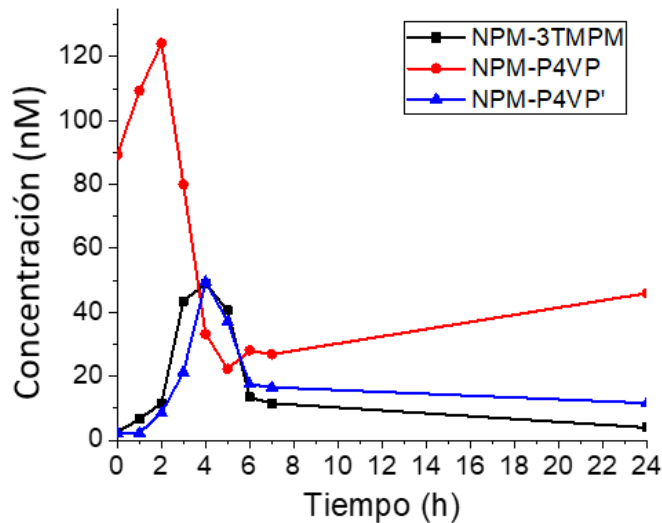
En la TABLA 4.11 se muestran los valores de las  $I_p$  y los valores de las concentraciones de Dox liberada por las NPM para cada prueba.

**TABLA 4.11.** Valores de  $I_p$  y de concentración de la molécula de Dox liberada en la solución Buffer Citratos a pH 6 para las NPM funcionalizadas a distintas mediciones de tiempos.

T (h)	NPM-3TMPM		NPM-P4VP		NPM-P4VP'	
	$I_p$ ( $\mu$ A)	C (nM)	$I_p$ ( $\mu$ A)	C (nM)	$I_p$ ( $\mu$ A)	C (nM)
10 min	1.223	2.61	7.83	89.28	1.151	2.24
1	2	6.63	9.532	109.32	1.176	2.37
2	2.964	11.61	10.7	124.12	2.371	8.55
3	9.14	43.54	7.04	79.98	4.845	21.34
4	10.19	48.97	3.07	33.26	10.294	49.51
5	8.571	40.6	2.14	22.31	7.904	37.16
6	3.312	13.41	2.631	28.09	4.11	17.54
7	2.95	11.54	2.53	26.9	3.924	16.58
24	1.483	3.96	4.152	45.99	2.969	11.64

Nuevamente podemos comprobar que para los tres nanomateriales se presenta cierto incremento en la concentración de fármaco indicando su liberación desde el contacto de las NPM con la solución a pH 6 aunque en menor medida que a pH 4.

En la FIGURA 4.11 se presenta la gráfica de la concentración de Dox liberada a pH 6 con respecto al tiempo, comparando los 3 nanomateriales.



**FIGURA 4.11** Liberación de Dox a pH 6 de 10 minutos a 24 horas para ■ NPM-3TMPM, ● NPM-P4VP y ▲ NPM-P4VP'.

4 horas después de iniciada la liberación, las NPM-3TMPM alcanzan la medición más alta de concentración de 49 nM de Dox. De este tiempo en adelante, la concentración de Dox baja hasta 11.5 nM a las 7 horas y a 4 nM 24 horas después de iniciada la liberación.

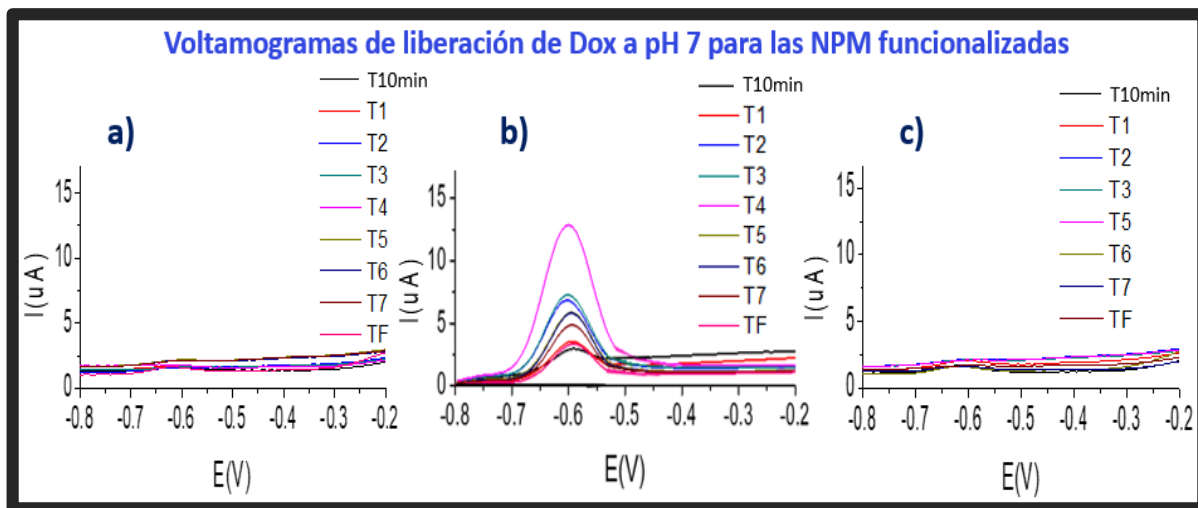
Específicamente, para las NPM-P4VP encontramos el mismo comportamiento de aumento de concentración de Dox y a cierto tiempo un decremento solo que a una velocidad mayor comparado a pH 4 ya que, a este pH, se encuentra la máxima liberación a pH 6 se encuentra a 2 horas, pero con menor concentración de Dox. Esto fue debido a que se decidió realizar una sonicación de esta muestra antes de realizar la medición.

Las NPM-P4VP' siguen el mismo comportamiento teniendo una liberación máxima de 50 nM, a un tiempo de 4 horas y una concentración final de 11 nM, muy similar a las NPM-3TMPM.

De cualquier forma, se comprueba que los 3 nanomateriales si tiene la capacidad de liberar la Dox a un pH de 6, pero en menor medida en comparación a un pH de 4, hasta que surge o un reatrapamiento o la degradación de Dox.

**pH 7,4.**

La FIGURA 4.12 muestra los voltamperogramas obtenidos para las pruebas de liberación de Dox a pH 7 para, a) NPM-3TMPM, b) NPM-P4VP y c) NPM-P4VP' respectivamente.



**FIGURA 4.12 Voltamogramas por VOC de la liberación de Dox en la solución de Buffer Fosfatos a pH 7,4. a) NPM-3TMPM, b) NPM-P4VP y c) NPM-P4VP'.**

Para las pruebas en las NPM-3TMPM y NPMP4VP' no se encuentra la señal de Dox. En contraste, para las NPM-P4VP si muestra picos de corriente a un potencial de -0.64 V.

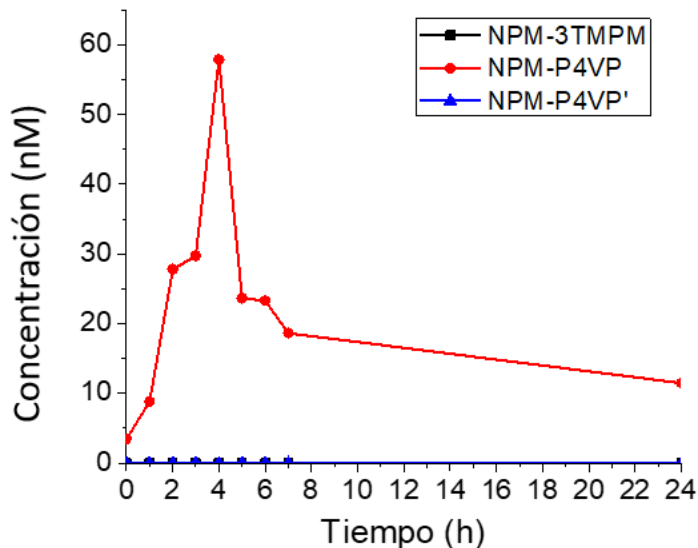
Así entonces, se puede inferir que solo para NPM-P4VP existe una liberación de Dox. Continuando con la misma tendencia de liberación para las pruebas pasadas, notamos un ligero aumento a un tiempo 10 min, nuevamente llegando a un poco máximo de corriente a un tiempo de 4 horas (T4). Posterior a este tiempo, existe la disminución de concentración de Dox hasta llegar a un tiempo final (TF) de 24 horas

En la TABLA 4.12 se muestran los valores de las  $I_p$  y los valores de las concentraciones de Dox liberada por las NPM para cada prueba a pH 7,4.

**TABLA 4.11.** Valores de  $I_p$  y de concentración de la molécula de Dox liberada en la solución Buffer Fosfatos a pH 7,4 para las NPM funcionalizadas a distintas mediciones de tiempos.

T (h)	NPM-3TMPM		NPM-P4VP		NPM-P4VP'	
	$I_p$ ( $\mu$ A)	C (nM)	$I_p$ ( $\mu$ A)	C (nM)	$I_p$ ( $\mu$ A)	C (nM)
10 min	0.23	0	1.38	3.43	0.15	0
1	0.14	0	2.42	8.80	0.2	0
2	0.11	0	6.093	27.79	0.2	0
3	0.21	0	6.473	29.76	0.22	0
4	0.21	0	11.913	57.88	0.17	0
5	0.19	0	5.292	23.65	0.22	0
6	0.16	0	5.223	23.30	0.17	0
7	0.22	0	4.319	18.62	0.18	0
24	0.23	0	2.933	11.46	0.19	0

En la FIGURA 4.13 se presenta la gráfica de la concentración de Dox liberada a pH 7,4 con respecto al tiempo, comparando los 3 nanomateriales.



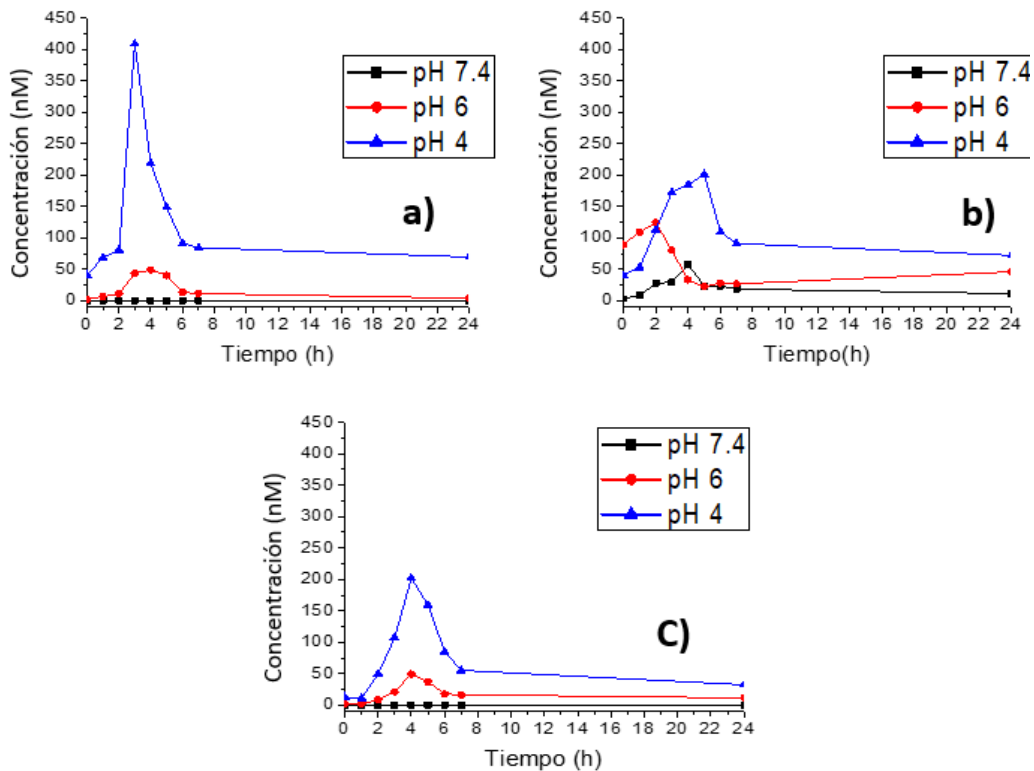
**FIGURA 4.13** Liberación de Dox a pH 7,4 de 10 minutos a 24 horas para ■ NPM-3TMPM, ● NPM-P4VP y ▲ NPM-P4VP'.

Con ayuda de la ecuación de la curva de calibración se logró obtener los valores de concentración para estas corrientes específicamente para las NPM-3TMPM y NPM-P4VP'. Estos valores de concentración resultaban tener valores muy cercanos a 0, como, por ejemplo, en NPM-3TMPM, para las 3 horas, contábamos con un  $I_p$  de 0.21  $\mu$ A. Al obtener la concentración resultó ser de un valor de -0.4 nM, por lo que inferimos un valor establecido de 0 nM.

Ahora, específicamente, para las NPM-P4VP volvemos a encontrarnos con el mismo comportamiento de aumento de concentración de Dox hasta el tiempo de 4 horas (T4) donde se llega a una concentración máxima de 58 nM. De ese tiempo en adelante, existe una reducción de la concentración hasta llegar a 11 nM en 24 horas. Esto nos indica que para estas NPM si existe una liberación de Dox a pH de 7,4.

#### **4.3.7 Perfiles de liberación de Dox para NPM a los distintos pHs.**

Con los resultados obtenidos anteriormente, en la FIGURA 4.14, se comparan los perfiles de liberación para los diferentes nanomateriales en los pHs correspondientes (4, 6 y 7,4).



**FIGURA 4.14** Perfiles de liberación de Dox a pH 7,4 (■), pH 6 (●) y pH (▲) para a) NPM-3TMPM, b) NPM-P4VP y c) NPM-P4VP'.

En el perfil de liberación de NPM-3TMPM (FIGURA 4.11-a se puede comprobar que a un pH de 7,4 (pH fisiológico) en un transcurso de 24 horas no se lleva a cabo la liberación de Dox. Comparando la liberación del principio activo en medios más ácidos, tanto a un pH 6 como un pH 4, en ambos existe la liberación de Dox, siendo a un pH de 4 el medio donde se libera mayor cantidad del fármaco llegando a un máximo de 408 nM por cada 5mg de NPM. Por lo tanto, las NPM-3TMPM, tiene la capacidad de liberar un máximo de moléculas del fármaco hasta cierto tiempo en suspensiones con pH ácidos. En cambio, en suspensiones con pH neutros, no existe la liberación del principio activo.

En el perfil de liberación para NPM-P4VP, encontramos que a un pH de 7,4 (pH fisiológico) si existe una ligera concentración en la liberación de Dox a comparación de la liberación a pHs ácidos. Comparando la liberación del principio activo, tanto a un pH 6, como un pH 4, en ambos existe la liberación de Dox, siendo a un pH de 4, el medio donde se libera mayor cantidad del fármaco llegando a un máximo de 200 nM. Aunque, por otro lado, a partir de cierto tiempo, comienza disminuir la concentración del fármaco debido al

reatrapamiento de este. Entonces, el nanomaterial NPM-P4VP si tiene la capacidad de liberar un máximo de moléculas dentro de él hasta cierto tiempo, tanto para medios de pH neutro, como en medios ácidos, pero a tiempos mayores, se presenta un re-atrapamiento de Dox.

Por su parte, en el perfil de liberación de fármaco para las NPM-P4VP', se puede comparar como a un pH de 7,4 (pH fisiológico) en un transcurso de 24 horas tampoco se logra propiciar la liberación de Dox a diferencia de los otros dos medios ácidos. Por otro lado, comparando la dosificación del principio activo, tanto a un pH 6, como un pH 4, en ambos existe la liberación de Dox, siendo a un pH de 4, el medio donde se libera mayor cantidad del fármaco como para las NPM-3TTPM, solo que ahora llegando a un máximo de 201 nM. Igualmente, para ambos pHs ácidos, a partir de cierto tiempo la concentración de Dox comienza disminuir hasta llegar a un valor constante después de 24 horas. Por lo tanto, las NPM-P4VP' si tiene la capacidad de comenzar a liberar un máximo de moléculas dentro de él hasta cierto tiempo mediante un cambio de pH neutro, donde no existe liberación, a pH ácido, pero a tiempos mayores, se presenta un reatrapamiento o una degradación de Dox.

#### **4.4 CONCLUSIONES PARCIALES CAPÍTULO IV.**

Se determinó que los 3 nanomateriales resultaron ser capaces de capturar el principio activo Dox en ellos, teniendo eficiencias de carga de  $22.39 \pm 2.74$ ,  $25.17 \pm 2.95$  y  $41.81 \pm 2.08$  % para las NPM-3TTPM, NPM-P4VP y NPM-P4VP' respectivamente, siendo las ultimas las que tuvieron mayor capacidad de captura. Por otro lado, se demostró que la carga de la Dox se da por el atrapamiento de la molécula Dox entre las cadenas poliméricas. Una ventaja de este método es que no es necesario realizar reacciones o modificaciones previas a la molécula de Dox para su inserción en los nanomateriales mediante el método de atrapamiento.

Para las pruebas de liberación se demostró que a pHs ácidos, los 3 nanomateriales fueron capaces de liberar cierta cantidad de fármaco, teniendo un máximo de liberación a



cierto tiempo y posteriormente, presentando un reatrapamiento. Se presentó una mayor liberación a un pH de 4, siendo las NPM-3TMPM la que tuvo mayor liberación con una concentración de 408 nM. Por otro lado, a un pH fisiológico (7,4) las NPM-3TMPM y NPM-P4VP' no presentaron liberación de Dox en el plazo de tiempo medido, a diferencia de las NPM-P4VP que sí presentan una ligera liberación y un reatrapamiento posterior.

Por lo tanto, en base a los resultados de atrapamiento y liberación de Dox controlada por pHs, podemos determinar que las mejores NPM funcionalizadas son las NPM-3TMPM.

#### **4.4 REFERENCIAS CAPÍTULO IV.**

[57] Louguet, S., Rousseau, B., Epherre, R., Guidolin, N., Goglio, G., Mornet, S., ... & Schatz, C. (2012). Thermoresponsive polymer brush-functionalized magnetic manganite nanoparticles for remotely triggered drug release. *Polymer Chemistry*, 3(6), 1408-1417.

[58] Du, J. Z., Du, X. J., Mao, C. Q., & Wang, J. (2011). Tailor-made dual pH-sensitive polymer-doxorubicin nanoparticles for efficient anticancer drug delivery. *Journal of the American Chemical Society*, 133(44), 17560-17563.

[59] Liu, M., Du, H., Zhang, W., & Zhai, G. (2017). Internal stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery: design strategies and applications. *Materials Science and Engineering: C*, 71, 1267-1280.

[60] Chen, A. M., Zhang, M., Wei, D., Stueber, D., Taratula, O., Minko, T., & He, H. (2009). Co-delivery of doxorubicin and Bcl-2 siRNA by mesoporous silica nanoparticles enhances the efficacy of chemotherapy in multidrug-resistant cancer cells. *Small*, 5(23), 2673-2677.

- [61] Rafi, A. A., Mahkam, M., Davaran, S., & Hamishehkar, H. (2016). A smart pH-responsive nano-carrier as a drug delivery system: a hybrid system comprised of mesoporous nanosilica MCM-41 (as a nano-container) & a pH-sensitive polymer (as smart reversible gatekeepers): preparation, characterization and in vitro release studies of an anti-cancer drug. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, 64-73.
- [62] Karimi, M., Ghasemi, A., Zangabad, P. S., Rahighi, R., Basri, S. M. M., Mirshekari, H., ... & Ghosh, D. (2016). Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems. *Chemical Society Reviews*, 45(5), 1457-1501.
- [63] Cheng, B., Thapa, B., Remant, K. C., & Xu, P. (2015). Dual secured nano-melittin for the safe and effective eradication of cancer cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(1), 25-29.
- [64] Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 1-18.
- [65] Quintanar-Guerrero, D., Allemann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (1998). Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug development and industrial pharmacy*, 24(12), 1113-1128.
- [66] Avgoustakis, K. (2004). Pegylated poly (lactide) and poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Current drug delivery*, 1(4), 321-333.
- [67] Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., & Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. *Journal of controlled release*, 100(1), 5-28.
- [68] Song, X., Zhao, Y., Wu, W., Bi, Y., Cai, Z., Chen, Q., ... & Hou, S. (2008). PLGA nanoparticles simultaneously loaded with vincristine sulfate and verapamil hydrochloride: systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *International journal of pharmaceutics*, 350(1-2), 320-329.
- [69] Win, K. Y., & Feng, S. S. (2005). Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials*, 26(15), 2713-2722.



## **CONCLUSIONES GENERALES.**

Se prepararon materiales magnéticos recubiertos con 3 diferentes polímeros sensibles al pH: NPM-3TMPM (lineal), NPM-P4VP (ramificado), y NPM-P4VP' (mixto).

Mediante la caracterización por STEM y SEM se demostró que los 3 nanomateriales muestran morfología esférica con tamaños de nanopartícula entre 30 y 35 nm. Con la técnica de DLS se midieron los tamaños hidrodinámicos de las nanopartículas funcionalizadas, teniendo como resultados valores de 330 nm para NPM-3TMPM y de 396 nm para NPM-P4VP y NPM-P4VP'. Además, se observaron variaciones en los valores de potencial  $\xi$  después de incorporar los diversos polímeros.

Mediante espectroscopia infrarroja se demostró la funcionalización de las NPM con los polímeros indicados, identificando los grupos funcionales correspondientes: enlace C=O a  $1712\text{ cm}^{-1}$  del poli(metoxisilil metacrilato) para NPM-3TMPM,  $1620\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la piridina para NPM-P4VP, y ambas señales para NPM-P4VP'.

Mediante V.C. y V.O.C se realizó la caracterización de la Doxorubicina, observando las señales electroquímicas correspondientes los procesos redox de las fracciones quinona e hidroquinona presentes en este fármaco modelo.

Se optimizaron los parámetros para la cuantificación de Dox a distintos valores de pH relevantes: 1, 4, 6 y 7,4, obteniendo curvas de calibración que fueron posteriormente utilizadas durante las pruebas de atrapamiento y liberación del fármaco por los nanomateriales.

Los 3 tipos de NPM mostraron la capacidad de atrapamiento del fármaco con aceptable eficiencia de carga, siendo las NPM funcionalizadas con el polímero mixto (P4VP') con la mejor capacidad acarreadora de Doxorubicina a un  $41.81 \pm 2.08\%$ .

Las NPM funcionalizadas con los 3 diferentes tipos de polímeros fueron capaces de liberar el fármaco en suspensiones con valores de pH ligeramente ácidos, logrando a pH 4

(pH lisosomal en células cancerosas) una mayor concentración de Dox. Tanto NPM-3TMPM como NPM-P4VP' retuvieron el fármaco adecuadamente a pH fisiológico (7,4).

Gracias a sus propiedades químicas y estructurales, así como a la capacidad de carga y liberación de fármacos como la doxorubicina, las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con polímeros inteligentes sensibles al pH preparadas en este trabajo son atractivas por su potencial aplicación en el tratamiento alternativo de cáncer.