

FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS LUMINISCENTES CON RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS

Agreda Arana, Cynthia Cristina (1), Gutierrez Granados, Silvia (2), Espinola Portilla, Fernando (3)

1 [Licenciatura en Química, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: agreda95@hotmail.com

2 [Departamento de Electroquímica, DCNE, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: gutigs@ugto.mx

3 [Departamento de Electroquímica, DCNE, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: fernandoeep_mexico@hotmail.com

RESUMEN

El cáncer es un padecimiento global que afecta a millones de personas, y se encuentra entre las causas más frecuentes de muerte. Los tratamientos actuales inducen una gran cantidad de efectos secundarios indeseables, por lo que se pretende desarrollar una herramienta terapéutica alternativa, basada en nanopartículas luminiscentes de zirconio (NPLs) recubiertas con polímeros sensibles al pH intracelular, lo cual podría ayudar a la detección de tumores y además servir como transportador de principios activos anticancerígenos. En este proyecto se desarrolló la funcionalización de las NPLs con el polímero 4-polivinil-piridina a diferentes concentraciones, después se llevó a cabo su caracterización mediante las técnicas de SEM, DLS, LDE e IR, para conocer las condiciones más favorables para su funcionalización, obteniéndose que con una cantidad de 42 del polímero se obtienen mejores resultados. Posteriormente se incorporó un agente anticancerígeno en la matriz polimérica, y se llevó a cabo su caracterización fisicoquímica. De igual manera, se realizaron estudios que permitieron controlar la liberación del principio activo dextrorubicina (DOX) mediante la variación del pH en las suspensiones, mismo fenómeno que se presenta de manera natural en algunos organelos dentro de las células cancerosas.

ABSTRACT

Cancer is a global disease that affects millions of people, and is among the most frequent causes of death. Current treatments induce a large number of undesirable side effects, so it is intended to develop an alternative therapeutic tool, based on luminescent zirconium nanoparticles (NPLs) coated with polymers sensitive to intracellular pH, which could help the detection of tumors and also serve as a carrier of anticancer active ingredients. In this project the functionalization of the NPLs was developed with the polymer 4-polyvinyl-pyridine at different concentrations, then its characterization was carried out using the techniques of SEM, DLS, LDE and IR, to know the most favorable conditions for its functionalization, obtaining that with a quantity of 42 of the polymer better results are obtained. Subsequently, an anticancer agent was incorporated into the polymer matrix, and its physicochemical characterization was carried out. Similarly, studies were conducted to control the release of the active principle dextrorubicin (DOX) by varying the pH in the suspensions, the same phenomenon that occurs naturally in some organelles within cancer cells.

Palabras clave

Luminiscencia; Polímero; Principio Activo; Ph; Electroquímica.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es un padecimiento que provoca cerca de ocho millones de muertes al año, lo que lo convierte en la principal causa de muerte a nivel mundial. Estudios revelan que las células cancerosas pueden ser discriminadas de las sanas, debido a que las células cancerosas difieren de las normales en su morfología, elasticidad, permeabilidad y propiedades químicas, como el pH. Otros métodos pueden presentar diversos efectos secundarios indeseables que alteran severamente la salud. La nanomedicina ha atraído gran atención y se ha convertido en un candidato ideal para el diagnóstico del cáncer, así como la administración eficiente de fármacos [1]. Debido a las propiedades de las nanopartículas poliméricas, éstas podrían acumularse preferentemente en tejidos enfermos a través del efecto de permeabilidad y retención mejorada [2].

La utilización de nanopartículas inorgánicas con la capacidad de irradiar luz puede brindar la capacidad de detectar células cancerígenas, debido a que pueden convertir la luz de excitación en el IR en emisiones en la región UV-Vis mediante un proceso de absorción múltiple de fotones. Dado que la longitud de onda de excitación de estos materiales (980 nm) se encuentra en la ventana de transparencia de tejidos, su activación y correspondiente emisión pueden llevarse a cabo en zonas más profundas del cuerpo, y no sólo en zonas superficiales [3]. El proceso de liberación controlada del fármaco puede ser activado por diversos estímulos externos o internos, uno de ellos es el pH. Los nanomateriales con sensibilidad al pH han demostrado una variedad de aplicaciones, debido a que dentro del cuerpo humano existen de manera natural diversos gradientes de pH. El pH extracelular en los tumores sólidos tiende a ser significativamente más ácido (≈ 6.5) que el pH de la sangre (7.4). Diversos estudios han demostrado que a valores de pH cercanos al de sangre (7,4), las cadenas de polímeros aniónicos (poli-ácido acrílico, etc.), como catiónicos (poli-4vinilpiridina, etc.) 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 del polímero se protonan, volviéndose hidrófilas, con lo que se activa la liberación de fármacos en la superficie de las nanopartículas.

En este trabajo se llevará a cabo la funcionalización de nanopartículas luminiscentes a fin de crear una estrategia de liberación controlada de fármacos, cuya distribución en el organismo pueda ser observable mediante la irradiación de luz y la liberación del medicamento activada por el ambiente ácido propio de las células cancerosas utilizando un polímero (4-polivinil-piridina) que ha demostrado sensibilidad al pH.

MATERIALES Y MÉTODOS

Funcionalización

Las nanopartículas luminiscentes de zirconio fueron proporcionadas por parte del Centro de Investigaciones en Óptica (CIO). Posteriormente se llevó a cabo la funcionalización en tres etapas (Imagen 1), partiendo por la etapa 1 con la hidroxilación de las NPLs, posteriormente la etapa 2 con una reacción de amino-silanización y por último, la etapa 3 con una reacción de polimerización con el compuesto lineal 4-vinil-piridina.

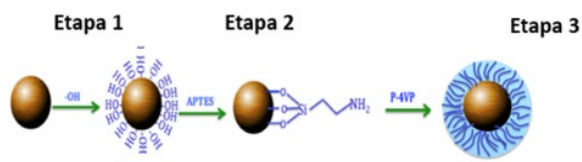


Imagen 1: Representación esquemática de la funcionalización de las NPLs.

Etapa 1 (Hidroxilación): Se realizó con la finalidad de activar la superficie mediante la adición de grupos -OH. Se mezclaron 10 mg de NPLs con 20 ml de una solución de citrato de sodio 50 mM. La mezcla fue sometida a sonicación por 3 minutos para permitir una buena dispersión entre las NPLs y se dejó en agitación durante 24 horas a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de reacción, las NPL-OH (Nanopartículas luminiscentes funcionalizadas con -OH) fueron lavadas dos veces en agua y dos veces en DMF.

Etapa 2 (Amino-silanización): Se colocaron 20 mg de NPL-OH 50 mM en 8 ml de DMF, posteriormente se agregaron 80 μ L de APTES ((3-Aminopropil) triethoxisilano-Sigma Aldrich) y la mezcla se sonó durante 2 minutos para propiciar la dispersión, y se dejó en agitación durante 3 horas. Al finalizar la reacción, las nanopartículas obtenidas (NPL-APTES) se lavaron 3 veces con DMF y 2 veces con Tolueno sin sonicación, debido a que de ser así las NPL-APTES se aglomerarían.

Etapa 3 (Polimerización (NPL-P4VP)): Se mezclaron los 20 mg de NPL-APTES con 10 ml de Tolueno seco, posteriormente se añadieron 42 μ l del polímero P4VP y 9.69 μ l de AIBN (Azobisisobutironitrilo-Sigma Aldrich) como iniciador, en atmósfera de nitrógeno. La mezcla se mantuvo a una temperatura de 70-80 °C por 48 horas. Al finalizar las NPL-P4VP fueron separadas por centrifugación a 4800 rpm y se sometieron sucesivamente a lavados con tolueno, THF (Tetrahidrofurano - Sigma Aldrich), etanol, agua y acetona para eliminar los residuos. Finalmente se dejó secar.

Caracterización

Posteriormente se continuó con el proceso de caracterización. Para ello se realizaron las siguientes técnicas:

- Microscopía electrónica (SEM): Esta técnica permitió observar el tamaño físico de las nanopartículas.
- Dispersión de luz dinámica (DLS): Permite calcular el tamaño hidrodinámico, el cual también indica el índice de polidispersidad (PDI). Los valores de PDI cercanos a 0 indican que la muestra está monodispersa y valores cercanos a 1 indican que presenta gran variedad de tamaños. Las nanopartículas se encontraban en un buffer de fosfatos con una fuerza iónica de 10 mM, utilizando el equipo Zetasizer Malvern.
- Espectroscopia infrarroja acoplada a ATR (FTIR-ATR): Esta técnica permitió verificar el acoplamiento superficial de los grupos funcionales del polímero.
- Electroforesis laser doppler (LDE): Finalmente se realizó esta técnica para demostrar la estabilidad de las nanopartículas funcionalizadas. El recubrimiento de NPs con polímeros disminuye el potencial ζ , ya que las capas de revestimiento protegen la carga superficial. Las nanopartículas se encontraban en un buffer fosfatos con una fuerza iónica de 10 mM a pH=7.4.

Atrapamiento y Liberación de la Dexorubicina

Finalmente se realizaron pruebas de Voltamperometría de onda cuadrada (V.O.C.) para determinar la electroactividad del fármaco Dox al momento de su atrapamiento y liberación por parte de las nanopartículas.

- **Atrapamiento:** Se colocaron 0.001415 g de Dox en 20 ml de una solución de HCl a pH=1. Se realizó la V.O.C. al tiempo 0 y 24 horas después, utilizando como parámetros un voltaje de -800V a 1200 V, un potencial de pulso (ΔE_{sw}) de 35 mV, un potencial de paso (ΔE_s) de 5 mV, y una frecuencia de 80 Hz.
- **Liberación:** Se desmontó el sistema anterior y se lavaron dos veces las nanopartículas con una solución de NaOH a pH=4. Posteriormente las nanopartículas se colocaron en 30 ml de un buffer citratos a pH=4 con una fuerza iónica (F.I.) de 10 mM. Se realizaron pruebas de V.O.C. cada hora durante 7 horas y 24 horas después utilizando los mismos parámetros.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización

Caracterización por microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la imagen 2 se observan las fotografías tomadas por la técnica SEM de las nanopartículas solas y de las funcionalizadas. En ambos casos, las nanopartículas tienen una morfología esférica. Las NPLs solas están aglomeradas debido al solvente en el que se encontraban (etanol), sin embargo, tienen un rango mayor de tamaños en comparación con las anteriores y la mayoría miden entre 51 y 65 nm.

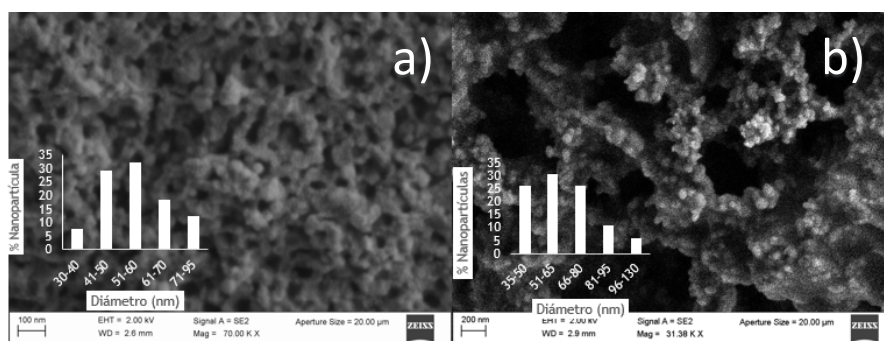


IMAGEN 2. Fotografías SEM de a) NPLs y b) NPL-P4VP.

Caracterización por DLS

La imagen 3 muestra los gráficos de distribución de tamaño hidrodinámico, los valores medios y el índice de polidispersidad (PDI) para ambos casos. El PDI de las NPLs de 0.5 indica que estaban más monodispersas que las NPL-P4VP con un PDI de 1. En cuanto al tamaño hidrodinámico medio, las NPL-P4VP mostraron mayor tamaño como se esperaba.

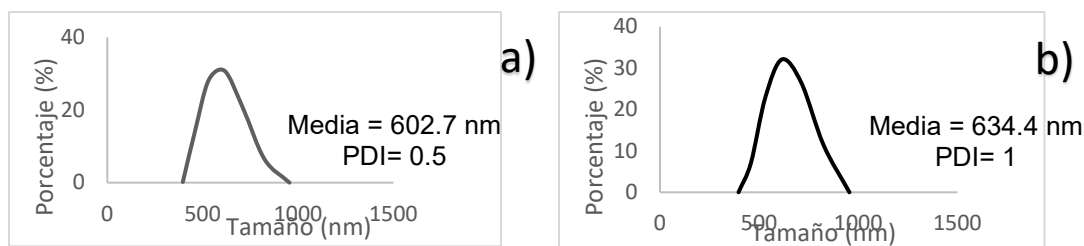


IMAGEN 3. Distribución del tamaño hidrodinámico en solución de buffer fosfatos a pH=7.4 y fuerza iónica de 10 mM: a) NPLs y b) NPL-42P4VP.

Caracterización por TFIR-ATR

Los espectros obtenidos en TFIR-ATR se observan en la imagen 4. En el caso de las NPLs solas no hay absorción debido a que están hechas de zirconio. Para las NPL-P4VP a 1644 cm^{-1} se observa la señal del enlace N-C característica de la piridina. En la señal traslapada y fuerte a 1025 y 1096 cm^{-1} se observa el enlace Si-O de APTES y la señal a 2919 cm^{-1} podría tratarse del enlace C-H de los grupos metileno.

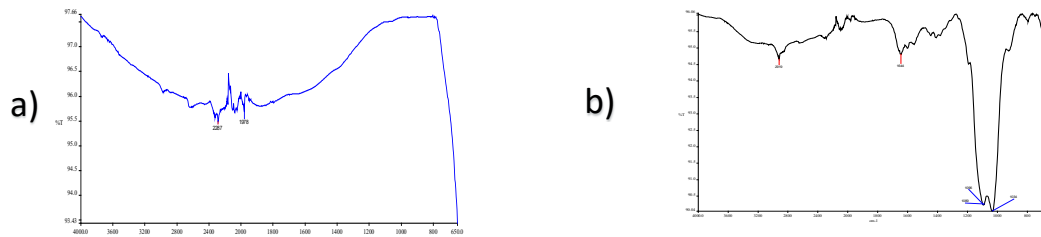


IMAGEN 4. Espectros TFIR-ATR de a) NPLs y b) NPL-P4VP.

Caracterización por LDE

Se puede confirmar con los valores de potenciales ζ , la incorporación de grupos funcionales alrededor de las NPs, ya que el valor de las NPL-P4VP es de -31.8 mV, es menor que el de las NPLs con -23.1 mV, indicando que hay un recubrimiento en las nanopartículas y buena estabilidad fisicoquímica.

Atrapamiento y Liberación de la Dexorubicina

Después de realizar las pruebas de voltamperometría de onda cuadrada (V.O.C), podemos confirmar en la imagen 5 que se llevó a cabo el atrapamiento del dox a pH=1 debido a que disminuyó la concentración de este 24 horas después. De igual manera la liberación a pH=4 fue exitosa a partir de 5 horas después, observándose mayor liberación 24 horas después. Posteriormente se sacó la concentración utilizando el potencial de pico, obteniéndose la curva de calibración.

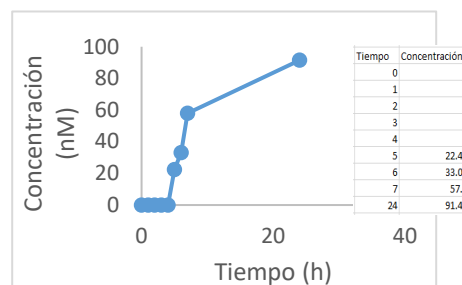
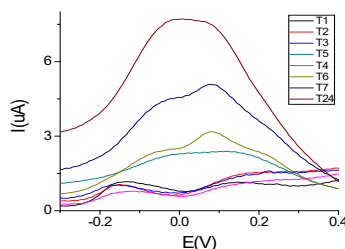
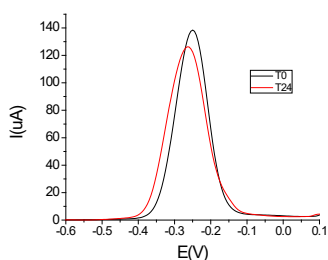


IMAGEN 5. a) Voltamperograma de liberación a $t=0$ y 24 h después a pH=1, b) Voltamperograma de Liberación durante 7 h y 24 h después a pH=4 y c) Curva de calibración.

CONCLUSIONES

Se funcionalizaron y caracterizaron mediante las técnicas de SEM, DLS, FTIR-ATR y LDE NPLs recubiertas con un polímero lineal (P4VP). Los tamaños finales de las nanopartículas fueron de 60-65 nm con una morfología esférica. Mediante FTIR-ATR se comprueba la funcionalización debido a la presencia de las señales características del polímero. Los valores de potencial ζ nos demuestran una buena estabilidad fisicoquímica. De igual manera se logra atrapar y liberar el principio activo en los diferentes pHs. Por los resultados obtenidos estas nanopartículas son adecuadas para su posible aplicación biomédica.

REFERENCIAS

- 1) Y. Li, K. Xiao, W. Zhu, W. Deng, K.S. Lam, Adv. Drug Deliv. Rev. 66 (2014) 58–73
- 2) Guimei Lin, Hong Zhang, and Leaf Huang. (December 22, 2014). Smart Polymeric Nanoparticles for Cancer Gene Delivery. Mol. Pharmaceutics, 12, 314–321. 2018, De American Chemical Society Base de datos.
- 3) Wang, C., L. Cheng, and Z. Liu, Upconversion nanoparticles for photodynamic therapy and other cancer therapeutics. Theranostics, 2013. 3(5): p. 317-30.